

## Efeitos Bradicárdicos e Antiarrítmicos do D-Limoneno em Ratos

*Bradycardic and Antiarrhythmic Effects of the D-Limonene in Rats*

Gildenisson Araújo do Nascimento,<sup>1</sup> Diego Santos de Souza,<sup>1</sup> Bruno Santos Lima,<sup>1</sup> Carla Maria Lins de Vasconcelos,<sup>1</sup> Adriano Antunes de Souza Araújo,<sup>1</sup> Aimée Obolari Durço,<sup>1</sup> Lucindo José Quintans-Junior,<sup>1</sup> Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida,<sup>2</sup> Aldeída Pereira Oliveira,<sup>3</sup> Valter Joviniano de Santana-Filho,<sup>1</sup> André Sales Barreto,<sup>1</sup> Márcio Roberto Viana dos Santos<sup>1</sup>

Universidade Federal de Sergipe,<sup>1</sup> São Cristóvão, SE – Brasil

Universidade Federal do Vale do São Francisco,<sup>2</sup> Petrolina, PE – Brasil

Universidade Federal do Piauí,<sup>3</sup> Teresina, PI – Brasil

### Resumo

**Fundamento:** O D-limoneno (DL) é um monoterpeno e o principal componente do óleo essencial de frutas cítricas. Ele apresenta atividades anti-hiperglicêmicas e vasodilatadoras.

**Objetivos:** Este estudo avaliou os efeitos cardiovasculares e antiarrítmicos potenciais do DL em ratos.

**Métodos:** Os parâmetros hemodinâmicos e eletrocardiográficos (ECG) foram mensurados em ratos Wistar machos que, sob anestesia, tiveram a aorta abdominal e a veia cava inferior canuladas e receberam eletrodos implantados subcutaneamente. Na abordagem *in vitro*, o coração foi removido e perfundido utilizando a técnica de Langendorff. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Resultados:** DL, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg (i.v.), produziu bradicardia intensa e persistente associada à hipotensão. A bradicardia com QTc prolongado foi observada no registro *in vivo* do ECG. No modelo *in vivo* de arritmia induzida por Bay K8644, DL (10 mg / kg) houve diminuição do escore da arritmia de  $15,33 \pm 3,52$  para  $4,0 \pm 2,64$  u.a ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Em corações perfundidos isolados, o DL ( $10^{-3}$  M) promoveu reduções significativas na frequência cardíaca (de  $228,6 \pm 8,5$  ms para  $196,0 \pm 9,3$  bpm;  $p < 0,05$ ) e na pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo (de  $25,2 \pm 3,4$  para  $5,9 \pm 1,8$  mmHg;  $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ).

**Conclusões:** O DL produz bradicardia e atividade antiarrítmica no coração de ratos. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):925-932)

**Palavras-chave:** Ratos; Limoneno; Monoterpenos; Arritmias Cardíacas; Antiarrítmicos; Bradicardia; Antioxidantes.

### Abstract

**Background:** D-limonene (DL) is a monoterpene and is the major component in the essential oil of citrus fruit. It presents antihyperglycemic and vasodilatation activities.

**Objectives:** This study evaluated the cardiovascular effects and potential antiarrhythmic of DL in rats.

**Methods:** Hemodynamic and electrocardiographic (ECG) parameters were measured in male Wistar rats, which under anesthesia had been cannulated in the abdominal aorta and lower vena cava and had electrodes subcutaneously implanted. In the *in vitro* approach, the heart was removed and perfused using the Langendorff technique. The significance level adopted was 5% ( $p < 0.05$ ).

**Results:** DL, in doses of 10, 20, and 40 mg/kg (i.v.), produced intense and persistent bradycardia associated with hypotension. Bradycardia with prolonged QTc was observed in the ECG *in vivo* recording. In the *in vivo* model of arrhythmia induced by Bay K8644, DL (10 mg/kg) decreased the arrhythmia score from  $15.33 \pm 3.52$  to  $4.0 \pm 2.64$  u.a ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ). In isolated perfused hearts, DL ( $10^{-3}$  M) promoted significant reductions in heart rate (from  $228.6 \pm 8.5$  ms to  $196.0 \pm 9.3$  bpm;  $p < 0.05$ ) and left ventricular development pressure (from  $25.2 \pm 3.4$  to  $5.9 \pm 1.8$  mmHg;  $n = 5$ ,  $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** DL produces bradycardia and antiarrhythmic activity in rat heart. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(5):925-932)

**Keywords:** Rats; Limonene; Monoterpenes; Arrhythmias, Cardiac; Anti-Arrhythmia Agents; Bradycardia; Antioxidants.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Carla Maria Lins de Vasconcelos •

Universidade Federal de Sergipe - Fisiologia - Av. Marechal Rondon, s/n. CEP: 49000-100, Rosa Elze, São Cristóvão, SE – Brasil

E-mail: carlamlv@hotmail.com

Artigo recebido em 28/09/2018, revisado em 21/12/2018, aceito em 13/02/2019.

DOI: 10.5935/abc.20190173

## Introdução

Apesar das pesquisas extensas realizada sobre arritmias cardíacas nas últimas décadas, apenas um pequeno número de drogas antiarrítmicas surgiu para serem adicionadas ao atual arsenal terapêutico para essa condição. Além disso, os antiarrítmicos “clássicos” apresentam sérias limitações de eficácia e segurança e apresentam vários efeitos colaterais.<sup>1,2</sup>

Na busca de alternativas terapêuticas para arritmias, estudos recentes examinaram compostos químicos de ocorrência natural, com o objetivo de avaliar seus efeitos nos parâmetros cardíacos. Por exemplo, estudos com os monoterpenos pulegona e geraniol mostraram um inotropismo negativo no miocárdio de mamíferos através do bloqueio das correntes de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$ .<sup>3-5</sup> Mais recentemente, Vasconcelos et al.,<sup>6</sup> verificaram que o citrionelol e o nerol apresentam inotropismo negativo no átrio esquerdo de cobaias.

