



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ATIVIDADES DE UM EXTRATO HIDROALCOÓLICO
PADRONIZADO DE *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE
NATIVA DE MANACAPURU/AM – MECANISMO DO
EFEITO HIPOTENSOR EM ROEDORES**

KARLA BARROSO FEITOSA

**MANAUS
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

KARLA BARROSO FEITOSA

ATIVIDADES DE UM EXTRATO HIDROALCOÓLICO
PADRONIZADO DE *Ampelozizyphus amazonicus* DUCKE
NATIVA DE MANACAPURU/AM – MECANISMO DO
EFEITO HIPOTENSOR EM ROEDORES

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal do Amazonas, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia, área de concentração
Biotecnologias para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa
Co-Orientação: Prof.^a Dra Mirtes Midori Tanae

MANAUS
2010

Ficha Catalográfica
Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Feitosa, Karla Barroso

F311a Atividades de um extrato hidroalcoólico padronizado de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke nativa de Manacapuru/AM – mecanismo do efeito hipotensor em roedores / Karla Barroso Feitosa. - Manaus: UFAM, 2010.
152 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-Orientador: Prof.^a Dra Mirtes Midori Tanae

1. *Ampelozizyphus amazonicus* 2. Plantas medicinais 3. Extratos vegetais I. Lapa, Antonio José II. Tanae, Mirtes Midori III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

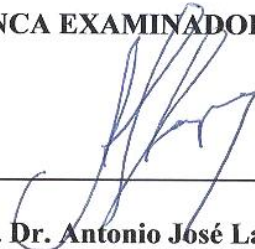
CDU 633.88(811.3)(043.3)

KARLA BARROSO FEITOSA

**Atividade cardiovascular em roedores de um extrato
hidroalcoólico padronizado de *Ampelozizyphus amazonicus*
Ducke nativa de Manacapuru/AM – Mecanismo do efeito
hipotensor em roedores**

Novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

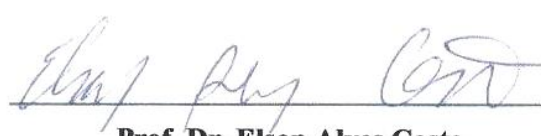


Prof. Dr. Antonio José Lapa
Orientador

Universidade do Federal do Amazonas – UFAM
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP



Profa. Dra. Cinthya Iamille Fritz Brandão de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Elson Alves Costa

Universidade Federal de Goiás

DEDICATÓRIAS

*À Maria Osinda (in memoriam), meu eterno agradecimento
por me ensinar a dar prioridade aos estudos.*

*À meus pais Domingos (in memoriam) e
Maria, pelo exemplo de dedicação e amor à família.*

*À minha mãe **Lúcia**, minha irmã **Keila** e
minha sobrinha **Karolina**. Obrigada por ficarem
sempre ao meu lado em todos os momentos e,
principalmente, por me compreenderem todas as
vezes que disse "hoje não posso".*

*À Dra. Mirtes Midori Tanae, pela amizade,
conselhos, pelas sugestões que muito contribuíram para
este trabalho e por facilitar a comunicação entre
orientador e aluno.*

*Ào prof. Dr. Antonio José Lapa, pelos
ensinamentos, oportunidades e principalmente, pela
paciência com o meu silêncio.*

AGRADECIMENTOS

À fé em Deus que me deu força e perseverança durante a realização deste trabalho.

À Isabela Santana e Cristiano Gonçalves, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Aos professores Dr. Afonso Caricatti, Dra. Caden Souccar, Dra. Maria Teresa Lima-Landman, Dra. Valderez (UNIFESP) e Thereza Christina Lima (UFSC), pelos ensinamentos, experiências e pela disposição em ajudar mesmo à distância.

À Marcela Nering (UNIFESP) pelos experimentos de atividade antiplasmódio.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA):

- Alzemir, Andrezza, Dr. Dângelo, Fabíola, Francianny, Jeffeson, Márcia Caroline, Marnyce, Ricardo, Suélen e Tânia.

- Kaori Isla, Sandra Sales, Siglia Braga e Thaís Biondo, pelo apoio, participação nos experimentos e pelas palavras de incentivo.

- Aos funcionários do biotério: Antonio, Celina, Claudia, Gabriel, Leandro, Rosangela e Stener.

- Jackeline, pela ajuda no trabalho burocrático.

- Aos técnicos Geane, Toni, Danilo e em especial à Vânia (muito obrigada pela dedicação na concentração dos extratos), pelo auxílio nos experimentos, dedicação e disposição para ajudar.

Ao Pedro Barbalho pela ajuda durante a coleta do material e no experimento de pressão arterial.

Aos colegas da pós-graduação Alcineide, Eliene, Juliana, Maciel, Suzana e Thiago, por compartilharem essa etapa. E a Claudia e Charles que fizeram parte dessa caminhada.

Ao prof. Ari Hidalgo, pela identificação e valiosas informações sobre a planta.

Ao prof. Paulo Roberto e Dorotéia da Faculdade de Farmácia-UFAM, pela ajuda com solvente e moagem do material botânico, respectivamente.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pelo suporte técnico.

À Fundação de Amazônia de Defesa da Biosfera (FDB) pelo suporte financeiro.

À coordenação do PPGBIOTEC-UFAM, em especial aos professores Dr. José Odair, Dr. Spartaco e Dr. Edmar de Andrade pelo apoio e atenção dispensada.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Na região Amazônica, a *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, conhecida como saracura-mirá ou cerveja de índio, é utilizada no tratamento de distúrbios gastrintestinais, como anti-inflamatória, antídoto para veneno de cobra e na prevenção da malária. Estudos químicos descrevem o isolamento e identificação de saponinas triterpênicas como as principais substâncias. Não há relatos da padronização de extratos de *A. amazonicus*. A atividade antiplasmódio dos extratos aquoso e etanólico não foi comprovada *in vitro* em cultura de *P. falciparum* e nem *in vivo* em camundongos e galinhas infectados com *P. berghei* e *P. gallinaceum*, respectivamente. A atividade dos compostos isolados não foi testada. Estudos sistêmicos dos extratos correlacionando dose-efeito são raros. Considerando essas informações, este trabalho propõe a padronização química do extrato a ser estudado e a avaliação da farmacodinâmica secundária, principalmente na atividade cardiovascular. Exemplares da planta nativa foram colhidos em Manacapuru, AM. A alta concentração de saponinas dificultou a extração aquosa do pó do caule, optando-se pela extração hidroalcoólica com etanol a 50%, de melhor rendimento, permitindo a partição em n-butanol para a separação dos componentes químicos em cromatografia líquida preparativa. Como referência, foram utilizados os seis componentes majoritários, identificados pelo tempo de retenção e concentração de cada pico. O extrato hidroalcoólico e a fração butanólica, testados com protocolos padronizados para a triagem farmacológica, mostraram efeito depressor leve do SNC comprovado com a potenciação do sono barbitúrico e etéreo. Os extratos produziram também efeitos do tipo ansiolítico no labirinto em cruz elevado e efeito depressor no teste de suspensão pela cauda. Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram detectadas nos testes da formalina e do edema de pata induzido por carragenina. A fração butanólica (Fbut) protegeu a mucosa gástrica das lesões induzidas por estresse a frio ou por etanol, mas não as induzidas por indometacina, indicando que a atividade anti-úlceras não está relacionada à síntese de prostaglandina. A FBut, inibiu a secreção gástrica *in vivo* e a $H^+-K^+-ATPase$ *in vitro*, sugerindo que esse mecanismo pode ser o responsável pelo efeito antissecretor ácido. A FBut provocou hipotensão quando administrada cronicamente por via oral e quando injetada e.v. em ratos anestesiados. O automatismo atrial não foi alterado, mas em miocárdio de ratos foi observado efeito inotrópico negativo. Em aorta de rato, a FBut relaxou o tônus adrenérgico. Esse efeito foi parcialmente bloqueado pela incubação prévia com L-NAME ou destruição mecânica do endotélio. Na musculatura lisa, a CE_{50} da ACh foi aumentada sem alteração do efeito máximo em jejuno de rato; em ducto deferente de rato contraído à adição de noradrenalina, a FBut teve efeito antagonista do tipo não-competitivo. Em ducto deferente despolarizado, a FBut diminuiu a contração induzida pela adição de $CaCl_2$, indicando bloqueio do influxo de cálcio. A capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta ou indiretamente não foi alterada. Em ATPases tipo-P isoladas de mamíferos, a FBut inibiu a atividade da $H^+,K^+-ATPase$ da mucosa gástrica de porco, mas não a $Ca^{2+}-ATPase$ da coxa de coelho. Os resultados indicam que a FBut produz hipotensão que parece estar relacionada com o relaxamento do tônus vascular adrenérgico, possivelmente decorrente da ativação da via do NO na célula endotelial. A ação da FBut na aorta de rato e na musculatura lisa, indica que outros mecanismos vasodilatadores podem estar envolvidos, como o bloqueio canais de cálcio na musculatura lisa vascular.

Palavras-chave: *Ampelozizyphus amazonicus*, pressão arterial, analgesia, SNC, gastrintestinal

ABSTRACT

In Amazonian region, *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, known as “saracura-mirá” or “cerveja de índio”, is used to treat gastrointestinal disorders, as an antidote to snake venoms and to prevent malaria. Chemical studies report the triterpenic saponins as the main constituents, however, chemical standardization of the extracts are not described. The anti-plasmodium effect of the aqueous and ethanolic extracts was not observed neither *in vitro* in cultured *P. falciparum*, nor *in vivo* in mice infected with *P. berghei* and chickens infected with *P. gallinaceum*. The isolated compounds were not tried in these experiments. Studies on systemic effects of the extracts and dose-effect correlation are scarce. For these reasons, this work proposes the chemical standardization of the extract and the evaluation of the secondary pharmacology, mainly in the cardiovascular system. The plant was collected in Manacapuru (AM). Due to the high concentration of saponins in stems, the extraction was performed in ethanol 50 % and latter partitioned with n-butanol for the separation of the chemical compounds in preparative HPLC. Six majoritary compounds, identified by the peaks retention time and concentration in sample were used as references. The hydroalcoholic extract and its butanolic fraction have shown a slight CNS depressant effect demonstrated by the potentiation of the sleeping time induced by pentobarbital and ethylic ether. The extracts also produced anxiolytic-like effect in the plus maze test and depression in the tail suspension test in mice. Antinociceptive and anti-inflammatory effects were detected in paw edema induced by formalin and carrageenan in rats. FBut protected the gastric mucosa against cold stress or ethanol- induced gastric damage, but not against indomethacin-induced gastric damage. FBut inhibited the gastric secretion *in vivo* in mice and the H^+-K^+ -ATPase *in vitro*, suggesting an anti-secretory effect. FBut showed hypotensive effect in rats chronically treated *per os* and in anesthetized rats after e.v. injection. The atrial automatism was not altered, but negative inotropic effect was observed in rat myocardium *in vitro*. In rat aorta, FBut relaxed the adrenergic tonus. This effect was partially blocked by L-NAME pre-incubation or mechanical destruction of the endothelium. In rat isolated jejunum, the EC_{50} of the ACh was increased, however, the maximum contraction was not altered. In rat isolated vas deferens adrenergic contraction, the FBut showed non-competitive antagonistic effect. In depolarized vas deferens, the FBut decreased the contraction induced by $CaCl_2$, suggesting a calcium influx blockade. In rat isolated diaphragm, the directly or indirectly contractions induced by electrical stimulation of the muscle was not altered. In mammalian P-type ATPases, FBut inhibited the gastric H^+,K^+ -ATPase, but did not inhibit the Ca^{2+} -ATPase *in vitro*. The results indicate that hypotension produced by FBut seems to be related to the relaxation of the adrenergic vascular tonus, possibly due to the activation of the NO synthesis in the endothelial cells. The FBut effects in rat aorta and smooth muscles indicate that other vasodilatory mechanism(s) may be involved, probably calcium channel blockade in vascular smooth muscle.

Key words: *Ampelozizyphus amazonicus*, arterial pressure, analgesia, CNS, gastrintestinal

ABREVIATURAS

ACh	- acetilcolina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ang II	- angiotensina II
AMPc	- monofosfato cíclico de adenosina
ATP	- trifosfato de adenosina
BK	- canais de K^+ de alta condutância ativados por Ca^{2+}
BPM	- batimentos por minuto
BVLr	- bulbo ventrolateral rostral
$[Ca^{2+}]_i$	- concentração intracelular de Ca^{2+}
CaM	- calmodulina
CCD	- cromatografia em camada delgada
CLAE-Prep	- cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
CLAE-analit	- cromatografia líquida de alta eficiência analítica
COX	- ciclooxigenase
DAG	- diacilglicerol
DC	- débito cardíaco
DDR	- ducto deferente
DHPR	- receptor diidropiridínico
dP/dt	- primeira derivada de contração e relaxamento
d-tubo	- d-tubocurarina
DZP	- diazepam
EA	- extrato aquoso
EC ₅₀	- concentração efetiva 50%
EDHF	- “fator hiperpolarizante dependente de endotélio”
EDRF	- “fator relaxante dependente de endotélio”
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EHA	- extrato hidroalcoólico
FA	- fração aquosa
FDA	- Food and Drug Administration
FBut	- fração butanólica
FC	- frequência cardíaca

GCs	- guanilato ciclase solúvel
GMPc	- monofosfato cíclico de 3', 5' guanosina
GTP	- trifosfato de guanosina
ICH	- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IP ₃	- trifosfato de inositol
LCE	- labirinto em cruz elevado
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
LNV	- líquido nutritivo de vesícula
MOPS	- ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NA	- núcleo ambíguo
NDMV	- núcleo dorsal motor do vago
Nor	- noradrenalina
NO	- óxido nítrico
NOS	- sintase do óxido nítrico
NTS	- núcleo do trato solitário
PA	- pressão arterial
PBS	- tampão fosfato salino
PLC	- fosfolipase C
PKA	- proteína quinase dependente de AMPc
PKC	- proteína quinase dependente de cálcio
PKG	- proteína quinase dependente de GMPc
RP	- resistência periférica
RS	- retículo sarcoplasmático
RyR	- receptor de rianodina
SERCA	- Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
VDCC	- canais de cálcio dependentes de voltagem
TRPC	- “transient receptor potential”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke. A - Caule torcido, presença de árvores suportes e B - Curso d'água no local de ocorrência	32
Figura 2 – Aspectos de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke	32
Figura 3 - Estruturas químicas dos triterpenos pentacíclicos isolados de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke	34
Figura 4 – Ativação de receptores endoteliais	41
Figura 5 – Ondas de propagação de cálcio	44
Figura 6 – Cromatografia em camada delgada em folha de alumínio sílica gel 60 F ₂₅₄ , eluída em butanol : ácido acético : água (4 : 1 : 2), revelado com vapor de iodo e visualizado a 254 nm	49
Figura 7 - Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico (EHA), fração aquosa (FA), fração butanólica (FBut) e fracionamento da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	50
Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> em CLAE analítica	52
Figura 9 - Perfis cromatográficos das frações isoladas da fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> em CLAE analítica	52
Figura 10 – Atividade antiplasmódio da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i>	53
Figura 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos	77
Figura 12 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos	78
Figura 13 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos	79
Figura 14 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos	81
Figura 15 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no tempo de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos ...	81

Figura 16 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. (A) estiramentos e (B) imersões de cabeça	82
Figura 17 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos	84
Figura 18 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no tempo de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado, em camundongos	84
Figura 19 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos (A) estiramentos e (B) imersões de cabeça	85
Figura 20 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste de suspensão pela cauda, durante 5 minutos, em camundongos	86
Figura 21 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste de suspensão pela cauda, durante 5 minutos, em camundongos	87
Figura 22 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/ kg) no teste da formalina 1,5 %, em ratos	88
Figura 23 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke (0,3 g/ kg, v.o.) no teste da retirada da cauda, em camundongos	89
Figura 24 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da placa quente, em camundongos	90
Figura 25 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%) em camundongos	91
Figura 26 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1%, em ratos	92
Figura 27 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1 %, em ratos	93
Figura 28 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1 % (1 mL, i.p.), em camundongos	94

Figura 29 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por estresse por imobilização a frio (4 °C por 2 h), em camundongos	95
Figura 30 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por etanol 75% (5 mL/kg, v.o.), em camundongos	96
Figura 31 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por indometacina (20 mg/kg, s.c.), em camundongos	97
Figura 32 – Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) da fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg) no volume, pH e na acidez total da secreção ácida gástrica de camundongos submetidos à ligadura pilórica de 4 h	98
Figura 33 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no percurso do carvão ativado 10 % (5 mL/kg, v.o.), em camundongos	99
Figura 34 – Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,3 g/kg/ dia, v.o.) na pressão arterial sistólica em ratos normotensos não anestesiados	101
Figura 35 – Efeito pressórico da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (3, 10 e 20 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados	102
Figura 36 – Efeitos pressóricos da injeção de FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (10 mg/kg, e.v.) antes e após o tratamento com atropina (1 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados	102
Figura 37 – Efeitos pressóricos da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.) antes e após a injeção de FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados	103
Figura 38 – Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,3 µg/kg, e.v.) e angiotensina II (0,03 µg/kg, e.v.) antes e após injeção da fração butanólica (FBut) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados	103
Figura 39 – Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,3 µg/kg,e.v.) e angiotensina II (0,03 µg/kg, e.v.) em ratos tratados cronicamente com FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (1 g/kg/dia,v.o., durante 10 dias) e em ratos normotensos anestesiados controle	104
Figura 40 – Efeito da fração butanólica (FBut) (10 a 1000 µg/mL) de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> na frequência de batimentos do átrio isolado de rato (A) e na força de contração do músculo papilar de rato (B)	105
Figura 41 – Efeito da incubação cumulativa de FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (10 a 300 µg/mL) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio, em condições controle e na presença de L-NAME (10 ⁻⁵ M)	106

Figura 42 - Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,01 a 0,3mg/mL) em ducto deferente de rato estimulado	107
Figura 43 – Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-4} M) obtidas antes (controle) e após incubação de FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) em preparações de ducto deferente de rato	108
Figura 44 – Curvas concentração-efeito de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) obtidas antes (C-controle) e após incubação de FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) em preparações de jejuno de rato	109
Figura 45 – Curvas concentração-efeito de CaCl_2 (10^{-5} a 10^{-1} M) obtidas antes (controle) e após incubação da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) em preparações de ducto deferente despolarizado de ratos	110
Figura 46 – Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) em diafragma de rato a 30 °C, estimulado indiretamente	111
Figura 47 – Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) em diafragma de rato a 30 °C, estimulado diretamente	111
Figura 48 – Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (0,1 a 100 µg/mL) (A) e da tapsigargina (0,01 a 1 µM) (B) na atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho	112
Figura 49 - Efeito da FBut de <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> (1 a 100 µg/mL) (A) e do SCH28080 (3 a 1000 µM) (B) na atividade da H^+, K^+ - ATPase de mucosa gástrica de porco	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico (EHA) e fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> (1 g/kg, v.o.) no teste hipocrático em camundongos	76
Tabela 2 – Concentrações efetivas médias (CE ₅₀) obtidas de curvas concentração-efeito da noradrenalina (10 ⁻⁸ a 10 ⁻⁴ M) antes e após a incubação de FBut (0,1 a 1 mg/mL) em ducto deferente de rato a 30°C	108
Tabela 3 – Concentrações efetivas médias (CE ₅₀) obtidas de curvas concentração-efeito de acetilcolina (10 ⁻⁸ a 10 ⁻⁴ M) antes e após a incubação da FBut de <i>A. amazonicus</i> (0,1 a 1 mg/mL) no jejuno de rato a 30°C	109
Tabela 4 – Concentrações efetivas médias (CE ₅₀) obtidas de curvas concentração-efeito de CaCl ₂ (10 ⁻⁵ a 10 ⁻¹ M) antes e após a incubação de FBut (0,1 a 1 mg/mL) em ducto deferente despolarizado de rato	110

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DA LITERATURA	30
2.1. <i>Ampelozizyphus amazonicus</i> Ducke	31
2.2. Regulação da pressão arterial	35
2.2.1. Regulação endotelial do tônus vascular	37
3. OBJETIVOS	45
Geral.....	46
Específicos	46
4. MATERIAL	47
4.1. Material de estudo	48
4.1.1. Extração e controle dos extratos	48
4.1.1.1. Obtenção do extrato aquoso (EA) de <i>A. amazonicus</i>	48
4.1.1.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>A. amazonicus</i>	48
4.1.1.3. Obtenção da fração butanólica (FBut)	48
4.1.1.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	49
4.1.2. Padronização química da FBut de <i>A. amazonicus</i>	51
4.1.2.1. Purificação da FBut por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep)	51
4.1.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência analítica das frações purificadas	51
4.1.3. Comprovação da atividade antiplasmódio da FBut de <i>A. amazonicus</i>	53
4.2. Animais	54
4.3. Fármacos, reagentes e solventes	54
4.4. Composição das soluções (em mM)	55
5. MÉTODOS	57
5.1. Triagem farmacológica geral	58
5.2. Atividade no Sistema Nervoso Central	58

5.2.1. Avaliação da atividade hipnosedativa do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i>	58
5.2.1.1. Teste do sono induzido por barbitúrico	58
5.2.1.2. Teste do sono induzido por éter etílico	59
5.2.2. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste do labirinto em cruz elevado	59
5.2.3. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da suspensão pela cauda	60
5.3. Atividade em nocicepção e inflamação	60
5.3.1. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da formalina	60
5.3.2. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da retirada da cauda	60
5.3.3. Avaliação da atividade analgésica da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da placa quente	61
5.3.4. Avaliação da atividade analgésica da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	61
5.3.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste do edema de pata induzido por carragenina ou dextrana	62
5.3.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da peritonite induzida por carragenina 1%	62
5.4. Avaliação da atividade no trato gastrointestinal	63
5.4.1. Estudo da atividade anti-úlceras da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> ..	63
5.4.1.1. Lesões gástricas induzidas por estresse	62
5.4.1.2. Lesões gástricas induzidas por etanol	64
5.4.1.3. Lesões gástricas induzidas por indometacina	64
5.4.2. Avaliação da atividade antissecretora gástrica da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i>	64
5.4.2.1. Método da ligadura pilórica	64
5.4.3. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na motilidade intestinal	65
5.4.3.1. Trânsito intestinal	65

5.5. Avaliação de ações no sistema cardiovascular	66
5.5.1. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na pressão arterial de ratos	66
5.5.1.1. Registro indireto da pressão arterial em ratos não – anestesiados	66
5.5.1.2. Registro da pressão arterial em ratos anestesiados	66
5.5.2. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no músculo cardíaco	67
5.5.2.1. Avaliação na frequência de batimentos de átrio de rato	67
5.5.2.2. Avaliação da atividade na força de contração do músculo papilar de rato	67
5.5.3. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na musculatura vascular	68
5.5.3.1. Anéis de aorta de rato pré–contraídos com noradrenalina (10^{-7} M)	68
5.5.4. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no músculo liso	68
5.5.4.1. Ducto deferente de rato (DDR) estimulado eletricamente	68
5.5.4.2. Ducto deferente de rato (DDR)	69
5.5.4.3. Jejunó de rato	69
5.5.5. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no influxo de cálcio em músculo liso	69
5.5.5.1. Ducto deferente despolarizado de rato	69
5.6. Avaliação da atividade neuromuscular	70
5.6.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente.....	70
5.7. Avaliação da atividade nas P-ATPases de mamíferos	71
5.7.1. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na atividade da Ca^{2+} -ATPase	71
5.7.1.1. Isolamento da Ca^{2+} -ATPase	71
5.7.1.2. Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase	71
5.7.2. Avaliação da ação da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na atividade da H^+,K^+ -ATPase	72

5.7.2.1. Isolamento de microsomas gástricos e da $H^+-K^+-ATPase$ gástrica	72
5.7.2.2. Medida da atividade da $H^+-K^+-ATPase$ gástrica	73
5.7.3. Determinação do teor de proteína	73
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	74
6. RESULTADOS	75
6.1. Triagem farmacológica geral	76
6.2. Sistema Nervoso Central	77
6.2.1. Avaliação da atividade hipnosedativa	77
6.2.1.1. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>A. amazonicus</i> no teste do sono induzido por barbitúrico	77
6.2.1.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste do sono induzido por barbitúrico	78
6.2.1.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste do sono induzido por éter etílico	79
6.2.2. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>A. amazonicus</i> no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	80
6.2.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)	83
6.2.4. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>A. amazonicus</i> no teste da suspensão pela cauda	86
6.2.5. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da suspensão pela cauda	87
6.3. Avaliação da atividade em nocicepção e inflamação	88
6.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da formalina 1,5%	88
6.3.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da retirada da cauda	89
6.3.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no teste da placa quente ...	90
6.3.4. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> nas contorções abdominais induzidas por ácido acético à 0,8%	91
6.3.5. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no edema de pata induzido por carragenina 1%	92

6.3.6. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no edema de pata induzido por dextrana 0,1%	93
6.3.7. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na peritonite induzida por carragenina 1%	94
6.4. Avaliação da atividade no trato gastrointestinal	95
6.4.1. Estudo da atividade anti-úlceras	95
6.4.1.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no modelo de lesão gástrica induzida por estresse	95
6.4.1.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no modelo de lesão gástrica induzida por etanol	96
6.4.1.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina	97
6.4.2. Estudo da atividade antissecretora gástrica	98
6.4.2.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no modelo da ligadura pilórica	98
6.4.3. Estudo da atividade na motilidade gastrointestinal	99
6.4.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no trânsito intestinal ...	99
6.5. Avaliação de ações no sistema cardiovascular	100
6.5.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na pressão arterial de ratos	100
6.5.1.1. Pressão arterial em ratos não-anestesiados	100
6.5.1.2. Pressão arterial em ratos anestesiados	101
6.5.2. Atividade no músculo cardíaco	105
6.5.2.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na frequência de batimentos do átrio de rato e na força de contração do músculo papilar de rato	105
6.5.3. Atividade na musculatura vascular	106
6.5.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> em anéis de aorta de rato pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M)	106
6.5.4. Atividade da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> em músculo liso	107
6.5.4.1. Efeito no ducto deferente estimulado	107
6.5.4.2. Efeito no ducto deferente de rato (DDR)	108

6.5.4.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> em jejuno de rato	109
6.5.5. Medida do influxo de cálcio em músculo liso	110
6.5.5.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> no ducto deferente de rato despolarizado (DDR)	110
6.6. Atividade na junção neuromuscular esquelética	111
6.6.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente	111
6.7. Atividade das P-ATPases de mamíferos	112
6.7.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na atividade da Ca^{2+} -ATPase	112
6.7.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>A. amazonicus</i> na atividade da H^+, K^+ -ATPase	113
7. DISCUSSÃO	114
8. SUMÁRIO E CONCLUSÃO	132
REFERÊNCIAS	136

I. Introdução



As plantas medicinais constituem importante fonte para obtenção de moléculas a serem exploradas por sua potencialidade terapêutica. De fato, estima-se que 20% da biodiversidade mundial está concentrada na Amazônia (BRASIL, 2003; MITTERMEIER *et al.*, 1998) e, com boa margem de acerto, a probabilidade de encontro de moléculas bioativas é muito maior que em áreas inóspitas, ou já degradadas, e por isso menos biodiversas. Portanto, a riqueza da Amazônia está onde estiverem as águas, a flora, e a fauna; Manaus, no centro da floresta e ao lado dos rios que trazem a ela os ribeirinhos, é um local estratégico para estudo do potencial farmacológico dos recursos naturais.

Do manancial vegetal, as plantas vasculares que se destacam na floresta sempre foram as mais estudadas; entretanto, como poucas áreas geográficas foram exploradas botanicamente, o conhecimento das espécies presentes e suas relações filogenéticas é pequeno. Nesse sentido, a coleta aleatória e esparsa das espécies nativas mais exuberantes, pouco tem ajudado na avaliação das influências do ecossistema sobre as plantas (RIBEIRO *et al.*, 1999). Além disso, inúmeros microrganismos convivem no mesmo ecossistema amazônico. O papel e a influência dessa biota microbiana na estruturação biológica ambiental, na densidade, no crescimento e na adaptação regional das espécies são quase desconhecidos. Por exemplo, o progresso rápido da biotecnologia tem mostrado que a infecção vegetal por microrganismos endofíticos - vírus, fungos e bactérias - pode modular a expressão gênica dos metabólitos secundários das plantas superiores (RYAN *et al.*, 2008; STROBEL *et al.*, 2004), controlando dessa forma, a concentração desses compostos na seiva e nos órgãos vegetais. A utilidade desses compostos para a planta é pouco conhecida; alguns postulam atividade defensiva e síntese em condições de estresse (BENNETT, WALLSGROVE, 1994; CROTEU *et al.*, 2000); o que se conhece, é que compostos do metabolismo secundário de muitas espécies são capazes de atrair, repelir, inibir o crescimento, ou alterar a homeostasia de animais e plantas do mesmo convívio geográfico.

Por estas razões, do ponto de vista farmacológico, é difícil expressar valores quantitativos da biodiversidade amazônica que não sejam valores subjetivos influenciados pelos sucessos históricos (LEE, 2002a) e pela necessidade futura de medicamentos inovadores, cuja descoberta tem sido decrescente há quase duas décadas (BOOTH; ZEMMEL, 2004; DREWS, 2000).

Na Amazônia, o ecossistema da floresta tropical, ao mesmo tempo em que dá subsistência e proteção ao homem, abriga também vetores de doenças humanas cuja propagação torna-se inevitável. No dia a dia, as comunidades recorrem a práticas diversas para prevenir e tratar essas enfermidades endêmicas; o uso de plantas medicinais é muito comum e a fonte dessa informação é considerada por alguns uma grande riqueza indígena, que seguramente o é pelo uso humano prolongado (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; RODRIGUES, 2006; SANTOS *et al.*, 2005). No entanto, fora da concepção sócio-antropológica da comunidade de origem, a descrição e o uso empírico dessas práticas tradicionais, podem ter significados e efeitos diferentes (ELIZABETSKY, 2002; ETKIN, 1988). A etnofarmacologia é a área científica que estuda essas práticas populares, seus usos e benefícios, sua importância na vida e desenvolvimento de comunidades tradicionais, as substâncias utilizadas e a potencialidade de seu uso terapêutico em enfermidades fora da comunidade de origem. Esse estudo farmacológico conta com concepção, protocolos e técnicas modernas já incorporadas à maioria das Normas Éticas dos órgãos internacionais de vigilância e controle da saúde (ANVISA, FDA e ICH).

Este trabalho estudou a farmacologia pré-clínica de *Ampelozizyphus amazonicus*, planta amazônica utilizada para prevenir malária. A malária é doença humana, talvez a endemia mundial mais preocupante do momento pela incidência elevada (WHO, 2009), pelo insucesso momentâneo para obtenção de vacina eficaz (WINZELER, 2008), e pelo desenvolvimento crescente da resistência do plasmódio à maioria dos medicamentos

conhecidos (WHO, 2008). É preocupante pensar que a falta de medicamentos eficazes poderá ocorrer futuramente (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002). Portanto, é prioritário investir na obtenção de novos produtos com essa atividade, produtos que sejam eficazes, baratos e acessíveis às populações de baixa renda.

Os estudos nesta área são numerosos e abrangentes, incluindo pesquisas de novas drogas, vacinas, além do desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e aprimoramento dos estudos *in vitro* (MURRAY *et al.*, 2003; SATTABONGKOT *et al.*, 2006).

O genoma dos parasitas (plasmódios) é dos mais estudados entre os eucariotes (ver revisão CONWAY, 2007) e muitos alvos moleculares que se prestam à ação de novos compostos foram identificados; da mesma forma, marcadores das causas da resistência do protozoário às drogas antimaláricas foram validados (NTOUMI *et al.*, 2007; TALISUNA *et al.*, 2004).

Nesse sentido, vários estudos foram direcionados para a obtenção de análogos sintéticos dos antimaláricos atuais, ou de compostos com estrutura orientada pela estereoquímica dos alvos moleculares do parasita. Recentemente, foi divulgado o estudo de mais de 2 milhões de compostos avaliados quanto à eficácia em culturas de *P. falciparum* (*in vitro*). Desses, aproximadamente 13 mil mostraram-se promissores (GAMO *et al.*, 2010; GUIGUEMDE *et al.*, 2010). Até o momento, no entanto, a avaliação da eficácia *in vivo* e das propriedades farmacodinâmicas desses compostos, principalmente a biodisponibilidade, os efeitos sistêmicos colaterais e a segurança farmacológica, não foram mostrados.

Mesmo em número muito menor, compostos de origem natural obtidos de estudos fitoquímicos aleatórios, ou de extratos de plantas de uso popular comunitário, têm sido sistematicamente estudados. Antimaláricos de origem natural obtidos da *Cinchona* spp e *Artemisia annua* originalmente nativas na Amazônia e China, respectivamente, são exemplos

importantes, embora antigos, do sucesso do estudo de plantas para uso nessa enfermidade (BRAZ FILHO, 2010; LEE, 2002a,b).

De modo geral, a atividade antimalárica dos compostos utilizados na terapêutica humana tem sido relacionada a mecanismos envolvendo canais iônicos, enzimas, receptores, sistemas transportadores e também mecanismos de sinalização intracelular (GAZARINI *et al.*, 2007; MARCHESINI *et al.*, 2005). De fato, novos compostos que interferem com a homeostasia iônica de sódio e potássio, com a sinalização de cálcio, com proteínas transportadoras, ou com o controle do volume celular, podem comprometer a viabilidade do parasita e ser de grande valor terapêutico em espécies resistentes às drogas conhecidas (GARCIA, 1999). Portanto, é importante avaliar novas drogas quanto à ação nestes mecanismos iônicos que controlam a homeostasia do protozoário, lembrando, no entanto, que proteínas homólogas a essas - enzimas, receptores e canais iônicos - têm as mesmas funções na manutenção da homeostasia de células humanas.

Nesse particular, estudos evidenciaram que ATPases de *Plasmodium falciparum* relacionadas com o transporte de cálcio no parasita humano (PfATPase4 e PfATPase6), guardam grande homologia com a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de mamíferos (DYER *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1993). Isto indica que vários mecanismos envolvidos na regulação do Ca^{2+} intracelular no *Plasmodium* spp podem se assemelhar a mecanismos celulares de mamíferos, e que os alvos protéicos homólogos (correlatos funcionais) são potenciais alvos de uma droga antiparasitária, ainda que não guardem identidade molecular absoluta (KIMURA *et al.*, 1993). A ação da artemisinina, por exemplo, foi relacionada ao bloqueio da mobilização de cálcio na célula do parasita, uma ação semelhante à taspigargina, que no mamífero bloqueia a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (ECKSTEIN-LUDWIG *et al.*, 2003).

A especificidade de novos antimaláricos com ação mediada por estes mecanismos é, portanto, muito importante para definir a janela terapêutica dos novos medicamentos.