O D-limoneno (DL) (Figura 1), é um monoterpeneo alcoólico e o principal componente do óleo essencial extraído de espécies cítricas, como limão, lima e laranja.<sup>7</sup> Estudos anteriores demonstraram que o DL possui baixa toxicidade e apresenta propriedades antioxidantes,<sup>8,9</sup> vasodilatadoras,<sup>10,11</sup> e anti-hipertensivas.<sup>12</sup>

O efeito do DL no coração ainda não foi elucidado e as investigações sobre seu mecanismo de ação podem fornecer novos insights sobre o DL e o sistema cardiovascular. O presente estudo, portanto, objetivou avaliar o potencial efeito antiarrítmico do DL utilizando abordagens *in vivo* e *ex vivo*.

## Métodos

### Produtos químicos

Os produtos químicos utilizados foram: d-limoneno (DL: pureza: 97%) e S(-)-Bay K8644, ambos adquiridos de Sigma Aldrich (Chemical CO, EUA), e cetamina e xilazina (adquiridos de Sespo, São Paulo, Brasil). A solução estoque de DL foi preparada utilizando uma mistura de solução salina/Cremophor® (0,15% v/v); o S(-)-Bay K8644 foi diluído em metanol e a solução de DL em água destilada.

As soluções estoque foram preservadas a 0 °C e diluídas com água destilada, se necessário. Os veículos (metanol ou solução salina + Cremophor®) não demonstraram nenhum efeito nas preparações de controle.

### Animais

Trinta e seis ratos sadios (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 e 350 g, foram obtidos de colônias do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, Brasil. Eles foram mantidos sob condições de temperatura padrão ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06h00) e foram alimentados com uma dieta padrão (Labina®) com água *ad libitum*.

Em cada conjunto de experimentos, os ratos foram divididos em dois grupos: controle com 4 ou 6 animais e grupo tratado com DL, com 4 ou 6 animais. Todos os protocolos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética e Cuidados Animais da Universidade Federal de Sergipe.

### Efeitos do DL nos parâmetros hemodinâmicos *in vivo*

Os ratos foram anestesiados com cetamina e xilazina (80 mg/kg e 10 mg/kg; por via intraperitoneal, respectivamente) e cateteres de polietileno foram implantados na aorta abdominal e na veia cava inferior através da artéria e da veia femoral esquerda, respectivamente. Após a inserção e fixação por fios de algodão, os cateteres foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão na região cervical posterior do animal.

As incisões foram fechadas e foi permitido aos animais um período de recuperação pós-operatório de 24 horas. A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas por meio de um transdutor de pressão (Edwards LifeSciences, Irvine, CA, EUA) acoplado a um amplificador (FE221, Bridge Amp; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália).

Após o período de recuperação pós-operatório, PAM e FC foram registrados antes (valores basais) e após a administração *in bolus* de DL (1, 5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) ou veículo para obter curvas dose-resposta. A curva do DL (n = 6) foi comparada com a curva do veículo (n = 6).

### Medidas eletrocardiográficas *in vivo*

Os animais de ambos os grupos, controle (n = 4) e tratados com DL (n = 4), foram heparinizados (200 I.U., i.p.), anestesiados com uma injeção i.p. de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e a veia cava foi canulada como descrito anteriormente. Os ratos foram mantidos em decúbito dorsal com respiração espontânea e veículo ou DL foi administrado (10 mg/kg). O volume injetado através da cânula foi o mesmo para todas as concentrações (200  $\mu\text{L}$ ). Para registrar o sinal eletrocardiográfico, os eletrodos foram colocados sob a pele na disposição do eletrodo DII. Os parâmetros eletrocardiográficos observados foram o intervalo PR, intervalo QT, duração do complexo QRS e FC. O intervalo QT foi corrigido pela fórmula de Bazett modificada para ratos.<sup>13</sup>

### Experimentos no coração isolado perfundido (técnica de Langendorff)

Os animais, de ambos os grupos, controle (n = 4) e tratados com DL (n = 4), foram heparinizados (200 UI, i.p.) e após 15 min o coração foi retirado e montado em um sistema de perfusão aórtica do tipo Langendorff, em um fluxo constante (10 mL/min).<sup>14</sup> Os corações foram continuamente perfundidos com solução de Krebs-Henseleit (em mM: 120 NaCl, 5,4 KCl, 1,2  $MgCl_2$ , 1,25  $CaCl_2$ , 2  $NaH_2PO_4$ , 27  $NaHCO_3$ , 11 glicose), previamente filtrados através de uma membrana de acetato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ ). O pH foi ajustado para 7,4 e oxigenado (95%  $O_2$  + 5%  $CO_2$ ) e mantido a  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$  (Haake F3, Berlim, Alemanha). Os sinais cardíacos do eletrocardiograma (ECG) foram capturados utilizando-se três eletrodos (Ag/AgCl/NaCl, 1 M) que foram colocados dentro da câmara próxima ao coração. Os sinais foram amplificados, digitalizados (PowerLab 4/35 ADInstruments, EUA) e armazenados em um computador. A pressão desenvolvida do ventricular esquerdo (PDVE, mmHg) e a FC (bpm) foram medidas utilizando-se um balão cheio

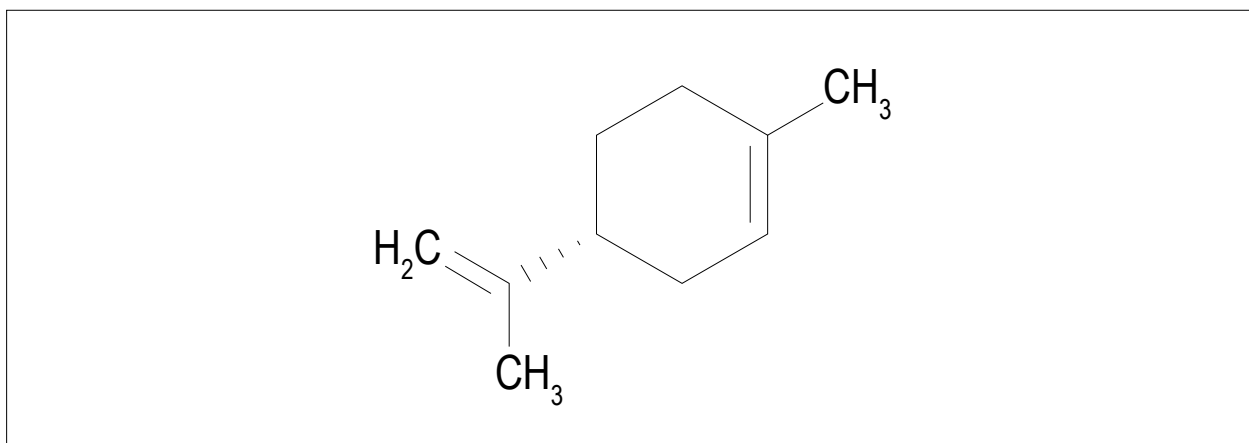


Figura 1 – Estruturas químicas do d-limoneno (DL) (FW: 136,24).

de água introduzido na cavidade do ventrículo esquerdo. Este dispositivo foi acoplado a um transdutor de pressão (FE221, Bridge Amp, ADInstruments, EUA) e um amplificador (PowerLab 4/35, ADInstruments). O sistema foi calibrado utilizando uma coluna de mercúrio. O tempo de pico (ms), que é definido como o tempo necessário para atingir o pico de contração ventricular máxima, e tempo de relaxamento, também foram analisados.

#### Avaliação do efeito antiarrítmico do DL

O efeito antiarrítmico de DL foi determinado no modelo animal *in vivo* utilizando (S)-(-)-Bay K8644, um agonista do canal de cálcio do tipo L (LTCC). A arritmia foi induzida pela administração de (S)-(-)-Bay K8644, (1 mg/kg, i.v.) na veia femoral de ambos os grupos, controle (n = 4) e tratamento com DL (n = 4).

DL (10 mg/kg) foi administrado 10 minutos antes do (S)-(-)-Bay K8644<sup>15</sup>. Arritmias cardíacas foram observadas por 20 minutos através da análise do registro do ECG. Para uma melhor análise, o tempo total foi dividido em 10 intervalos de 3 min para classificação da arritmia.

As arritmias foram determinadas por meio de um sistema de escore modificado previamente validado por Curtis e Walker.<sup>16</sup> As arritmias observadas foram batimentos prematuros ventriculares (BPV), taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV). BPVs < 10/período de 3 min foram registrados como 0; BPVs > 10/3 min foram registrados como 1; Episódios de TV de 1 a 5/ período de 3 min foram registrados como 2; > 5 episódios de TV/3 min e /ou qualquer número de episódios de FV e/ou 1 episódio de FV com um período de duração <40 s foi registrado como 3; 2-5 episódios de FV/3 min ou TV e FV com um total combinado com duração < período de 80 s foi registrado como 4; 5 episódios de FV ou TV e FV combinados /3 min com uma duração < 160 s foram registrados como 5; TV ou FV ou ambos/3 min com duração total combinada <300 s foram registrados como 6, e TV ou FV ou ambos/3 min com duração total combinada >300 s foram registrados como 7.