Estudos fitoquímicos mostraram, por exemplo, que vários terpenos (diterpenos, sesquiterpenos, limonóides) e compostos fenólicos como as lignanas, chalconas e auronas, flavonóides, naftoquinonas e quinonas têm ação antiparasitária, a maioria *in vitro* (KAYSER *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, o estudo sistemático exaustivo de dezenas de plantas brasileiras com informação de uso na malária, febre e inflamação foi realizado pelos grupos de Krettli *et al.* (2001) e Brandão *et al.* (1992a, 1997), utilizando técnicas *in vitro* e *in vivo* clássicas, que permitiram a identificação de plantas e extratos promissores.

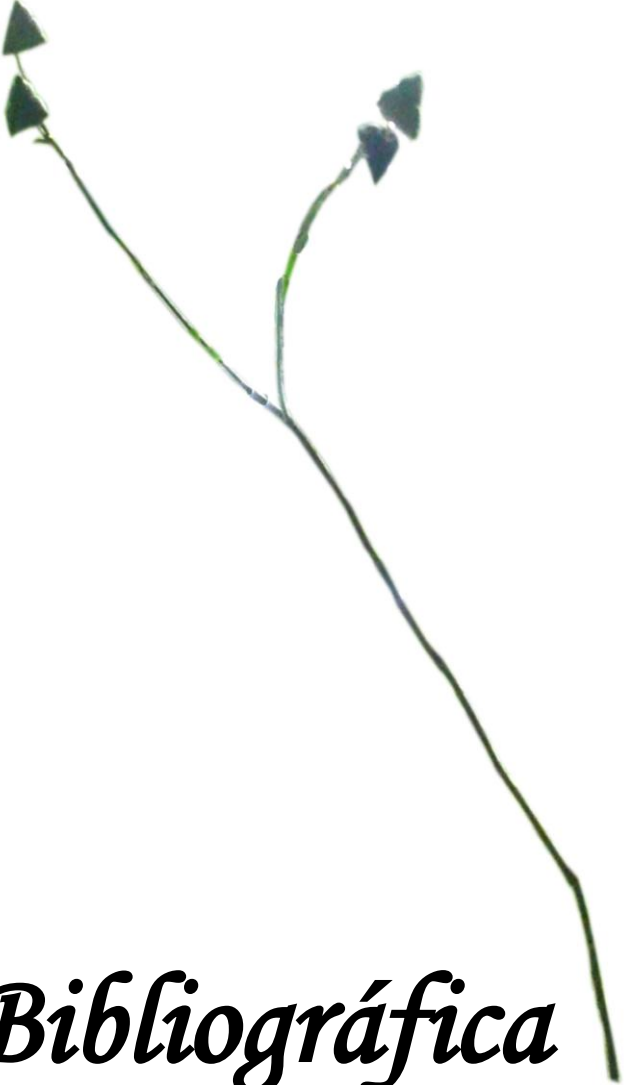
A literatura científica, no entanto, não contempla nenhum estudo com planta brasileira que tenha sido avaliada na espécie humana segundo protocolos éticos que considerem a padronização do extrato, a farmacodinâmica primária, a farmacodinâmica secundária (efeitos colaterais), a segurança farmacológica e a toxicologia pré-clínica em mamíferos. Por alguma razão indefinida, os estudos foram interrompidos sem que as causas fossem publicadas. Consequentemente, pouco se sabe dos estudos de eficácia e segurança das plantas medicinais brasileiras utilizadas na medicina popular para tratar malária. O mesmo se diga de todas as muitas plantas medicinais brasileiras, com outras atividades, que não tiveram continuidade além dos estudos farmacológicos pré-clínicos.

Embora a legislação brasileira seja menos exigente para fitoterápicos (BRASIL, 2004a, 2004b), métodos padronizados para os estudos de toxicidade pré-clínica foram contemplados na legislação específica que determina a utilização de amostras padronizadas do medicamento fitoterápico, ou do derivado vegetal a partir do qual será produzido o novo medicamento (BRASIL, 2004c).

Portanto, a legislação já considera que a atividade do fitoterápico não é garantida apenas pela identificação taxonômica do vegetal, embora esta seja essencial para sua seleção (LAPA *et al.*, 2004); como realçado acima, a expressão gênica de uma espécie pode ser influenciada tanto por fatores físicos do ecossistema, quanto por microrganismos endofíticos capazes de direcionar a expressão de metabólitos secundários, os quais, em última análise, são os compostos que mostram atividade farmacológica quando em contato com células animais. Além disso, mesmo com origem controlada e identificação apropriada, os métodos de extração da droga vegetal podem selecionar alguns compostos em detrimento de outros, tornando necessária a padronização química dos extratos ativos em função de marcadores químicos responsáveis pela atividade. Finalmente, só o conhecimento da concentração relativa dos marcadores químicos permitirá estabelecer a correlação entre causa (compostos ativos) e efeitos produzidos nos modelos experimentais.

Por tudo isso, a padronização química do fitoterápico é essencial ao estudo farmacológico.

Vários métodos são utilizados para a padronização química de extratos vegetais: partição em solventes de polaridade diferente, separação e purificação cromatográfica em diferentes suportes, identificação química instrumental com técnicas variadas (ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa e outras) (HANDA *et al.*, 2008). Recentemente, Tanae *et al.* (2007) descreveram um método rápido e eficiente para padronização de extratos polares por CLAE. A conveniência desse método, em se tratando de extratos aquosos usualmente utilizados na medicina popular, seria a preservação da mistura de compostos extraídos por infusão, polares e menos polares, o que facilita o estudo da atividade farmacológica e a purificação bio-orientada dos compostos ativos.



II. Revisão Bibliográfica

2.1. *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke

Ampelozizyphus amazonicus Ducke, conhecida como saracura-mirá ou cerveja de índio, é uma espécie endêmica na América do Sul com ampla distribuição na Amazônia brasileira, venezuelana, colombiana, peruana e também no Equador (LIMA, 2006).

No Brasil, é encontrada em florestas de terra firme nos Estados do Amazonas, Pará e Roraima, onde as cascas da raiz e do caule são utilizadas para o tratamento de febre, na prevenção da malária e como antídoto para o veneno de cobra (LIMA, 2006; ROSAS *et al.*, 2007).

A. amazonicus é uma liana lenhosa, com caule torcido, folhas com 3 a 5 nervuras de primeira ordem. Ocorre em áreas de baixio com adjacência declivosa, solos argilosos na parte superior e areno-argilosos na mais baixa, com poucas árvores emergentes (RIBEIRO *et al.*, 1999). A planta apóia-se nos galhos de plantas-suportes e a diferenciação entre essa espécie e outras trepadeiras semelhantes é possível devido à cor avermelhada de seu caule e pelo odor característico de salicilato de metila (NETTO, 2005).

Estudos indicam que essa espécie pode apresentar inflorescência bianual, propagar-se por sementes e sua dispersão pode ocorrer por gravidade e/ou pela água e animais (RIBEIRO *et al.*, 1999; VIANA, 2005).

Segundo Viana (2005), a possibilidade de regeneração após o corte do caule próximo do solo em plantas adultas, permitiria sua propagação por estaquia.

Embora seja muito conhecida e utilizada por moradores do interior do Estado do Amazonas, constatou-se que, entre estes, há desconhecimento da época de floração e características da flor, fruto e semente (HIDALGO, 2003).



Figura 1 – Características de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. **A** - caule torcido, presença de árvores suportes e **B** - Curso d'água no local de ocorrência. Fotos tiradas pela autora, outubro/2007



Figura 2 – Aspectos de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. **A** - crescimento sobre planta suporte e **B** - cor avermelhada da entrecasca da espécie. Fotos tiradas pela autora, outubro/2007

Triterpenos pentacíclicos do grupo lupano, como lupeol, betulina, ácido betulínico e ácidos carboxílicos foram isolados de extratos clorofórmicos de *A. amazonicus* (BRANDÃO *et al.*, 1992b).

O lupeol também isolado de *Holarrhena floribunda* mostrou atividade antiplasmódio em linhagens de *Plasmodium falciparum* (FOTIE *et al.*, 2006; KHALID *et al.*, 1986); a lupenona e ácido betulínico também isolados de *Acosmium dasycarpum* mostraram atividades depressora e analgésica em camundongos (ROCHA *et al.*, 1981).

Dos extratos da casca de *A. amazonicus* foram isolados os compostos apresentados na figura 03 e também os fitoesteróides: stigmasterol, sitosterol e campesterol (ROSAS *et al.*, 2007).

Os triterpenos: ácido betulínico, betulina, ácido ursólico e lupano, já foram isolados também das raízes de *A. amazonicus* (BRANDÃO *et al.*, 1993). Os demais compostos 3 β -hydroxylup-20(29)-ene-27,28-diólico e ácido 2 α ,3 β dihydroxylup-20(29)-ene-27,28-diólico foram identificados pela primeira vez por Rosas *et al.* em 2007.

Estudos farmacológicos com *A. amazonicus* (origem indefinida) em camundongos e galinhas infectadas com *P. berghei* ou *P. gallinaceum* mostraram que os extratos aquoso e etanólico da raiz, respectivamente, não apresentaram atividade sobre parasitas no estágio eritrocítico; os animais tratados com os extratos apresentaram alta parasitemia, anemia severa e maior mortalidade em relação aos animais controles, efeito atribuído às saponinas (KRETTLI *et al.*, 2001). No entanto, o extrato etanólico fresco de uma nova coleta (origem não mencionada) foi ativo contra esporozoítas de *P. gallinaceum* no estágio exoeritrocítico primário, reduzindo em 67% a parasitemia em galinhas inoculadas (FERRARI, 1997).

Outros componentes presentes na planta, como as saponinas, afetaram a diurese em ratos (MEYER *et al.*, 2002). Diniz (2006) demonstrou que as saponinas extraídas de *A. amazonicus* Ducke possuem efeito antidiurético, sem afetar significativamente o ritmo de

filtração glomerular. Este efeito envolveria a diminuição da concentração urinária de urodilatina e aumento da atividade da Na^+ -ATPase.

Dentro da família Rhamnaceae, outras espécies demonstraram atividade anti-inflamatória, citotóxica, genotóxica, neurotóxica, antipirética e hepatoprotetora, relacionadas ao extrato e compostos puros (LIN *et al.*, 1996). Recentemente, uma nova espécie, *A. guaquirensis*, foi identificada na Venezuela (MEIER; BERRY, 2008), mas dela pouco se conhece.

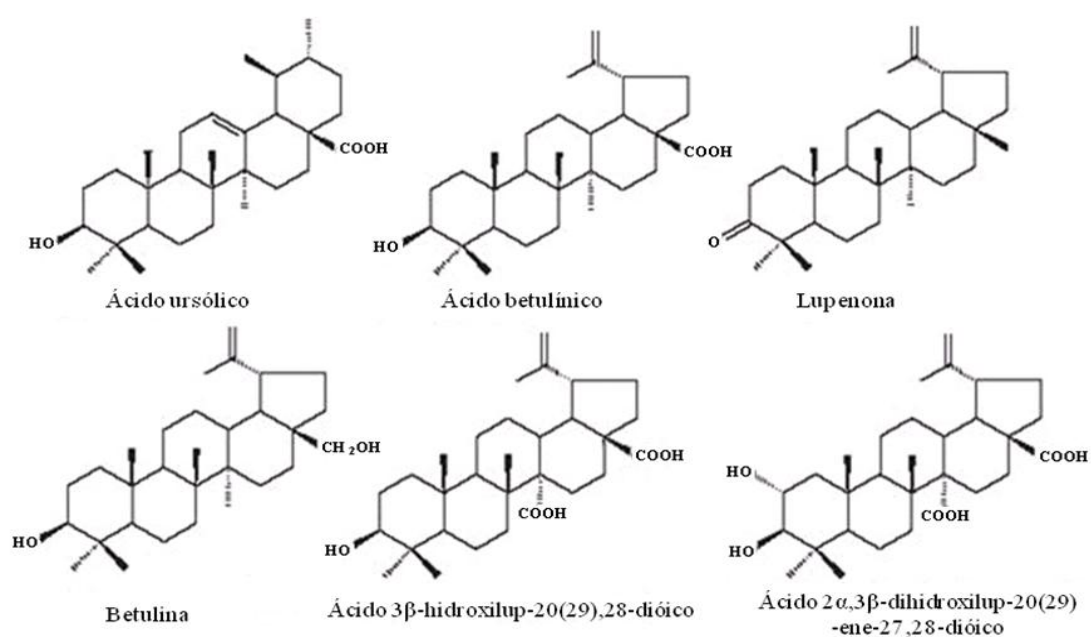


Figura 3 – Triterpenos pentacíclicos isolados de *Ampeloziziphus amazonicus* Ducke (ROSAS *et al.*, 2007)

2.2. Regulação da pressão arterial

Os extratos da *A. amazonicus* produziram hipotensão arterial muito evidente (vide resultados).

Sabe-se que a perfusão sanguínea dos órgãos de vertebrados é garantida pela pressão arterial (PA) que move o sangue ao longo dos vasos, garantindo o bom funcionamento celular e a remoção dos produtos resultantes do metabolismo corporal. A manutenção dos níveis pressóricos é de vital importância e depende de variações do débito cardíaco, da resistência periférica, ou de ambos, sendo controlada pela ação integrada de diferentes mecanismos neurais, hormonais, renais e locais (AIRES, 1999; BEUTEL *et al.*, 2006; IRIGOYEN *et al.*, 2001).

A pressão arterial é o produto do débito cardíaco (DC) e da resistência periférica (RP) ao fluxo do sangue. O débito cardíaco, por sua vez, é determinado pela frequência de batimentos cardíacos (FC) e pela eficiência com que o bombeamento cardíaco ejeta o sangue acumulado no ventrículo durante a diástole (volume sistólico) (GUYTON; HALL, 2006; LOLIO, 1990).

$$PA = DC \times RP$$

$$PA = FC \times \text{volume sistólico} \times RP$$

Alterações no débito cardíaco (volume sanguíneo, contratilidade do miocárdio ou frequência cardíaca) ou na resistência periférica (tônus vascular) modificam a PA.

O controle da PA, momento a momento, é alcançado por reflexos arteriais e não arteriais que detectam e corrigem mudanças na PA basal (barorreceptores), no volume sanguíneo, ou na composição química (reflexo cardiopulmonar) e alterações específicas na pressão parcial do oxigênio, dióxido de carbono e no pH do sangue (reflexo quimiorreceptor) (VASQUEZ *et al.*, 1997).

Entre os mecanismos de controle da PA em curto prazo, o controle reflexo mediado pelos pressorreceptores arteriais é considerado o mecanismo mais importante. Os pressorreceptores são mecanorreceptores constituídos por terminações nervosas livres situadas na adventícia de grandes vasos (aorta e carótida); são estimulados por deformações das paredes desses vasos (IRIGOYEN *et al.*, 2001). A elevação da PA distende e ativa pressorreceptores que geram potenciais de ação. Estes sinais elétricos são conduzidos via nervo glossofaríngeo (fibras carótidas) e vago (fibras aórticas) ao núcleo do trato solitário (NTS) no sistema nervoso central (SNC). Neurônios secundários do NTS projetam para o núcleo dorsal motor do vago (NDMV) e no núcleo ambíguo (NA), excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático e estes se projetam (eferentes vagais) aos gânglios intramurais do coração, aumentando a atividade vagal e diminuindo a FC. Outros neurônios do NTS projetam para e excitam o bulbo ventrolateral rostral (BVLR), diminuindo o tônus simpático, reduzindo a contratilidade e a frequência cardíacas, diminuindo a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, levando à diminuição da PA (BEUTEL *et al.*, 2006; GIULIANO *et al.*, 1989).

A modulação da frequência dos batimentos cardíacos em mamíferos é função dos marca-passos atriais localizados no átrio direito. *In situ*, sua inervação extrínseca influencia positivamente (sistema simpático) ou negativamente (sistema parassimpático) a frequência de disparo do marca-passo. *In vitro*, no entanto, a frequência é modulada pela ação direta das drogas na excitabilidade nodal. Ativação ou inibição simpática pode ser comprovada com incubação de agonistas ou antagonistas dos receptores β_1 -adrenérgicos, mas, o bloqueio β -adrenérgico *in vitro* não é detectado na frequência atrial espontânea. Mais comumente, a bradicardia induzida *in vitro* no átrio isolado deve ser explicada por ativação de receptores colinérgicos M_2 que pode ser identificada com aplicação de antagonistas colinérgicos muscarínicos específicos.

A ejeção de sangue durante a sístole cardíaca depende da força de contração do miocárdio ventricular. A avaliação de drogas no inotropismo cardíaco *in vitro* utiliza preparação de átrio, ou de miocárdio ventricular. A conveniência desta é a ausência de automatismo que pode influenciar negativamente a capacidade contrátil. O músculo papilar do ventrículo esquerdo do rato é uma estrutura delgada que permite a nutrição do miocárdio por difusão; esta preparação não apresenta automatismo, e sua contração deve ser controlada com um marca-passo artificial.

Na maioria das vezes, o aumento do inotropismo em ratos está relacionado à atividade simpatomimética, o que pode ser comprovado com a incubação de bloqueadores de receptores β_1 -adrenérgicos. A depressão do inotropismo, no entanto, não está relacionada à atividade colinérgica, mas à depressão da excitabilidade cardíaca. O registro eletrônico da primeira derivada de contração (dP/dt) fornece indicação quanto à velocidade de contração e relaxamento do miocárdio; a primeira está relacionada diretamente com a ativação do sistema contrátil (potencial de ação, influxo de cálcio, liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, interação do cálcio com troponina C, ativação do deslizamento das miofibrilas). O dP/dt de relaxamento indica a velocidade de repolarização e a ativação da Ca^{2+} -ATPase que promove a recaptação do cálcio citoplasmático livre pelo retículo endo/sarcoplasmático, finalizando a contração.

2.2.1. Regulação endotelial do tônus vascular

O papel do endotélio vascular na modulação do estado contrátil do músculo liso foi demonstrado por Furchgott e Zawadzki (1980): os autores observaram que anéis de aorta de coelho pré-contraídos com noradrenalina relaxavam a concentrações crescentes de ACh somente quando o endotélio apresentava-se íntegro. Ao contrário, quando as células endoteliais estavam lesadas, a resposta à ACh era nula, ou ocorria vasoconstrição. A partir dessas observações, os autores postularam a existência de uma substância liberada pelas

células endoteliais que foi denominada de “fator relaxante dependente de endotélio” (“endothelium derived relaxing factor” - EDRF). Palmer *et al.* (1987) identificaram esse fator como sendo o óxido nítrico (NO), um gás com alta capacidade de difusão. Subsequentemente, foi demonstrado que outros agentes além da ACh, exerciam efeitos diferentes quando na presença ou na ausência do endotélio (FURCHGOTT, 1983). Esses agentes foram denominados agonistas endoteliais e incluem, entre outros, a serotonina, a bradicinina, a substância P, a histamina e a noradrenalina (Figura 4).

Embora esses agonistas desencadeiem a liberação de fatores relaxantes endoteliais, sabe-se que a ação regulatória do endotélio no músculo liso é exercida através da síntese e liberação de uma variedade de substâncias, algumas produzindo relaxamento do músculo liso para provocar vasodilatação, outras produzindo contração com aumento da resistência vascular. As substâncias produzidas pelo endotélio possuem grande diversidade, variando de pequenas moléculas, como o NO e radicais livres de oxigênio, a prostanóides e moléculas de adesão, peptídeos e proteínas como a endotelina e fatores de crescimento. Os fatores derivados de endotélio têm efeitos contrastantes na atividade contrátil do músculo liso vascular e também interagem com outros mediadores em diferentes níveis da cadeia contrátil, produzindo uma regulação endotelial muito complexa do tônus vascular (VANE *et al.*, 1990). O balanço entre a ação dos vasodilatadores e dos vasoconstritores determina o estado contrátil das células do músculo liso. A regulação do tônus vascular é também significativamente modificada por outros processos independentes de endotélio. Estes incluem: reatividade do músculo liso vascular a agonistas (que agem em receptores na superfície da membrana celular, ou em segundos mensageiros intracelulares), atividade simpática ou ativação do sistema nervoso central e a ação de hormônios como a angiotensina II e o peptídeo natriurético atrial (PANZA, 2000).

A principal substância liberada pelo endotélio para regular o tônus vascular é o NO formado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (PALMER *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1988). Três isoformas dessa enzima são descritas:

- Tipo I (NOS I ou nNOS), primeiramente identificada em neurônios centrais e periféricos, embora também seja encontrada fora do sistema nervoso. É expressa constitutivamente e sua ativação depende da elevação de concentrações intracelulares de Ca^{2+} ligado à calmodulina (CaM) (LINCOLN *et al.*, 1997).

- Tipo II (NOS II ou iNOS), indutível e age independentemente das concentrações intracelulares de Ca^{2+} (STUEHR *et al.*, 1991). Requer calmodulina para sua ativação, mas é ativada mesmo na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} . É encontrada nas células de músculo liso vascular, macrófagos e, em menor extensão, nas plaquetas. Usualmente, requer citocinas ou lipopolissacarídeos para sua ativação (LINCOLN *et al.*, 1997).

- Tipo III (NOS III ou eNOS), primeiramente purificada e clonada a partir de células do endotélio vascular (LAMAS *et al.*, 1992; POLLOCK *et al.*, 1991), mas também encontrada em cardiomiócitos (BALLINGAND *et al.*, 1993) e plaquetas (MEHTA *et al.*, 1995). Como a NOS I, é expressa constitutivamente e sua ativação é pela fosforilação de vários resíduos de serina através de proteínas quinases (BUTT *et al.*, 2000; DIMMELER *et al.*, 1999).

As NOS I e III constitutivas produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo. Em células endoteliais, por exemplo, estímulos como o atrito do sangue (pressão de cisalhamento), ou a ativação de receptores de membrana por agonistas como a ACh, aumentam a concentração de Ca^{2+} intracelular por aumento na produção de IP_3 e liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (BOULANGER; VANHOUTTE, 1997). Após interação com a calmodulina (CaM), o complexo Ca^{2+} /CaM ativa a NOS I ou NOS III, que

catalisam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidino da L-arginina, formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário N^o- hidroxil-L-arginina (KERWIN *et al.*, 1995; MARLETTA, 1988, 1993). O NO produzido, por sua vez, difunde-se facilmente para o músculo liso subjacente e liga-se ao grupo heme prostético da guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de 3',5' guanosina (GMPc), principal segundo mensageiro intracelular para o NO (Figura 4). Este, por ativação de uma proteína quinase dependente de GMPc (PKG), diminui a concentração intracelular de Ca²⁺ pela fosforilação e ativação da Ca²⁺-ATPase do retículo endo/sarcoplasmático. A ativação dessa bomba e conseqüente diminuição da concentração de Ca²⁺ intracelular desfosforila a quinase da miosina de cadeia leve, relaxando a musculatura lisa vascular (McDONALD; MURAD, 1996; ZHANG *et al.*, 2005). Através desse mecanismo, o NO regula o tônus, relaxando o músculo liso vascular.

Assim, o sistema endotélio/NO constitui um mecanismo vasodilatador capaz de modular continuamente a resistência vascular periférica e a pressão arterial sistêmica.

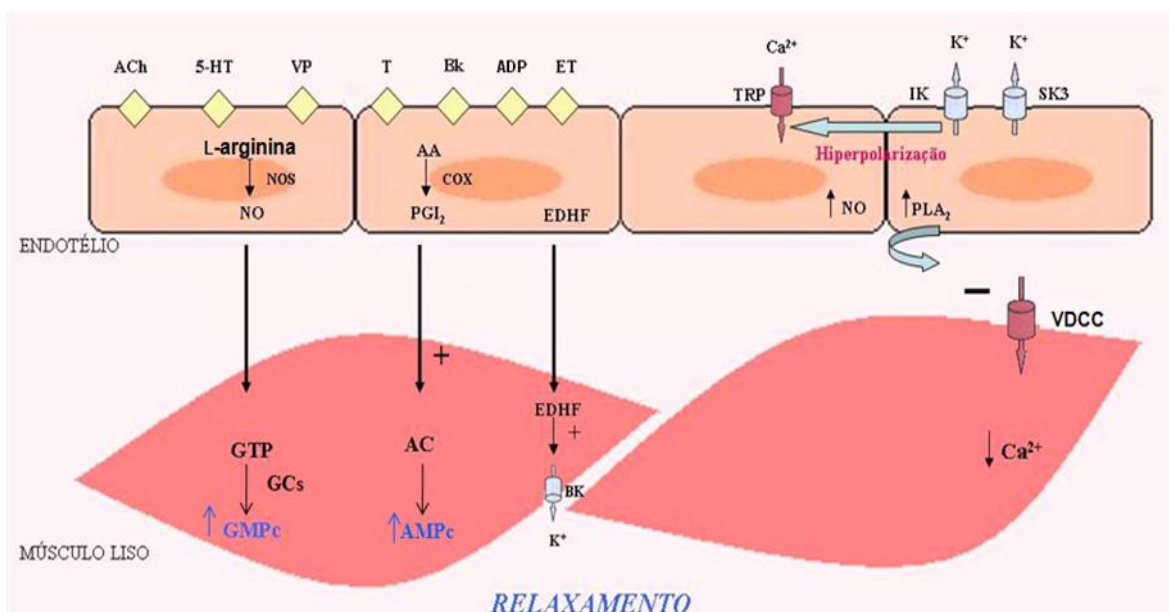


Figura 4 – Ativação de receptores endoteliais estimula a sintase do óxido nítrico (NOS) que produz óxido nítrico (NO) e a ciclooxigenase (COX), que produz prostaciclina (PGI_2) a partir do ácido araquidônico e pode levar à liberação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). O NO provoca o relaxamento por ativar a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir de trifosfato de guanosina (GTP) ativada pela guanilato ciclase solúvel (GCs). A prostaciclina (PGI_2) provoca relaxamento através da ativação da adenilato ciclase (AC), levando à formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O EDHF provoca hiperpolarização pela abertura de canais de K^+ e relaxamento vascular. A ativação dos canais de K^+ de baixa condutância (SK3) e de condutância intermediária (IK), localizados na célula endotelial leva à vasodilatação. Esses canais regulam o potencial de membrana das células endoteliais e são ativados por um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). A hiperpolarização da membrana da célula endotelial força a entrada de cálcio, possivelmente através do canal “transient receptor potencial” (TRP). Um aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eleva a produção de NO e de metabólitos do ácido araquidônico que hiperpolarizam o músculo liso vascular adjacente e, por diminuição da entrada de cálcio através de canais de cálcio dependentes de voltagem, (VDCCs) leva ao relaxamento vascular. Os mediadores neurohumorais que causam a liberação de fatores relaxantes derivados de endotélio através da ativação de receptores endoteliais específicos incluem a acetilcolina (ACh), a serotonina (5-HT), a vasopressina (VP), a trombina (T), a bradicinina (Bk), o difosfato de adenosina (ADP) e a endotelina (ET) (Adaptado de Vanhoutte, 2001)

No endotélio, a hiperpolarização da membrana não reduz o influxo de íons cálcio; ao contrário, a hiperpolarização promove o influxo de íons cálcio através de canais TRP (“Transient Receptor Potential” - TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6) cuja permeabilidade ao Ca^{2+} aumenta com o aumento do gradiente elétrico (AHMMED; MALIK, 2005; WATANABE *et al.*, 2003).

A resistência periférica e a pressão arterial são determinadas pelo estado contrátil das células do músculo liso vascular. Os vasoconstritores agem por aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, enquanto a maioria dos vasodilatadores tem efeito oposto.

No músculo liso, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é mantida principalmente pelo influxo de íons por canais de cálcio tipo L (“voltage dependent calcium channel” – VDCC), ativados pela polaridade da membrana celular. O ajuste fino do potencial de membrana é realizado pelos canais iônicos de K^+ , Cl^- e outros canais de cátions que indiretamente modulam o influxo de cálcio pelos VDCC. No músculo liso, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ depende, também, da ativação dos canais de rianodina (RyR) e dos canais de trifosfato de inositol (IP_3), presentes na membrana do retículo endo/sarcoplasmático. Por outro lado, ondas de cálcio responsáveis pela contração do músculo liso podem ativar canais de potássio dependentes de Ca^{2+} de alta condutância (BK), promovendo a hiperpolarização celular e, paradoxalmente, inativando os VDCC e inibindo a contração do músculo liso vascular (YOUNG *et al.*, 2001) (Figura 5).

A descoberta da liberação transitória e espacialmente localizada de cálcio em músculos esquelético (TSUGORKA *et al.*, 1995), cardíaco (CHENG *et al.*, 1993) e liso (NELSON *et al.*, 1995) modificou a visão geral de que a elevação homogênea do cálcio por toda a célula era necessária para uma sinalização efetiva do cálcio. No miócito vascular, por exemplo, três formas diferentes de sinalização do cálcio foram identificadas:

1. A concentração citoplasmática global de cálcio livre ($[Ca^{2+}]_i$ global): representa a média das concentrações de cálcio por todo o citoplasma; dela depende a ativação da quinase de cadeia leve de miosina e a contratilidade do músculo liso (HAI; MURPHY, 1989).

2. Ondas de propagação de cálcio (“calcium waves”) liberado pela ativação via IP_3R ou RyR : alcalinização extracelular, exposição à cafeína (HEPPNER *et al.*, 2002), ou exposição a vasoconstritores endógenos, como a noradrenalina, liberam em ondas o cálcio armazenado no retículo endoplasmático (BOITTIN *et al.*, 1999; JACOBSON *et al.*, 2003; NISHIMURA *et al.*, 1989).

3. Cálcio de liberação transitória (“calcium sparks”) resultante da ativação de $RyRs$ no retículo endo/sarcoplasmático; um único “spark” gera aumento localizado (~1% do volume celular) na $[Ca^{2+}]_i$, que pode ser elevado (10 – 100 μM) no local de ocorrência, sem que o cálcio global seja alterado (~ 2 nM) (JAGGAR *et al.*, 1998). Um “spark” de cálcio pode modular processos que não respondem a aumentos globais na $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 5).

O retorno a valores basais de Ca^{2+} depende da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), que bombeia o Ca^{2+} para dentro do RS, e da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PAMCA) que bombeia Ca^{2+} para fora da célula.

A SERCA pertence à família das ATPases tipo-P, que formam um intermediário fosforilado pela interação covalente do fosfato terminal com um resíduo aspartil do sítio catalítico. É uma enzima que utiliza energia derivada da hidrólise do ATP para transportar Ca^{2+} para o RS contra o gradiente de concentração. É regulada pela proteína endógena fosfolamban (PLB) (MARKS, 2002). A fosforilação da PLB pela proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc ou pela proteína quinase dependente de calmodulina (CaMKII), diminui a inibição da SERCA, conseqüentemente, diminui a $[Ca^{2+}]_i$ e permite o relaxamento (BRITTSAN; KRANIAS, 2000).

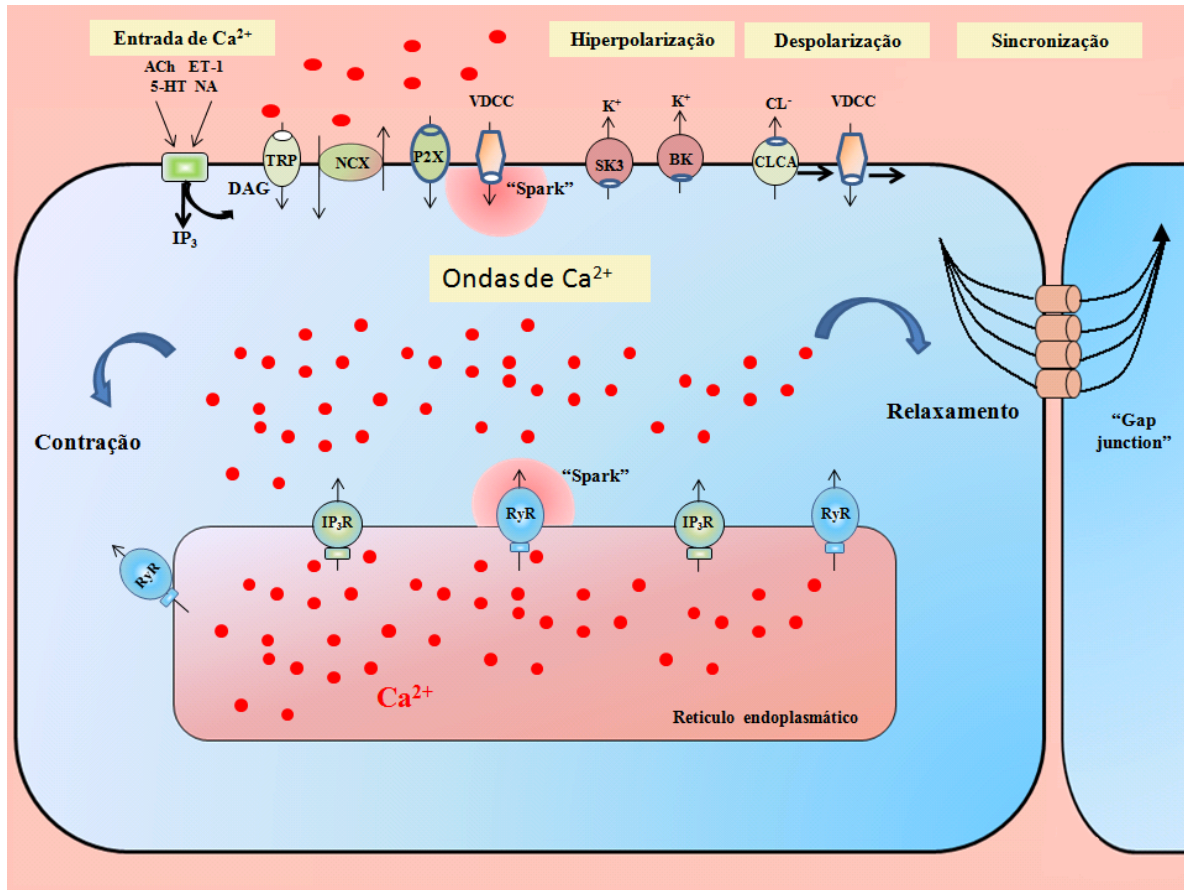


Figura 5 – Mecanismos de sinalização do cálcio em células endoteliais. Ondas de propagação de cálcio (“calcium waves”) resultantes da liberação de cálcio intracelular mediadas por receptores de IP_3 (IP_3R) ou de rianodina (RyR) podem levar à contração do músculo liso ou ativar canais de potássio ativados por Ca^{2+} de alta condutância (BK), promovendo a hiperpolarização e relaxamento do músculo liso. A liberação transitória de cálcio (“calcium sparks”) resultante da abertura de RyR s promove massiva elevação de cálcio local, modulando processos dependentes de cálcio que não são responsivos a aumentos globais na concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). (Adaptado de Berridge, 2008)

A complexa integração entre estímulos endoteliais e musculares deve ser realçada, pois, ao contrário do descrito acima para a fibra muscular lisa, uma elevação na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ da célula endotelial induz o relaxamento do músculo liso vascular adjacente. Assim, entender o ajuste da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nas células do endotélio e nas do músculo liso é essencial para explicar a ação de novas drogas na regulação da resistência periférica, na pressão arterial e na perfusão dos órgãos e tecidos (LEDOUX *et al.*, 2006).