#### Análise estatística

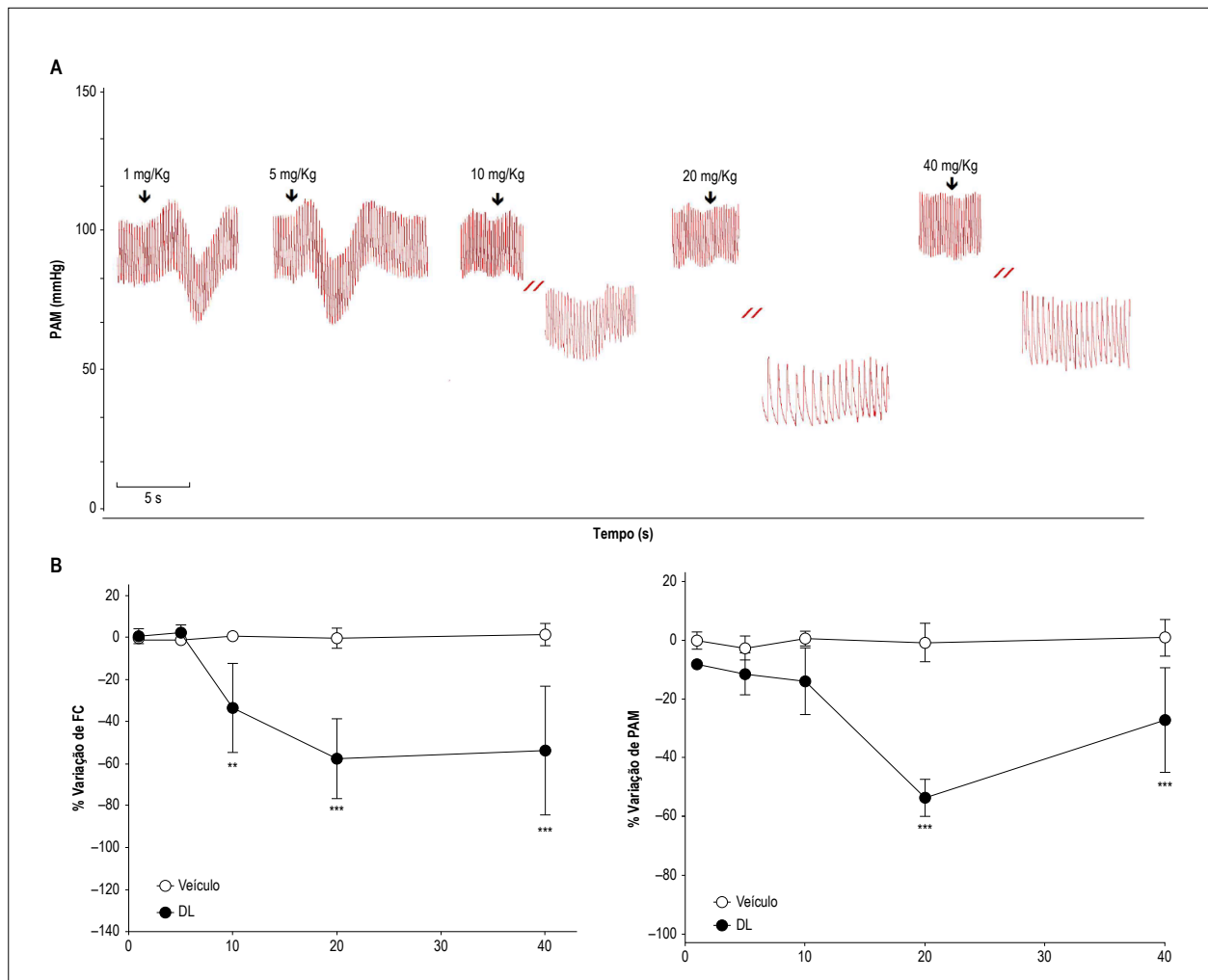
A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados foram representados como média  $\pm$  DP. Quando apropriado, utilizou-se o teste *t* de Student não-pareado ou a análise de variância (ANOVA unidirecional, bidirecional) e o teste *post hoc* de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism<sup>TM</sup> 5.0.

#### Resultados

Em todos os ratos testados, os valores basais de FC e PAM foram de  $371 \pm 45$  bpm e  $114 \pm 11$  mmHg, respectivamente. A Figura 2A mostra os traçados originais do efeito do DL (1, 5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) no sinal pulsátil da pressão arterial de um rato consciente. Nestes animais, o DL, nas doses de 1 e 5 mg/kg, produziu hipotensão transitória e não significativa sem alterar a FC (Figura 2B - gráfico à esquerda). Por outro lado, o DL, nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, produziu bradicardia intensa e persistente ( $-33,0 \pm 21$ ;  $-57,0 \pm 19$  e  $-53,0 \pm 30\%$ ; n = 6;  $p < 0,05$ , respectivamente) (Figura 2B - gráfico à direita) que persistiu por  $19 \pm 12$  min após a administração. Esta bradicardia foi associada à hipotensão apenas nas doses de 20 e 40 mg/kg ( $-53,0 \pm 6$  e  $-28,0 \pm 18\%$ ; n = 6,  $p < 0,05$ , respectivamente).

A figura 3A mostra os traçados representativos do ECG para o veículo (parte superior) e 10 min depois da administração i.v. de 10 mg/kg de DL (parte inferior). Como pode ser visto, o DL diminuiu significativamente a FC ( $p < 0,05$ ) e aumentou o QTc (Figuras 3B e E). Entretanto, o DL não alterou a duração do iPR e do complexo QRS (Figuras 3C e D).

No experimento com a técnica de Langendorff, o DL (10-3 M) causou uma redução significativa na PDVE comparado ao controle (Figura 4A). Os dados médios mostraram que a PDVE diminuiu de  $25,2 \pm 11,4$  mmHg para  $5,9 \pm 6,1$  mmHg (n = 5,  $p < 0,05$ , Fig. 4B). O DL também promoveu redução da FC de  $228,6 \pm 19,1$  para



**Figura 2** – Efeito do DL (1, 5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) em ratos conscientes. A) Traçados originais mostrando o efeito do DL (1, 5, 10, 20 e 40 mg/Kg, i.v., aleatoriamente) na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) de um rato saudável e consciente. As setas indicam o momento da administração. B) Gráfico de linhas do efeito DL na FC e PAM. Os valores são expressos em média  $\pm$  DP de seis experimentos. Os dados foram analisados através de ANOVA bidirecional com medidas repetidas, seguido por pós-teste de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  vs. veículo.

196,0  $\pm$  20,8 bpm (n = 4,  $p < 0,05$ , Figura 4C). Em relação ao curso temporal das fases de contração e relaxamento, nossos resultados mostraram que o DL não alterou o tempo até o pico da contração do ventrículo esquerdo (Figura 4D), mas aumentou o tempo de relaxamento de 129,0  $\pm$  3,0 para 193,5  $\pm$  37,8 ms (n = 4,  $p < 0,05$ , Figura 4E).

No modelo *in vivo* de arritmias induzidas por Bay K8644, o DL reduziu significativamente a incidência de arritmias ventriculares, tais como BPV, TV e FV, e o índice de arritmia total de 15,3  $\pm$  6,1 a.u para 4,0  $\pm$  4,5 a.u (n = 4,  $p < 0,05$ ) (Figura 5B). Além disso, o DL foi capaz de evitar a taquicardia sinusal evocada por Bay K8644 (300,0  $\pm$  46,1 para 93,0  $\pm$  17,4 bpm, n = 4,  $p < 0,05$ ).

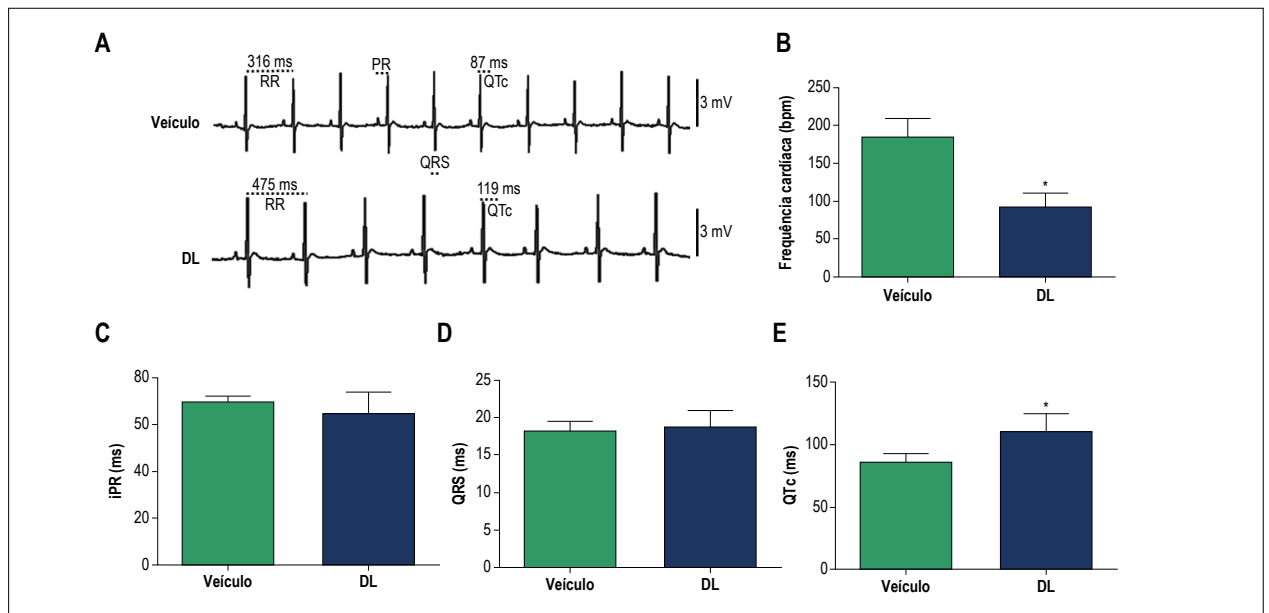
## Discussão

Em ratos conscientes, a administração intravenosa de DL em doses mais baixas (1 e 5 mg/kg) foi capaz de produzir

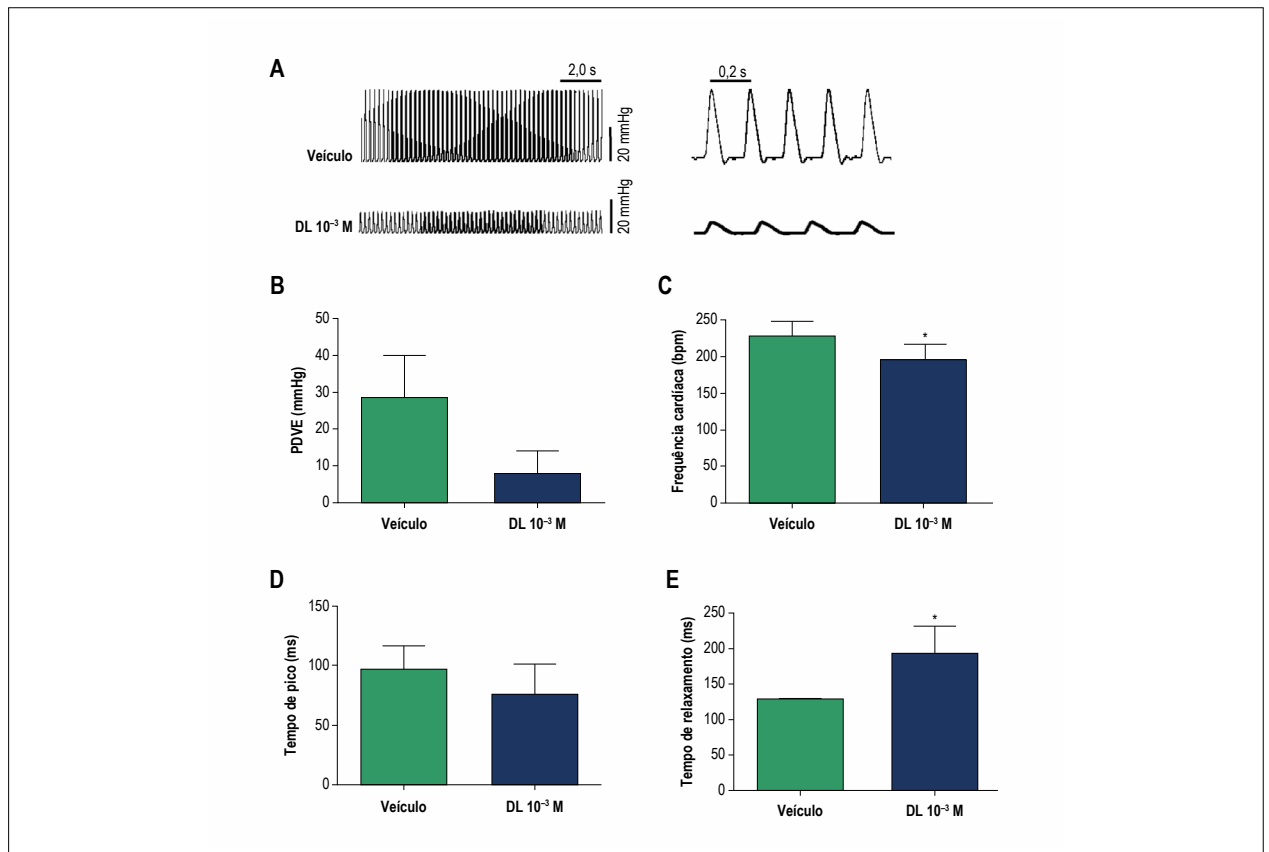
uma hipotensão não significativa, sem alterar a FC. Por outro lado, o DL em doses mais elevadas (10, 20 e 40 mg/kg) produziu bradicardia intensa e persistente, que persistiu por quase 20 min. Efeitos semelhantes foram encontrados para outros monoterpenos, tais como 1,8-cineol<sup>17</sup> terpinen-4-ol,<sup>18</sup> e  $\gamma$ (-)- $\alpha$ -bisabolol.<sup>19</sup>