III. Objetivos



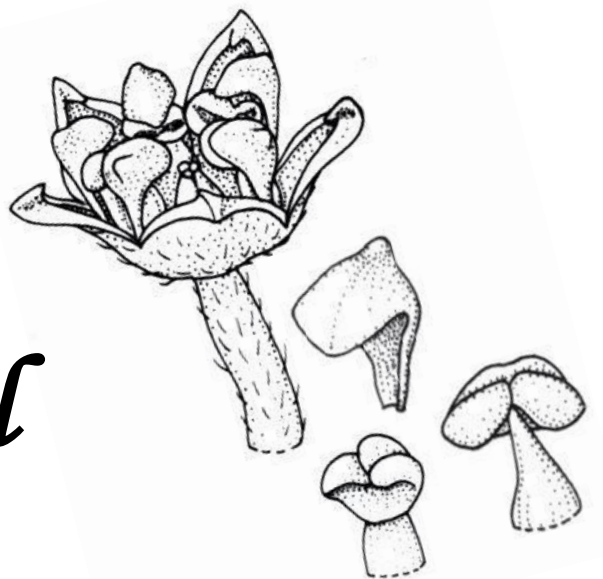
Geral:

- Avaliar a atividade farmacológica de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke nativa da região de Manacapuru-AM, em roedores.

Específicos:

- Padronizar o extrato hidroalcoólico (50%) da *A. amazonicus* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Purificar o extrato hidroalcoólico do caule e isolar os compostos biologicamente ativos mais abundantes.
- Quantificar as ações farmacológicas gerais da fração purificada e estudar os mecanismos moleculares dos efeitos mais relevantes.
- Avaliar a ação cardiovascular do extrato padronizado da *A. amazonicus* em ratos.
- Avaliar a atividade dos extratos purificados nas atividades da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de coelho e na H^+ , K^+ -ATPase da mucosa gástrica de porco.

IV. Material



4.1. Material de estudo

O caule de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke foi coletado na Comunidade Nova Esperança, Km 60 da rodovia Manoel Urbano (AM-070), Manacapuru (AM) a 03°16'33.2 de latitude e 060°32'36.5 de longitude, em outubro de 2007. Amostras das folhas e frutos foram coletadas para a confecção da exsicata, depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas sob o registro HUAM 8620 (número coletor: FEITOSA, K. B. & BARROS, F. C. F./01).

4.1.1. Extração e controle dos extratos

O material vegetal coletado foi seco à sombra durante cinco dias, moído a um tamanho não inferior a 1 mm e estocado em sacos plásticos selados e identificados.

4.1.1.1. Obtenção do extrato aquoso (EA) de *A. amazonicus*

Foram pesados 25 g do caule triturado da planta e adicionados a 1 L de água quente (72 °C) por 30 minutos. A mistura foi agitada por 3 vezes, a cada 10 minutos. O extrato foi filtrado, concentrado a vácuo e liofilizado. O rendimento foi de 10%.

4.1.1.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico (EHA) de *A. amazonicus*

Caule triturado da planta (100 g) foi extraído em etanol 50% a frio (800 mL, 3 vezes) dando origem ao extrato hidroalcoólico (EHA). Após filtração, o EHA foi concentrado em rotavapor a vácuo, até evaporação do etanol. O rendimento foi de 16%.

4.1.1.3. Obtenção da fração butanólica (FBut)

O EHA concentrado foi suspenso em 500 mL de água e extraído em funil de separação com 300 mL de butanol, por 3 vezes. A partição do EHA com n-butanol deu origem a duas frações: fração butanólica (FBut), com rendimento de 43% em relação ao EHA e a fração aquosa (FA), com rendimento de 57% (Figura 7).

4.1.2.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos aquoso (EA), hidroalcoólico (EHA) e as frações butanólica (FBut) e aquosa (FA), foram aplicados (150 µg de cada) em cromatofolhas de alumínio cobertas por sílica gel 60 F₂₅₄, e eluídos em butanol : ácido acético : água (4:1:2). A cromatoplaca foi revelada com vapor de iodo.

O EHA e o EA apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, o mesmo foi comprovado quando os extratos foram comparados em CLAE. O EHA foi escolhido para a continuação dos experimentos por apresentar maior rendimento e facilidade para concentração. A FBut apresentou seis bandas com R_fs que variaram de 0,23 a 0,6 (Figura 6).

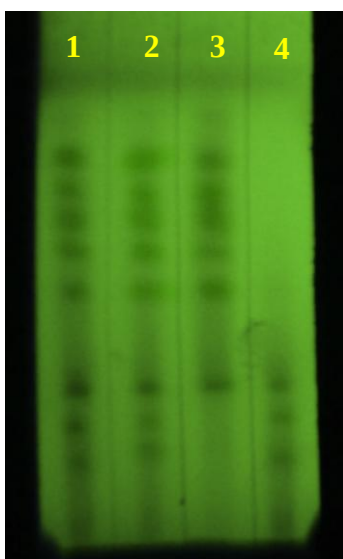


Figura 6 – Cromatografia em camada delgada em folha de alumínio sílica gel 60 F₂₅₄, eluída em butanol:ácido acético:água (4:1:2), visualizado em lâmpada UV a 254 nm. **1:** Extrato aquoso (EA); **2:** Extrato hidroalcoólico (EHA); **3:** Fração butanólica (FBut) e **4:** Fração aquosa (FA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke

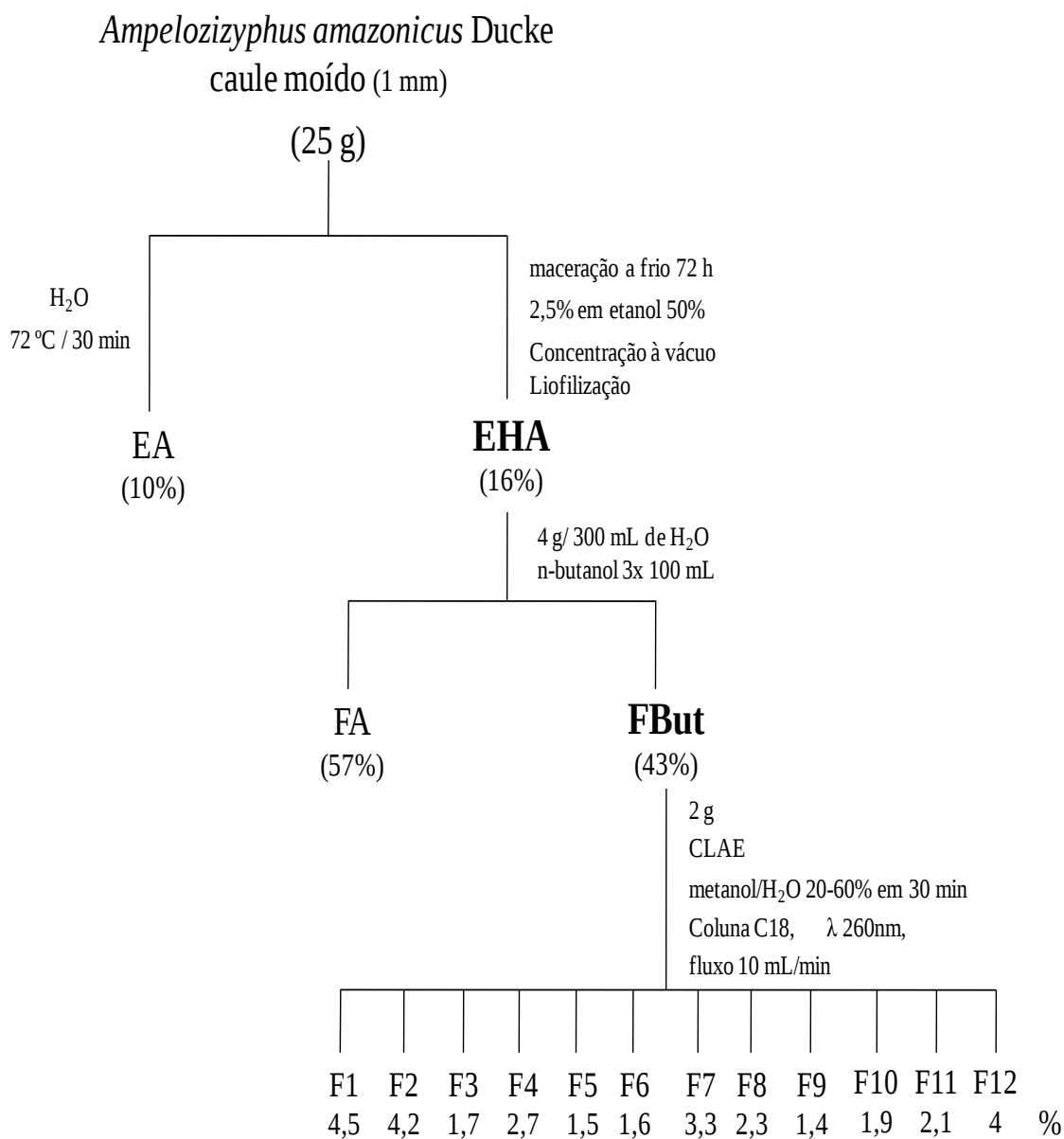


Figura 7 - Fluxograma de obtenção do extrato hidroalcoólico (EHA), fração aquosa (FA), fração butanólica (FBut) e fracionamento da FBut de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke. Os rendimentos do EHA, da FBut e das frações isoladas (F1 a F12) foram calculados em relação ao caule moído, ao EHA e à FBut, respectivamente

4.1.2. Padronização química da FBut de *A. amazonicus*

4.1.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep)

A purificação da FBut em CLAE-Prep foi realizada pela Dra. Mirtes Midori Tanae.

A FBut foi purificada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (Shimadzu – Japão) composto por 2 bombas injetoras (LC-8A), controlador (SCL-8A), integrador CR4A, coletor de frações (FCV-100B) e detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-6A), operando a 260 nm.

A fase móvel consistiu em gradiente linear de água/metanol de 20 a 60% em 30 min, em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm, em fluxo constante de 10 mL/min.

A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL, coletando-se 12 frações referentes aos picos majoritários. A purificação da FBut em CLAE-prep resultou em 12 frações com rendimentos: F1 4,5%, F2 4,2%, F3 1,7%, F4 2,7%, F5 1,5%, F6 1,6%, F7 3,3%, F8 2,3%, F9 1,4%, F10 1,9%, F11 2,1% e F12 4%.

Considerando a FBut (2 g) como 100%, a soma dos rendimentos das frações obtidas (F1 a F12) foi de 31%. Isso deve-se às perdas na concentração e liofilização das frações e, principalmente, porque foram coletados somente os picos majoritários com participação maior que 1% da área total do cromatograma. Os seis picos com maior área foram utilizados para a padronização do extrato e a proporção relativa foi confirmada até o fim dos trabalhos. As frações foram encaminhadas para análises de ^{13}C RMN e ^1H RMN para posterior identificação.

4.1.2.2. Cromatografia líquida de alta eficiência analítica das frações purificadas

A FBut e as frações isoladas de *A. amazonicus* foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas analíticas LC–

20AT, módulo de comunicação CBM-20A e detector UV-VIS SPD-10A, operando a 260 nm. O sistema estava acoplado a um computador e operado por software Shimadzu LC solution, versão 1.21, SP1.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/metanol 20 a 60% em 30 min, em coluna analítica C18 (Phenomenex – USA), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 1,0 mL/min. A amostra foi dissolvida em água/metanol 10%, filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetada no cromatógrafo em alíquota de 20 µL.

A análise por CLAE da fração butanólica de *A. amazonicus* na concentração de 2 mg/mL mostrou que a FBut é composta por um mínimo de 12 substâncias com tempos de retenção variando de 3,0 a 25,0 min (Figuras 8 e 9). Os 6 picos majoritários apresentaram tempos de retenção de 6,7; 15,0; 17,6; 19,5; 19,7; e 26,6 min com áreas 5,4; 12,1; 9,1; 3,5; 3,5 e 3,3% do total do cromatograma, respectivamente.

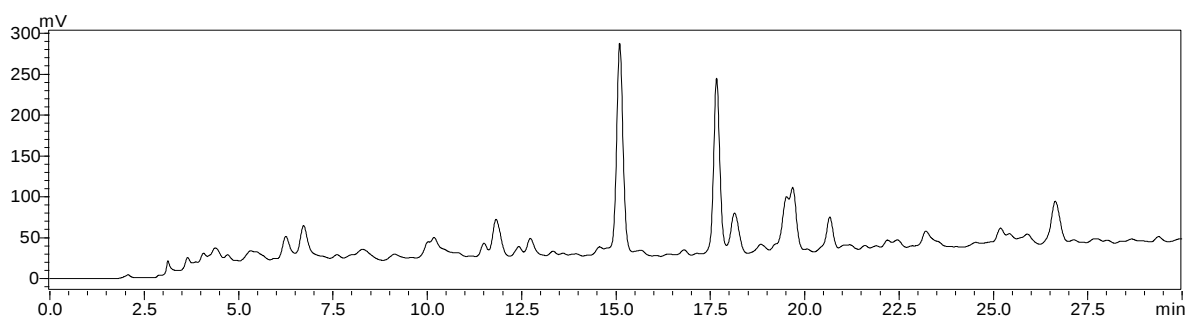


Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke em CLAE analítica, utilizando-se coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 20 a 60% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector UV-Vis operando a 260 nm

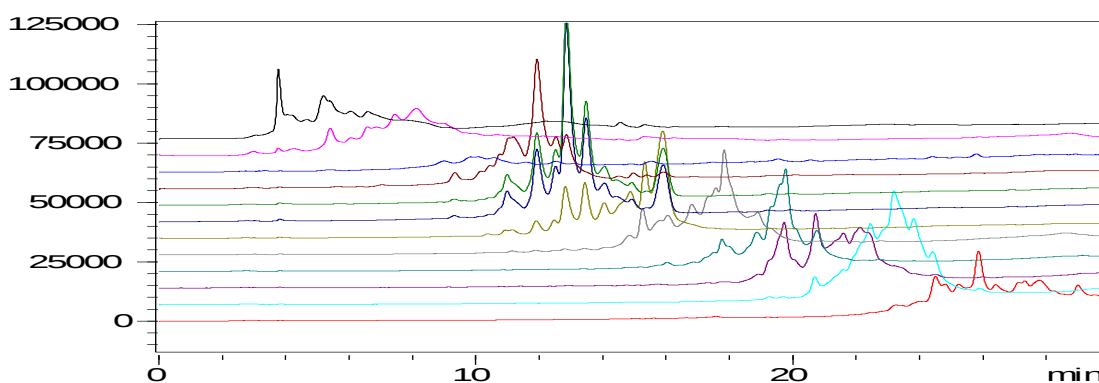


Figura 9 - Perfis cromatográficos das frações isoladas da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke em CLAE analítica, utilizando-se coluna C18, gradiente linear de água/metanol de 20 a 60% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector UV-Vis operando a 260 nm

4.1.3. Avaliação da atividade antiplasmódio da FBut padronizada de *A. amazonicus*

Os testes de avaliação da atividade antiplasmódio foram realizados pela Dra. Maria Teresa R. Lima-Landman e pela bióloga Marcela Nering da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

A informação popular de uso do *A. amazonicus* na prevenção ou no tratamento da malária (atividade primária) orientou a seleção da planta para o presente estudo farmacológico. Como alguns trabalhos anteriores utilizando a mesma informação popular e extratos obtidos em ocasiões diferentes não comprovaram o efeito antiplasmódio do *A. amazonicus* (KRETTLI *et al.*, 2001), a fração FBut padronizada foi testada *in vitro* em cultura de *Plasmodium chabaudi* e *in vivo* em camundongos Balb/C inoculados com o parasita.

Os resultados (Figura 10) mostraram que a FBut (100 mg/kg) administrada por via oral durante 4 dias, diminuiu a parasitemia de camundongos em 55%, no entanto *in vitro*, não inibiu o crescimento do *Plasmodium* como descrito por Krettli *et al.* (2001), dados não publicados da Dra M.T.R. Lima-Landman e Marcela Nering.

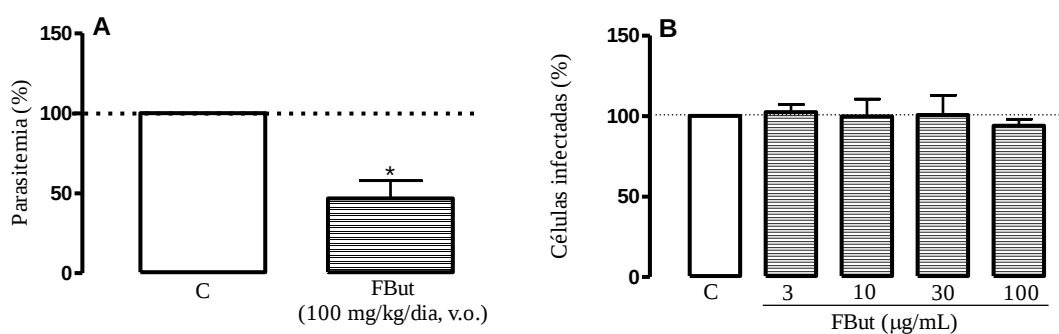


Figura 10 – Atividade antiplasmódio da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus*. **(A)** Porcentagem de células infectadas por inoculação intraperitoneal de *Plasmodium chabaudi* em camundongos Balb/C após tratamento com FBut de *A. amazonicus* (100 mg/kg/dia, v.o., 4 dias), determinada por microscopia utilizando corante de Leishman. **(B)** Porcentagem de células infectadas em cultura de sangue parasitado após incubação com FBut de *A. amazonicus* (3, 10, 30 e 100 µg/mL) por 24 h (37°C, 5% CO₂) em microplaca, determinada em citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton-Dickinson) utilizando acridina orange como corante. As colunas e barras verticais representam as médias ± erro padrão (n = 4). * difere do controle (C) p < 0,05

4.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos e fêmeas adultos (250-300 g) e camundongos Swiss adultos (30-45 g), entre 4 - 6 meses de idade, fornecidos pelo biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os animais foram alojados em número de 6 (seis) por caixa plástica e permaneceram em sala com temperatura 23 ± 1 °C, iluminação com ciclo 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. Coelhos (1,5 a 2 kg) e porcos (15 a 20 kg) foram adquiridos de fornecedores credenciados. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (CEP/UNIFESP- 0760/07).

4.3. Fármacos, reagentes e solventes

Ácido acético glacial P.A (Nuclear - Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec - Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear - Brasil), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA - Sigma - EUA), ácido etilenoglicol tetracético (EGTA-Sigma - EUA), ácido fosfórico P.A. (C.P.Q), ácido 4-morfolinopropanosulfônico (MOPS M1254, Sigma-EUA), ácido 1,4-piperazinadietanosulfônico (PIPES – Sigma), ácido sulfúrico (Nuclear - Brasil), ácido tricloroacético (Nuclear - Brasil), albumina de soro bovino (Sigma - EUA), angiotensina II (Sigma –EUA), butanol P.A. (Nuclear – Brasil), bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), bitartarato de noradrenalina (Sigma-EUA), calcimicina (Sigma-EUA), citrato de fentanila (Fentanest®-Cristália), cloreto de acetilcolina (Sigma-EUA), cloreto de d-tubocurarina (Sigma - EUA), cloreto de magnésio P.A (Merck - EUA), cloreto de potássio (Vetec - Brasil), cloreto de sódio P.A (Merck - Brasil), diazepam (Rambaxy S.A), etanol P.A (Merck - Brasil), éter etílico P.A (Nuclear -Brasil), fenoltaleína (Sigma – EUA), (fosfato bibásico de sódio (Labsynth - Brasil), fosfato monobásico de sódio (Labsynth - Brasil), glicose P.A (C.R.Q -Brasil), hidróxido de sódio (Reagen - Brasil), indometacina (Sigma - EUA), metanol grau HPLC (J. T. Baker - EUA), molibdato de amônio (Reagen - Brasil), naloxona (Sigma - EUA), N^ω-nitro-L-arginina

metil éster (Sigma-EUA), pentobarbital sódico (Sigma - EUA), sacarose P.A (Queel-Brasil), SCH 28080 (Schering-Plough), tapsigargina (Sigma-EUA), trifosfato de adenosina (Sigma - Brasil), trizma-HCl (Sigma - EUA), trizma-maleato (Sigma - EUA), uretana (Sigma-EUA).

4.4. Composição das soluções (em mM)

Gradiente de Ficol (Ficol 400, w/v): Ficol 4% e 12% em tampão PIPES/Trizma 4 mM contendo sacarose 30 mM.

Líquido nutritivo Tyrode: NaCl 135,0; KCl 5,0; MgCl₂ 1,0; NaHCO₃ 15,0; NaH₂PO₄ 1,0; CaCl₂.2H₂O 2,0; glicose 11,0. Borbulhado com carbogênio (95% de O₂+ 5% de CO₂), pH 7,4

Líquido nutritivo Tyrode despolarizante: NaCl 63; KCl 80; NaHCO₃ 15,0; NaH₂PO₄ 1,0; glicose 11,0. Borbulhado com carbogênio (95% de O₂+ 5% de CO₂), pH 7,4

Líquido nutritivo para vesícula (LNV): NaCl 138; KCl 5,7; NaHCO₃ 15; NaH₂PO₄ 0,4; CaCl₂ 1,8; glicose 5,5. Borbulhado com carbogênio (95% de O₂+ 5% de CO₂), pH 7,4

Reagente de Bradford: H₃PO₄ 85 mL; etanol 95% 50 mL; coomassie brilliant blue G-250 150 µg; água destilada q.s.p. 100 mL.

Solução I (pH 7,0): MOPS 10; sacarose 10%; EDTA 0,1

Solução II (pH 7,0): MOPS 10; KCl 0,6 M

Solução III (pH 7,0): MOPS 10; sacarose 30%

Solução ácida de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio; 23,8 mL de H₂SO₄ para um litro de água.

Solução de Krebs bicarbonato: NaCl 119,0; KCl 4,6; MgCl₂ 1,2; NaHCO₃ 15,0; NaH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,5; glicose 11,0. Borbulhado com carbogênio (95% de O₂+ 5% de CO₂), pH 7,4.

Solução tampão para lavagem (pH 6,7): manitol 120; PIPES/Trizma 4; sacarose 40; EDTA 1.

Solução tampão de homogeneização (pH 7,4): PIPES/Trizma 4; sacarose 30.

Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 140; Na₂HPO₄ 5; KH₂PO₄ 1,8.

Tris-maleato 50 mM (pH 7,4): MgCl₂ 8; KCl 120; EGTA 1; ionóforo A23187 10 µM; CaCl₂ 1,008. A mesma solução tampão foi utilizada para determinar a atividade de Mg²⁺-ATPase, excluindo-se o CaCl₂.

V. Métodos



5.1. Triagem farmacológica geral

Camundongos machos foram divididos em grupos (3/grupo): controle (tratados com água, 5 mL/kg, v.o.), experimental EHA (extrato hidroalcoólico) e experimental FBut (fração butanólica) com dose de 1 g/kg, v.o. (gavagem por cânula intragástrica). Após os tratamentos, os animais foram colocados em caixas-moradia e foi feita a análise comportamental nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas e duas semanas após os tratamentos.

O teste de observação geral (IRWIN, 1968) ou teste hipocrático (MALONE; ROBICHAUD, 1962) consistiu no preenchimento de uma tabela de acordo com a resposta comportamental animal espontânea ou a estímulos padronizados sendo observados: contorções abdominais, pêlos eriçados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, cromodacriorréia, secreção brônquica, convulsões e mortes.

5.2. Avaliação da atividade no Sistema Nervoso Central

Em todos os experimentos, grupos de camundongos (8/grupo) foram tratados com veículo (água), EHA e FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg v.o., volume máximo de 5 mL/kg, 60 minutos antes dos experimentos.

5.2.1. Avaliação da atividade hipnosedativa do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus*

5.2.1.1. Teste do sono induzido por barbitúrico (CARLINI *et al.*, 1986)

Após os tratamentos, foi administrado pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e registrou-se o tempo de indução do sono (latência) e o tempo de recuperação do reflexo postural (duração do sono) dos animais por 3 horas seguidas após a injeção do barbitúrico.

5.2.1.2. Teste do sono induzido por éter etílico

Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram rapidamente colocados em uma câmara de vidro transparente (30 cm x 20 cm de diâmetro), hermeticamente fechada, saturada com 5 mL de éter etílico e foram registrados os tempos de indução do sono (latência) e para recuperação do sono (duração).

5.2.2. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste do labirinto em cruz elevado (PELLOW *et al.*, 1985)

O labirinto em cruz elevado tem a forma de uma cruz grega de acrílico transparente com dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados opostos da mesma medida. Os braços são conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm) com uma altura de 45 cm do nível do chão (LISTER, 1990).

Após 60 min dos tratamentos, os animais foram colocados no centro da plataforma com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o comportamento foi observado durante 5 minutos. As medidas comportamentais registradas neste equipamento foram: tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados (considerou-se a entrada em um dos braços quando a maior parte do corpo do animal estava dentro do respectivo braço), medidas etológicas de avaliação de risco tais como imersões de cabeça desprotegidas (*unprotected head-dipping*), estiramentos corporais protegidos (*protected stretch-attend postures*), exploração da região distal dos braços abertos (*open-arms end activity*) e comportamento de levantar (*rearing*). Para a análise estatística dos dados e confecção dos gráficos, a porcentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas (soma das entradas nos braços abertos e fechados), e esse índice multiplicado por 100. De maneira semelhante, foi calculada a porcentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços abertos em relação ao

somatário do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Para os demais parâmetros observados, fez-se a soma simples das frequências obtidas.

5.2.3. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da suspensão pela cauda (STÉRU *et al.*, 1985)

Sessenta minutos após os tratamentos, os animais foram suspensos pela cauda a 80 cm de altura por um período de 5 minutos no qual foi observado o tempo total de imobilidade e a latência para o aparecimento deste comportamento.

5.3. Atividade em nocicepção e inflamação

5.3.1. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1985)

Ratos machos (6/grupo) foram tratados com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.; o grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Após 60 min, a formalina 1,5% foi injetada (300 µL/pata, s.pl.) na pata posterior direita de cada animal. Em seguida, os animais foram colocados em caixa de acrílico transparente e observados durante 30 minutos em dois intervalos de tempo: fase I (imediatamente após a injeção de formalina até cinco minutos) e fase II (de 15 a 30 minutos). A quantificação dos resultados (índice de nocicepção) foi obtida pela medida do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata (*licking-time*).

5.3.2. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da retirada da cauda

Neste teste, o terço inferior da cauda de camundongos machos de 3 meses (6/grupo) foi submerso na água aquecida a 55 °C por duas vezes consecutivas, sendo anotado o segundo tempo de reação, caracterizada por um movimento de flexão da cauda feito predominantemente na direção rostral. Durante a imersão, os animais foram mantidos em

contensores com a cauda exposta. Foram obtidas duas medidas basais a cada 30 minutos. Trinta minutos após a segunda medida basal, os camundongos foram tratados com FBut 0,3 g/kg, v.o.; o grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o grupo controle positivo tratado com fentanil 50 µg/kg, s.c. Naloxona (antagonista opióide) 5 mg/kg, i.p., administrada 15 minutos antes do tratamento com FBut ou fentanil, foi utilizada para analisar a possível ação tipo opióide do extrato. As leituras foram efetuadas a cada 30 minutos até duas horas após os tratamentos. Para minimizar danos tissulares, foi estabelecido tempo de corte de 15 segundos.

5.3.3. Avaliação da atividade analgésica da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da placa quente

Camundongos machos de 3 meses (6 /grupo) foram colocados individualmente em placa quente com temperatura constante (55 °C). Este estímulo desencadeia uma resposta característica: o animal troca rapidamente o apoio dos pés (“sapateia”), levanta ou lambe uma das patas. A latência para essa resposta, cronometrada em segundos, foi considerada como indicativo da intensidade da resposta nociceptiva. Foram obtidas duas medidas basais (com intervalo de 30 minutos). Após a segunda medida basal os camundongos foram tratados com FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) e o grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). A resposta foi avaliada nos intervalos de 0,5; 1; 2 e 3 horas da administração das drogas. Para minimizar danos tissulares, foi estabelecido tempo de corte de 15 segundos.

5.3.4. Avaliação da atividade analgésica da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos machos (6/grupo) foram tratados com FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu água (5 mL/kg, v.o.). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi utilizada como controle positivo. Cinquenta minutos após os tratamentos, os animais foram colocados em caixas de acrílico durante 10 minutos, para ambientação. Após esse período, foi injetado

ácido acético (0,8%, 10 mL/kg). As contorções, caracterizadas por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras, foram contadas durante os 30 minutos subsequentes em intervalos de 5 minutos.

5.3.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste do edema de pata induzido por carragenina ou dextrana

O volume das patas de ratos machos (6/grupo) foi medido pelo deslocamento de líquido em um pletismômetro digital LE 7500. Após a medida do volume basal de ambas as patas traseiras, os animais foram tratados com água (5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.). Após 60 minutos, foi injetada carragenina (1%) ou dextrana (0,1%) (300 µL/pata, s.pl.) em uma das patas traseiras e igual volume de salina 0,9% foi injetado na pata contralateral. Imediatamente após a injeção do estímulo irritante, o volume das patas foi medido, repetindo-se a cada hora até completar 5 horas da injeção da carragenina e 3 horas da dextrana. O volume do edema foi obtido pela diferença entre a pata injetada com carragenina ou dextrana e a pata injetada com salina.

5.3.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da peritonite induzida por carragenina 1%

Camundongos machos (6/grupo) foram tratados com FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) ou com veículo água (5 mL/kg, v.o.). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam injeção de carragenina 1% (0,25 mL, i.p.) e foram devolvidos às caixas com livre acesso à ração e água. Decorridas 5 horas, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Foram injetados 5 mL de PBS heparinizado (5 UI/mL, i.p.) e massageou-se o abdômen para soltura das células aderidas. O exsudato foi coletado com pipeta Pasteur através de laparotomia abdominal e após diluição da amostra em líquido de Türk (1:20), as células foram contadas em câmara de Neubauer.

5.4. Avaliação da atividade no trato gastrointestinal

5.4.1. Estudo da atividade anti-úlceras da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus*

5.4.1.1. Lesões gástricas induzidas por estresse (SENAY; LEVINE, 1967)

Camundongos (6/grupo) mantidos em jejum por 16 h e com livre acesso à água foram tratados com veículo (água, 5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.); a ranitidina (50 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo. Após uma hora dos tratamentos, os animais foram imobilizados em contêntores individuais e mantidos em câmara fria (4 °C) por duas horas. Ao final deste período, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e os estômagos removidos. O órgão foi lavado e seccionado ao longo da curvatura maior. O conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi delicadamente lavada. Os estômagos foram mantidos em salina 0,9% até inspeção. Foram determinados o índice de lesão gástrica e o número de úlceras em estereoscópio acoplado ao programa Motic Images Plus 2.0 ML de acordo com a pontuação dos parâmetros abaixo (TAKAGI *et al.*, 1969, GAMBERINI *et al.*, 1991):

PARÂMETRO	PONTUAÇÃO
- Edema	1
- Hiperemia	1
- Petéquias	
Leves (< 25% do estômago)	1
Moderadas (até 50% do estômago)	2
Intensas (> 75% do estômago)	3
- Pontos hemorrágicos	3
- Úlceras	1 x mm
- Úlcera perfurada	2 x mm
- Espessura da borda da lesão	1 x mm

5.4.1.2. Lesões gástricas induzidas por etanol (ROBERT *et al.*, 1979)

Camundongos (6/grupo) mantidos em jejum por 16 h e com livre acesso à água foram tratados com veículo (água, 5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.). Após 60 minutos, foi administrado etanol 75% (5 mL/kg, v.o.). Após uma hora da administração do etanol, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e os estômagos removidos. O órgão foi lavado e seccionado ao longo da curvatura menor. O conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi delicadamente lavada com salina 0,9%. Os estômagos foram mantidos em salina gelada até inspeção em estereoscópio. Foram determinados o índice de lesão gástrica e o número de úlceras como descrito acima.

5.4.1.3. Lesões gástricas induzidas por indometacina (DJAHANGUIRI, 1969)

Camundongos (6/grupo) mantidos em jejum por 20 h e com livre acesso à água foram tratados com veículo (água, 5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.). Após 1 hora, foi administrada indometacina (20 mg/kg, s.c.). Seis horas após a administração da indometacina, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e os estômagos removidos. O órgão foi lavado e seccionado ao longo da curvatura menor. O conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi delicadamente lavada com salina 0,9%. Os estômagos foram mantidos em salina gelada até inspeção em estereoscópio. Foram determinados o índice de lesão gástrica e o número de úlceras como descrito acima.

5.4.2. Avaliação da atividade antissecretora gástrica da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus*

5.4.2.1. Método da ligadura pilórica (VISSCHER *et al.*, 1954)

Camundongos (6/grupo) mantidos em jejum por 16 h e com livre acesso à água foram anestesiados i.p. com uma mistura de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e fixados em decúbito dorsal em placa de cortiça. Após tricotomia, foi feita uma incisão de 2 cm na região epigástrica, o estômago foi localizado e o piloro amarrado com linha. O veículo (água,

5 mL/kg), FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg) ou ranitidina (50 mg/kg) foram administrados por via intraduodenal. A parede abdominal e pele foram suturadas. Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram sacrificados sob anestesia etérea profunda. O esôfago foi pinçado para evitar a perda do material secretado e os estômagos foram removidos, lavados com água destilada, secos com papel de filtro e mantidos sobre placa de gelo. O órgão foi seccionado ao longo da curvatura menor e a mucosa lavada com 2 mL de água, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos submersos em gelo. O material foi centrifugado (1500 rpm, 30 minutos). O sobrenadante foi transferido para uma proveta e o volume medido completado para 10 mL com água destilada. A acidez livre foi determinada em pHmetro e a acidez total determinada por titulação com NaOH 0,01 N, utilizando fenolftaleína como indicador ácido – base. Os resultados foram expressos em volume (mL), pH e acidez total (mEq[H⁺]/ L / 4 h).

5.4.3. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na motilidade intestinal

5.4.3.1. Trânsito intestinal

Camundongos (6/grupo) mantidos em jejum por 16 h e com livre acesso à água foram tratados com veículo (água, 5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.); a atropina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo. Uma hora após os tratamentos, foi administrado carvão ativado (10%, 5 mL/kg, v.o.). Após 30 minutos, os animais foram sacrificados, o estômago e o intestino delgado foram removidos e mediu-se o comprimento total do intestino (da região gastropilórica até a junção ileocecal) e a distância percorrida pelo carvão, do piloro até a última porção do intestino que continha pelo menos 1 cm contínuo de carvão. A velocidade do trânsito foi expressa como % de percurso do carvão em função do comprimento total do intestino.

5.5. Avaliação de ações no sistema cardiovascular

5.5.1. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na pressão arterial de ratos

5.5.1.1. Registro indireto da pressão arterial em ratos não – anestesiados

Ratos (6/grupo) normotensos de 2,5 a 3 meses de idade receberam água (5,0 mL/kg/dia, v.o.), por 2 a 4 semanas. Após esse período, os animais foram divididos em grupo controle, que continuou recebendo água, e grupo tratado com FBut (0,3 e 1 g/kg, v.o.). A pressão sistólica foi medida com medidor de pressão LE 5002, que dispõe de um manguito e um transdutor, colocados na cauda do animal. A pressão arterial foi medida 2 vezes por semana, durante 4 semanas, sempre 1 hora após os tratamentos, pela manhã. Os animais foram mantidos a 32 °C por 10 min antes das medidas, efetuadas em triplicata. Os pesos dos animais, bem como a ingesta de água e ração foram avaliados semanalmente.

5.5.1.2. Registro da pressão arterial em ratos anestesiados

Ratos anestesiados com uma mistura de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) e uretana (600 mg/kg, i.p.) foram fixados em decúbito dorsal, canulando-se a veia ilíaca para injeção de drogas e a artéria carótida para o registro da pressão arterial. As variações pressóricas foram medidas com um transdutor de pressão e registradas em computador, utilizando software Chart 5 Pro (AD Instruments). Nessas preparações, foram obtidas curvas dose-resposta à FBut (3, 10 e 30 mg/kg, e.v.) e ao agonista padrão acetilcolina (0,1, 0,3 e 1 µg/kg, e.v.). Após a escolha da dose média da FBut, os efeitos foram comparados em doses injetadas antes e após o bloqueio com atropina (1 mg/kg, e.v.) injetada 5 minutos antes.

5.5.2. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no músculo cardíaco

5.5.2.1. Avaliação na frequência de batimentos de átrio de rato

Ratos sob anestesia etérea foram mortos por deslocamento cervical e o coração retirado rapidamente através de toracotomia. O átrio direito apresentou batimentos espontâneos e foi utilizado para verificar a ação *in vitro* da FBut sobre a frequência do marcapasso. A preparação não foi utilizada para avaliar ação inotrópica porque a força de contração é dependente e inversamente relacionada com a frequência cardíaca. O órgão foi montado em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio e ligado a um transdutor de força, sob tensão inicial de 0,5 g. Após 30 min de estabilização, a FBut foi incubada em concentrações cumulativas (10, 30; 100; 300 e 1000 µg/mL), a cada 10 minutos. Os sinais elétricos captados foram digitalizados e analisados com auxílio de software Chat 5 Pro (AD Instruments).

5.5.2.2. Avaliação da atividade na força de contração do músculo papilar de rato

Ratos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e o coração retirado rapidamente através de toracotomia. Após remoção do pericárdio, músculos papilares do ventrículo direito foram isolados. O órgão foi montado em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio e ligado a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g. As contrações musculares foram obtidas por estimulação elétrica com frequência de 1 Hz, duração de 2 ms e voltagem supramáxima. Os sinais elétricos captados foram digitalizados e analisados em software Chat 5 Pro (AD Instruments). Após 30 minutos de estabilização, a FBut foi incubada em concentrações cumulativas (10, 30; 100; 300 e 1000 µg/mL), a cada 10 minutos.

5.5.3. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na musculatura vascular

5.5.3.1. Anéis de aorta de rato pré-contráídos com noradrenalina (10^{-7} M)

Ratos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. A aorta torácica foi removida e lavada em placa de Petri contendo solução nutritiva Krebs-bicarbonato. Anéis de aproximadamente 3 mm foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba de 2 mL contendo solução de Krebs a 35 °C borbulhada com carbogênio. A integridade do endotélio foi comprovada pelo relaxamento muscular após incubação da acetilcolina 10^{-6} M. Em algumas preparações, o endotélio vascular foi removido mecanicamente com uma linha cordonê introduzida intraluminalmente. Após 45 minutos de estabilização e contração prévia com noradrenalina (10^{-7} M), foram realizadas curvas cumulativas com a FBut (10; 30; 100 e 300 µg/mL). A dependência do óxido nítrico (NO) no relaxamento produzido em anéis de aorta com endotélio foi testada na presença de L-NAME (10^{-5} M), incubado 45 minutos antes da realização das curvas.

5.5.4. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no músculo liso

5.5.4.1. Ducto deferente de rato (DDR) estimulado eletricamente

O ducto deferente foi retirado seguindo-se o protocolo anterior e colocado em placa de Petri contendo líquido nutritivo para vesícula (LNV) a 30 °C para dissecção fina e colocação das amarras. A porção prostática foi montada em cuba para órgão isolado contendo LNV carbogenado a 30 °C, sob tensão de 1,0 g e estimulada com pulsos quadrados com frequência de 1 Hz, duração de 0,5 ms e voltagem supramáxima. Após estabilização das contrações, a FBut (0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/mL) foi incubada por 30 minutos. As contrações obtidas foram digitalizadas, armazenadas e analisadas com auxílio de software Chat 5 Pro (AD Instruments).

5.5.4.2. Ducto deferente de rato (DDR)

Ratos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Após incisão à altura das bolsas escrotais, o ducto deferente foi retirado e colocado em placa de Petri contendo LNV a 30 °C. Os tecidos circunjacentes foram removidos e a luz do ducto lavada com líquido nutritivo. A porção epididimal foi montada em cuba para órgão isolado contendo Tyrode carbogenado a 30 °C, sob tensão de 1,0 g. Após 30 min de estabilização, foram realizadas curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-4} M), na ausência e na presença da FBut (0,1; 0,3 e 1 mg/mL), incubada 20 minutos antes da adição do agonista.

5.5.4.3. Jejuno de rato

Ratos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. O jejuno foi retirado e colocado em placa de Petri com líquido nutritivo a 30 °C para dissecação fina. Os tecidos circunjacentes foram removidos e a luz do jejuno lavada. Após a montagem em cuba contendo Tyrode, sob tensão de 0,5 g e estabilização do órgão, foram feitas curvas concentração-efeito cumulativas de acetilcolina (ACh, 10^{-8} a 10^{-4} M), na ausência e na presença da FBut (0,1; 0,3 e 1 mg/mL), incubado 20 minutos antes da adição do agonista.

5.5.5. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no influxo de cálcio em músculo liso

5.5.5.1. Ducto deferente despolarizado de rato

Ratos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Após incisão à altura das bolsas escrotais, o ducto deferente foi retirado e colocado em placa de Petri contendo líquido nutritivo de Tyrode modificado a 30 °C. Os tecidos circunjacentes foram removidos e a luz do ducto lavada com líquido nutritivo. A porção epididimal foi montada em cuba para órgão isolado contendo Tyrode carbogenado a 30 °C, sob tensão de 0,5 g. Após 30 min de estabilização, o líquido nutritivo foi substituído por Tyrode contendo KCl 80 mM (despolarizante) e cálcio zero nominal, permanecendo nesta condição por 30 minutos e com

renovação do líquido a cada 15 minutos. Foram obtidas curvas concentração-efeito de Ca^{2+} (10^{-5} a 10^{-1} M) na ausência e na presença da FBut (0,1; 0,3 e 1 mg/mL), incubada 20 minutos antes da adição do agonista.

5.6. Avaliação da atividade neuromuscular

5.6.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente

Ratos machos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Após sangramento da aorta abdominal, o gradeado costal foi aberto e o nervo frênico esquerdo, identificado abaixo do coração, foi seccionado na altura do timo e dissecado ao longo dos vasos da base e borda cardíaca até sua inserção no diafragma. Evitando-se trações e ressecamento do nervo, todos os ligamentos que mantinham o conjunto neuromuscular preso ao animal foram seccionados e a preparação transferida para placa de Petri contendo líquido nutritivo de Tyrode para a dissecação fina e colocação das amarras nas costelas, no centro tendíneo e no nervo. O conjunto nervo frênico/músculo diafragma foi posicionado verticalmente em uma cuba de vidro com capacidade para 5 mL, contendo líquido nutritivo à 30 °C aerado constantemente com carbogênio (O_2 95% + CO_2 5%). Para o registro das contrações, a amarra costal foi fixada a uma haste de vidro e a amarra tendínea a um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 5. O nervo foi introduzido em um eletrodo bipolar de platina e estimulado com pulsos de 0,5 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima.

As contrações por estimulação elétrica direta do diafragma foram obtidas com pulsos de 2 ms de duração, frequência de 0,5 Hz e voltagem supramáxima, através de um segundo eletrodo bipolar de platina imerso na cuba. Em músculos diafragma estimulados diretamente, o nervo frênico foi seccionado e o antagonista não despolarizante d-tubocurarina (10^{-5} M) foi incubado, bloqueando os receptores nicotínicos na junção da placa neuromuscular. Após

estabilização, a FBut (0,1; 0,3 e 1 mg/mL) foi incubada (uma concentração por preparação) e as contrações comparadas às aquelas obtidas antes da incubação.

5.7. Avaliação da atividade nas P-ATPases de mamíferos

5.7.1. Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na atividade da Ca^{2+} -ATPase

5.7.1.1. Isolamento da Ca^{2+} -ATPase

A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (SERCA 1) foi extraída dos músculos da coxa de coelho (1,5-2 kg) pelo método descrito por Kosk-Kosicka (1999). Todas as etapas foram realizadas a 4 °C. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital sódico (>100 mg/kg, i.p.) de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. Os músculos das duas coxas foram removidos, transferidos para béquer contendo EDTA 0,1 mM, dissecados e lavados com água destilada gelada. Os músculos foram cortados e homogeneizados em tampão MOPS (170 g: 510 mL solução I), pH 7,0 por 5 min e o homogenato foi centrifugado a 15.000 *g* por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em gaze e o filtrado foi centrifugado a 40.000 *g* por 90 min. O precipitado resultante foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e mantido em câmara fria por 40 min. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 15.000 *g* por 20 min e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 40.000 *g* por 90 min. O *pellet* final foi ressuspenso e homogeneizado em homogeneizador de vidro e o material foi conservado em freezer a -80 °C até a realização dos ensaios de atividade enzimática. O teor de proteína da preparação membranar foi determinado pelo método de Bradford (1976).

5.7.1.2. Medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase

As medidas da atividade da Ca^{+2} -ATPase foram feitas de acordo com o método de Fiske e Subbarow (1925) adaptado para leitor de microplaca, utilizando microplacas transparentes de fundo chato de 96 poços. A velocidade de hidrólise enzimática do ATP foi

determinada colorimetricamente por quantificação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP em função do tempo (MURAKAMI *et al.*, 1992). As amostras membranares contendo 0,6 µg de proteína preparadas em tampão Tris-maleato 50 mM foram incubadas na ausência e na presença de FBut (3 a 100 µg/mL) em volume final de 75 µL por poço. A reação foi iniciada com a adição de 7,5 µL de ATP 30 mM durante 10 min de incubação a 37 °C. A reação foi interrompida com 25 µL de TCA 50% gelado. Adicionou-se 200 µL de solução de molibdato de amônio (15 mL para 0,36 g de ácido ascórbico, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37 °C por 10 minutos. Amostras contendo tapsigargina (0,01 a 1 µM) foram utilizadas como controle positivo. As leituras das absorbâncias foram feitas a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

5.7.2. Avaliação da ação da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na atividade da H^+-K^+ -ATPase

5.7.2.1. Isolamento de microsomas gástricos e da H^+-K^+ -ATPase gástrica

As membranas contendo H^+-K^+ -ATPase foram obtidas da fração microsomal extraída da mucosa gástrica de suíno pelo método descrito por Rabon *et al.* (1988). O animal foi adquirido de fornecedor credenciado e sacrificado de acordo com as normas. O estômago foi removido, seccionado ao longo da curvatura menor, lavado com PBS gelado e transferido para um béquer contendo tampão de homogeneização. O fundo do estômago foi dissecado e estendido em placa de vidro sobre gelo, o muco foi removido e as glândulas gástricas foram isoladas. O material foi homogeneizado em homogeneizador de vidro contendo tampão de homogeneização (20 – 30 mL) a 3000 rpm. O homogenato foi centrifugado a 13000 g por 15 minutos, o *pellet* foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 g por 60 minutos. O *pellet* (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão de homogeneização (18 mL), aplicado em gradiente de Ficoll e sacarose (4% e 12%) e centrifugado a 24.000 rpm por 60 minutos. A

fração contendo a $H^+-K^+-ATPase$ foi coletada na interface do Ficol 12%, ressuspensa em tampão de homogeneização (6 mL) contendo sacarose 30% e homogeneizada em homogeneizador de vidro. Os microsomas gástricos foram conservados em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios e o teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

5.7.2.2. Medida da atividade da $H^+-K^+-ATPase$ gástrica

Para as medidas da atividade da $H^+-K^+-ATPase$ gástrica, amostras microsomais (0,9-1 μg) foram incubadas em tampão Tris-HCl 50 mM, contendo ouabaína 1 mM (para inibir a $Na^+,K^+-ATPase$ presente no homogenato) em volume final de 100 μL . Foram usadas microplacas transparentes de 96 poços. A FBut foi testada em triplicata nas concentrações de 3 a 100 $\mu\text{g/mL}$. A reação foi iniciada adicionando-se 20 μL de ATP 5 mM e incubando-se as amostras a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μL de TCA 50% a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionou-se às amostras 200 μL de solução ácida de molibdato de amônio (0,36 g de ácido ascórbico para 15 mL de solução, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37°C por 10 minutos. Para controle positivo foram feitas determinações da atividade enzimática em amostras contendo o antagonista específico da $H^+-K^+-ATPase$, SCH 28080 (3 a 1000 μM).

A leitura das absorbâncias foi feita a 820 nm em leitor de placa (Spectramax M2 - Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol Pi/ mg proteína / min}$.

5.7.3. Determinação do teor de proteína

A concentração de proteínas das amostras membranares foi determinada pelo método de Bradford (1976). O método baseia-se na mudança de coloração vermelha do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250, presente no reagente de Bradford, para coloração azul após sua ligação à proteína das amostras. As determinações foram feitas em triplicata e as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu) a 595 nm. A

concentração de proteína foi determinada por interpolação da curva padrão obtida com albumina de soro bovino (1 a 8 µg/mL).

5.8. Análise estatística

Os resultados das experiências *in vivo* e *in vitro* foram expressos como médias $\pm$ erro padrão e a significância estatística relativamente ao grupo controle foi determinada pelo test *t* de Student (para comparação de 2 grupos) ou por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls, Bonferroni ou Dunnett (para comparar mais de 2 grupos). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.



VI. Resultados

6.1. Triagem farmacológica geral

No teste geral de atividades, o extrato hidroalcoólico (EHA) e a fração butanólica (FBut) foram administrados inicialmente em dose única elevada de 1 g/kg, v.o. Os camundongos tratados (n = 3) apresentaram alguns sinais de ação farmacológica do extrato e da fração: houve diminuição na deambulação, no número de auto-limpeza e levantadas em relação ao grupo controle tratado apenas com água (5 mL/kg, v.o.) até as duas horas iniciais após o tratamento. Sinais de ataxia, incoordenação motora, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos não foram registrados em nenhum período de observação; tampouco foram observados sinais de alteração autonômica, como: salivação, lacrimejamento, defecação aumentada ou de consistência pastosa. Não houve morte dos animais tratados com EHA e FBut, demonstrando que estes não foram tóxicos na dose testada (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico (EHA) e fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (1 g/kg, v.o.) no teste hipocrático em camundongos

Comportamento (SNC)	
Estimulante	Sem efeito (0)
Depressora	Menor deambulação (++) Até 2 h após tratamento
Outros	menor auto-limpeza (+) levantadas (++) Até 2 h após tratamento
SNA	Sem efeito (0)
Morte	Ausente Até 24 h após tratamento

Quantificação: (-) inibição (0) sem efeito observável (+) efeito presente (++) efeito intenso

Observações realizadas 30 min, 1, 2, 3, 4 e 24 h após o tratamento

6.2. Sistema Nervoso Central

6.2.1. Avaliação da atividade hipnosedativa

6.2.1.1. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de *A. amazonicus* no teste do sono induzido por barbitúrico

A injeção de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) nos camundongos do grupo controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) produziu sono com latência de $5,3 \pm 0,1$ minutos e duração de $42,5 \pm 4,3$ minutos.

O tratamento prévio dos camundongos com EHA 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., uma hora antes da injeção do pentobarbital, diminuiu a latência para o sono para $3,4 \pm 0,1$; $3,1 \pm 0,1$ e $3,0 \pm 0,4$ minutos, respectivamente. Nesses animais, a duração do sono foi de $61,2 \pm 3,1$; $60,1 \pm 3,2$ e $75,1 \pm 7,3$ minutos. Apenas o sono dos animais tratados com a maior dose do EHA foi maior que o do grupo controle.

O diazepam 1 mg/kg, v.o., utilizado como controle positivo do teste, diminuiu a latência para $2,6 \pm 0,5$ minutos e aumentou a duração do sono para $117,7 \pm 24,6$ minutos, comparativamente aos controles (Figura 11).

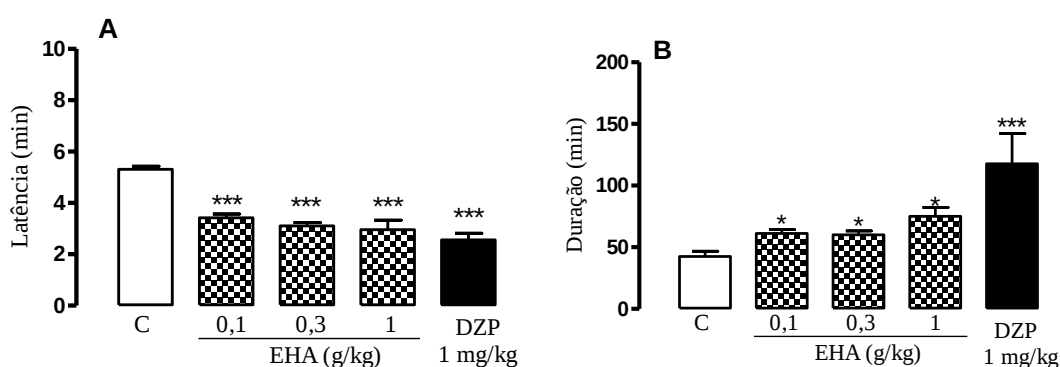


Figura 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. **A** – latência para indução do sono (min); **B** – duração do sono (min). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.2.1.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste do sono induzido por barbitúrico

A injeção de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) nos camundongos do grupo controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) produziu sono com latência de $5,3 \pm 0,1$ minutos e duração de $42,5 \pm 4,3$ minutos.

O tratamento prévio dos camundongos com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., uma hora antes da injeção do pentobarbital diminuiu a latência para o sono para $3,4 \pm 0,1$; $3,4 \pm 0,1$ e $3,1 \pm 0,1$ minutos, respectivamente. Nesses animais, a duração do sono foi de $62,7 \pm 6,3$; $54,8 \pm 4,4$ e $75,0 \pm 7,8$ minutos. Apenas o sono dos animais tratados com a maior dose da FBut foi maior que o do grupo controle.

O diazepam (1 mg/kg, v.o.) utilizado como controle positivo do teste diminuiu a latência para $2,6 \pm 0,5$ minutos e aumentou a duração do sono para $117,7 \pm 24,6$ minutos comparativamente aos controles (Figura 12).

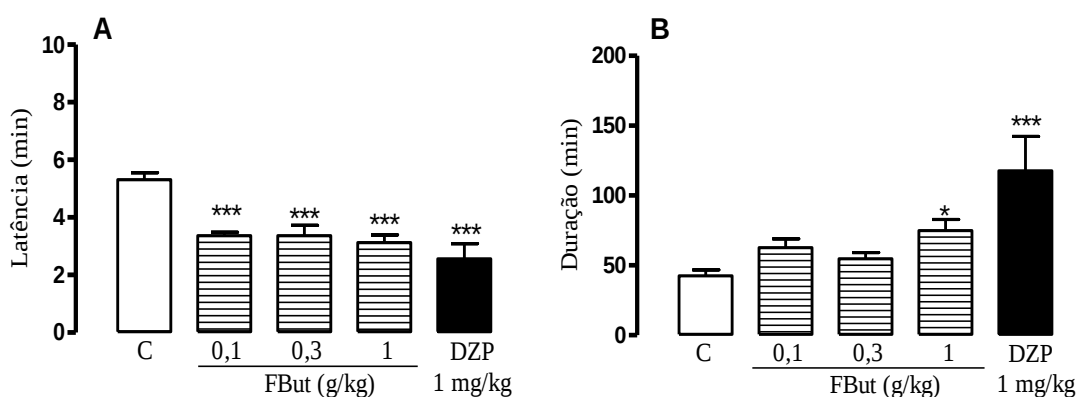


Figura 12 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. **A** – latência para indução do sono (min); **B** – duração do sono (min). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * p < 0,05 e ***p < 0,001 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.2.1.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste do sono induzido por éter etílico

A exposição ao éter etílico nos camundongos do grupo controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) produziu sono com latência de $25,6 \pm 1,7$ segundos e duração de $58,6 \pm 5,6$ segundos.

O tratamento prévio com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., uma hora antes da exposição ao éter etílico diminuiu a latência para o sono para $22,4 \pm 1,6$; $18,8 \pm 1,2$ e $17,4 \pm 1,3$ segundos, respectivamente. Nesses animais, a duração do sono foi $95,9 \pm 14,6$; $91,6 \pm 12,4$ e $106,9 \pm 4,2$ segundos, respectivamente. Nos animais tratados com as doses de 0,3 e 1g/kg da FBut a duração do sono foi maior que a do grupo controle (Figura 13).

O diazepam (1 mg/kg, v.o.), utilizado como controle positivo do teste, diminuiu a latência ao sono para $20,0 \pm 0,8$ segundos e aumentou a duração do sono para $136,5 \pm 10,9$ segundos, comparativamente ao controle.

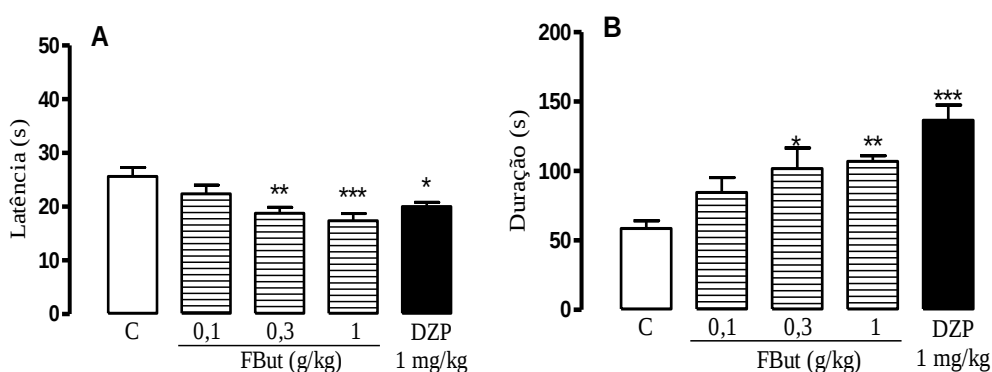


Figura 13 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos. **A** - latência para indução do sono e **B** - duração do sono. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * p < 0,05, ** p < 0,01 *** p < 0,001 (ANOVA seguida do teste de Dunnett)

6.2.2. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de *A. amazonicus* no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Em camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) e colocados no LCE a frequência total de entradas (soma das entradas nos braços fechados e nos braços abertos) foi $8,0 \pm 0,9$ entradas nos braços/5 minutos e o tempo total (soma do tempo nos braços fechados e nos braços abertos) foi $248,9 \pm 7,5$ segundos/5 minutos. A frequência de entrada e o tempo nos braços abertos foram $7,5 \pm 3,0\%$ da frequência total de entradas/ 5 minutos e $1,3 \pm 0,7\%$ do tempo total/5 minutos. O tempo de permanência na plataforma de interseção foi de $45,5 \pm 9,5$ segundos/5 minutos. Os parâmetros de atividade exploratória foram $19,4 \pm 2,1$ estiramentos/ 5 minutos e $8,3 \pm 1,4$ imersões de cabeça / 5 minutos.

Em camundongos tratados previamente com EHA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) a frequência total de entradas foi $10,0 \pm 0,9$; $11,0 \pm 1,2$ e $10,5 \pm 1,2$ entradas nos braços/5 minutos. A frequência de entrada nos braços abertos foi $19,0 \pm 7,5$; $8,1 \pm 2,7$ e $4,4 \pm 2,5\%$ do total de entradas/5 minutos, respectivamente. O tempo total nos braços foi $216,3 \pm 5,0$; $197,3 \pm 11,0$ e $206,4 \pm 9,8$ segundos/5 minutos. O tempo de permanência nos braços abertos com as mesmas doses foi $6,9 \pm 3,4$; $4,1 \pm 1,8$ e $2,8 \pm 1,5\%$ do tempo total/5 minutos, respectivamente, e não diferiu do grupo controle (Figura 14).

O controle positivo diazepam (1 mg/kg, v.o.) aumentou a frequência de entrada nos braços abertos para $31,7 \pm 9,0\%$ da frequência total de entradas/5 minutos e o tempo de permanência foi de $9,4 \pm 3,1\%$ do tempo total/5 minutos.

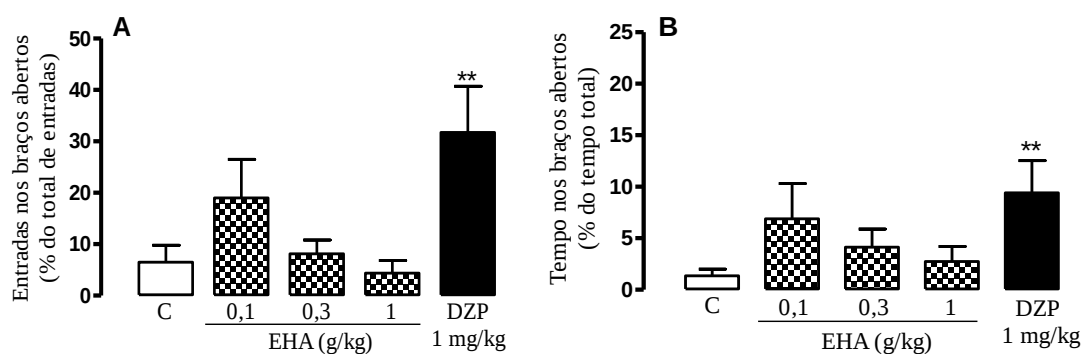


Figura 14 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. **A** - frequência de entrada nos braços abertos do LCE (em % do total de entradas nos braços abertos e fechados) e **B** - tempo nos braços abertos (% do tempo total nos braços abertos e fechados). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

O tratamento com EHA (0,1; 0,3 e 1 g/kg) aumentou significativamente o tempo de permanência no centro da plataforma para $83,8 \pm 14,0$; $104 \pm 32,5$ e $93,6 \pm 27,6$ segundos /5 minutos, respectivamente. Todas as doses foram maiores que o controle (Figura 15).

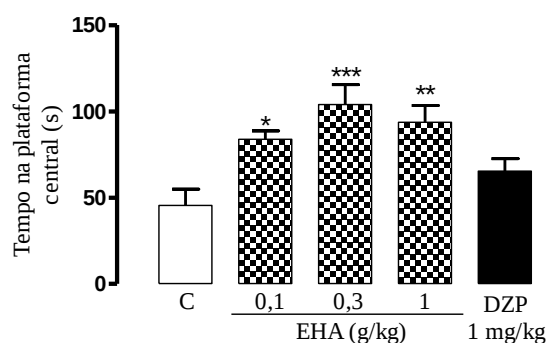


Figura 15 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no tempo de permanência na plataforma central do labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

Camundongos tratados com EHA 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o. apresentaram $20,1 \pm 1,2$; $26,8 \pm 1,2$ e $24,8 \pm 1,9$ estiramentos/ 5 minutos, respectivamente. Somente a dose intermediária (0,3 g/kg) aumentou 14% o número de estiramentos em relação ao grupo controle. Nessas mesmas doses de EHA, os camundongos apresentaram $16,1 \pm 2,6$; $23,0 \pm 1,7$ e $23,9 \pm 3,8$ imersões de cabeça/5 minutos. As doses maiores aumentaram esse parâmetro em 177% e 187%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 16).

O grupo tratado com o controle positivo diazepam (1mg/kg, v.o.) apresentou $17,4 \pm 3,7$ estiramentos/5 minutos e $30,2 \pm 11,1$ imersões de cabeça/5 minutos.

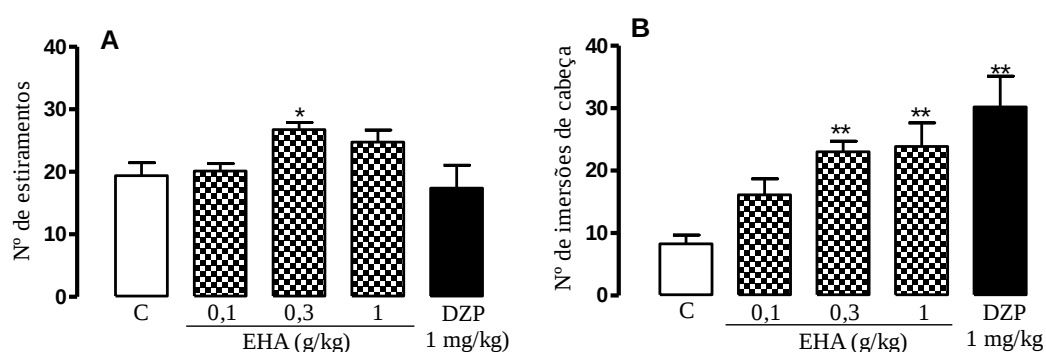


Figura 16 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. **A** - estiramentos e **B** - imersões de cabeça. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.2.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste do labirinto em cruz elevado (LCE)

Em camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) e colocados no LCE a frequência total de entradas (soma das entradas nos braços fechados e nos braços abertos) foi $8,0 \pm 0,9$ entradas nos braços/5 minutos e o tempo total (soma do tempo nos braços fechados e nos braços abertos) foi $248,9 \pm 7,5$ segundos/5 minutos. A frequência de entrada e o tempo nos braços abertos foram $7,5 \pm 3,0\%$ da frequência total de entradas/ 5 minutos e $1,3 \pm 0,7\%$ do tempo total/5 minutos. O tempo de permanência na plataforma de interseção foi de $45,5 \pm 9,5$ segundos/5 minutos. Os parâmetros de atividade exploratória foram $19,4 \pm 2,1$ estiramentos/ 5 minutos e $8,3 \pm 1,4$ imersões de cabeça / 5 minutos.

Em camundongos tratados previamente com FBut (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) a frequência total de entradas foi $10,8 \pm 0,5$; $10,5 \pm 0,9$ e $10,1 \pm 1,0$ entradas nos braços/5 minutos. A frequência de entrada nos braços abertos foi $21,0 \pm 3,8$; $34,4 \pm 4,4$ e $19,2 \pm 6,5\%$ do total de entradas/5 minutos, respectivamente. A dose intermediária (0,3 g/kg) aumentou 27% em relação ao controle. O tempo total nos braços foi $238,4 \pm 6,7$; $227,8 \pm 9,2$ e $220,6 \pm 13,1$ segundos/5 minutos. O tempo de permanência nos braços abertos com as mesmas doses foi $67,1 \pm 2,1$; $12,1 \pm 2,6$ e $5,5 \pm 3,0\%$ do tempo total/5 minutos, respectivamente. A dose intermediária foi 11% maior que o controle (Figura 17).

O controle positivo diazepam (1 mg/kg, v.o.) aumentou a frequência de entrada nos braços abertos para $31,7 \pm 9,0\%$ da frequência total de entradas/5 minutos e o tempo de permanência foi de $9,4 \pm 3,1\%$ do tempo total/5 minutos.

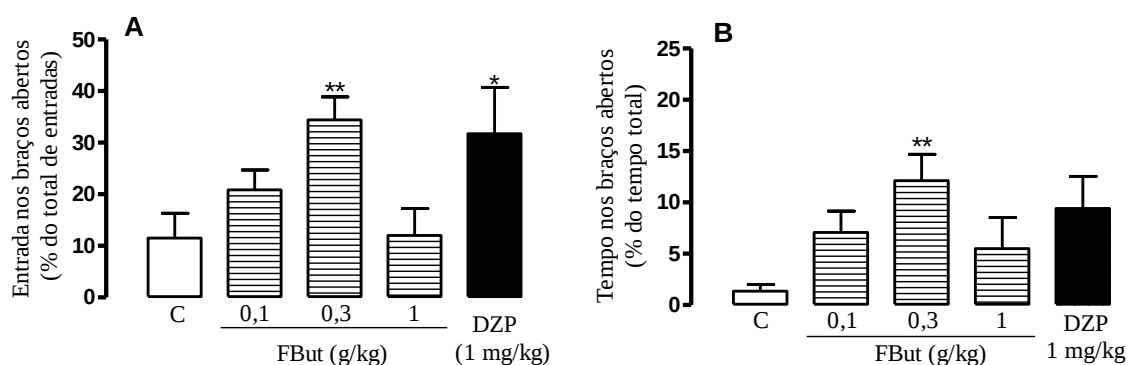


Figura 17 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. **A** - frequência de entrada nos braços abertos do LCE (% do total de entradas nos braços abertos e fechados) e **B** - tempo nos braços abertos (% do tempo total nos braços abertos e fechados). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

Camundongos tratados com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg permaneceram na plataforma de intersecção por $56,3 \pm 9,98$; $79,6 \pm 6,4$ e $79,4 \pm 13,1$ segundos, respectivamente. Estes valores não diferiram do grupo controle (Figura 18).

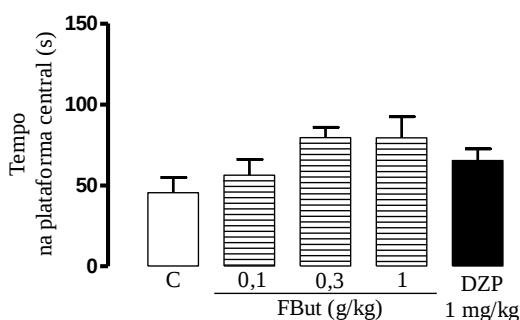


Figura 18 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no tempo de permanência na plataforma central (s) do labirinto em cruz elevado, em camundongos.. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). ANOVA seguida pelo teste de Dunnett

Camundongos tratados com FBut (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) apresentaram $19,6 \pm 1,1$; $18,3 \pm 0,9$ e $24,6 \pm 0,9$ estiramentos corporais/5 minutos, respectivamente. Estes resultados não diferiram significativamente do grupo controle. Com as mesmas doses esses animais apresentaram $16,5 \pm 2,0$; $17,4 \pm 1,0$ e $12,0 \pm 1,5$ imersões de cabeça/5 minutos. As doses menores aumentaram as imersões em 99% e 109%, em relação ao grupo controle (Figura 19).

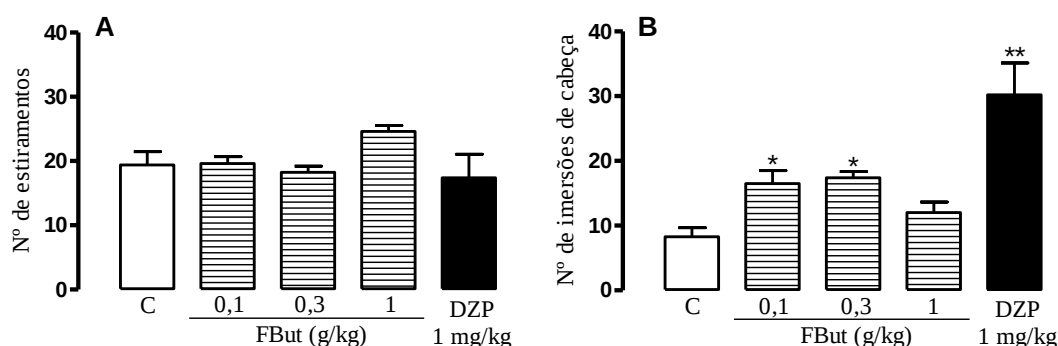


Figura 19 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos, em camundongos. **A** - estiramentos e **B** - imersões de cabeça. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.2.4. Efeito do extrato hidroalcoólico (EHA) de *A. amazonicus* no teste da suspensão pela cauda

O grupo controle apresentou latência para imobilidade de $78,6 \pm 17,1$ segundos, permanecendo imóvel por $49,5 \pm 8,7$ segundos em 5 minutos de observação.

O tratamento prévio com EHA 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o. diminuiu a latência para $39,6 \pm 4,0$; $28,3 \pm 4,6$ e $18,4 \pm 1,6$ segundos, respectivamente. Estes valores foram 50%, 64% e 77% menores que dos animais controles.

Nestes animais o tempo de imobilidade foi $69,9 \pm 8,7$; $84,9 \pm 7,3$ e $99,3 \pm 17,2$ segundos, respectivamente, sendo 2 vezes maior com 1 g/kg, em relação ao controle (Figura 20).

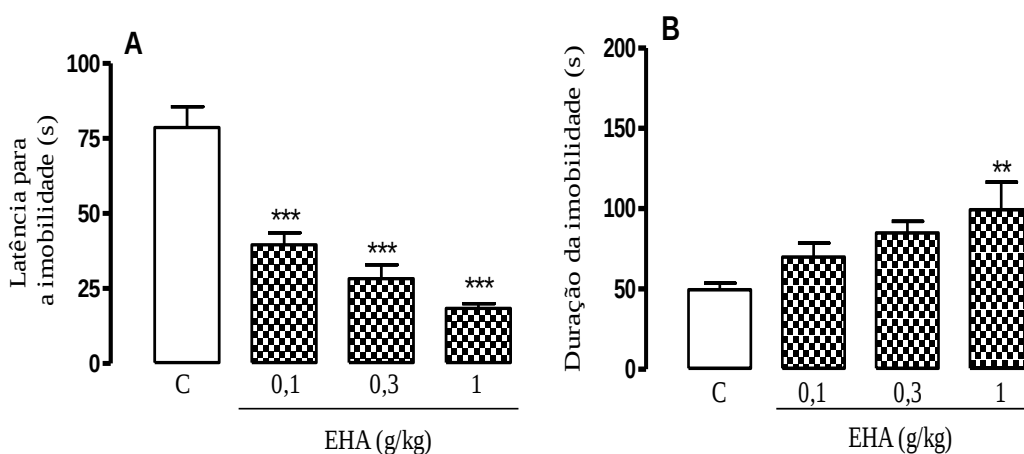


Figura 20 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato hidroalcoólico (EHA) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste de suspensão pela cauda, durante 5 minutos, em camundongos. **A** – latência (s) e **B** - duração da imobilidade (s). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.2.5. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da suspensão pela cauda

O grupo controle apresentou latência para imobilidade de $78,6 \pm 17,1$ segundos, permanecendo imóvel por $43,2 \pm 5,0$ segundos em 5 minutos de observação.

O tratamento prévio com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o. diminuiu a latência para $47,6 \pm 4,3$; $33,2 \pm 3,2$ e $27,4 \pm 2,3$ segundos, respectivamente. Estes valores foram 39%, 58% e 65% menores que dos animais controles, respectivamente.

Nestes animais, o tempo de imobilidade foi $75,1 \pm 12,9$; $115,7 \pm 29,7$ e $140,6 \pm 21,8$ segundos, respectivamente. Com as doses de 0,3 e 1 g/kg foram 134% e 184% maiores que dos animais controle, respectivamente (Figura 21).

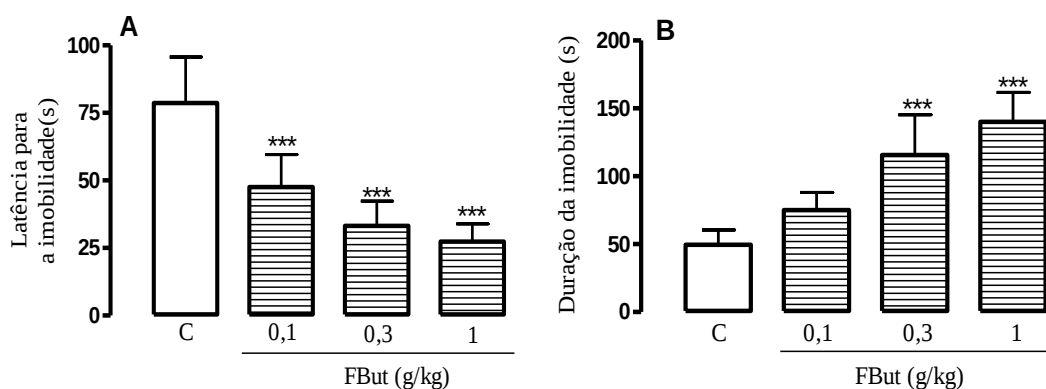


Figura 21 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste de suspensão pela cauda, durante 5 minutos, em camundongos. **A** – latência (s) e **B** – duração da imobilidade (s). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.3. Avaliação da atividade em nocicepção e inflamação

6.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da formalina 1,5%

1,5%

Em ratos tratados com água (5 mL/kg, v.o.), o tempo de lambedura da pata na primeira fase do teste (0-5 minutos) foi $105,7 \pm 8,3$ segundos e na segunda fase (15-30 minutos) foi de $154,4 \pm 17,4$ segundos.

O tratamento prévio com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o. diminuiu o tempo de lambedura da pata na primeira fase para $89,8 \pm 7,1$; $65,3 \pm 4,9$ e $67,1 \pm 6,9$ segundos, respectivamente. Com as maiores doses, a diminuição foi de 38% e 36%, respectivamente, comparativamente aos animais controles.

Na segunda fase do teste, o tempo de lambedura foi reduzido para $124,3 \pm 14,7$; $94,0 \pm 14,5$ e $94,8 \pm 7,9$ segundos, respectivamente. Com as maiores doses os tempos foram 39% menores que dos animais controles (Figura 22).

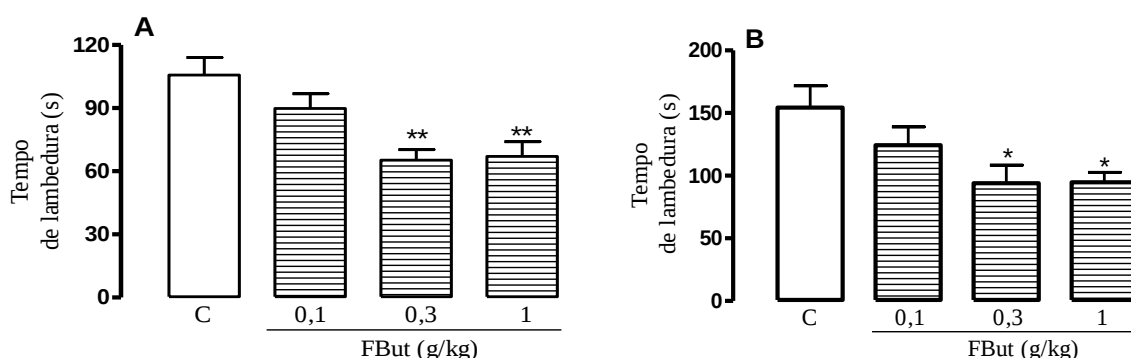


Figura 22 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1,0 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5%, em ratos. **A** - tempo de lambedura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (cinco animais/grupo). * p < 0,05 e **p < 0,01 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.3.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da retirada da cauda

Em camundongos controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) a latência basal de reação ao estímulo térmico (55 °C) foi $2,9 \pm 0,1$ segundos ($n = 6$) e $2,7 \pm 0,3$; $2,9 \pm 0,1$; $2,7 \pm 0,3$ e $2,9 \pm 0,3$ segundos após 30, 60, 90 e 120 minutos após o tratamento.

Camundongos tratados previamente (1 h antes) com a FBut de *A. amazonicus* 0,3 g/kg, v.o. apresentaram latência basal de $3,0 \pm 0,2$ s. Após o tratamento a latência foi aumentada após 1,5 h para $5,6 \pm 0,7$ s (Figura 23). O fentanil (50 µg/kg, s.c.) aumentou a latência para a retirada da cauda para $10,0 \pm 1,9$; $7,2 \pm 1,7$; $5,2 \pm 0,6$ após 0,5; 1 e 1,5 horas, respectivamente.

A administração prévia de naloxona (5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com FBut ou fentanil, bloqueou a resposta ao fentanil, mas não à FBut.

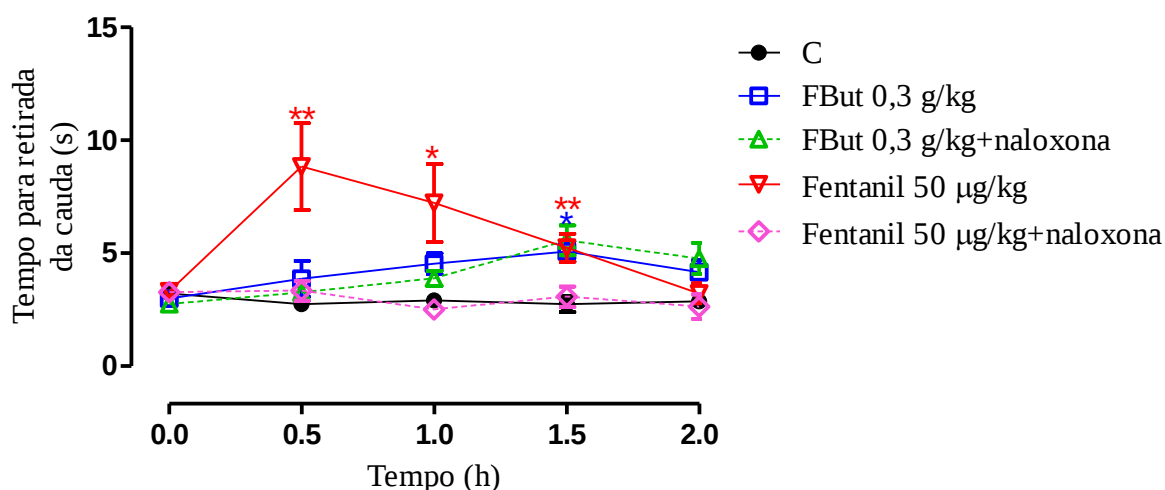


Figura 23 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,3 g/ kg, v.o.) no teste da retirada da cauda, em camundongos. Grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e controle positivo fentanil (50 µg/kg, s.c.). Naloxona (5 mg/kg, i.p.). Os pontos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.3.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no teste da placa quente

Em camundongos controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) a latência basal de reação ao estímulo térmico (55 °C) foi $4,7 \pm 0,5$ segundos ($n = 6$) e $4,8 \pm 0,4$; $4,3 \pm 0,6$; $4,3 \pm 0,5$ e $3,7 \pm 0,4$ segundos após 30, 60, 120 e 180 minutos após o tratamento.

Camundongos tratados previamente (1 h antes) com a FBut de *A. amazonicus* 0,3 g/kg, v.o., apresentaram latência basal de $4,8 \pm 0,5$ s. Após o tratamento a latência foi aumentada para $7,8 \pm 0,7$; $7,5 \pm 0,7$; $8,6 \pm 1,8$ e $5,4 \pm 0,7$ após 0,5; 1; 2 e 3 horas, respectivamente (Figura 24).

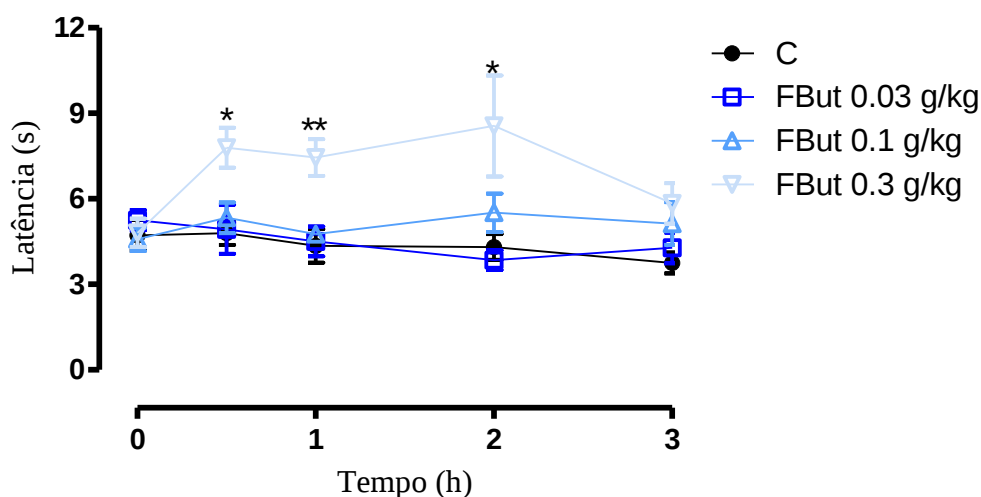


Figura 24 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da placa quente (55 °C), em camundongos. Grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e controle positivo fentanil (50 µg/kg, s.c.). Os pontos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)

6.3.4. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* nas contorções abdominais induzidas por ácido acético à 0,8%

Em camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) o número de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,8%, 10 mL/kg, i.p.) foi $7,0 \pm 2,1$; $22,8 \pm 2,8$; $18,4 \pm 1,8$; $14,0 \pm 2,3$; $12,6 \pm 2,9$ e $10,4 \pm 2,2$ após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção, respectivamente.

O tratamento prévio com FBut 0,1 g/kg, v.o., inibiu o número de contorções em 39%, 41%, 49%, 70% e 70% nos intervalos de 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de ácido acético (0,8%), respectivamente (Figura 25). Os camundongos tratados com FBut 0,3 g/kg, v.o., apresentaram redução do número de contorções de 59 e 45% nos intervalos de 10 e 15 minutos.

A indometacina (10 mg/kg, v.o.) diminuiu o número de contorções de 51 a 68% durante todo o experimento.

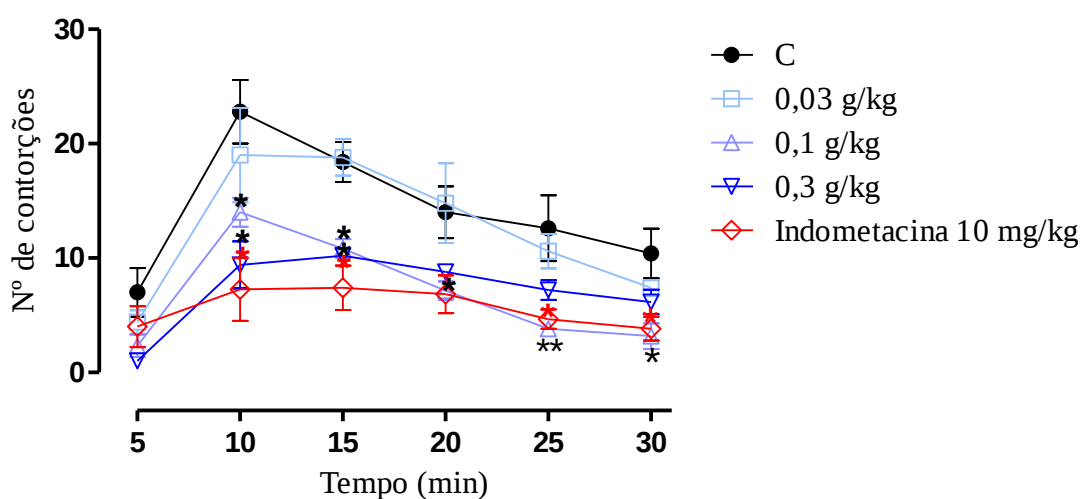


Figura 25 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%) em camundongos. Controle positivo tratado com indometacina 10 mg/kg, v.o. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)

6.3.5. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no edema de pata induzido por carragenina 1%

O volume médio das patas dos animais imediatamente após a injeção de carragenina foi $2,2 \pm 0,01$ mL ($n = 6$). A injeção subplantar de carragenina 1% produziu reação edematogênica aguda progressiva atingindo pico máximo após 3 horas. Nos animais controle, o aumento do volume das patas injetadas com o agente flogístico em relação às patas contralaterais foi de $0,1 \pm 0,01$; $0,5 \pm 0,01$; $0,7 \pm 0,01$; $1,1 \pm 0,1$; $0,8 \pm 0,1$ e $0,8 \pm 0,1$ mL após 0,5; 1; 2; 3; 4 e 5 horas, respectivamente.

O tratamento prévio (1 h antes) dos ratos com a FBut de *A. amazonicus* 0,1 e 0,3 g/kg, v.o. reduziu a formação do edema de 18 a 27% e de 25%, respectivamente a partir de 3 horas, representando um bloqueio no efeito edematogênico produzido pela injeção de carragenina (Figura 26).

A indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema de 36 a 70% dos 60 a 300 minutos da administração da carragenina.

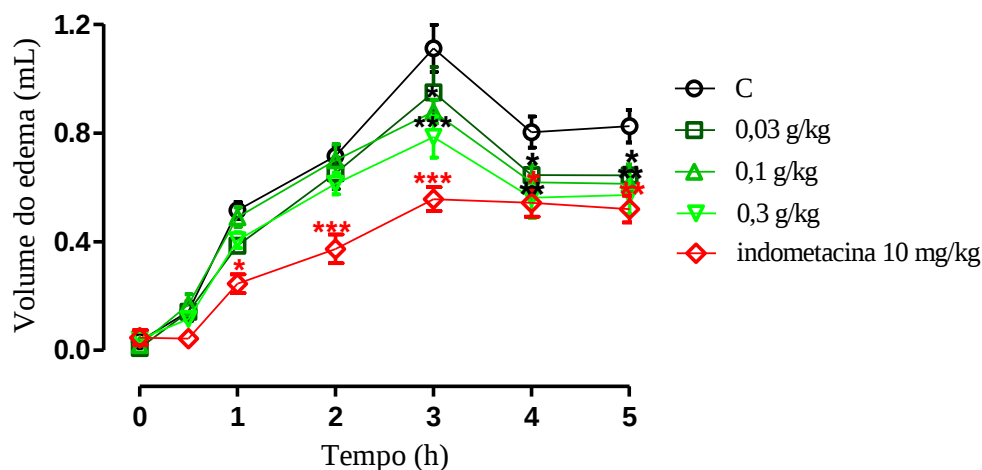


Figura 26 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1%, em ratos. Grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e controle positivo indometacina (10 mg/kg, v.o.). Os pontos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)

6.3.6. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no edema de pata induzido por dextrana 0,1%

A injeção subplantar de dextrana 0,1% nas patas de ratos produziu uma reação edematogênica de latência pequena e intensidade máxima após 60 minutos.

Nos animais controle, o aumento do volume das patas injetadas com dextrana em relação às patas contralaterais foi de $0,8 \pm 0,1$; $1,2 \pm 0,1$; $0,9 \pm 0,0$ e $1,0 \pm 0,01$ mL após 30, 60, 120 e 180 minutos, respectivamente.

O tratamento prévio com FBut (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) não alterou a formação do edema (Figura 27). A ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema durante todo o tempo de avaliação experimental de 33 a 80%, comparativamente aos animais controles.

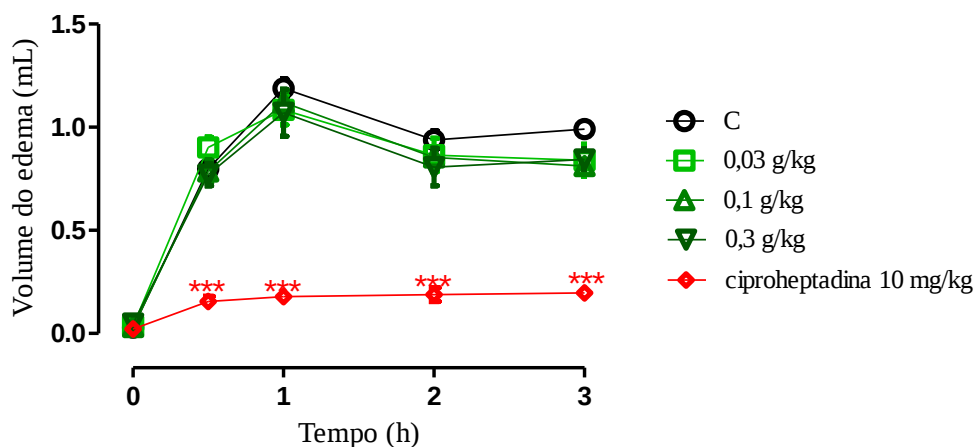


Figura 27 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1%, em ratos. Grupo controle positivo tratado com ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni)

6.3.7. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na peritonite induzida por carragenina 1%

Após 5 horas da injeção de carragenina (1%, 1 mL, i.p.), o exsudato peritoneal coletado de camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) apresentou $1,8 \pm 0,2 \times 10^3$ células / mm³.

O tratamento prévio com FBut 0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o. reduziu a migração celular para $1,5 \pm 0,1$; $1,1 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,1 \times 10^3$ células/mm³, respectivamente. O efeito foi significativamente menor (38%) somente nos animais tratados com a dose de 0,1 g/kg (Figura 28).

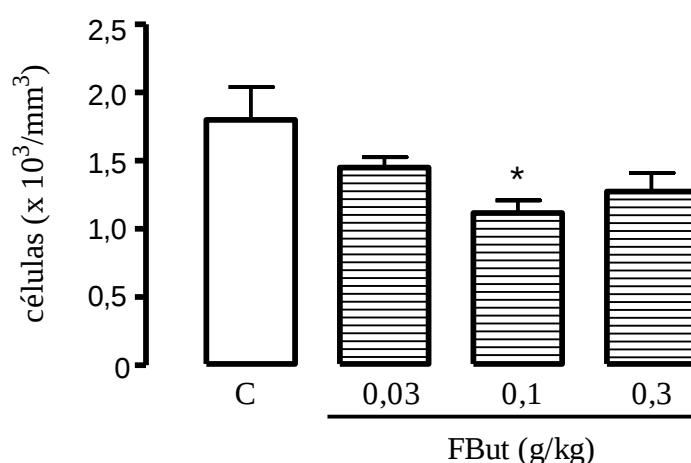


Figura 28 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* (0,03; 0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1% (1 mL, i.p.), em camundongos. Número de células (10³/mm³). Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias ± erro padrão (seis animais/grupo). * p < 0,05 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.4. Avaliação da atividade no trato gastrintestinal

6.4.1. Estudo da atividade anti-úlceras

6.4.1.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no modelo de lesão gástrica induzida por estresse

Em camundongos controle tratados com água (5 mL/kg, v.o) submetidos ao estresse por imobilização a frio (4 °C, 2 h), o índice de lesão foi de $43,3 \pm 4,0$ com $22,8 \pm 2,9$ úlceras / animal (n = 6).

O tratamento prévio com FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., reduziu o índice de lesão em 34, 59 e 68%, respectivamente, em relação ao controle. O mesmo efeito foi observado no número de úlceras/animal com redução de 40, 61 e 80% do controle com as doses de 0,1; 0,3 e 1 g/kg, respectivamente (Figura 29).

Em camundongos tratados com o controle positivo ranitidina (50 mg/kg, v.o), o índice de lesão foi de $10,9 \pm 2,1$ com $1,7 \pm 1,7$ úlceras/animal (n = 6).

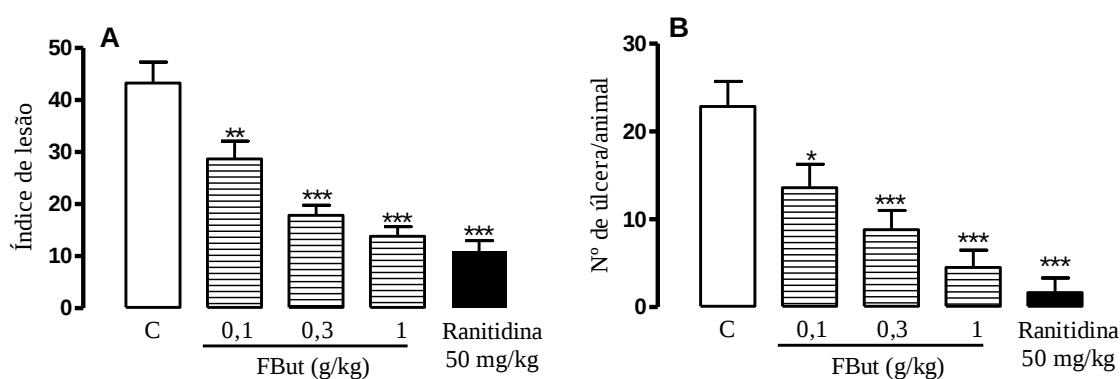


Figura 29 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por estresse por imobilização a frio (4 °C por 2 h), em camundongos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com ranitidina (50 mg/kg, v.o.). **A** - índice de lesão da mucosa gástrica e **B** - número de úlceras/animal. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.4.1.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no modelo de lesão gástrica induzida por etanol

Em camundongos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.) e submetidos ao etanol 75% (5 mL/kg, v.o.), o índice de lesão foi de $56,8 \pm 9,1$ com $37,8 \pm 6,1$ úlceras/animal ($n = 6$).

O tratamento prévio com FBut 0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o., reduziu o índice de lesão 5, 32 e 85%, respectivamente, em relação ao controle. O mesmo efeito foi observado no número de úlceras/animal com redução de 20, 43 e 93% do controle, respectivamente (Figura 30).

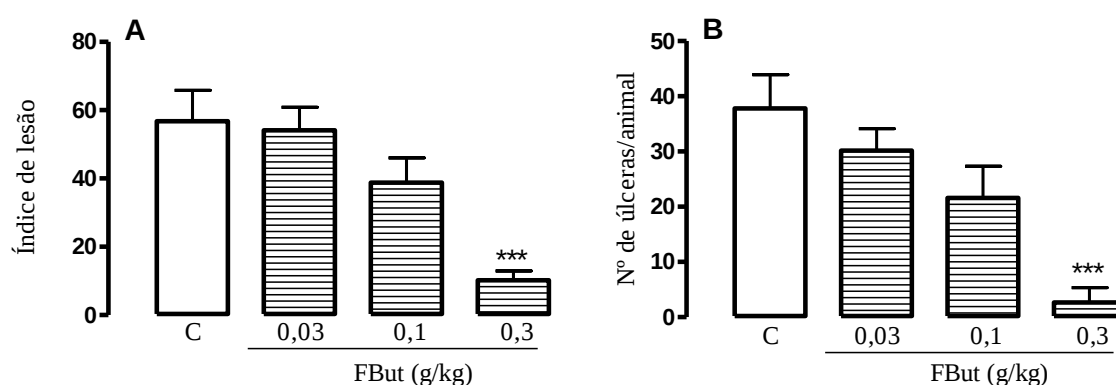


Figura 30 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por etanol 75% (5 mL/kg, v.o.), em camundongos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.). **A** - índice de lesão da mucosa gástrica e **B** - número de úlceras. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.4.1.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no modelo de lesão gástrica induzida por indometacina

Em camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) o índice de lesão produzido por indometacina (20 mg/kg, s.c.) foi de $28,2 \pm 4,5$ com $17,0 \pm 3,6$ úlceras/animal ($n = 6$).

Em camundongos tratados previamente com FBut 0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o., o índice de lesão foi $25,6 \pm 3,3$; $27,5 \pm 3,2$ e $38,8 \pm 2,4$ com $15,2 \pm 3,2$; $16,0 \pm 3,5$ e $27,0 \pm 1,4$ úlceras/animal, respectivamente (Figura 31). Esses valores não diferiram significativamente do grupo controle.

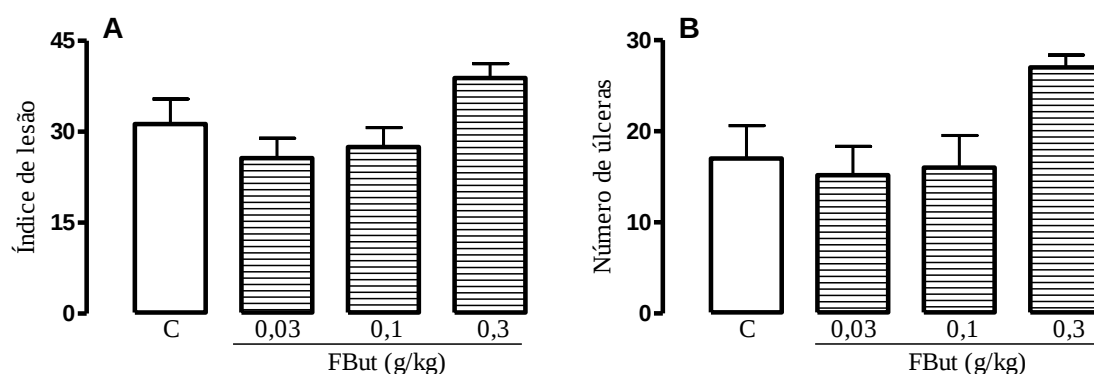


Figura 31 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) na lesão gástrica induzida por indometacina (20 mg/kg, s.c.), em camundongos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.) **A** - índice de lesão da mucosa gástrica e **B** - número de úlceras/animal. As colunas representam as médias $\pm$ erros padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.4.2. Estudo da atividade antissecretora gástrica

6.4.2.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no modelo da ligadura pilórica

Após 4 horas de ligadura pilórica, o volume da secreção gástrica coletada de camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, i.d.) foi de $0,5 \pm 0,05$ mL com $\text{pH} = 4,4 \pm 0,5$ e acidez titulável de $0,5 \pm 0,1$ mEq[H⁺]/L/4 h (n = 6).

A administração intraduodenal da FBut 0,03; 0,1 e 0,3 g/kg reduziu o volume da secreção para $0,4 \pm 0,05$; $0,2 \pm 0,02$ e $0,2 \pm 0,05$ mL, respectivamente. As maiores doses reduziram o volume 54% e 65%, respectivamente, em relação ao controle. O pH não foi alterado pela FBut. A acidez total foi $0,6 \pm 0,09$; $0,3 \pm 0,02$ e $0,2 \pm 0,02$ mEq[H⁺]/L/4 h, respectivamente. As maiores doses reduziram a acidez total 51% e 65%, respectivamente em relação ao controle (Figura 32).

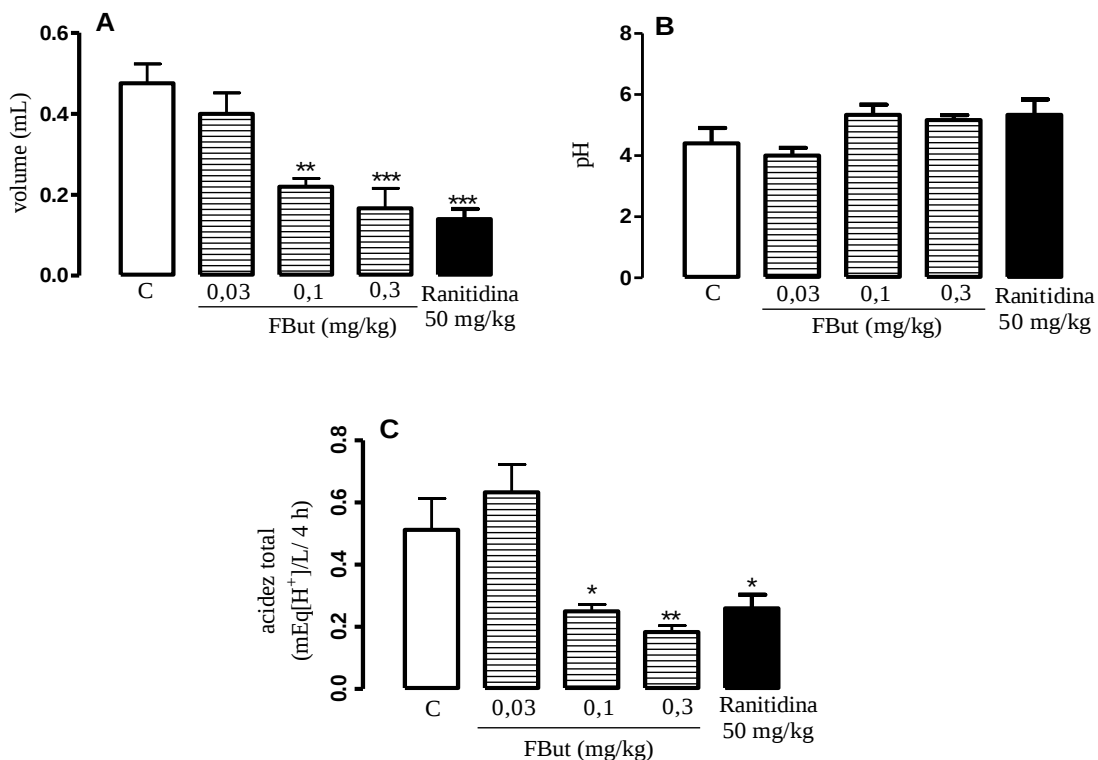


Figura 32 – Efeitos da fração butanólica (FBut) de *Ampeloziphyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg) administrada na luz duodenal no volume, pH e na acidez total da secreção ácida gástrica de camundongos submetidos à ligadura pilórica de 4 h. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, i.d.) e o controle positivo com ranitidina (50 mg/kg, i.d.). **A** - volume (mL); **B** - pH e **C** - acidez total (mEq[H⁺]/L/4 h). As colunas representam as médias ± erro padrão (seis animais/grupo). * p < 0,05; **p < 0,01 e *** p < 0,001 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.4.3. Estudo da atividade na motilidade gastrointestinal

6.4.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no trânsito intestinal

Em camundongos controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) o percurso do carvão ativado 10% (5 mL/kg, v.o.) foi de $52,2 \pm 7,0\%$ do comprimento total do intestino delgado ($n = 6$).

Em camundongos tratados previamente com FBut 0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o., o percurso do marcador foi de $53,3 \pm 4,6$; $58,0 \pm 5,6$ e $59,0 \pm 3,2\%$ (Figura 33). Esses valores não diferiram do grupo controle.

Em camundongos tratados com atropina (3 mg/kg, v.o.), utilizada como controle positivo, o percurso do marcador foi $26,2 \pm 8,5\%$, significativamente menor que o do controle.

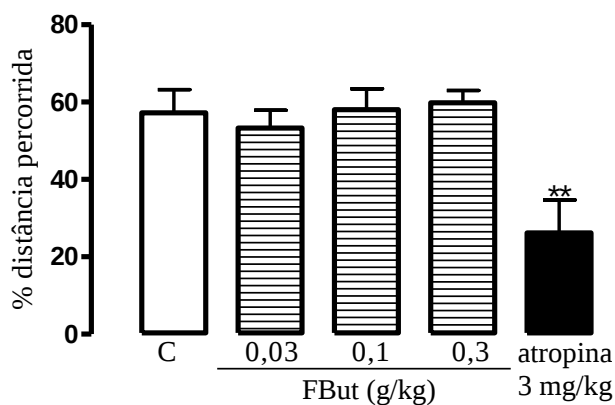


Figura 33 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no percurso do carvão ativado 10% (5 mL/kg, v.o.), em camundongos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com atropina (3 mg/kg, v.o.). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.5. Avaliação de ações no sistema cardiovascular

6.5.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na pressão arterial de ratos

6.5.1.1. Pressão arterial em ratos não-anestesiados

Ratas normotensas com 90 dias de idade, foram tratadas cronicamente com FBut de *A. amazonicus*, ou com igual volume de água por via oral. Ao final do período controle (0 a 30 dias), antes da administração do extrato, a PA foi estável em 139 ± 4 mmHg ($n = 6$). A PA dos animais controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) não foi alterada durante 21 dias de tratamento com FBut.

Com a administração repetida de FBut (0,3 g/kg/dia, v.o.), a PA basal foi reduzida progressivamente para 121 ± 4 mmHg, após 14 dias. O tratamento desses animais com dose maior de FBut (1g/kg/dia/v.o.) durante sete dias reduziu a PA para 117 ± 3 mmHg enquanto a PA dos animais controle manteve-se constante.

A inversão do tratamento entre os grupos teve o mesmo resultado, isto é, nos animais tratados anteriormente com FBut 1 g/kg/dia/v.o., a PA retornou aos valores basais 48 h após a interrupção da FBut e administração do veículo. Nos animais que passaram a receber FBut 1 g/kg/dia/v.o. a PA foi reduzida a 121 ± 1 mm Hg 48 horas após o início do tratamento (Figura 34).

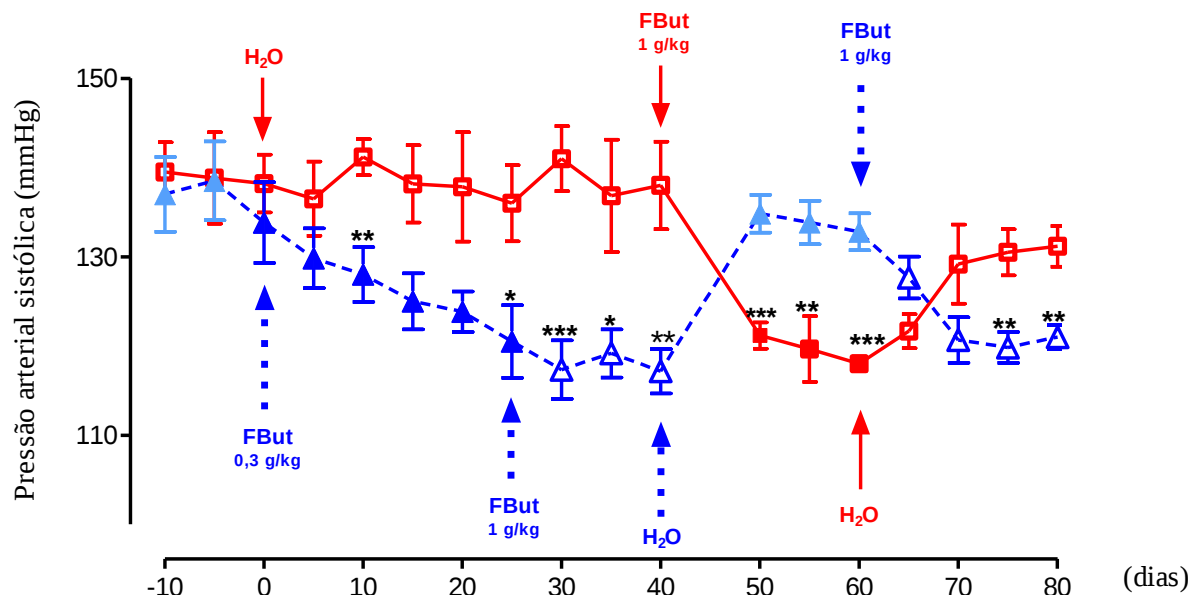


Figura 34 – Efeito da FBut de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,3 g/kg/ dia, v.o.) na pressão arterial sistólica em ratos normotensos não anestesiados. Os animais controles (□) receberam água (5 mL/kg, v.o.) e os tratados receberam FBut 0,3 g/kg, v.o. (▲) durante 14 dias, quando a dose foi aumentada para FBut 1 g/kg, v.o. (△) durante 7 dias. Nesse momento o tratamento dos grupos foi invertido. Notar que a PA dos animais que passaram a receber água (5 mL/kg, v.o.) voltou aos valores controles (▲) e a PA dos animais que receberam FBut 1 g/kg, v.o. por 7 dias (■) foi reduzida. Nova inversão dos tratamentos após esse período produziu efeitos semelhantes. Dados expressos como médias ± erro padrão (seis animais/grupo) * $p < 0,05$ (teste t de Student)

6.5.1.2. Pressão arterial em ratos anestesiados

A FBut (3, 10 e 20 mg/kg, e.v.) diminuiu a pressão arterial em ratos anestesiados proporcionalmente às doses. A injeção da FBut 3, 10 e 20 mg/kg, e.v. produziu hipotensão de $12,5 \pm 0,9$; $25,5 \pm 3,5$ e $35 \pm 4,1$ mmHg com pico máximo em dois minutos sem reversão à pressão basal com as duas maiores doses (Figura 35).

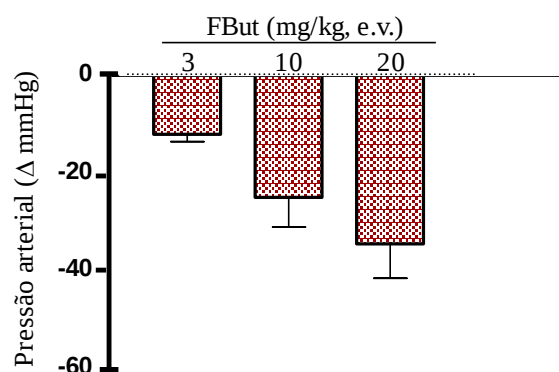


Figura 35 – Efeito pressórico da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (3, 10 e 20 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (três animais/grupo)

A administração prévia de atropina (1 mg/kg, e.v.) suficiente para inibir 90% do efeito hipotensor da acetilcolina (0,1; 0,3 e 1 μ g/kg, e.v.), não interferiu com a hipotensão produzida pela FBut (Figura 36).

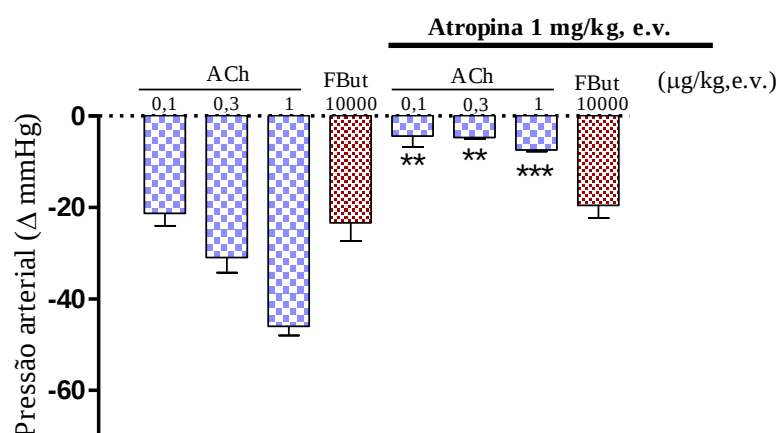


Figura 36 – Efeitos pressóricos da injeção da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (10 mg/kg, e.v.) antes e após o tratamento com atropina (1 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (quatro animais/grupo). Test *t* não pareado

A FBut (10 mg/kg, e.v.) injetada 2 minutos antes não alterou o efeito hipotensor produzido pela acetilcolina (0,1; 0,3 e 1 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) (Figura 37).

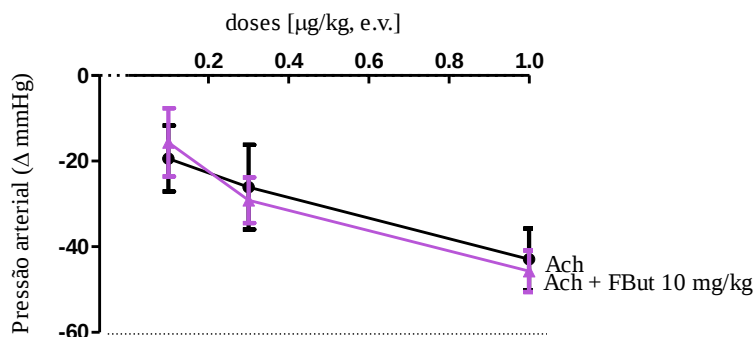


Figura 37 – Efeitos pressóricos da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) antes e após a injeção da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados. Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (quatro animais/grupo)

A injeção de noradrenalina (0,1; 0,3 e 1 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) produziu hipertensão de $13,9 \pm 2,2$; $20,4 \pm 3,0$ e $35,3 \pm 1,9$ mm Hg. A injeção de angiotensina II (0,01; 0,03 e 0,1 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) produziu hipertensão de $11,8 \pm 0,7$; $17,9 \pm 3,0$ e $25,2 \pm 2,3$ mmHg. As doses médias foram selecionadas para os estudos posteriores.

A administração prévia de FBut (10 mg/kg, e.v.) suficiente para reduzir a pressão arterial de $25,2 \pm 2,0$ mmHg em ratos normotensos anestesiados, não inibiu as respostas pressóricas à noradrenalina (0,3 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) e à angiotensina II (0,03 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) (Figura 38).

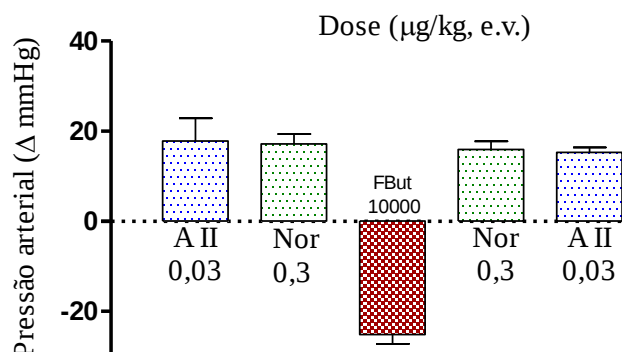


Figura 38 – Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,3 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) e angiotensina II (0,03 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) antes e após injeção da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (quatro animais/grupo)

A administração prévia de FBut (10 mg/kg, e.v.) suficiente para reduzir a pressão arterial de $25,5 \pm 3,5$ mmHg em ratos normotensos anestesiados, não inibiu as respostas pressóricas à noradrenalina (0,3 µg/kg, e.v.) e à angiotensina II (0,03 µg/kg, e.v.) em animais controle. O tratamento crônico com FBut 1 g/kg, v.o. durante 10 dias, também não alterou a resposta aos agonistas (Figura 39).

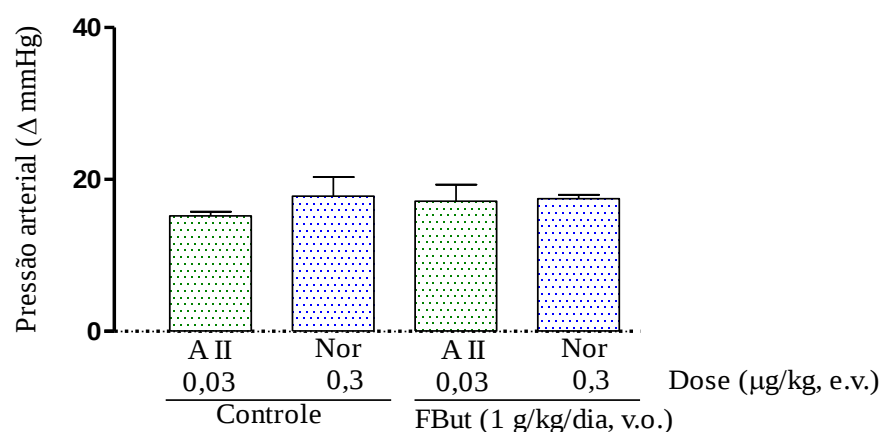


Figura 39 – Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,3 µg/kg,e.v.) e angiotensina II (0,03 µg/kg, e.v.) em ratos tratados cronicamente com fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (1 g/kg/dia,v.o., durante 10 dias) e em ratos normotensos anestesiados controle. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo)

6.5.2. Atividade no músculo cardíaco

6.5.2.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na frequência de batimentos do átrio de rato e na força de contração do músculo papilar de rato

Após 30 min de estabilização *in vitro* a 35 °C, os átrios de rato apresentaram batimentos espontâneos com frequência média de 240 bpm.

A incubação de FBut em concentrações cumulativas (10 a 1000 µg/mL) não alterou significativamente a frequência de batimentos espontâneos em átrio de rato até a concentração de 300 µg/mL, enquanto a maior concentração diminuiu a frequência 29% (Figura 40a).

Após 30 min de estabilização a 35 °C, o músculo papilar de rato apresentou tensão média de contração igual a 367 ± 85 mg ($n = 4$). As velocidades máximas de contração e relaxamento do músculo, calculadas pela primeira derivada da contração ao estímulo elétrico foram $6,1 \pm 1,0$ g/s, e $5,3 \pm 1,3$ g/s, respectivamente.

A incubação da FBut 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL diminuiu a tensão de contração do músculo papilar de rato 13%, 25%, 35%, 38% e 45%, respectivamente (Figura 40b).

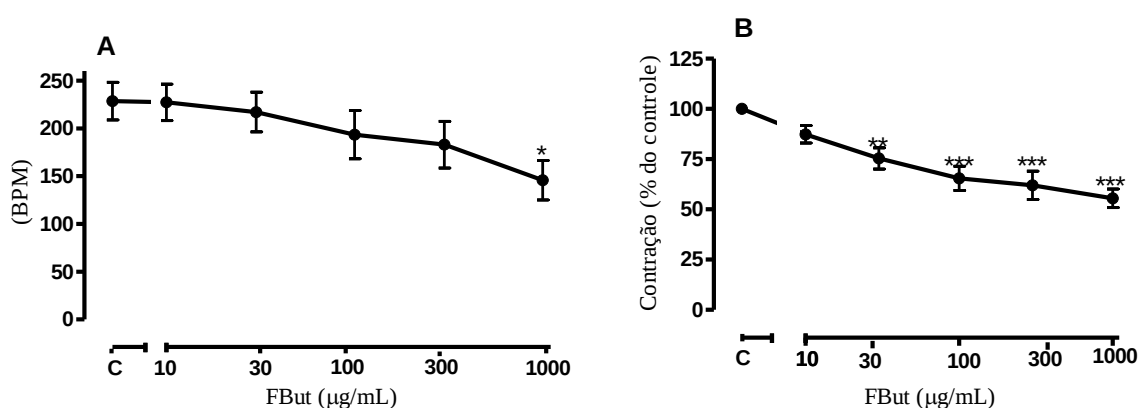


Figura 40 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (10 a 1000 µg/mL) na frequência de batimentos do átrio isolado de rato (**A**) e na força de contração do músculo papilar de rato estimulado a 1 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima (**B**), T = 35 °C ($n = 4$). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls)
BPM = batimentos por minuto

6.5.3. Atividade na musculatura vascular

6.5.3.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* em anéis de aorta de rato pré-contráídos com noradrenalina (10^{-7} M)

Anéis de aorta de rato com endotélio íntegro, ao serem incubados com noradrenalina (10^{-7} M), desenvolveram tensão de $2,7 \pm 0,1$ g ($n = 4$). A incubação de acetilcolina (10^{-6} M) relaxou o tônus induzido pela noradrenalina. Nas preparações com destruição mecânica do endotélio o efeito relaxante da ACh foi bloqueado.

A incubação da FBut 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ em anéis de aorta de rato pré-contráídos com noradrenalina (10^{-7} M), relaxou a preparação 4, 20, 62 e 82%, respectivamente. A incubação prévia de L-NAME (10^{-5} M) durante 45 minutos bloqueou as respostas das concentrações menores de FBut (10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) e parcialmente as concentrações mais altas (100 e 300 $\mu\text{g/mL}$).

Em aortas de rato com endotélio destruído mecanicamente a incubação da FBut (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) relaxou o tônus induzido por noradrenalina (10^{-7} M) em 45% somente com a maior concentração (300 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 41).

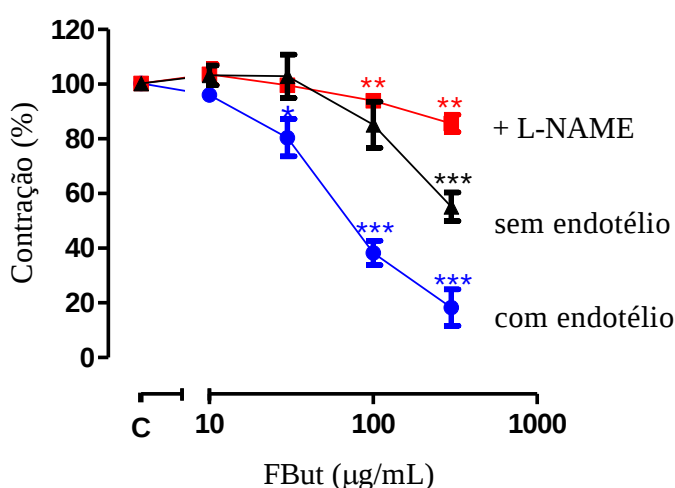


Figura 41 – Efeito da incubação cumulativa da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio, em condições controle e na presença de L-NAME (10^{-5} M) incubado 45 minutos antes da administração da fração. A contração máxima induzida pela noradrenalina foi considerada 100%. A adição da FBut foi cumulativa após estabilização do tônus, usualmente a cada 10 minutos. Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 4$). Teste *t* Student

6.5.4. Atividade da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* em músculo liso

6.5.4.1. Efeito no ducto deferente estimulado

Na preparação de ducto deferente de rato estimulado eletricamente com frequência de 1 Hz, duração de 0,5 ms e voltagem supramáxima, a incubação da FBut 0,01; 0,03; 0,1 e 0,3 mg/mL, após 30 minutos de estabilização, reduziu a contração em 22, 35, 61 e 82%, respectivamente (Figura 42). As contrações foram recuperadas após lavagem da preparação.

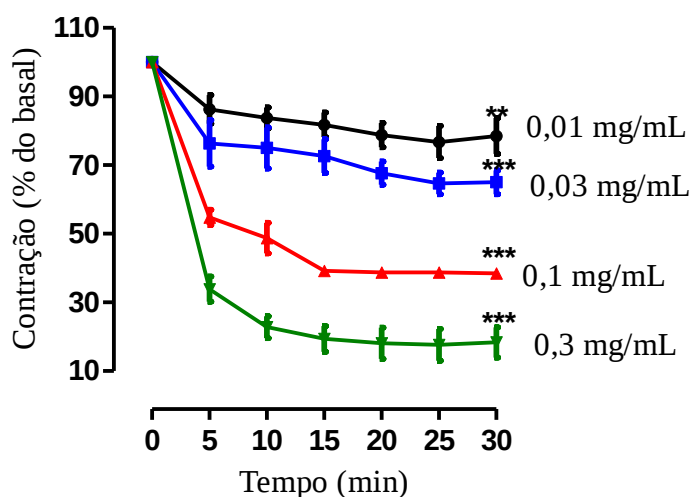


Figura 42 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,01 a 0,3mg/mL) em ducto deferente de rato estimulado, 30 °C (1 Hz; 0,5 ms e voltagem supramáxima). Os símbolos e barras verticais correspondem às médias $\pm$ erro padrão (n =4). ** p < 0,01 *** p < 0,001 (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.5.4.2. Efeito no ducto deferente de rato (DDR)

O DDR contraiu à incubação de noradrenalina proporcionalmente às concentrações de 10^{-8} a 10^{-4} M (CE_{50} = 1,71 μ M; LC 1,33-2,21 μ M). Após 20 minutos de incubação com a FBut 0,1; 0,3 e 1 mg/mL, as respostas máximas de contração à noradrenalina foram reduzidas a $88,2 \pm 4,6\%$; $80,2 \pm 7,3$ e $70,2 \pm 2,8\%$, respectivamente, em relação ao controle (Figura 43). As concentrações efetivas médias (CE_{50}) do agonista na presença das mesmas concentrações da fração não diferiram significativamente do controle (Tabela 2).

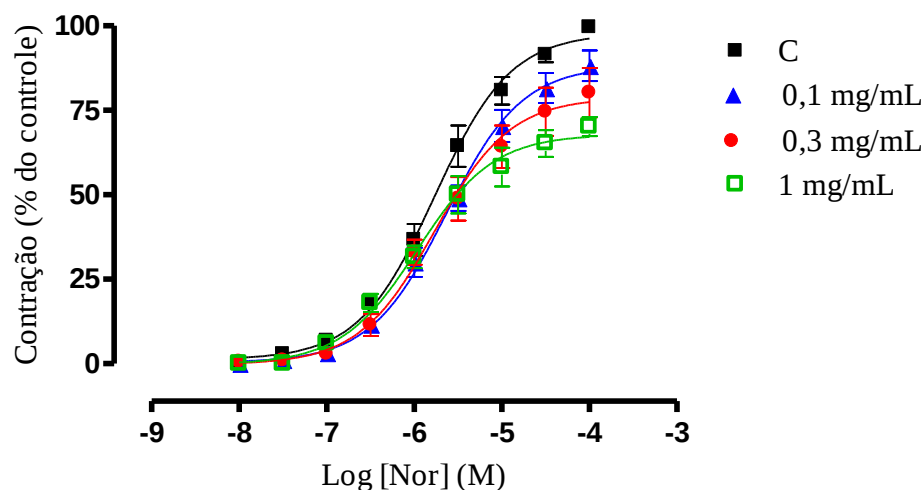


Figura 43 – Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-4} M) obtidas antes (controle) e após incubação da fração butanólica (FBut) de *Ampeloziphyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em preparações de ducto deferente de rato. Os símbolos e barras verticais correspondem às médias $\pm$ erro padrão (n = 4)

Tabela 2 – Concentrações efetivas médias (CE_{50}) obtidas de curvas concentração-efeito da noradrenalina (10^{-8} a 10^{-4} M) antes e após a incubação fração butanólica (FBut) de *Ampeloziphyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em ducto deferente de rato a 30 °C

	FBut (mg/mL)			
	Controle	0,1	0,3	1,0
CE_{50} (μ M)	1,71 (LC 1,33-2,21)	2,32 (LC 1,72-3,12)	1,72 (LC 1,07-2,76)	1,09 (LC 0,74-1,61)

Valores apresentados como médias geométricas e limites de confiança (n = 4)

6.5.4.3. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* em jejuno de rato

O jejuno contraiu à incubação cumulativa de acetilcolina proporcionalmente às concentrações de 10^{-8} a 10^{-4} M (CE_{50} 0,59 μ M, LC 0,39-0,88 μ M). Após 20 minutos de incubação com a FBut 0,1; 0,3 e 1 mg/mL, as respostas máximas de contração à acetilcolina não foram alteradas em relação ao controle e a CE_{50} foi aumentada para 3,17 μ M (LC 0,39-0,88), 1,81 μ M (LC 1,16-4,51) e 4,73 μ M (LC 3,70-6,03), respectivamente (Figura 44 e Tabela 3).

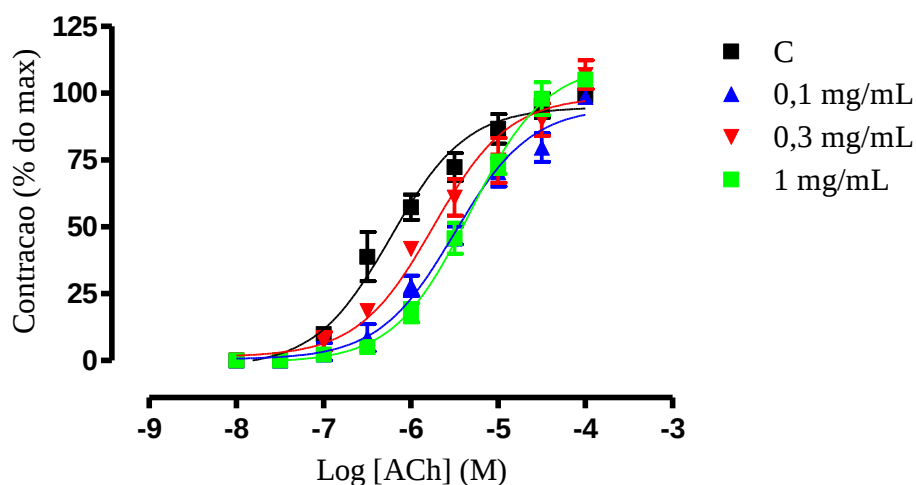


Figura 44 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em jejuno de rato. Curvas concentração-efeito de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) obtidas antes (C- controle) e após a incubação da FBut. Os símbolos e barras verticais correspondem às médias $\pm$ erro padrão (n = 4)

Tabela 3 – Concentrações efetivas médias (CE_{50}) obtidas de curvas concentração-efeito de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) antes e após a incubação da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) no jejuno de rato a 30 °C

	FBut (mg/mL)			
	Controle	0,1	0,3	1
CE_{50} (μ M)	0,59 (LC 0,39-0,88)	3,17** (LC 2,32-4,51)	1,81 (LC 1,16-2,83)	4,73*** (LC 3,70-6,03)

Valores apresentados como médias geométricas e limites de confiança (n = 4) * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 (Student-Newman-Keuls test)

6.5.5. Medida do influxo de cálcio em músculo liso

6.5.5.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* no ducto deferente de rato despolarizado (DDR)

Após 20 minutos de incubação com FBut (0,1; 0,3 e 1 mg/mL), as contrações máximas foram reduzidas em $91,7 \pm 0,9\%$, $76,3 \pm 0,9\%$ e $56,0 \pm 1,7\%$ do controle, respectivamente (Figura 45). As concentrações efetivas médias (CE_{50}) do cálcio determinadas na presença das mesmas concentrações da FBut diferiram significativamente do controle (1,25 mM, LC 0,76-2,06 mM) (Tabela 4).

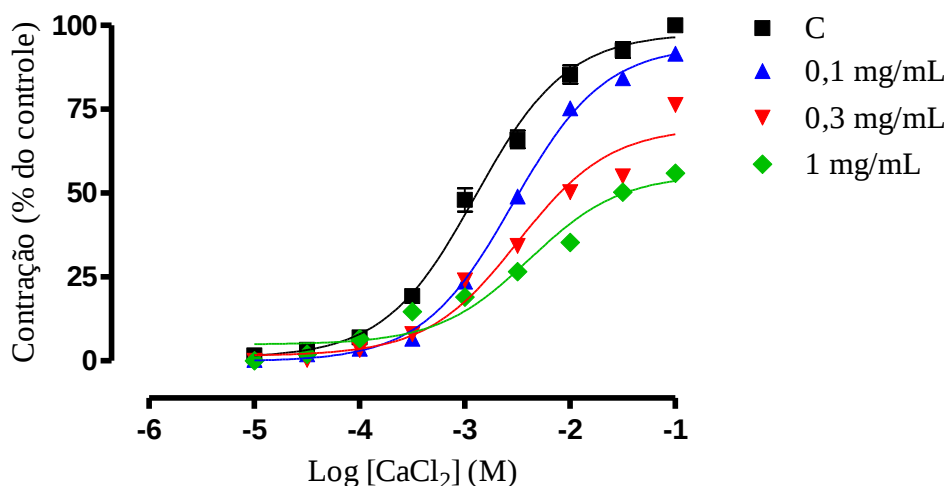


Figura 45 – Curvas concentração-efeito de $CaCl_2$ (10^{-5} a 10^{-1} M) obtidas antes (controle) e após incubação da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em preparações de ducto deferente despolarizado de ratos. Os símbolos e barras verticais correspondem às médias $\pm$ erro padrão, respectivamente (n = 4 por grupo)

Tabela 4 – Concentrações efetivas médias (CE_{50}) obtidas de curvas concentração-efeito de $CaCl_2$ (10^{-5} a 10^{-1} M) antes e após a incubação de fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em ducto deferente despolarizado de rato

	FBut (mg/mL)			
	Controle	0,1	0,3	1
CE_{50} (mM)	1,27 (1,04 – 1,55)	2,89** (2,60 – 3,20)	3,23** (2,19 – 4,76)	4,11*** (2,64 – 6,39)

Valores apresentados como médias geométricas e limites de confiança (n = 4) ** p < 0,01 (Student-Newman-Keuls test)

6.6. Atividade na junção neuromuscular esquelética

6.6.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente

A incubação da FBut (0,1 a 1 mg/mL) não alterou significativamente as contrações do diafragma de rato produzidas por estimulação elétrica do nervo frênico (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima) (Figura 46).

As contrações do diafragma obtidas por estímulo direto (0,5 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima) na presença da d-tubocurarina (10^{-5} M) não foi alterada até a concentração de 1 mg/mL (Figura 47).

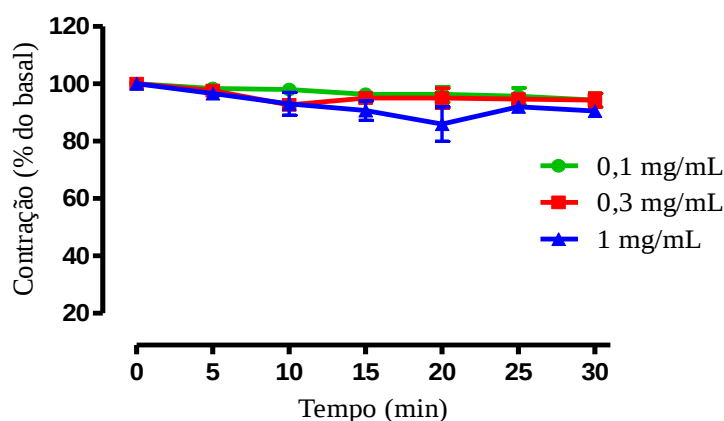


Figura 46 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em diafragma de rato a 30 °C, estimulado indiretamente (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Os símbolos e barras verticais correspondem às medias $\pm$ erro padrão (n =4).

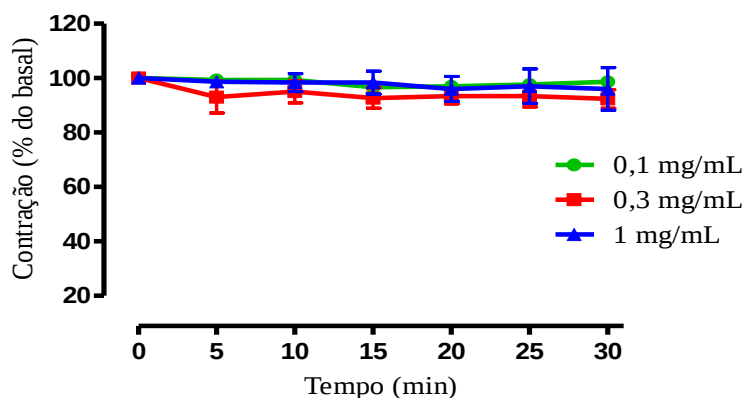


Figura 47 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 1 mg/mL) em diafragma de rato a 30 °C, estimulado diretamente (0,5 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima). Os símbolos e barras verticais correspondem às medias $\pm$ erro padrão (n =4).

6.7. Atividade das P-ATPases de mamíferos

6.7.1. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na atividade da Ca^{2+} -ATPase

Ensaio preliminares realizados na presença de diferentes quantidades da enzima (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,5 μg), em diferentes tempos de reação (5, 10, 15, e 20 minutos) e concentração fixa de ATP (3 mM), mostraram que a atividade ótima da Ca^{2+} -ATPase isolada da coxa de coelhos foi obtida com 0,4 μg de enzima após 10 minutos de incubação a 37 °C. Nessas condições, a atividade da Ca^{2+} -ATPase foi de 205,5 $\mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$ (controle = 100%, n = 3).

A FBut de *A. amazonicus*, incubada nas concentrações de 0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, não alterou significativamente a atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de mamífero até a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. A maior concentração reduziu a atividade em 56% do controle (Figura 48).

O controle positivo tapsigargina testado nas concentrações de 0,01 a 1 μM inibiu a Ca^{2+} -ATPase de forma concentração dependente com IC_{50} 0,11 μM (LC 0,06 – 0,21 μM).

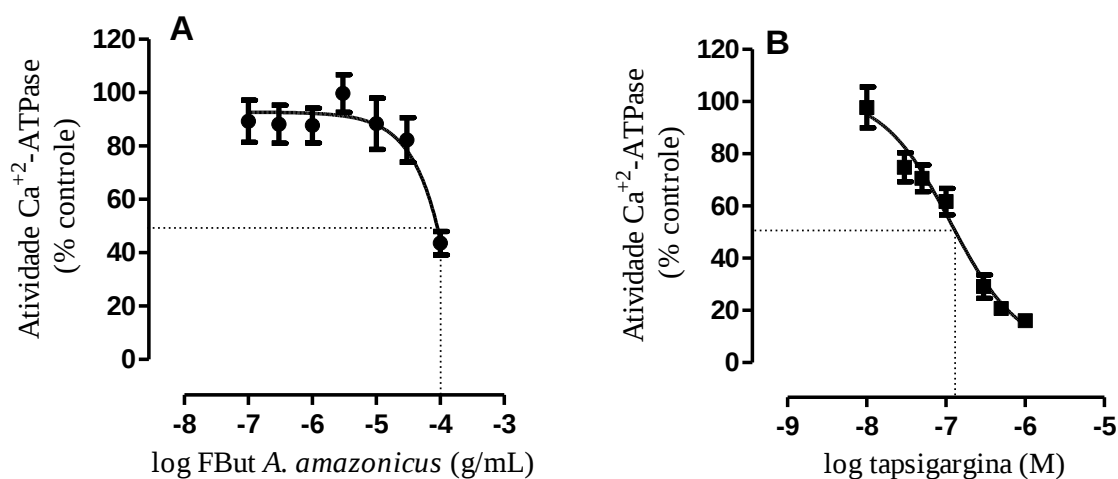


Figura 48 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) (A) e da tapsigargina (0,01 a 1 μM) (B) na atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho, após 10 minutos a 37 °C (n = 3 em triplicata)

6.7.2. Efeito da fração butanólica (FBut) de *A. amazonicus* na atividade da H^+-K^+ -ATPase

Ensaio preliminares realizados na presença de diferentes concentrações da enzima (2,0; 3,5; 7,0 e 11,0 μg), em diferentes tempos de reação (10, 15, 20, 25 e 30 minutos) e concentração fixa de ATP (20 mM) mostraram que a atividade ótima de microssomas isolados da mucosa gástrica de porco foi obtida com 3,5 μg da enzima após 30 minutos de incubação, a 37°C. Nessas condições, a atividade foi de $104,9 \pm 1,9 \mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$ (controle = 100%, n = 3).

A pré-incubação de ouabaína (1 mM) nas mesmas condições não alterou os valores de hidrólise obtidos em condições controle, indicando que a preparação estava livre de Na^+-K^+ -ATPase. A FBut de *A. amazonicus*, incubada nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$, inibiu a atividade da H^+-K^+ -ATPase gástrica de suíno em 38% na maior concentração (Figura 49).

O bloqueador específico da atividade da H^+-K^+ -ATPase - SCH 28080, testado nas concentrações de 3 a 1000 μM inibiu a H^+-K^+ -ATPase de forma concentração dependente com IC_{50} 467 μM (LC 269-813 μM).

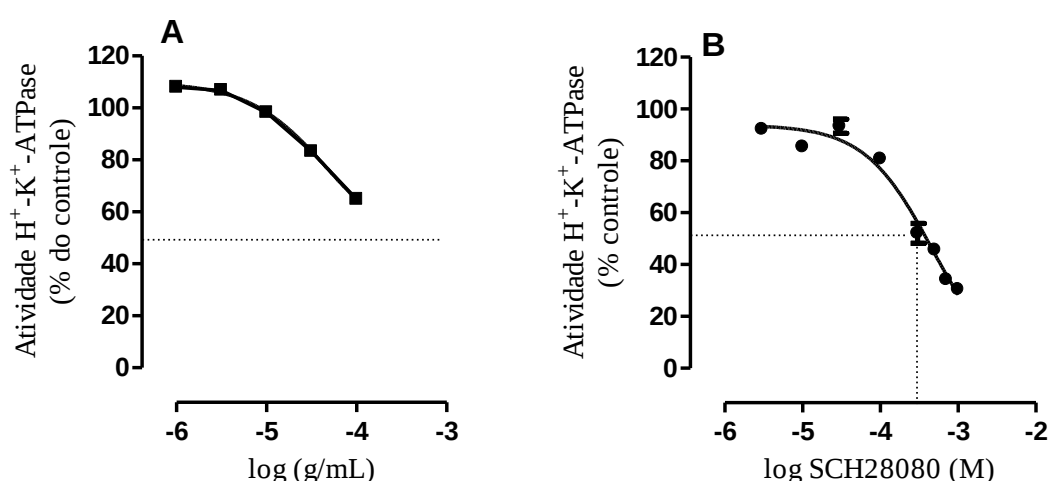


Figura 49 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke (1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) (A) e do SCH28080 (3 a 1000 μM) (B) na atividade da H^+-K^+ -ATPase de mucosa gástrica de porco, após 30 minutos de incubação a 37 °C (n = 3 em triplicata)

VII. DISCUSSÃO



Este trabalho descreve a padronização e purificação do extrato hidroalcoólico (EHA) e da fração butanólica (FBut) de *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke visando os estudos farmacodinâmicos, e nestes, como foco principal, a determinação da eficácia e segurança dos extratos, indicadas pelos efeitos obtidos durante a triagem farmacológica nos principais sistemas fisiológicos.

Conhecida popularmente como saracura-mirá ou cerveja de índio, a *A. amazonicus* é utilizada para tratar picada de cobra, como anti-inflamatório e na prevenção da malária (BRANDÃO *et al.*, 1992; ROSAS *et al.*, 2007). Além disso, foi relatado o uso para tratar problemas hepáticos, distúrbios gastrintestinais (casca e raiz), distúrbios do sono, tratamento de “doenças tropicais” (raiz), como energético/estimulante e afrodisíaco (RODRIGUES, 2006; SANTOS *et al.*, 2005). A planta foi selecionada para o presente estudo em vista das referências de uso como preventivo da malária. Para esse fim, a informação popular indica que a infusão das raspas da casca da raiz deve ser agitada por até três vezes, desprezando a espuma formada. A mistura final é então utilizada, não havendo referências quanto à quantidade tomada, ou ao tempo de antecedência para a prevenção da malária.

Não foram encontradas na literatura, referências científicas indicativas da eficácia dos extratos da *A. amazonicus*. Ao contrário, em um primeiro estudo relatado, não foi encontrado o efeito, embora uma ação antiplasmódio tenha sido descrita em um segundo estudo do mesmo grupo (KRETTLI *et al.*, 2001). Em nenhum caso encontrou-se a descrição da padronização química do extrato, ou razões da diferença encontrada entre as duas amostras. Da mesma forma, não há descrição na literatura de estudos da *A. amazonicus* que indiquem ação preventiva da malária.

Quanto aos estudos químicos, vários trabalhos descrevem o isolamento e a identificação principalmente de saponinas; alguns destes indicam as quantidades relativas dos

compostos nos extratos estudados (para revisão ver ROSAS *et al.*, 2007). A atividade antiplasmódio das substâncias isoladas não foi estudada.

Estudos farmacológicos dos efeitos sistêmicos dos extratos e de seus constituintes, com relação dose-efeito, são raros; um trabalho de dissertação descreve o efeito do extrato hidroalcoólico e da mistura de saponinas na função renal de ratos (DINIZ, 2006).

Frente à falta de informações, este trabalho preocupou-se inicialmente em estudar as ações farmacológicas de um extrato etanólico quimicamente padronizado.

A amostra foi coletada em Manacapuru (AM), em local com pouca influência antrópica. No local da coleta, as informações populares foram confirmadas pelo proprietário da gleba, que orientou a coleta e separou um pedaço do caule de 5 kg. No laboratório, o caule foi reduzido a lascas que permitiram a secagem e a moagem. Ao mesmo tempo, o material foi encaminhado para a identificação e depósito da exsicata no Herbário da UFAM, em Manaus.

O estudo foi iniciado com a padronização do extrato realizada pela Dra. Mirtes Tanae. Inicialmente foi preparado o extrato aquoso (EA) 2,5% por infusão a 72 °C, com rendimento de 10%. O extrato apresentou dificuldade para concentração em rotavapor a vácuo devido à formação de espuma. Por esse motivo, optou-se pela extração em etanol 50% a frio durante 72 h, que resultou no extrato hidroalcoólico (EHA) com rendimento de 16%. Essa extração permitiu a concentração em rotavapor até metade do volume, sendo então encaminhado para liofilização. O EHA foi pré-purificado por partição com n-butanol originando a fração aquosa (FA) e a fração butanólica (FBut), com rendimento de 43% a partir do EHA. A CCD mostrou que o EA e o EHA tiveram o mesmo perfil cromatográfico. O mesmo foi comprovado quando o EA e EHA foram comparados em CLAE. Tanto o EHA quanto a FBut foram solúveis em água, eliminando a necessidade de dispersá-los em surfactantes.

A purificação da FBut em CLAE mostrou que este extrato podia ser separado em 12 frações correspondentes aos picos com rendimento maior que 1% da área total do

cromatograma. Todas essas frações foram encaminhadas para análises de ^{13}C RMN e ^1H RMN na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e da Universidade de São Paulo (USP) e encontram-se em processo de identificação. Durante o trabalho, verificou-se que a espuma separada do extrato aquoso tem o mesmo perfil cromatográfico da FBut (dados da Dra. Mirtes Tanae não incluídos no trabalho atual). Os seis picos com maior área foram utilizados para a padronização do extrato e a proporção relativa foi confirmada até o fim dos trabalhos.

A atividade antimalárica da FBut foi estudada pelas professoras Dra MTR Lima-Landman e Marcela Neri em modelos *in vivo* e *in vitro* no Setor de Produtos Naturais do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) da UNIFESP. Os resultados (ainda não publicados) foram animadores ao mostrarem que a FBut não inibiu a parasitemia *in vitro* até a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ mas que o tratamento prévio por via oral durante 4 dias com a dose de 100 mg/kg inibiu a parasitemia de camundongos *in vivo*. Esses dados preliminares podem dar suporte à informação popular ao mesmo tempo que eliminam a ação citotóxica direta do extrato e valorizam a ação *in vivo* após administração oral. No entanto, permitem também pensar na hipótese da atividade antiplasmódio ser devida a um metabólito originado *in vivo* e não diretamente a compostos encontrados no extrato.

Com estas evidências animadoras justificou-se ainda mais o estudo da farmacodinâmica secundária dos extratos e suas ações em órgãos vitais que pudessem indicar um comprometimento funcional capaz de interferir com o possível uso terapêutico. Ao mesmo tempo, esperava-se desses estudos indicações quanto a possíveis alvos farmacológicos antiplasmódio e indicações do(s) mecanismo(s) de ação.

No processo de purificação bio-orientada, a chance de ser encontrado o princípio ativo, ou aquele com maior atividade é maior se utilizado o extrato bruto com todas as substâncias extraídas da planta. Por esse motivo, e também em vista do tempo para conclusão

do mestrado e das quantidades necessárias para a avaliação das atividades sistêmicas, a primeira fase dos estudos utilizou o extrato bruto. Além disso, foi considerado que o uso popular atribui os efeitos a esta mistura.

O estudo farmacológico iniciou-se com a triagem farmacológica geral proposta por Irwin (1968) e Malone e Robichaud (1962). Verificou-se que os animais tratados com o EHA e com a FBut em dose única elevada de 1 g/kg, v.o., apresentaram alguns sinais de efeito depressor do SNC como diminuição da deambulação, do número de levantadas e de auto-limpeza, em relação aos animais controles. Sinais de toxicidade do EHA e da FBut não foram observados até essa dose, em concordância com relatos da não toxicidade em humanos (Pontes, 1999).

Para comprovar a atividade hipnosedativa, foi utilizado o teste do sono induzido por pentobarbital, uma droga que induz sono em roedores e humanos agindo diretamente no sítio de ligação de barbitúricos, entre as unidades α_1 e β_1 que compõe o canal de cloreto do complexo receptor GABA_A (GOTTESMANN, 2002; KOCH-WESER; GREENBLATT, 1974). Neste estudo, o tratamento oral com EHA ou com FBut (0,1; 0,3 e 1 g/kg) 1 h antes da injeção de pentobarbital sódico, diminuiu a latência para indução do sono com as três doses e aumentou a duração total do sono na dose de 1 g/kg. Este efeito foi similar ao DZP (padrão utilizado). No entanto, considerando-se a possível interferência dos extratos com a farmacocinética do pentobarbital, estes resultados não garantiam um efeito hipnosedativo direto, pois os barbitúricos são metabolizados no fígado pela via oxidativa que envolve o citocromo P₄₅₀, NADPH e O₂ (BENET, 1996; SHAH *et al.*, 1996) e compostos que inibem esse sistema enzimático aumentam a vida média plasmática do barbitúrico, prolongam sua ação e, no teste do sono, irão apresentar perfil de atividade semelhante à de drogas depressoras do sistema nervoso central (BLUMENTHAL, 2002; GOLOUBKOVA *et al.*, 1998).

O teste do sono induzido por éter etílico foi realizado para investigar a possível ação depressora central direta da FBut. O teste segue o mesmo princípio da hipnose induzida por pentobarbital. O éter etílico não tem metabolização hepática e é totalmente eliminado por via respiratória (MEDRADO, 2002) e, portanto, sua ação não é influenciada por inibidores das enzimas do P450. Neste teste, o tratamento com a FBut (0,3 e 1 g/kg, v.o.) reduziu a latência para indução do sono e aumentou significativamente o tempo de hipnose. Esse resultado excluiu a influência de interações farmacocinéticas e confirmou a atividade hipnosedativa direta do EHA e da FBut detectada no teste do sono induzido por barbitúrico. Os resultados indicaram também, que as substâncias responsáveis pelo efeito no SNC foram extraídas na partição com Fbut, permitindo a realização de todos os testes posteriores com esta fração semi-purificada.

O estudo de outras atividades dos extratos no SNC foi realizado utilizando o labirinto em cruz elevado (LCE) e o teste de suspensão pela cauda. O LCE é um dos testes mais utilizados no estudo das bases neurobiológicas da ansiedade experimental (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005). O método está baseado no fato de os braços desprotegidos (ambiente aberto) do labirinto serem aversivos (ansio gênicos) aos roedores (PELLOW; FILE, 1986), que adotam estratégias de exploração e avaliação de risco frente ao ambiente desconhecido. A aferição dos parâmetros dessa exploração - tempo de permanência nos braços e frequência de entradas nos braços abertos - fornece índices primários de “ansiedade” avaliados no LCE. Um aumento nestes parâmetros ilustra uma ação tipo-ansiolítica e o oposto, uma ação tipo-ansio gênica (RODGERS; COLE, 1994). A entrada nos braços fechados avalia a atividade motora dos animais (RODGERS; DALVI, 1997). A sensibilidade do método aumenta com a associação de parâmetros etológicos (movimentos ou posturas que sinalizam, para outros animais da mesma espécie ou de outras espécies, disposições comportamentais de agressão, de submissão, de afiliação e sexuais) aos parâmetros clássicos (RODGERS; COLE, 1994).

No presente estudo, o tratamento com o EHA da *A. amazonicus* não alterou a frequência de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos; no entanto, todas as doses testadas aumentaram o tempo de permanência na plataforma de interseção dos braços, indicando incerteza na tomada de decisão, comportamento característico induzido por drogas ansiolíticas (RODGERS; DALVI, 1997). O aumento concomitante do número de estiramentos e imersões de cabeça (parâmetros etológicos) com as maiores doses reforçam esta conclusão.

Efeito semelhante foi observado com a dose intermediária da FBut: o número de entradas, o tempo de permanência nos braços abertos e as imersões de cabeça foram aumentados. Com a maior dose utilizada houve perda dessa resposta, talvez pelo efeito sedativo de altas doses, como observado no teste da hipnose que reduz a exploração no LCE. Segundo alguns autores, a falta de relação dose-efeito observada em estudos experimentais, particularmente com plantas medicinais, pode estar relacionada ao fato de extratos apresentarem múltiplos constituintes químicos que podem agir em diferentes vias (CARVALHO-FREITAS; COSTA, 2002). Deve ser considerado, no entanto, que a biodisponibilidade dos constituintes da mistura também pode ter sido alterada com a administração de maior volume do extrato, ou do extrato mais concentrado. Por isso, ainda que os resultados obtidos no LCE sejam bons indicativos da ação tipo-ansiolítica dos extratos da *A. amazonicus*, a falta de correlação dose-efeito indica que o teste deve ser repetido com frações mais purificadas, ou com os compostos isolados da FBut.

A ação tipo-antidepressiva dos extratos da *A. amazonicus* foi avaliada no teste da suspensão pela cauda. Este teste foi inspirado no modelo da natação forçada proposto por Porsolt *et al.* (1977) para triagem de drogas com ação antidepressiva em camundongos. Estes testes estão baseados na reação ao “desespero comportamental” (PORSOLT *et al.*, 1978), no qual animais submetidos a uma situação de perigo inevitável apresentam dois tipos de

comportamentos alternados: agitação (luta) e imobilidade. A imobilidade significa a desistência de lutar, o que para alguns pesquisadores representa o conceito psicológico observado na depressão clínica (LUCKI, 2001). Drogas com atividade antidepressiva diminuem o tempo de imobilidade (STÉRU *et al.*, 1985).

No teste de suspensão pela cauda, o tratamento com EHA, ou com a FBut, diminuiu a latência para a imobilidade e aumentou a duração da imobilidade com as doses mais elevadas. Esses resultados não indicam ação tipo-antidepressiva. Ao contrário, os resultados podem ser explicados pela ação depressora do SNC detectada nos testes de hipnose.

No seu conjunto, as ações do EHA e da FBut no SNC foram semelhantes. Em alguns testes, a intensidade dos efeitos favoreceram a FBut, como seria esperado pela concentração dos compostos (2 vezes) nessa fração, comparativamente ao EHA. Por esta razão, a continuação dos testes farmacológicos utilizou a FBut, fração mais purificada que serviu também para a purificação química e isolamento dos compostos de *A. amazonicus*.

Os estudos da farmacodinâmica secundária da FBut foram continuados com os testes de analgesia e inflamação. O teste da formalina em roedores é um modelo de nocicepção muito utilizado. Neste teste, após a injeção subcutânea de formol diluído, os animais apresentam uma resposta de lamber as patas, caracteristicamente bifásica: a primeira fase (durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina) parece ser devida à estimulação química direta de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas (A δ) e não mielinizadas (principalmente fibras C) e à ação da substância P e da bradicinina. As respostas da primeira fase podem ser suprimidas com a administração de drogas analgésicas opióides como a morfina (AMARAL *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). A segunda fase (dos 15 aos 30 minutos após a formalina) envolve a liberação dos mediadores inflamatórios histamina,

serotonina, bradicinina e prostaglandinas formados nos tecidos periféricos em contato com o formol. Esta fase pode ser suprimida com a administração de anti-inflamatórios e de drogas opióides (CAPONE; ALOISI, 2004; FRANÇA *et al.*, 2001; HUNSKAAR *et al.*, 1985; OLIVEIRA *et al.*, 2008; TJOLSEN; HOLE, 1997). A contagem do número de lambeduras durante a 1ª. e a 2ª. fases do teste da formalina quantifica a resposta de nocicepção.

O tratamento com FBut inibiu significativamente o tempo de lambedura nas duas fases do teste da formalina, em relação ao controle, semelhante a ação de opióides. Este tipo de ação, no entanto, não foi comprovado no teste da retirada da cauda (“tail flick”), uma vez que o tratamento com FBut aumentou a latência para retirada da cauda, mas o pré-tratamento com naloxona não bloqueou este efeito.

A FBut também apresentou atividade analgésica no teste da placa quente, perdurando por 2 horas. Este teste envolve mecanismos de integração supra espinhal (BARS *et al.*, 2001). Resultados apresentados anteriormente indicaram que a FBut tem ação hipnosedativa; portanto, essa ação depressora do SNC pode ser responsável por parte da atividade anti-nociceptiva no teste da formalina.

A ação anti-inflamatória da FBut foi testada no edema induzido por carragenina, um teste clássico para avaliar a atividade anti-inflamatória/anti-edematogênica (DI ROSA *et al.*, 1971). Neste teste, a injeção subplantar de carragenina 1% produz reação edematogênica aguda progressiva atingindo pico máximo após 3 horas.

Da ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios forma-se um exsudato rico em proteínas, neutrófilos e metabólitos do ácido araquidônico originados pelas vias da ciclooxigenase e lipoxigenase (LO *et al.*, 1982, ZHANG, *et al.*, 2007). Inicialmente (0 a 60 min), a resposta está relacionada à liberação de histamina e serotonina. A partir desse momento (90-150 min), envolve a liberação de cininas e finalmente (150-360 min), o edema é

mantido pela produção de prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971, GARCIA *et al.*, 2004). O teste do edema induzido por carragenina em ratos foi utilizado para avaliar a atividade anti-edematogênica.

O tratamento prévio com a FBut da *A. amazonicus* inibiu o edema apenas a partir da 3ª hora da administração de carragenina, quando o edema já atingia seu valor máximo. A inibição foi pequena (20-30%) e igual com as duas doses de FBut testadas; comparativamente, a indometacina, fármaco anti-inflamatório inibidor da COX-1, diminuiu o edema a partir da primeira hora após a injeção da carragenina.

Foi avaliado também, se a FBut poderia interferir com a ação edematogênica da histamina e serotonina no modelo de edema induzido por dextrana, no qual a resposta tem evolução mais curta, com pico máximo em 1 hora e envolve a liberação de histamina e 5-hidroxitriptamina (serotonina) (ESTEVES *et al.*, 2005; TAMURA *et al.*, 2002) originários da degranulação de mastócitos (LO *et al.*, 1982). A FBut não interferiu com a formação do edema produzido pela dextrana. A ciproheptadina, um antagonista de receptores H₁ e 5-HT₂ (CHINUCK *et al.*, 2007, SLAVNOV *et al.*, 1982), reduziu em todos os tempos o edema induzido pela dextrana. Os resultados indicam, portanto, que a FBut tem pequena ação anti-edematogênica. Este efeito pode ser explicado por inibição da síntese de prostaglandinas, uma vez que os efeitos iniciais da carragenina e os da dextrana não foram inibidos. A atividade anti-inflamatória da FBut também foi observada na inibição da migração celular produzida por carragenina. Além disso, o tratamento com a FBut diminuiu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, indicando uma possível atividade analgésica por ação anti-inflamatória.

Os estudos *in vitro* da FBut foram iniciados na preparação isolada de diafragma de rato comandado por estimulação elétrica do nervo motor, ou estimulado diretamente com

estímulos elétricos transmuralis. Em músculos esqueléticos, o potencial de ação gerado no neurônio motor propaga-se até os terminais axônicos e resulta na liberação de ACh na fenda sináptica (SPERELAKIS, 2001). A ACh liga-se ao receptor pós-juncional, que é um canal iônico não seletivo. Este, quando ativado, permite o influxo de Na^+ e efluxo de K^+ que leva à despolarização do sarcolema. O potencial de ação assim gerado no sarcolema propaga-se por toda a fibra muscular. Na preparação estimulada diretamente com pulsos transmuralis o potencial de ação independe da liberação de ACh do terminal nervoso. Nos dois casos, a despolarização muscular propagada pelos túbulos T é detectada pelos receptores dihidropiridínicos (DHPRs) da tríade que, através de uma mudança conformacional, ativam os receptores (canais) de rianodina (RyR) que liberam Ca^{2+} armazenado no retículo sarcoplasmático (RS) muscular. O Ca^{2+} liberado no citosol liga-se à troponina C ativando o complexo actina-miosina e a contração (FILL; COPELLO, 2002; HAMILTON *et al.*, 2000). O aumento do Ca^{2+} livre no citoplasma ativa a Ca^{2+} - ATPase, também do RS, que recapta e armazena de volta o Ca^{2+} , iniciando o relaxamento e garantindo a quiescência muscular.

A FBut até a concentração de 1 mg/mL não alterou a capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta ou indiretamente, indicando que não houve efeito na placa motora, ou na transmissão neuromuscular, respectivamente. Da mesma forma, os estudos *in vitro* mostraram que a FBut não alterou a atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de mamífero, ocorrendo diminuição da atividade apenas com concentrações elevadas, caracterizando uma resposta inespecífica.

Os efeitos mais notáveis da *A. amazonicus* foram no trato gastrointestinal e na pressão arterial.

Nos testes gerais utilizando o jejuno isolado de rato, foi verificado que a resposta contrátil à ACh foi inibida com a incubação prévia de FBut: a CE_{50} da ACh aumentou de 3 a 4

vezes na presença do extrato (0,1 a 1 mg/mL), sem alteração do efeito contrátil máximo, indicando ação inibidora competitiva da atividade colinérgica que comanda a movimentação e a secreção intestinal. No entanto, o tratamento com FBut não alterou o trânsito do carvão ativado, indicando que a motilidade intestinal não foi modificada *in vivo*. Nenhuma outra evidência da ação antimuscarínica que pudesse corroborar o teste *in vitro* foi obtida neste trabalho. É possível que o(s) composto(s) com atividade antimuscarínica tenha(m) baixa biodisponibilidade, mas também não contamos no momento com outras indicações nesse sentido. Como será discutido, os resultados obtidos na pressão arterial falam contra essa possibilidade, uma vez que a injeção endovenosa de FBut não inibiu a resposta à ACh. Ainda no trato gastrointestinal, o tratamento com a FBut por via oral impediu a formação de úlceras gástricas induzidas por estresse a frio e por etanol. O tratamento prévio com administração da FBut na luz duodenal também inibiu a secreção ácida gástrica em camundongos. É conhecido que úlceras induzidas por estresse, por etanol e por medicamentos, principalmente anti-inflamatórios, são as mais comuns na patologia da úlcera gástrica humana (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2006; LAPA *et al.*, 2008). Os modelos animais utilizados para avaliar os efeitos de protetores da mucosa e antissecretores reproduzem as ações no homem. Os mecanismos também são semelhantes: úlceras por estresse envolvem mecanismos nervosos centrais, principalmente hipotalâmicos, que diminuem o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, aumentam a motilidade intestinal e estimulam a secreção ácida (GLAVIN; SZABO, 1992; KONO *et al.*, 2001; TEPPERMAN; JACOBSON, 1994). O álcool administrado em concentrações elevadas (70-80%) produz lesões, ou úlceras, por uma ação direta sobre a mucosa gástrica com necrose acompanhada de hemorragia e peroxidação lipídica, independente da secreção ácida (BATISTA *et al.*, 2004; TOMA *et al.*, 2004). Já os anti-inflamatórios não-esteroidais têm seu efeito ulcerativo explicado pela inibição da ciclooxigenase I (COX I), enzima constitutiva da mucosa gástrica responsável pela síntese de

prostaglandinas, resultando em diminuição da secreção de bicarbonato, de muco e do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica (LIU *et al.*, 2006).

Em nossas experiências a administração oral da FBut reduziu de forma dose-dependente as lesões gástricas desencadeadas por estresse a frio e por etanol, mas não protegeu contra as úlceras induzidas por indometacina. Estes resultados indicaram que a atividade antiúlcera da FBut não parecia estar relacionada ao estímulo da síntese de prostaglandinas. De fato, o tratamento prévio com a FBut administrada na luz duodenal reduziu o volume da secreção gástrica proporcionalmente às doses. O pH da secreção não foi alterado, mas a acidez total foi diminuída. Como o extrato foi injetado na luz duodenal, depreende-se que os constituintes ativos na mucosa gástrica foram absorvidos no intestino e que o efeito não podia ser devido a uma neutralização do ácido gástrico luminal pela fração, ou por aderência desta fração à mucosa gástrica formando uma barreira protetora. A ação não poderia também ser explicada por bloqueio colinérgico pelas razões discutidas acima.

O mecanismo desse efeito antissecretor ácido da FBut foi avaliado *in vitro* medindo-se a atividade da bomba de prótons $H^+-K^+-ATPase$ isolada da mucosa gástrica de porco. Esta bomba de prótons é o alvo final comum de todas as vias estimuladoras da secreção de ácido nas células parietais: histaminérgica, colinérgica e gastrinérgica. A histamina ativa receptores H_2 acoplados à proteína G, convertendo o trifosfato de adenosina (ATP) intracelular em monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), que ativa proteínas quinases dependentes de AMPC (PKA). Estas, fosforilam as proteínas responsáveis pela ativação da $H^+-K^+-ATPase$ (URUSHIDANI; FORTE, 1997; YAO; FORTE, 2003). A estimulação ácida por acetilcolina e gastrina envolve o aumento do cálcio citosólico na célula parietal. Esses mediadores ativam seus receptores M_3 e CCK_2 , respectivamente, que são acoplados a fosfolipases e catalisam a formação de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) a partir dos fosfolípidos da membrana. O IP_3 mobiliza íons cálcio dos estoques sensíveis a IP_3 e aumentam a

permeabilidade da membrana ao cálcio. O cálcio liga-se à calmodulina, formando o complexo cálcio-calmodulina (CaM) que promove a fosforilação de proteínas em cascata e ativa as proteínas quinases dependentes de cálcio (PKC). O DAG atua como co-fator juntamente com o cálcio na ativação de PKC (URUSHIDANI; FORTE, 1997). O estímulo da PKA, pela via histaminérgica e da PKC, pelas vias colinérgica e gastrinérgica, promove a fosforilação das proteínas responsáveis pela ativação da $H^+-K^+-ATPase$, translocada das vesículas tubulares citoplasmáticas para os canalículos secretores da membrana após estimulação. A enzima induz a liberação de íons H^+ para o lúmen gástrico em troca de um íon K^+ . O H^+ associa-se ao íon Cl^- no canalículo secretor, formando HCl, que é liberado na luz do estômago. Esta é a etapa final da produção do ácido (RABÓN *et al.*, 1982).

Os resultados obtidos *in vitro* não mostraram atividade elevada da FBut ensaiada na $H^+-K^+-ATPase$ de porco, mas não permite excluir a inibição da bomba como um dos mecanismos responsáveis pela atividade antissecretora da *A. amazonicus*. Outros estudos em glândulas oxínticas isoladas ou de secreção *in vivo* com estímulos de histamina e betanecol serão necessários.

A administração oral da FBut reduziu a pressão arterial de ratos não anestesiados, mostrando, uma vez mais, que alguns componentes da planta são absorvidos por via oral. A inversão do tratamento entre os grupos controle e tratados com FBut, produziu hipotensão nos animais que passaram a receber a FBut v.o., mas a frequência cardíaca durante o registro da PA sistólica não se alterou simultaneamente à hipotensão em nenhum grupo. Nos animais hipotensos que passaram a ser tratados com água, a pressão arterial retornou aos valores basais em dois dias. Em ratos anestesiados a injeção endovenosa de FBut (3 a 20 mg/kg) produziu hipotensão relacionada à dose, sem reversão à pressão basal com as maiores doses. Esse efeito não foi bloqueado pela administração prévia de atropina. A administração prévia

de FBut também não alterou o efeito hipotensor produzido pela ACh, indicando que a hipotensão não é mediada por ativação de receptores M_2 ou M_3 . A FBut não interferiu com as respostas pressóricas à noradrenalina e à angiotensina II, portanto, o efeito hipotensor da FBut não se deve ao bloqueio dos receptores destes mediadores. Como obtido no registro da PA em ratos não anestesiados, não foram detectadas alterações cardíacas durante o efeito da FBut em animais anestesiados.

Esses resultados, hipotensão não relacionada à ação muscarínica cardíaca ou vascular, ou ao bloqueio de vasoconstritores endógenos, indicou o estudo de possíveis ações da FBut no débito cardíaco e em mecanismos intracelulares indutores de relaxamento da musculatura lisa vascular.

A pressão arterial (PA) é mantida pelo débito cardíaco (DC) e pela resistência vascular periférica (RP), segundo a relação $PA = DC \times RP$. Portanto, na constância do volume circulante nos ratos anestesiados, alterações cardíacas diminuindo o débito sanguíneo e ações vasculares diminuindo a resistência periférica poderiam explicar a ação hipotensora da FBut.

Assim como observado *in vivo*, a FBut não alterou a frequência cardíaca *in vitro* em átrios de rato, portanto, não há indicação de que a fração altere o automatismo cardíaco. No entanto, a força de contração do músculo papilar de rato *in vitro* foi reduzida de forma concentração-dependente após a incubação da FBut, caracterizando uma ação inotrópica negativa. A influência dessa ação no débito cardíaco *in vivo* ainda não foi avaliada.

A ação vascular foi estudada em aorta isolada de rato. Como anéis de aorta *in vitro* têm tônus basal baixo, a resposta vasorrelaxante foi obtida no tônus vascular induzido pela noradrenalina. Os anéis de aorta de rato contraíram pela incubação de noradrenalina de forma concentração-dependente: o tônus induzido pela noradrenalina (10^{-7} M) foi mantido além dos 20 minutos necessários para a experiência.

É conhecido que o tônus adrenérgico resulta de estímulo de receptores α_1 -adrenérgicos, que leva à ativação de fosfolipase C da membrana celular (PLC), com conseqüente formação de IP_3 e DAG (RHEE, 2001; TORGNARINI; MOULDS, 1997; WALSH, 1994). A ativação de receptores IP_3 localizados na membrana do retículo endo/sarcoplasmático, libera Ca^{2+} reticular para o citosol (BEECH, 1997; WALSH, 1994; McCARRON *et al.*, 2004), enquanto o DAG, ativa quinases protéicas (PKC), que fosforilam e ativam canais de Ca^{2+} da membrana (HIRAKAWA *et al.*, 1995; LEPRÊTE *et al.*, 1994; KAWASAKI *et al.*, 2010). Com o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, independente do mecanismo ativado, ocorre a contração do músculo liso vascular (WALSH, 1994).

A FBut relaxou o tônus da noradrenalina na aorta de rato, proporcionalmente à concentração incubada (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) inibindo quase 100% do tônus arterial na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$. Como a incubação prévia de L-NAME (análogo da L-arginina inibidor competitivo da NOS) bloqueou parcialmente a ação relaxante das concentrações mais altas (100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) de FBut, a ativação da síntese de NO parece ser um mecanismo comum.

O tônus vascular é modulado por várias substâncias liberadas por células endoteliais, principalmente os produtos da ciclooxigenase (PGI_2 e PGE_2) (FÉLÉTOU; VANHOUTE, 2000) e o NO produzido pela ativação da NO sintase (NOS). Além destes, o relaxamento vascular fisiológico ocorre pela ação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (endothelial derived hiperpolarization factor – EDHF), de rápida difusão, e que provavelmente aumenta a condutância de canais de K^+ ativados por cálcio e/ou sensíveis ao ATP (CAMPBELL *et al.*, 1996; COWAN *et al.*, 1993; YANG *et al.*, 2010). Por fim, o controle fino do tônus vascular pode ser regulado ainda por prostanóides vasoconstritores

(TXA₂/PGH₂) juntamente com os vasodilatadores já mencionados (BRIONES *et al.*, 2002; CORRIU *et al.*, 1996).

Na prática, a participação do endotélio no efeito vasodilatador de uma substância pode ser comprovada pelo efeito comparativo na presença e na ausência de endotélio. Nas experiências controle do trabalho atual, a incubação de ACh em anéis de aorta, pré-contraídos pela noradrenalina, promoveu o relaxamento proporcional à concentração utilizada. O efeito vasorrelaxante da ACh foi bloqueado pela incubação de atropina e pela incubação prévia de L-NAME, mas também pela destruição do endotélio, às vezes involuntária. Assim, para avaliar a ação da FBut em vasos com endotélio funcional, foram consideradas somente as preparações que à adição de ACh relaxaram pelo menos 80% do tônus induzido pela noradrenalina.

Foi demonstrado que o mecanismo pelo qual a ACh promove relaxamento vascular é dependente da liberação de NO pela célula endotelial (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; PALMER *et al.*, 1987). A interação com receptores colinoceptivos do tipo M₃ ativa a enzima NOS (sintase de óxido nítrico) endotelial promovendo a síntese de NO. Este, por sua vez, ativa na musculatura lisa vascular uma guanilato ciclase solúvel (GCs) e estimula a produção de GMPc (FEELISCH; NOACK, 1987), que ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), induzindo o relaxamento vascular por mecanismos diversos, que incluem inibição da geração de IP₃, aumento do sequestro de cálcio citosólico, inibição do influxo de cálcio, ativação de proteínas quinases, estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e desfosforilação da cadeia leve de miosina (CHINKERS; GARBERS, 1991; LINCOLN; CORNWELL, 1993; LINCOLN *et al.*, 1990).

O relaxamento vascular produzido pelas menores concentrações da FBut (10 a 100 µg/mL) foi inibido com a destruição do endotélio da aorta de rato, enquanto a maior concentração (300 µg/mL) foi bloqueada parcialmente. Estes resultados indicaram que a ação

vasorrelaxante da FBut de *A. amazonicus* é dependente do endotélio. No entanto, o bloqueio apenas parcial pelo L-NAME e pela destruição do endotélio, indica outros mecanismos envolvidos na ação da FBut, como, por exemplo, a redução do cálcio citosólico e a hiperpolarização celular devida ao aumento da condutância de canais de potássio (CORRIU *et al.*, 1996; GRUETTER *et al.*, 1981; MURPHY BRAYDEN, 1995).

A primeira possibilidade foi testada em preparações de ducto deferente de rato. Nesta preparação estimulada eletricamente, a incubação da FBut reduziu a contração do músculo de forma concentração-dependente. As contrações foram recuperadas após lavagem da preparação. Em ductos contraídos à adição de noradrenalina, a contração máxima foi reduzida na presença da FBut, sem alteração da CE_{50} , indicando um antagonismo não-competitivo, compatível com a redução de cálcio citosólico, mas que não elimina outras ações da FBut na membrana celular ou nas miofibrilas contráteis. Como as contrações do ducto à noradrenalina foram inibidas de forma não-competitiva, foi possível excluir uma ação bloqueadora α_1 adrenérgica, o que também foi observado nas experiências com registro da pressão arterial. Embora esses resultados no ducto não excluam a inibição da ação do ATP liberado como co-transmissor adrenérgico (BRAIN, 2009; BRAIN *et al.*, 2002; BURNSTOCK, 1976, 2009; WIER *et al.*, 2009), os dados são mais favoráveis a uma ação da FBut independente de receptores de membrana celular. Por exemplo, a inibição no influxo e da mobilização de cálcio intracelular podem ser responsáveis pelo efeito relaxante observado. Nesse sentido, indicando inibição do influxo de cálcio, em ducto deferente de rato despolarizado com KCl 80 mM em meio sem cálcio foi observado que a contração por incubação de $CaCl_2$ foi reduzida e que a CE_{50} foi aumentada de forma concentração-dependente. O efeito da FBut na mobilização de cálcio ainda não foi estudada.

VIII. Sumário e conclusão

A *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke, conhecida popularmente como saracura-mirá ou cerveja de índio, é utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais e prevenção da malária.

ESTE TRABALHO TEVE COMO OBJETIVO: AVALIAR A FARMACODINÂMICA SECUNDÁRIA DO EXTRATO PADRONIZADO EM ORGÃOS VITAIS, COM ÊNFASE NOS EFEITOS CARDIOVASCULARES E EM ATPASES TIPO P DE MAMÍFEROS.

O EHA foi obtido de planta oriunda de ambiente com pouca influência antrópica e a FBut obtida por partição em n-butanol. As frações isoladas da FBut com técnica CLAE permitiram a padronização do extrato a ser estudado. A purificação da FBut em CLAE mostrou que esta é composta por no mínimo 12 frações. Como referência foram citados os 6 componentes majoritários, identificados pelo tempo de retenção e concentração na amostra a 280 nm. As frações majoritárias estão em fase de identificação.

Os resultados farmacológicos obtidos foram:

1 - O EHA e a FBut administrados v.o. aumentaram a duração do sono induzido por barbitúrico, a anestesia induzida por éter etílico, e o tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda. A FBut aumentou também o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE.

2 – O tratamento com FBut diminuiu a nocicepção nas duas fases do teste da formalina e o edema induzido por carragenina.

3 - A FBut protegeu a mucosa gástrica das lesões induzidas por estresse a frio ou por etanol, mas não as induzidas por indometacina. Inibiu a secreção ácida *in vivo* e a atividade da $H^+-K^+-ATPase$.

4 – O tratamento com FBut (0,3 g/kg/dia, v.o.) diminuiu a pressão sistólica de ratos após 14 dias, sem modificar a frequência cardíaca. A interrupção do tratamento recuperou a pressão aos níveis basais.

5 – A injeção e.v. de FBut produziu hipotensão em ratos anestesiados, mas não inibiu as respostas pressóricas à noradrenalina, à Angiotensina I e à Angiotensina II.

6 – A FBut *in vitro* não alterou o automatismo atrial, mas produziu efeito inotrópico negativo em miocárdio de ratos.

7 – A FBut relaxou *in vitro* o tônus adrenérgico da aorta de rato. A incubação prévia de L-NAME ou a destruição mecânica do endotélio, inibiram parcialmente o efeito relaxante.

8- Na musculatura lisa intestinal, a FBut deslocou a CE_{50} da ACh para maiores doses sem alteração do efeito máximo em jejuno de rato. Em ducto deferente de rato (DDR), a FBut inibiu a contração induzida por estímulo elétrico e a contração máxima produzida por adição de Nor sem alteração da CE_{50} . Em DDR despolarizado, a FBut diminuiu a contração induzida pela adição de Ca^{2+} .

9 – A FBut não alterou a capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta ou indiretamente.

10 – Em P-ATPases de mamíferos, a FBut inibiu a atividade da $H^+-K^+-ATPase$ de porco, mas não a atividade da $Ca^{2+}-ATPase$ de coelho.

Os resultados indicam que a FBut produz hipotensão. Este efeito parece estar relacionado com o relaxamento do tônus vascular adrenérgico, possivelmente decorrente da ativação da via do NO na célula endotelial. A ação relaxante da FBut na aorta de rato sem endotélio funcional indica que outros mecanismos vasodilatadores ou bloqueio de canais de cálcio na musculatura lisa vascular podem estar envolvidos na ação hipotensora.

Referências

AHMED, G.U.; MALIK, A.B. Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 451, n. 1, p. 131-142, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0031-6768/>>.

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 795p.

AMARAL J. F. *et al.* Antinociceptive effect of the monoterpene *R*-(+)-limonene in mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1217-1220, 2007. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/_vols>.

BALLINGAND, J.L. *et al.* Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, v. 90, n. 2, p. 347-351, 1993. Disponível em: <<http://www.pnas.org/>>.

BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal model of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/53/4.toc>>.

BATISTA, L.M. *et al.* Gastric antiulcer activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 3, p. 328-332, 2004. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/_vols>.

BEECH, D.J. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca²⁺ channels and K⁺ channels in smooth muscle cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 73, n. 2, p. 91-119, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01637258>>.

BENET, L.Z. General principles. In: Hardman, J.G., Limbard, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.H., Gilman, A.G. (eds.) Goodman & Gilman's **The pharmacological basis of therapeutics**, 11th edition, McGraw Hill, USA, p. 12-13, 1996.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Physiologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.1994.127.issue-4/issuetoc>>.

BERRIDGE, M. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008. Disponível em: <<http://jp.physoc.org/content/586/21.toc>>.

BERTANI, S. *et al.* Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>.

BEUTEL, A. *et al.* Mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos determinantes da atividade vasomotora simpática. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 39, n. 1, p. 65-76, 2006. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista/2006/vol39n1/7_mecanismos_fisiologicos_e_fisiopatologicos.pdf>.

BLUMENTHAL, M. Kava safety questioned due to case reports of liver toxicity. **HerbalGram (American Botanical Council)**, v. 55, p. 26-32, 2002. Disponível em: <<http://cms.herbalgram.org/herbalgram/issue55/article2147.html>>.

BOITTIN, F. X. *et al.* Norepinephrine-induced Ca^{2+} waves depend on InsP_3 and ryanodine receptor activation in vascular myocytes. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 277, n. 1, p. C139-C151, 1999. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/vol277/issue1/>>.

BOOTH, B.; ZEMMEL, R. Prospects for productivity. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 451-457, 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n5/index.html>>.

BOULANGER, C. M.; VANHOUTE, P. M. G-proteins and endothelial responses. **Journal of Vascular Research**, v. 34, n. 3, p. 175-185, 1997. Disponível em: <<http://content.karger.com/ProdukteDB/produkte.asp?Aktion=backfileTOC&Ausgabe=239078&ProduktNr=224160>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAIN, K. L. Neuro effector Ca^{2+} transients for the direct measurement of purine release and indirect measurement of cotransmitters in rodents. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 1, p. 25-30, 2009. Disponível em: <<http://ep.physoc.org/content/94/1.toc>>.

BRAIN, K. L. *et al.* Intermittent ATP release from nerve terminals elicits focal smooth muscle Ca^{2+} transients in mouse vas deferens. **Journal of Physiology**, v. 541, n. 3, p. 849-862, 2002. Disponível em: <<http://jp.physoc.org/content/541/3.toc>>.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 2, p. 131-138, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* A dammarane-type saponin from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1123-1127, 1993.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 175-182, 1992a.

BRANDÃO, M. G. L. *et al.* Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 352-354, 1992b.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Status of the National biodiversity strategy advances. Meeting for identification of issues on biodiversity for cooperation and interchanging among South American countries. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE 89 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE 90 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004c

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/40.pdf>>.

BRENNER, R. *et al.* Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. **Nature**, v. 407, n. 6806, p. 870-876, 2000. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v407/n6806/index.html>>.

BRIONES, A.M. *et al.* Hypertension alters the participation of contractile prostanoids and superoxide anions in lipopolissacharide effects on small mesenteric arteries. **Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 1997-2014, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00243205>>.

BRITTSAN, A. G.; KRANIAS, E. G. Phospholamban and cardiac contractile function. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 32, n. 12, p. 2131-2139, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00222828>>.

BURNSTOCK, G. Do some nerve cells release more than one transmitter? **Neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 239-248, 1976.

BURNSTOCK, G. Purinergic cotransmission. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 1, p. 20-24, 2009. Disponível em: <<http://ep.physoc.org/content/94/1.toc>>.

BUTT, E. Endothelial nitric oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium-independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 5179-5187, 2000. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/275/7.toc>>.

CAMPBELL, W.B. *et al.* Identification os epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circulation Research**, v. 78, n. 3, p. 415-423, 1996. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/content/vol78/issue3/>>.

CAPONE, F.; ALOISI, A. M. Refinement of pain evaluation techniques. The formalin test. **Ann Ist Super Sanità**, v. 40, n. 2, p. 223-229, 2004. Disponível em: <<http://www.iss.it/binary/publ/publi/402223.1107857274.pdf>>.

CARLINI, E.A. *et al.* Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Staph). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 37-64, 1986.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-205, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=PublicationURL&_cdi=4864&_pubType=J&_acc>

t=C000037138&_version=1&_urlVersion=0&_userid=686157&md5=91a10223a5697f6dc5d56024a548964a&jchunk=29#29>.

CARVALHO-FREITAS, M. I. R.; COSTA M. Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from *Citrus aurantium* L. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 12, p. 1629-33, 2002. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/25/12/1629/_pdf>.

CHENG, H.; LEDERER, W.J.; CANNELL, M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 740-744, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/reprint/262/5134/740.pdf>>.

CHINKERS, M.; GARBERS, D. L. Signal transduction by guanylyl cyclases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 553-575, 1991. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/journal/biochem>>.

CHINUCK, R. S.; FORTNUM, H.; BALDWIN, D. R. Appetite stimulants in cystic fibrosis: a systematic review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 20, n. 6, p. 526-537, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jhn.2007.20.issue-6/issuetoc>>.

CONWAY, D. J. Molecular Epidemiology of Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 1, p. 188-204, 2007. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/cgi/reprint/20/1/188>>.

CORRIU, C. *et al.* Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of guinea-pig. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 5, p. 959-964, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1915922/pdf/brjpharm00074-0189.pdf>>.

COX, D.H.; CUI, J.; ALDRICH, R.W. Allosteric gating of a large conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channel. **The Journal of General of Physiology**, v. 110 n. 3, p. 3 256-281, 1997. Disponível em: <<http://jgp.rupress.org/content/110/3.toc>>.

COWAN, C.L. *et al.* Potassium channel-mediated relaxation to acetylcholine in rabbit arteries. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, n. 3, p. 1482-1489, 1993. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/266/3.toc>>.

CROTEU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES R. (Eds.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 1 Ed. American Society of Plant Physiologists, 2000. 1408 p.

DIMMELER, S. *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601-605, 1999. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v399/n6736/index.html>>.

DINIZ, L.R.L. **Efeito das saponinas triterpênicas isoladas de raízes da *Ampelozizyphus amazonicus* Duckesobre a função renal**. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Study of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The**

Journal of Pathology, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.v104:1/issuetoc>>.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, n. 3, p. 265-267, 1969.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/vol287/issue5460/index.dtl>>.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DYER, M. *et al.* Analysis of a cation-transporting ATPase of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 78, n. 1-2, p. 1-12, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01666851>>.

ECKSTEIN-LUDWIG, U. *et al.* Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 424, n. 6951, p. 957-961, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v424/n6951/index.html>>.

ELISABETSKY, E. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. In: IWU, M. M.; WOOTTON, J. C. **Advances in Phytomedicine: ethnomedicine and drug Discovery**, v. 1, p.133-144, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/1572557X>>.

ESTEVEZ, I. *et al.* Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 191-196, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

ETKIN, N.L. Cultural constructions of efficacy. In: VAN DER GEEST, S.; WHYTE, S.R. (eds). **The Context of Medicines in Developing Countries: studies in pharmaceutical anthropology**, pp. 299-306. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1 (suppl), p. 69-75, 2001. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/docs/2001/suppl-1/toc.html>>.

FEELISCH, M.; NOACK, E. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. **European Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 465-469, 1987.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 21, p. 1-18, 2000.

FERNANDEZ-FERNANDEZ, J.M. *et al.* Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 7, p. 1032-1039, 2004. Disponível em: <<http://www.jci.org/113/7>>.

FERRARI, W. M. **Avaliação da Atividade Antimalárica da Planta “Cerveja de Índio” (*Ampelozizyphus amazonicus*) Utilizada como Profilático na Amazônia.** 1997. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FILL, M.; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 4, p. 893-922, 2002. Disponível em: <<http://physrev.physiology.org/content/vol82/issue4/>>.

FOTIE, J. *et al.* Lupeol long-chain fatty acid esters with antimalarial activity from *Holarrhena floribunda*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 1, p. 62-67, 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jnprdf/69/1>>.

FRANÇA; D. S. *et al.* B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, n. 3, p. 157-164, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00142999>>.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v288/n5789/index.html>>.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 53, n. 5, p. 557-573, 1983. Disponível em: <<http://circres.ahajournals.org/cgi/reprint/53/5/557>>.

GAMBERINI, M.T. *et al.* Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 137-139, 1991. Disponível em: <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/1991p.html>>.

GAMO *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 305-310, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7296/index.html>>.

GARCIA, C.R. Calcium homeostasis and signaling in the blood stage malaria parasite. **Parasitology Today**, v. 15, n. 12, p. 488-491, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01694758>>.

GARCIA, M.A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extracts from leaves of *Pimenta racemosavarozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 69-73, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

GAZARINI, M.L. *et al.* Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 102(3): 329-334, 2007.

GIULIANO, R. *et al.* Cholinergic regulation of arterial pressure by the C1 area of the rostral ventrolateral medulla. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 923-942, 1989. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/reprint/9/3/923>>.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory model reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The Faseb Journal**, v. 6, n. 3, p. 825-831, 1992. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/vol6/issue3/>>.

GOLOUBKOVA, T. D. *et al.* Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 141-8, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

GONÇALVES, J. C. R. *et al.* Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmacological Bulletin**, v. 31, n.5, p. 1017-1020, 2008. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/_vols>.

GOTTESMANN, C. GABA mechanisms and sleep. **Neuroscience**, v. 111, n. 2, p. 231-239, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03064522>>.

GRUETTER, C.A. *et al.* Relationship between cyclic guanosine 3',5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprussiate and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 219, n. 1, p. 181-186, 1981. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/219/1.toc>>.

GUIGUEMDE, W. A. *et al.* Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 465, n. 7296, p. 311-315, 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v465/n7296/index.html>>.

GUYTON, A.; HALL, J. **Tratado de fisiologia médica**. 11 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.

HAI, C.M.; MURPHY, R.A. Ca^{2+} , crossbridge phosphorylation and contraction. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 285-298, 1989. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.ph.51.030189.001441>>.

HAMILTON, S.L.; SERYSHEVA, I.; STRASBURG, G.M. Calmodulin and excitation contraction coupling. **News in Physiological Sciences**, v. 15, n. 6, p. 281-284, 2000. Disponível em: <<http://physiologyonline.physiology.org/content/vol15/issue6/>>.

HANDA, S.S. *et al.* Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. **International Centre for Science and High Technology**, 2008.

HEPPNER, T.J. *et al.* Alkaline pH shifts Ca^{2+} sparks to Ca^{2+} waves in smooth muscle cells of pressurized cerebral arteries. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 6, p. H2169-H2176, 2002. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/content/vol283/issue6/>>.

HIDALGO, A. F. **Plantas de Uso Popular para o Tratamento da Malária e Males Associados da Área de Influência do Rio Solimões e Região de Manaus, Am.** 2003. 202p. Doutorado – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Botucatu.

HIRAKAWA, Y. *et al.* Dual regulation of L-type Ca^{2+} channels by serotonin 2 receptor stimulation in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 268, n. 2, p. 544-549, 1995. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/content/vol268/issue2/>>.

HIRUMA-LIMA, A.C. *et al.* Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1-2, p. 215-224, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

HORRIGAN, F.T.; CUI, J.; ALDRICH, R.W. Allosteric voltage gating of potassium channels. I. Slow ionic currents in the absence of Ca^{2+} . **The Journal of the General Physiology**, vol. 114, n. 2, p. 277-304, 1999. Disponível em: <<http://jgp.rupress.org/content/114/2.toc>>

HOSSEIN SADRZADEH, S.M.; VINCENZI, F.F.; HINDS, T. R. Simultaneous measurement of multiple membrane ATPases in microtiter plates. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 30, n. 2, p. 103-110, 1993.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n. 1, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formaline test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-1.asp>>.

IRWIN, S. Comparative observation assessment: I. a systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. **Psychopharmacology** (Berlin) v. 13, n. 3, p. 222-257, 1968. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0033-3158/13/3/>>.

JACOBSON, D. *et al.* Determinants contributing to estrogen-regulated expression of SK3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 660-668, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/0006291X>>.

JAGGAR, J.H.; STEVENSON, A.S.; NELSON, M.T. Voltage dependence of Ca^{2+} sparks in intact cerebral arteries. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 274, n. 6, p. C1755-C1761, 1998. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/vol274/issue6/>>.

KASUYA, Y. *et al.* Nonspecific denervation supersensitivity in the rat vas deferens “*in vitro*”. **European Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 177-184, 1969.

KAWASAKI, T. *et al.* Protein kinase c-induced phosphorylation of orai1 regulates the intracellular Ca^{2+} level via the store-operated Ca^{2+} channel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 25720-25730, 2010.

KAYSER, O.; MASIHI, K.N.; KIDERLEN, A.F. Natural products and synthetic compounds as immunomodulators. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 1, n. 2, p. 319-335, 2003. Disponível em: <<http://www.expert-reviews.com/toc/eri/1/2>>.

KERWIN, J.F. JR.; LANCASTER, J. R. JR.; FELDMAN, P. L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **Journal of Medicine Chemistry**, v. 38, n. 22, p. 4343-4362, 1995. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jmcmr/38/22>>.

KHALID, S.A. *et al.* Potencial antimalarial candidates from African plants: An *in vitro* approach using *P. falciparum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 201-209, 1986.

KIMURA, M. *et al.* Cloning of a Ca(2+)-ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca(2+)-ATPases. **Journal of Cell Science**, v. 104, n. 4, p. 1129-36, 1993. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/vol104/issue4/index.dtl>>.

KOCH-WESER J.; GREENBLATT, D. J. The archaic barbiturate hypnotics. **The New England Journal of Medicine**, v. 291, n. 15, p. 790-1, 1974. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM197410102911512>>.

KONO, T. *et al.* Adaptive cytoprotection against acetic acid induced colonic injury in rats. **International Journal of Colorectal Diseases**, v. 16, n. 6, p. 384-390, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0179-1958/16/6/>>.

KOSK-KOSICKA, D. Measurement of Ca²⁺-ATPase activity (in PMCA and SERCA1). **Methods in Molecular Biology-Calcium Signaling Protocols**, v. 114, p. 343-54, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/978-0-89603-597-3/>>.

KRETTLI, A.U. *et al.* The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 8, p. 1033-1042, 2001. Disponível em: <<http://memorias.ioc.fiocruz.br/968/968.html>>.

LAMAS, S. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 89, n. 14, p. 6348-6352, 1992. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/89/14.toc>>.

LAPA, A. J. *et al.* **Plantas Medicinais: métodos de avaliação da atividade farmacológica**. 5ª edição. Campinas: Expressão Gráfica, 2008. 144 p.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Edição. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102 p.

LEDOUX, J. *et al.* Calcium-activated potassium channels and regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, n. 1, p. 69-78, 2006. Disponível em: <<http://physiologyonline.physiology.org/content/vol21/issue1/>>.

LEE, M. R. Plants against malaria. Part 1: cinchona or the peruvian bark. **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2002a. Disponível em: <<http://www.rcpe.ac.uk/journal/issue/32-3.php>>.

LEE, M. R. Plants against malaria. Part 2: artemisia annua (qinghaosu or the sweet Wormwood). **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 32, n. 4, p. 300-305, 2002b. Disponível em: <<http://www.rcpe.ac.uk/journal/issue/32-4.php>>.

LEPRÊTE, N.; MIRONNEAU, J.; MOREL, J.L. Both α_{1A} and α_{2A} -adrenoreceptor subtypes stimulate voltage-operated L-type calcium channels in rat portal vein myocytes. **The Journal**

of **Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29546-29552, 1994. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/269/47.toc>>.

LIMA, R.B. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rhamnaceae. **Rodriguésia**, Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 57, n. 2, p. 247-249, 2006. Disponível em: <<http://rodriguesia.jbrj.gov.br/>>.

LIN, C.C. *et al.* Hepatoprotective effects of emodin from *Ventilago leiocarpa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 107-111, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

LINCOLN, J.; HOYLE, C.H.V.; BURNSTOCK, G. Nitric oxide in health and disease. **Cambridge University Press**, Cambridge, 1997. Disponível em: <http://www.cambridge.org/gb/knowledge/isbn/item1152008/?site_locale=en_GB>.

LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L.; TAYLOR, A.E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 258, n. 3, p. C399-407, 1990. Disponível em: <<http://ajpcell.physiology.org/content/vol258/issue3/>>.

LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L. Intracellular cGMP receptor proteins. **FASEB Journal**, v. 7, n. 2, p. 328-338, 1993. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/vol7/issue2/>>.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 46, n. 3, p. 321-340, 1990.

LIU, Y.; AKIYAMA, J.; GRAHAM, D.Y. Current understandings of *Helicobacter pylori*, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. **Minerva Gastroenterologica e Dietologica**, v. 52, n. 3, p. 235-2348, 2006. Disponível em: <<http://www.minervamedica.it/en/journals/gastroenterologica-dietologica/archive.php>>.

LO, T. N; ALMEIDA, A. P; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, USA, v. 221, n. 1, p. 261-267, 1982. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/221/1.toc>>.

LOLIO, C. A. Epidemiologia da hipertensão arterial. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 425-432, 1990. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issues&pid=0034-8910&lng=en&nrm=iso>.

LOPES, N.P. *et al.* Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazonian Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 3, p. 313-319, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

LUCKI, I. A prescription to resist proscriptions for murine models of depression. **Psychopharmacology**, Berlim, v. 153, n. 3, p. 395-398, 2001. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0033-3158/153/3/>>.

MALONE, M.H. ROBICHAUD RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320-332, 1962.

MARCHESINI, N. *et al.* A malaria parasite-encoded vacuolar H⁺-ATPase is targeted to the host erythrocyte. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 44, p. 36841-7, 2005. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/280/44.toc>>.

MARKS, A. R. Ryanodine receptors, FKBP12, and heart failure. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. d970-977, 2002. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/current/vol7.htm>>.

MARLETTA, M. A. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N nitrosating agents. **Chemical Research in Toxicology**, v. 1, n. 5, p. 249-25, 1988. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/crtoec/1/5>>.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/268/17.toc>>.

McCARRON, J.G. *et al.* Origin and mechanisms of Ca²⁺ - waves in smooth muscle as revealed by localized photolysis of caged inositol 1,4,5-triphosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 8417-8427, 2004.

McDONALD, L.J.; MURAD, F. Nitric oxide and cyclic GMP signaling. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 211, n. 1, p. 1-6, 1996.

McMANUS, O.B. Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 23, n. 4, p. 537-560, 1991. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0145-479x/23/4/>>.

MEDRADO, V. C. Anestésicos inalatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 377-390.

MEIER, W.; BERRY, P. *Ampelozizyphus guaqueirensis* (Rhamnaceae), a new tree species endemic to the Venezuelan Coastal Cordillera. **Brittonia**, v. 60, n. 2, p. 131-135, 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0007-196x/60/2/>>.

MEHTA, J.L. *et al.* Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 125, n. 3, p. 370-377, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00222143>>.

MEYER, N.B; VIEIRA, M.A.R.; BRANDÃO, M.G.L. **Efeito do extrato bruto de Ampelozizyphus amazonicus Ducke (Cerveja de Índio) sobre a diurese em ratos acordados e mantidos em gaiolas metabólicas**. In: Semana de Iniciação Científica da UFMG, 11, Belo Horizonte, 2002. Resumos...Belo Horizonte: UFMG. Disponível em: <http://www.ufmg.br/prpq_old/xisic/sic2002/resumos/1w1w67.html>.

MITTERMEIER, R. *et al.* Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 516-520, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cbi.1998.12.issue-3/issuetoc>>.

MURAKAMI, S. *et al.* Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase and acid secretion by cassigarol A: a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 33-37, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00062952>>.

MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J.E. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Physiology**, v. 486, n. 1, p. 47-58, 1995. Disponível em: <http://jp.physoc.org/content/486/Pt_1.toc>.

MURRAY, C. K. *et al.* Rapid diagnostic testing for malaria. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 10, p. 876-883, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tmi.2003.8.issue-10/issuetoc>>.

NELSON, M.T. *et al.* Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. **Science**, v. 270, n. 5236, p. 633-637, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/vol270/issue5236/index.dtl>>.

NETTO, J.V.B. Caracterização de áreas de ocorrência e regeneração natural de populações de saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*) em área de terra firme no estado do Amazonas. Relatório final PIB-A/071/2004. Manaus, 2005.

NISHIMURA, J.; KHALIL, R.A.; van BREEMEN, C. Agonist- induced vascular tone. **Hypertension**, v. 13, n. 6, p. 835-844, 1989. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/content/vol13/issue6/>>.

NTOUMI, F. *et al.* New Interventions for Malaria: mining the human and parasite genomes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6 (Suppl), p. 270-275, 2007. Disponível em: <http://www.ajtmh.org/content/vol77/6_Suppl/index.shtml>.

OLIVEIRA, A.B. *et al.* Plant-derived antimalarials agents: new leads and efficient phytomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=0001-3765&script=sci_issues>.

OLIVEIRA, F.S., SOUSA, D.P., ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 588-591, 2008. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/31/4/_contents>.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factors. **Nature**, v. 327 n. 6122, p. 524-526, 1987. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v327/n6122/index.html>>.

PALMER, R.M.J.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v333/n6174/index.html>>.

PANZA, J.A. In: OPARIL, S.; WEBER, M.A. **Hypertension: a companion to Brenner and Rector's the kidney**. W.B. Saunders Company, p. 158-165, 2000.

PELLOW, S. *et al.* Validation of open: closed arm entries in a elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-9, 1986.

POLLOCK, J.S. *et al.* Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v. 88, n. 23, p. 10480- 10484, 1991. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/88/23.toc>>.

PONTES, C.F. Manual de sobrevivência na selva. 4^a edição, Rio de Janeiro: IBGE, 1999. 116 p.

PORSOLT, R.D., LE PICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730–732, 1977. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v327/n6122/index.html>>.

PORSOLT, R.D., ANTON, G., BLAVET, N., JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal Pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 1978.

RABON, E.D.; McFALL, T.L.; SACHS, G. The gastric [H, K] ATPase: H⁺/ ATPase stoichiometry. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 11, p. 6296-6299, 1982. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/257/11.toc>>.

RABÓN, E.D.; IM, W.B.; SACHS, G. Preparation of gastric H⁺, K⁺ - ATPase. In: FLEISCHER, S.; FLEISCHER, B. (Ed.). **Methods in Enzymology - Biomembranes Part Q: ATP-Driven Pumps and Related Transport: Calcium, Proton, and Potassium Pumps**, v. 157, p. 649-654, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/00766879>>.

RHEE, S.G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, p. 281-312, 2001.

RIBEIRO, J.E.L.S. *et al.* **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 816p.

ROBERT, A. *et al.* Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, n. 3, p. 433-443, 1979. Disponível em: <<http://www.gastrojournal.org/issues>>.

ROCHA, R. F.; LAPA, A J.; BRAZ FILHO, R. Estudo comparativo da ação depressora central e do efeito analgésico produzido pelo Lupeol (L), Lupenona (LN) e Ácido Betulínico (B). **Oréades**, v. 8, n. 14-15, p. 366-374, 1981.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Ed.), **Ethology and Psychopharmacology**. Chichester: Wiley, 1994. p. 9-44.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

RODRIGUES, E. Plants and animal utilized as medicine in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 378-391, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.v20:5/issuetoc>>.

ROSAS, L. V. *et al.* *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 663-670, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issues&pid=0100-879X&lng=en&nrm=iso>.

RYAN, R.P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications - **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fml.2008.278.issue-1/issuetoc>>.

SANTOS, A.M.S. *et al.* Traditional medicines in the Rio Negro valley (Amazonas state, Brazil). Observations on the ethnopharmacology and the use of the plant saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*): Pharmacological activity and/or symbolic efficacy. **Boletim Museu Paraense Emilio Goeldi**, v. 1, n. 1, p. 137-147, 2005. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/bmpegch/v1n1/v1n1a06.pdf>>.

SATTABONGKOT, J. *et al.* Establishment of a human hepatocyte line that supports *in vitro* development of the exo-erythrocytic stages of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 5, p. 708-715, 2006. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/vol74/issue5/>>.

SEMAFUKO, W.E.; BOWIE, W.C. Active metabolism of mouse papillary muscle. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 228, n. 6, p. 1800-1807, 1975. Disponível em: <<http://ajplegacy.physiology.org/content/vol228/issue6/>>.

SENAY, E.C.; LEVINE, R.J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 4, p. 1221-1223, 1967.

SHAH, V. P. *et al.* Evaluation of orally administrated highly variable drugs and drug formulation. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1590-1594, 1996. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0724-8741/13/11/>>.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SLAVNOV, V. N.; VALUEVA, G. V.; LUCHITSKII, E. V. Mechanism of action of cyproheptadine (peritol) on activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 94, n. 3, p. 1245-1247, 1982. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/ptk173618m088618/>>.

SPERELAKIS, N. **Cell Physiology**. 3th edition, USA: Academic Press, 2001.

STÉRU, L. *et al.* The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 367-370, 1985. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0033-3158/85/3/>>.

STROBEL, G. *et al.* Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-68, 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jnprdf/67/2>>.

STUEHR, D.J. *et al.* Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN- containing flavoprotein. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences, USA, v. 88, n. 17, p. 7773-7777, 1991. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/88/17.toc>>.

TAKAGI, K.; OKABE, S.; SAZIKI, R. A new method for the production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 418-426, 1969. Disponível em: <http://www.journalarchive.jst.go.jp/english/jnltop_en.php?cdjournal=jphs1951>.

TALISUNA, A. O.; BLOLAND, P.; D'ALESSANDRO, U. History, Dynamics, and Public Health Importance of Malaria Parasite Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 235-254, 2004. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/vol17/issue1/index.dtl>>.

TALUKDER, G.; ALDRICH, R.W. Complex voltage-dependent behavior of single unliganded calcium-sensitive potassium channels. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 2, p. 761-772, 2000. Disponível em: <<http://www.cell.com/biophysj/archive/issue?pii=S0006-3495%2800%29X7138-X>>.

TAMURA, T. *et al.* Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. **European Journal of Pharmacology**, v. 448, n. 1, p. 81-87, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00142999>>.

TANAE, M.M. *et al.* Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glazoui* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 309-313, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/09447113>>.

TEPPERMAN, B.L. JACOBSON, E.D. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In: LEONARD, R. J. (Ed.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 3th edition. New York: Raven Press, 1994. pp. 1331-1351.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlim: Springer-Verlag, p. 21-41, 1997.

TOMA, W. *et al.*, Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 345-351, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03788741>>.

TORGNARINI, D.P.; MOULDS, R.F.W. Intracellular Ca²⁺ and contractile responses to α_1 -adrenoceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 322, n. 1, p. 31-36, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/00142999>>.

TSUGORKA, A.; RIOS, E.; BLATTER, L.A. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. **Science**, v. 269, n. 5231, p. 1723-1726, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/vol269/issue5231/index.dtl>>.

URUSHIDANI, T.; FORTE, J.G. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. **Journal of Membrane Biology**, v. 159, n. 2, p. 99-111, 1997. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0022-2631/159/2/>>.

VANE, J.R.; ÄNGGÅRD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **The New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 1, p. 27-36, 1990. Disponível em: <<http://www.nejm.org/medical-archives/1990>>.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Review**, v. 46, n. 3, p. 295-309, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01650173>>.

VANHOUTTE, P. M. Endothelial Adrenoceptors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 796-808, 2001. Disponível em: <<http://journals.lww.com/cardiovascularpharm/toc/2001/11000>>.

VASQUEZ, E.C. *et al.* Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 4, p. 521-532, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issues&pid=0100-879X&lng=en&nrm=iso>.

VIANA JR., J.M. Coleta, aclimação de mudas e cultivo de saracura-mirá (*Ampelozizyphus amazonicus*), uma espécie medicinal amazônica. RELATÓRIO FINALPIB-A/069/2004. Manaus, 2005.

VISSCHER, F.E. *et al.* Pharmacology of pamine bromide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, USA, v. 110, n. 2, p. 188-204, 1954. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/110/2.toc>>.

WALSH, M.P. Regulation of vascular smooth muscle tone. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 919-936, 1994. Disponível em: <<http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/rp-ps/inDetail.jsp?jcode=cjpp&lang=eng&vol=72&is=8>>.

WATANABE, H. *et al.* Anandamine and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRP4 channels. **Nature**, v. 424, n. 6947, p. 434-438, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v424/n6947/index.html>>.

WIER, W. G. *et al.* Sympathetic neurogenic Ca^{2+} signalling in rat arteries: ATP, noradrenaline and neuropeptide Y. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 1, p.31-37, 2009. Disponível em: <<http://ep.physoc.org/content/94/1.toc>>.

WINZELER, E.A. Malaria research in the post-genomic era. **Nature**, v. 455, n. 7214, p. 751-756, 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v455/n7214/index.html>>.

WONGSRICHANALAI, C. *et al.* Epidemiology of drug-resistant malaria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-218, 2002. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/journals/laninf/issue/current?tab=past>>.

WHO. **Global malaria control and elimination: report of a meeting on containment of artemisinin tolerance**. Geneva, Switzerland, 2008. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596817_eng.pdf>.

WHO. **World malaria report 2009**. Geneva, Switzerland, 2009. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241563901_eng.pdf>.

YANG, C. *et al.* Potentiation of EDHF-mediated relaxation by chloride channel blockers. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, p. 1303-1311, 2010.

YAO, X.; FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. **Annual Review of Physiology**, v. 65, p. 103-131, 2003. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/toc/physiol/65/1>>.

YOUNG, R.C.; SCHUMANN, R.; ZHANG, P. Intracellular calcium gradients in cultured human uterine smooth muscle : a functionally important subplasmalemmal space. **Cell Calcium**, v. 29, n. 3, p. 183-189, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01434160>>.

ZHANG, B. LI *et al.* Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 465-469, 2007. Disponível em: <http://www.jstage.jst.go.jp/browse/bpb/30/3/_contents>.

ZHANG, Q. *et al.* Cyclic GMP signaling and regulation of SERCA activity during cardiac myocyte contraction. **Cell Calcium**, v. 37, n. 3, p. 259-266, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/journal/01434160>>.