Para entender melhor o efeito bradicárdico induzido pelo DL, investigamos quaisquer alterações no perfil eletrocardiográfico na dose de 10 mg/kg. Essa dose foi escolhida porque foi a dose mais baixa capaz de produzir bradicardia sem produzir qualquer efeito significativo na PAM (ver Figura 2B). A administração de 10 mg/kg de DL (parte inferior) diminuiu significativamente a FC e aumentou o QTc. Entretanto, o DL não alterou a duração do iPR e do complexo QRS.

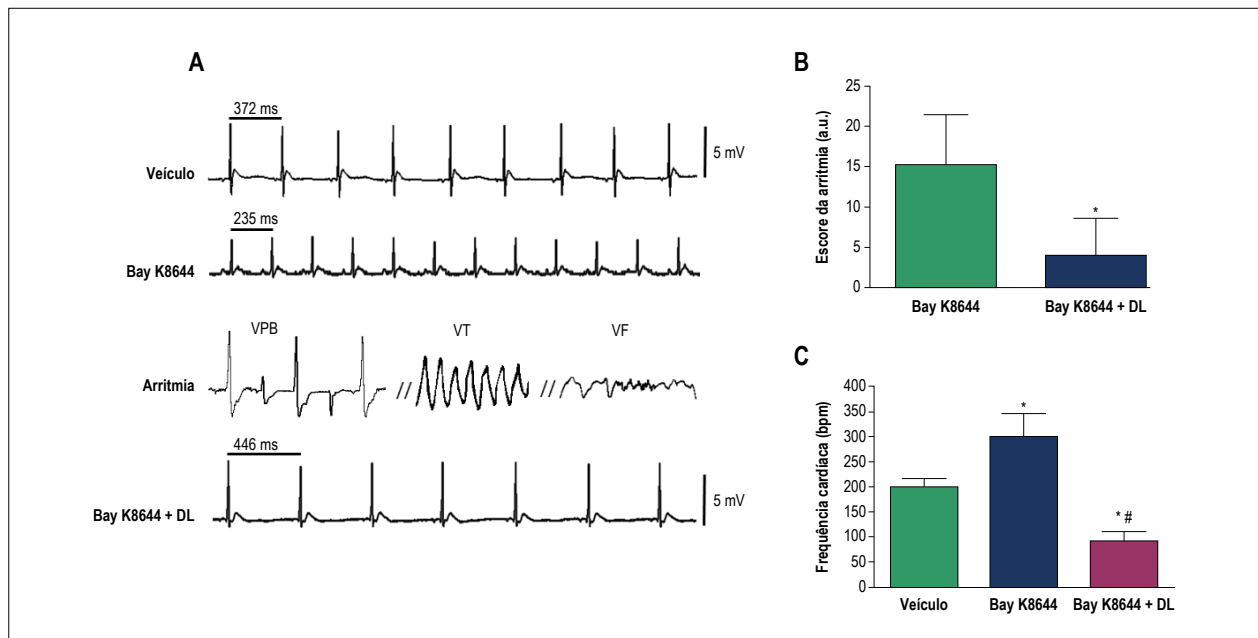
Corroborando os dados observados nos experimentos hemodinâmicos, observamos no ECG que o DL também promoveu bradicardia ao aumentar o QTc. Como mostrado na literatura, os bloqueadores dos canais de cálcio podem



**Figura 3** – Efeitos *in vivo* do DL (10 mg/kg) nos parâmetros eletrocardiográficos (ECG) antes (veículo) e após a perfusão do DL. Traçados originais (A) e gráfico de barras do efeito do DL na frequência cardíaca (B), intervalo PR (iPR) (C), duração do QRS (D) e intervalo QT corrigido (QTc) (E). Os dados são apresentados como média ± DP e foram analisados pelo teste t de Student não pareado. \* $p < 0,05$  vs. veículo,  $n = 4$ .



**Figura 4** – Efeitos *ex vivo* da perfusão com DL ( $10^{-3}$  M) nos parâmetros cardíacos. A) traços representativos da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) registrados na situação de controle (painel superior) e após a perfusão de  $10^{-3}$  M de DL (painel inferior); Gráfico de barras do efeito do DL na PDVE (B), frequência cardíaca; C), tempo de pico; D) e tempo de relaxamento E). Os dados são expressos em média ± DP e foram analisados pelo teste t de Student não pareado. \* $p < 0,05$  vs. veículo,  $n = 4$ .



**Figura 5** – Efeitos *in vivo* do DL (10 mg/kg) em arritmias induzidas por S(-)-Bay K 8644 em ratos anestesiados. Traçados originais A) e gráfico de barras do escore de arritmia B) e da frequência cardíaca C) antes e após o tratamento com DL. Os dados são expressos em média  $\pm$  DP e foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado B) (\* $p < 0,05$  vs. controle,  $n = 4$ ) e ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni C) (\* $p < 0,05$  vs. controle, # $p < 0,05$  vs. Bay K8644,  $n = 4$ ). BPV: batimentos prematuros ventriculares, TV: taquicardia ventricular; FV: fibrilação ventricular.

reduzir a velocidade de condução cardíaca e causar bradicardia.<sup>20,21</sup> Esses efeitos podem ou não estar associados ao prolongamento do QTc.<sup>22</sup>

O efeito direto do DL no músculo cardíaco foi avaliado em um coração isolado, montado em um sistema de Langendorff. Neste experimento, o DL ou veículo foi perfundido através da aorta para registrar a PDVE. O volume de sangue em um rato é de aproximadamente 7 mL para cada 100 g de peso corporal,<sup>23</sup> portanto, a concentração de DL após a administração de 10 mg/kg nos experimentos *in vivo* é aproximadamente a mesma que a perfusão com  $10^{-3}$  M de DL nas experiências *ex vivo*. Como demonstrado, a perfusão com DL causou uma redução significativa na PDVE. Curiosamente, esses resultados são muito semelhantes aos observados *in vivo*, onde o DL também promoveu redução da FC. Em relação ao curso temporal das fases de contração e relaxamento, nossos resultados mostraram que o DL não alterou o tempo até o pico de contração do ventrículo esquerdo (Figura 4D), mas aumentou o tempo de relaxamento. Como se sabe, a recaptura de cálcio pela Ca-ATPase do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) é um passo fundamental para o relaxamento miocárdico em ratos.<sup>24</sup> Nossos dados mostram que o DL retardou o relaxamento do músculo cardíaco, o que pode estar associado a menor recaptura do cálcio pela SERCA, mas esta suposição ainda precisa ser elucidada.

Nossos resultados *ex vivo* mostraram que o DL diminuiu a atividade de marcapasso e promoveu inotropismo negativo. Sabe-se que as drogas que bloqueiam o LTCC no músculo cardíaco diminuem a atividade de marcapasso

e resultam em bradicardia. Além disso, os antagonistas do cálcio diminuem a geração da força miocárdica (inotropia negativa). Estes resultados mostram que o DL apresenta uma ação similar a um bloqueador de LTCC. No músculo liso, De Sousa et al.,<sup>25</sup> mostraram que os efeitos relaxantes do DL em traqueias de porquinhos-da-índia e aortas de ratos foram independentes do endotélio e provavelmente causados por ação direta na dinâmica do cálcio.

Os bloqueadores de LTCC são classificados como drogas antiarrítmicas de classe IV. As propriedades antiarrítmicas dos bloqueadores de LTCC estão relacionadas à sua capacidade de diminuir a taxa de disparo aberrantes em sítios de marcapasso dentro do coração e à sua capacidade de diminuir a velocidade de condução no nó atrioventricular (AV) que pode ajudar a bloquear os mecanismos de reentrada, o que pode causar taquicardia supraventricular. De fato, decidimos investigar o possível efeito antiarrítmico do DL utilizando um modelo *in vivo* com arritmia induzida por Bay K8644, um agonista de LTCC. Em todos os animais testados, o Bay K8644 aumentou a FC e induziu arritmias como batimentos prematuros ventriculares (BPV), taquicardia ventricular (TV) e fibrilação ventricular (FV).

Como demonstrado, o DL reduziu significativamente a incidência de arritmias ventriculares e foi capaz de evitar a taquicardia sinusal causada por Bay K8644. De maneira similar aos nossos resultados, outro estudo mostrou que o verapamil, um antagonista do LTCC, foi capaz de evitar o aumento dos escores de arritmia total induzidos por Bay K8644.<sup>15</sup> Estes resultados fornecem evidências farmacológicas de que o DL atenua significativamente as arritmias cardíacas

causadas por Bay K8644, provavelmente através da inibição do LTCC; entretanto, outros estudos devem ser realizados para esclarecer esta suposição.

## Conclusão

Os resultados mostram que o DL possui propriedades antiarrítmicas *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o DL induziu bradicardia associada à hipotensão em ratos saudáveis (*in vivo*), corroborando os resultados em um coração isolado (*in vitro*), em que o DL promoveu bradicardia e redução da pressão ventricular esquerda. Consideramos, portanto, que este monoterpene é uma substância promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, como as arritmias cardíacas.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Vasconcelos CML, Souza DS, Lima BS, Araujo AAS, Quintans-Junior LJ, Almeida JRGS, Oliveira AP, Santana-Filho VJ, Barreto AS, Santos MRV; Obtenção de dados: Vasconcelos CML, Nascimento G, Souza DS, Lima BS, Durço A; Análise e interpretação dos dados: Vasconcelos CML, Nascimento G, Souza DS, Lima BS, Araujo AAS, Durço A, Oliveira AP, Santana-Filho VJ, Barreto AS, Santos MRV; Análise estatística: Vasconcelos CML, Nascimento G, Souza DS, Araujo AAS, Santos MRV;

Obtenção de financiamento: Vasconcelos CML, Araujo AAS, Quintans-Junior LJ, Almeida JRGS, Santana-Filho VJ, Santos MRV; Redação do manuscrito: Vasconcelos CML, Nascimento G, Souza DS, Durço A, Quintans-Junior LJ, Barreto A, Santos MRV; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Vasconcelos CML, Araujo AAS, Quintans-Junior LJ, Almeida JRGS, Oliveira AP, Santana-Filho VJ, Barreto AS, Santos MRV.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo CNPq, CAPES e FAPITEC/SE.

## Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Sergipe sob o número de protocolo 13/2016.

## Referências

1. Magoon R, Choudhury A, Malik V, Sharma R, Kapoor PM. Pharmacological update: New drugs in cardiac practice: A critical appraisal. *Ann Card Anaesth*. 2017;20(Sup):S49-S56.
2. Dan GA, Martinez-Rubio A, Agewall S, Boriani G, Borggreffe M, Gaita F, et al. Antiarrhythmic drugs-clinical use and clinical decision making: a consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Cardiovascular Pharmacology, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) and International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP). *Europace*. 2018;20(5):731-2.
3. De Cerqueira SVS, Gondim ANS, Roman-Campos D, Cruz JS, Passos AGD, Lauton-Santos S, et al. R(+)-pulegone impairs Ca<sup>2+</sup> homeostasis and causes negative inotropism in mammalian myocardium. *Eur J Pharmacol*. 2011;672(1-3):135-42.
4. Santos-Miranda A, Gondim AN, Menezes-Filho JE, Vasconcelos CM, Cruz JS, Roman-Campos D. Pharmacological evaluation of R(+)-pulegone on cardiac excitability: role of potassium current blockage and control of action potential waveform. *Phytomedicine*. 2014;21(10):1146-53.
5. Menezes-Filho JE, Gondim AN, Cruz JS, de Souza AA, Santos JN, Conde-Garcia EA, et al. Geraniol blocks calcium and potassium channels in the mammalian myocardium: useful effects to treat arrhythmias. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;115(6):534-44.
6. Vasconcelos CML, Oliveira ISN, Santos JNA, Souza AA, Menezes-Filho JER, Silva Neto JA, et al. Negative inotropism of terpenes on guinea pig left atrium: structure-activity relationships. *Nat Prod Res*. 2018;32(12):1428-31.
7. Dos Passos Menezes P, Dos Santos PB, Dória GA, de Sousa BM, Serafini MR, Nunes PS, et al. Molecular Modeling and Physicochemical Properties of Supramolecular Complexes of Limonene with  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cyclodextrins. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(1):49-57.
8. Sun J. D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev*. 2007;12(3):259-64.
9. Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(1) 38-44.
10. Andrade TU, Brasil GA, Endringer DC, da Nóbrega FR, De Sousa DP. Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. *Molecules*. 2017;22(9):1539.
11. De Sousa DP, Mesquita RF, de Araújo Ribeiro LA, de Lima JT. Spasmolytic Activity of Carvone and Limonene Enantiomers. *Nat Prod Commun*. 2015;10(11):1893-6.
12. Santiago JVA, Jayachitra J, Shenbagam M, Nalini N. d-limonene attenuates blood pressure and improves the lipid and antioxidant status in high fat diet and L-NAME treated rats. *J Pharm Sci Res*. 2010;2(11):752-8.
13. Gondim ANS, Lara A, Santos-Miranda A, Roman-Campos D, Lauton-Santos S, Menezes-Filho JER, et al. (-)-Terpinen-4-ol changes intracellular Ca<sup>2+</sup> handling and induces pacing disturbance in rat hearts. *Eur J Pharmacol*. 2017 Jul 15;807:56-63.
14. Santos MS, Oliveira ED, Santos-Miranda A, Cruz JS, Gondim ANS, Menezes-Filho JER, et al. Dissection of the effects of quercetin on mouse myocardium. *Basic & Clinical Pharmacol Toxicol*. 2017;120(6):550-9.
15. Zhou P, Zhang SM, Wang QL, Wu Q, Chen M, Pei JM. Anti-Arrhythmic Effect of Verapamil Is Accompanied by Preservation of Cx43 Protein in Rat Heart. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71567.
16. Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an *in vivo* model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1988;22(9):656-65.

17. Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhães PJ, Leal-Cardoso JH. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80:(12):1125–31.
18. Lahlou S, Interaminense LF, Leal-Cardoso JH, Duarte GP. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(3):323–30.
19. Menezes IA, Barreto CM, Antonioli AR, Santos MR, de Sousa DP. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *Z Naturforsch C.* 2010;65(9-10):562-6.
20. Nademane K, Singh BN. Control of cardiac arrhythmias by calcium antagonism. *Ann NY Acad Sci.* 1988;522:536–52.
21. Wann LS, Curtis AB, Ellenbogen KA, Estes NA, Ezekowitz MD, Jackman VM, et al., American College of Cardiology F, American Heart A, European Society of C, Heart Rhythm Management of patients with atrial fibrillation (compilation of 2006 ACCF/AHA/ESC and 2011 ACCF/AHA/HRS recommendations): a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2013;127(18):1916–26.
22. Prystowsky EN. Effects of bepridil on cardiac electrophysiologic properties. *Am J Cardiol.* 1992;69(11):63D-67D.
23. McGuill MW, Rowan AN. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILARJ.* 1989;31(4):5–18.
24. Bers DM. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 2002;415(6868):198–205.
25. De Sousa DP, Junior GA, Andrade LN, Calasans FR, Nunes XP, Barbosa-Filho JM. Structure and spasmolytic activity relationships of monoterpene analogues found in many aromatic plants. *Z Naturforsch C.* 2008; 63(11-12):808-12.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons