



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DE EXTRATOS
PADRONIZADOS DAS FOLHAS DE *Quassia amara* L. (PAU-
AMARGO) COLETADAS EM MANICORÉ, NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL.**

FRANCIANNY CARLA MORAES RETROZ

MANAUS
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCIANNY CARLA MORAES RETROZ

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DE EXTRATOS
PADRONIZADOS DAS FOLHAS DE *Quassia amara* L. (PAU-AMARGO)
COLETADAS EM MANICORÉ, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL.**

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

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

MANAUS
2012

R439e Retroz, Francianny Carla Moraes.

Estudo da ação cardiovascular de extratos padronizados das folhas de *Quassia amara* L. (pau-amargo) coletadas em Manicoré, na Amazônia Ocidental. [dissertação] / Francianny Carla Moraes Retroz; orientador, Antonio José Lapa. --- Manaus AM, 2012.

113 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.

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

FRANCIANNY CARLA MORAES RETROZ

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DE EXTRATOS
PADRONIZADOS DAS FOLHAS DE *Quassia amara* L. (PAU-AMARGO)
COLETADAS EM MANICORÉ, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL.**

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

25 de Junho de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP
Presidente da Banca

Profª. Dra. Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof. Dr. Anderson Iuras
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

À Deus, por estar sempre ao meu lado e ter permitido chegar até aqui, aos meus pais, *Antonieta Retroz e Ademir Rodrigues*, e a meu esposo, *William Guimarães*, que sempre torceram e acreditaram no meu sucesso, aos meus irmãos e a todos da minha família.

AGRADECIMENTOS

À DEUS pelo amor e por sua presença constante em minha vida.

Aos meus pais Antonieta e Ademir pelo amor, dedicação, apoio e principalmente por acreditar em mim.

Ao meu querido esposo William pela dedicação, companheirismo e acima de tudo o amor.

Aos meus irmãos Daniel e Rayanny pelo apoio e amizade.

À minha avó Francisca (in memorian) e ao meu pai Luiz Alberto (in memorian) pelo amor e apoio.

Ao meu orientador, Professor Dr. Antonio José Lapa, pela orientação, ensinamentos, paciência e compreensão durante toda essa caminhada.

À minha querida co-orientadora Dra Mirtes Midori Tanae, pela dedicação, ajuda, atenção e principalmente pelo seu incentivo.

A Dra Caden Souccar, a Dra Maria Teresa R. Lima-Landman e a Dra Tereza Christina Monteiro Lima pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Carlos D'Ângelo pelos ensinamentos, apoio e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo elevado grau de excelência das disciplinas que foram ministradas.

A toda equipe do Biotério do Laboratório de Farmacologia, na pessoa do Antonio, Claudia, Celina, Leandro, Rosangela, Sterner que me auxiliaram na obtenção e manutenção dos animais utilizados nos estudos farmacológicos.

A todos os técnicos do Laboratório de Farmacologia (Danilo, Geane, Tony e Vânia) que muito contribuíram para a obtenção das práticas e dos resultados para execução desta Dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, Toxicologia de Medicamentos e Biotério: Alzimir, Andrezza, Fabíola, Jeffeson, Juliana, Karla, Kaori, Lucinei Maciel, Márcia Caroline, Marnyce, Siglia, Suzana, Thiago, Thais e Tânia pela ajuda nos experimentos, pelo companheirismo e momentos de aprendizagem, pela descontração, enfim, pela amizade.

À direção e coordenação da Universidade Federal do Amazonas, nas pessoas, dos professores Dr. Edmar Vaz de Andrade e Dr. José Odair Pereira, pela oportunidade e por serem sempre prestativos às nossas dúvidas.

À fundação Djalma Batista e UNISOL, pelo suporte financeiro à realização deste trabalho.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta etapa de minha formação.

MUITO OBRIGADA.

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvarem diante da Divindade”.

Voltaire

I

RESUMO

A *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) é planta pan-americana conhecida como pau-amargo e quassia. É utilizada na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, hipertensão, malária, e também como inseticida e vermífuga. Das folhas e cascas foram isolados vários compostos químicos como alcaloides β -carbonila, 6-cantin, esteroides e quassinoides (neoquassina e quassina). Neste trabalho, foram estudados a farmacologia geral e os efeitos no sistema cardiovascular de roedores de extratos padronizados de *Quassia amara* coletada em Manicoré, AM. O extrato aquoso (EA) foi obtido por infusão de folhas secas, e a fração butanólica, por partição do EA em butanol. A padronização e purificação da FBut por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) levou ao isolamento de 6 frações (F1 a F6). A administração oral do EA (1,0 g/kg) não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica em ratos; a FBut produziu sinais de sedação, anestesia e cianose após 1 h. Não houve morte dos animais após 24 h do tratamento. No entanto, a administração da FBut (1,0 g/kg) por via intraperitoneal produziu sinais de sedação, anestesia e cianose intensos após 1 h de tratamento; todos os animais morreram após 2 h. Na pressão arterial em ratos anestesiados, a FBut produziu hipotensão rápida e passageira, sem alterar o efeito hipertensor da noradrenalina, ou a hipotensão produzida pela acetilcolina. A hipotensão provocada pela FBut (10,0 mg/kg, e.v.) também não foi alterada pelo tratamento prévio do animal com atropina ou prazosin. As frações responsáveis pela ação hipotensora são a F1, F3 e F6. As frações foram testadas em preparações de aorta de rato com e sem endotélio. As frações F1, F3, F4, F5 e F6 relaxaram o tônus muscular da aorta dependente de endotélio, indicando um provável mecanismo via cascata do NO. As atividades cronotrópica e inotrópica do EA e da FBut foram avaliadas em preparações de átrios direito e esquerdo isolados de rato. O EA (30 a 300 $\mu\text{g/mL}$) e a FBut (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) não alteraram o cronotropismo, no entanto, aumentaram o inotropismo de maneira concentração-dependente. A FBut potenciou a contração do músculo diafragma de rato sob estímulo direto e indireto. A FBut (1 a 300 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho; essa inibição pode estar relacionada à potenciação da contração do músculo diafragma. Em ducto deferente de rato, a FBut diminuiu a contração máxima produzida pela noradrenalina sem alterar a afinidade da droga pelos receptores α_1 -adrenérgicos. As frações purificadas responsáveis por este efeito foram as F1, F3, F4 e F5. A FBut não inibiu o influxo de cálcio.

PALAVRAS-CHAVE: pau-amargo, sistema cardiovascular, hipotensão, Ca^{2+} -ATPase

II

ABSTRACT

Quassia amara L. (Simaroubaceae) is a pan american plant known as pau amargo and quassia. It is used in the folk medicine to treat gastrointestinal disorders, hypertension, malaria, and as insecticide and vermifuge. Several compounds were isolated from the plant leaves and barks as β -carbonile alkaloids, 6-cantins, steroids and quassinoids (nequassin and quassin). In this work, the effects of the standardized extracts from *Q. amara* collected in Manicoré/AM were studied on the cardiovascular system of rodents. The aqueous extract (AE) was prepared from the dried leaves infusion and the butanolic fraction (BuF) was obtained from the AE partition in butanol. The BuF standardization and purification in HPLC isolated 6 fractions (F1 to F6). The AE oral administration (1.0 g/kg) did not produce evident signals of pharmacological activity in rats; BuF caused sedation, anesthesia and cyanosis after 1 h. Death was not observed after 24 h of the treatment. However, BuF (1.0 g/kg) intraperitoneal administration produced intense sedation, anesthesia and cyanosis after 1 h of the treatment; all animals died after 2 h. In anesthetized rats, BuF produced fast and transient hypotension, without altering the hypertensive effect of noradrenalin, or the hypotension induced by acetylcholine. The hypotension caused by BuF (10.0 mg/kg, e.v.) was unchanged by previous treatment with atropine or prazosin. The fractions responsible for the hypotensive effect were: F1, F3 and F6. All fractions were tested on intact endothelium- and denuded- aorta rings contracted by noradrenalin. F1, F3, F4, F5 and F6 fractions relaxed the endothelium intact aorta tonus, indicating a mechanism dependent on NO cascade. The chronotropic and inotropic effects of AE and BuF were also evaluated in isolated right and left rat atrium. Neither AE (30 to 300 μ g/mL) nor BuF (10 to 100 μ g/mL) alter the chronotropism, however, the force of contraction increased in a concentration dependent manner. BuF potentiated the diaphragm muscle contraction induced by direct and indirect electrical stimulation. BuF (1 to 300 μ g/mL) inhibited the activity of the Ca^{2+} -ATPase isolated from rabbit skeletal muscle; this enzyme inhibition may be related to the potentiation of the diaphragm contraction. In rat vas deferens preparations, BuF inhibited the maximal contraction induced by noradrenalin without affecting the drug affinity to the α_1 -adrenergic receptors. The purified fractions responsible for this effect were F1, F3, F4 e F5. BuF did not inhibit the calcium influx in cardiomyocytes and cultured rat uterus cells.

Key-words: pau-amargo, cardiovascular system, hypotension, Ca^{2+} -ATPase

III

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01-** *Quassia amara* L. *in situ* (Manaus, AM). Foto: Francianny Retroz.....28
- Figura 02-** Quassinoides isolados do extrato da folha de *Quassia amara* L.....31
- Figura 03-** Estrutura química da simalicalactona E (SkE).....32
- Figura 04-** Eventos relacionados ao fenômeno da contração muscular.....39
- Figure 05-** Transporte do Ca^{2+} em miócitos ventriculares.....42
- Figure 06-** Contração do músculo liso.....45
- Figure 07-** Representação esquemática da regulação da guanilato ciclase (cGMP) pelo óxido nítrico (NO) sintetizado no endotélio.....47
- Figura 08-** Área de coleta (folhas) da planta *Quassia amara* L. no município de Manicoré/AM, nas coordenadas Latitude: 3°16'28" e Longitude: 60°32'53".....51
- Figura 09-** Perfis cromatográficos do EA e FBut de *Q. amara* em CLAE analítica, utilizando coluna C18, gradiente de água/acetonitrila 5 a 45% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 210 nm.....72
- Figura 10-** Perfis cromatográficos das frações F1 a F6 purificadas da FBut de *Q. amara* em CLAE.....73
- Figura 11-** Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações de *Quassia amara* L relativamente a FBut.....73
- Figura 12-** Efeitos da FBut de *Q. amara* L. (1,0; 3,0 e 10,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.). Registro de uma experiência típica (n = 4).....76
- Figura 13-** Variação da pressão arterial (Δ mm Hg) após injeção de FBut de *Q. amara* L. (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em concentrações crescentes em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.).....76
- Figura 14-** (A) Variação da pressão arterial (Δ mm Hg) após injeção de FBut de *Q. amara* L. (10 mg/kg, e.v.) antes e após a injeção de atropina (1 mg/kg, e.v.) e (B) da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 μ g/kg, e.v., controle) em ratos normotensos anestesiados com

pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.).....	76
Figura 15- (A) Variação da pressão arterial (Δ mm Hg) após injeção de FBut de <i>Q. amara</i> L. (10 mg/kg, e.v.) antes e após a injeção de prazosin (1 mg/kg, e.v.) e (B) da injeção de noradrenalina (0,1; 0,3 e 1,0 μ g/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.).....	77
Figura 16- Variação da pressão arterial (Δ mm Hg) após injeção das frações (F1-F6) purificadas de FBut de <i>Q. amara</i> L. (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.).....	77
Figura 17- Efeito da incubação cumulativa das frações F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D), F5 (E) e F6 (F) (3, 10, 30 e 100 μ g/mL) de <i>Q. amara</i> em anéis de aorta de rato com e sem endotélio sob tônus induzido com noradrenalina 10^{-7} M (100%).....	79
Figura 18- (A) Efeito do EA (10 a 300 μ g/mL) e da (B) FBut (10 a 100 μ g/mL) de <i>Q. amara</i> L. na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. BPM = batimentos por minuto.....	80
Figura 19- (A) Efeito do EA (10 a 300 μ g/mL) e da (B) FBut de <i>Q. amara</i> L. (10 a 100 μ g/mL) na contração do átrio esquerdo isolado de rato estimulado eletricamente, a 35°C.....	81
Figura 20- Efeitos da FBut de <i>Q. amara</i> (10, 30 e 100 μ g/mL) na contração do músculo diafragma de rato obtida com estimulação elétrica direta da fibra muscular na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) a 30°C.....	81
Figura 21- Efeitos da FBut de <i>Q. amara</i> (10, 30 e 100 μ g/mL) na contração do músculo diafragma de rato obtida com estimulação elétrica do nervo frênico a 30°C.....	82
Figura 22- (A) Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> na atividade da Ca^{+2} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação a 37 °C. (B) A tapsigargina (THG), bloqueador específico da SERCA foi utilizada como controle positivo.....	83
Figura 23- Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> L. (10, 30 e 100 μ g/mL) na contração do ducto deferente de rato produzida por estimulação elétrica do músculo liso. Dados expressos como médias \pm erros padrão (n =4).....	84
Figura 24- Efeito das frações (F1-F6) de <i>Q. amara</i> L. (3 e 10 μ g/mL) na contração do ducto deferente de rato produzida por estimulação elétrica do músculo liso.....	85
Figura 25- Efeito da FBut de <i>Quassia amara</i> L. (10, 30 e 100 μ g/mL) na contração do ducto deferente de rato, produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor 10^{-8} a 10^{-3} M), a 30 °C. A FBut foi incubada 20 min antes da adição do agonista.....	86
Figura 26- Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> L. (10, 30 e 100 μ g/mL) na concentração de cálcio intracelular em cultura de células uterinas (A) e em cardiomiócitos de ratos neonatos (B).....	88

IV

LISTA DE TABELA

Tabela 01- Efeito máximo e concentração efetiva media (EC₅₀) obtidos de curvas concentração-efeito de noradrenalina (10⁻⁸ a 10⁻³ M) na ausência e após a incubação da FBut de *Quassia amara* L. nas concentrações indicadas em ducto deferente de rato87

V

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- acetilcolina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	- adenosina trifosfato
ATPase	- adenosina trifosfatase
BPM	- Batimentos por minuto
C	- Controle
CaCl ₂	- cloreto de cálcio
CBA	- Centro de Biotecnologia da Amazônia
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
Ca ²⁺	- íon cálcio
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-Prep	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa
CO ₂	- Gás carbônico
COX-2	- ciclooxigenase 2
DAG	- diacilglicerol
DDR	- Ducto Deferente de Rato
D-MEM	- <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DHP	- diidropiridina
EA	- Extrato Aquoso
EC ₅₀	- Concentração efetiva 50%
ED ₅₀	- Dose média efetiva
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA	ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
E _{max}	- Efeito Máximo
FA _q	- Fração Aquosa
FBut	- Fração Butanólica
FLIPR	- <i>fluorescent imaging plate reader</i>
GABA _A	- ácido gama amino butírico
H ⁺	- íon hidrogênio
HBSS	- <i>Hank's balanced salt solution</i> (solução salina balanceada de Hank)
IC ₅₀	- Concentração Inibitória 50%
IL-1 β	- Interleucina do tipo 1 β
i.p./s. pl/ e.v./v.o.	- intraperitoneal/sub-plantar/via endovenosa/via oral
IP ₃	- Trifosfato de inositol
K ⁺	- íon potássio
KCl	- cloreto de potássio
LC	- Limite de Confiança
LCE	- Labirinto em Cruz Elevado
LNV	- Líquido Nutritivo de Vesícula
L-NAME	- N ^o – nitro-arginina metil éster
Mg ²⁺	- íon magnésio
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
MCLK	- quinase da miosina de cadeia leve
MOPS	- tampão com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
Na ⁺	- íon sódio
Na ₂ HPO ₄	- fosfato dissódico
NaCl	- cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	- dihidrogeno fosfato monossódico
NaHCO ₃	- bicarbonato de sódio
NaOH	- hidróxido de sódio
NF-kB	- Fator nuclear kappa B
Nor	- noradrenalina
NO	- óxido nítrico
O ₂	- Gás oxigênio

OMS	- Organização Mundial de Saúde
p	- Valor de prova (estatística)
Pi	- fosfato inorgânico
PKC	- proteína quinase C
PLC	- fosfolipase C
QA	- <i>Quassia amara</i>
rpm	- rotações por minuto
RyR	- receptor de rianodina
SkD	- simalicalactona D
SkE	- simalicalactona E
SERCA	- <i>Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase</i>
THG	- tapsigargina
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
UFAM	- Universidade Federal do Amazonas
UNIFESP	- Universidade Federal de São Paulo
UV	- ultravioleta

VI

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELA	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
SUMÁRIO	VI
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 <i>Quassia amara</i> L	28
3.1.1 Descrição botânica.....	28
3.1.2 Distribuição geográfica.....	28
3.1.3 Sinonímia.....	29
3.1.4 Etnofarmacologia	30
3.1.5 Composição química	30
3.1.6 Estudos toxicológicos.....	32
3.1.7 Estudos farmacológicos.....	33
3.2 Contração do músculo estriado	36
3.2.1 Contração do Músculo Estriado Esquelético.....	36
3.2.2 Contração do Músculo Estriado Cardíaco.....	41
3.3 Contração do músculo liso	44
3.3.1 Endotélio vascular.....	46
3.4 Pressão Arterial	48
4. MATERIAL	50
4.1 Material Botânico	51

4.2 Material Biológico.....	52
4.3 Material Químico.....	52
4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais	52
4.3.2 Drogas	53
4.3.3 Soluções e Reagentes	53
4.3.3.1 Soluções utilizadas nos estudos.....	53
4.3.3.2 Soluções utilizadas no isolamento e na determinação da atividade da Ca ²⁺ -ATPase.....	54
4.3.3.3 Soluções utilizadas na avaliação de cálcio intracelular ([Ca ²⁺] _i) em cardiomiócitos de ratos e útero de rata em cultura.....	55
5. MÉTODOS.....	56
5.1 Obtenção dos extratos de <i>Q. amara</i>: extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut).....	57
5.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica).....	57
5.1.2 Purificação da FBut de <i>Q. amara</i> L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep).....	58
5.2 Métodos para Detecção de Ação no Sistema Nervoso Central.....	59
5.2.1 Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1964).....	59
5.3 Avaliação do efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> na atividade cardiovascular.....	60
5.3.1 Avaliação da ação da fração butanólica (FBut) e frações (F1-F6) de <i>Q. amara</i> na pressão arterial de ratos anestesiados.....	60
5.3.2 Avaliação da ação do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> na frequência de contração do átrio direito e na força de contração do átrio esquerdo de rato.....	61
5.3.3 Avaliação da ação das frações (F1-F6) de <i>Q. amara</i> em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10 ⁻⁷ M).....	62
5.4 Avaliação da ação no músculo esquelético e na junção neuromuscular.....	63
5.4.1 Músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto.....	63
5.4.2 Músculo diafragma de rato estimulado indiretamente - Preparação músculo/nervo frênico.....	63
5.5 Avaliação do efeito da fração butanólica (FBut) da <i>Q. amara</i> na atividade da Ca²⁺-ATPase.....	64
5.5.1 Isolamento da Ca ²⁺ -ATPase.....	64
5.5.2 Determinação do teor de proteína.....	65
5.5.3 Medida da atividade da Ca ²⁺ -ATPase.....	65
5.6 Avaliação do efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> no músculo	66

liso	
5.6.1 Avaliação da atividade da FBut de <i>Q. amara</i> em ducto deferente de rato estimulado eletricamente.....	66
5.6.2 Avaliação da atividade da FBut de <i>Q. amara</i> em curvas cumulativas de noradrenalina em ducto deferente de rato.....	66
5.7 Avaliação da atividade da FBut de <i>Q. amara</i>, na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em cardiomiócitos de ratos e em útero de rata	67
5.7.1 Cultura de músculo cardíaco de rato.....	67
5.7.2 Cultura de útero de rata.....	68
5.7.3 Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria.....	69
5.8 Análises Estatísticas	70
6. RESULTADOS	71
6.1 Obtenção dos extratos: extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut)	72
6.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica).....	72
6.1.2 Purificação da FBut de <i>Quassia amara</i> L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep).....	73
6.2 Efeito do Extrato Aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> no Sistema Nervoso Central	74
6.2.1 Efeito do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin).....	74
6.3 Ação cardiovascular	75
6.3.1 Efeito da fração butanólica (FBut) e frações (F1-F6) de <i>Q. amara</i> na pressão arterial de ratos anestesiados.....	75
6.3.2 Efeito das frações (F1-F6) de <i>Q. amara</i> em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).....	78
6.3.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> na frequência de contração do átrio direito isolado de rato e na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato.....	80
6.4 Ação na junção neuromuscular	81
6.4.1 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> (10 e 100 μ g/mL) em músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto.....	81
6.4.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> (10 e 100 μ g/mL) em músculo diafragma de rato estimulado indiretamente - Preparação nervo frênico.....	82
6.5 Avaliação do efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> na atividade da Ca^{2+}-ATPase	83
6.5.1 Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase.....	83
6.6 Ação no músculo liso	84
6.6.1 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> (10 e 100 μ g/mL) em ducto deferente de rato estimulado eletricamente.....	84

6.6.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> (10 e 100 µg/mL) em curvas cumulativas de noradrenalina em ducto deferente de rato.....	86
6.6.3 Avaliação da atividade da FBut na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em cardiomiócitos de ratos e útero de rata em cultura.....	87
7. DISCUSSÃO	89
8. CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS	102

1. Introdução

O uso popular de plantas medicinais no combate e cura de doenças é milenar. A comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas tem despertado interesse dos pesquisadores, pois um grande número permanece desconhecido tanto do ponto de vista químico quanto farmacológico.

Os produtos naturais exercem importante papel na medicina popular e também na medicina moderna, sendo fontes de compostos com importantes atividades biológicas (NODARI; GUERRA, 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza o uso de terapias alternativas, integrando a medicina ocidental à medicina tradicional (PERAZA *et al.*, 2007).

Em antigos hieróglifos egípcios e manuais chineses de fitoterapia podemos encontrar a descrição do uso extensivo de produtos naturais com fins medicinais e, ainda hoje, a natureza continua a ser uma grande fonte de medicamentos em todo o mundo (POLUNIN; ROBBINS, 1992). No Brasil, as plantas eram usadas pelos povos indígenas em rituais de cura e também os africanos recém chegados faziam sua utilização em rituais religiosos (FERRO, 2006).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, o que explica o fato de ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, encontrarmos plantas medicinais sendo comercializadas em feiras livres, mercados populares e em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

A imensa variedade de espécies de plantas, animais e microrganismos existentes no ecossistema brasileiro, sem dúvida, apresenta um importante diferencial para o desenvolvimento de medicamentos (KATO, 2001).

Apesar de possuímos a maior biodiversidade do mundo, até 2007 foi desenvolvido apenas um medicamento genuinamente nacional. Isto, talvez seja uma consequência da característica do mercado farmacêutico brasileiro, que é composto por empresas

multinacionais (70%) que vendem predominantemente (90%) produtos de marca, originados a partir de pesquisas desenvolvidas em seus países de origem (MAYER, 2007).

Com isso, a maioria das espécies de plantas não é investigada química e biologicamente com detalhes, apesar de todo conhecimento de técnicas analíticas disponíveis e, por isso, até mesmo plantas medicinais bem conhecidas, necessitam de mais estudos pré-clínicos e clínicos (PHILLIPSON, 2003).

Os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Esses são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares (CALIXTO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validação através de pesquisas científicas que utilizem modelos adequados de experimentação para comprovação dos efeitos farmacológicos e, em seguida, proceder ao isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos e mecanismo de ação para sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico (CALIXTO, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Os estudos de um novo medicamento, incluindo os fitoterápicos, costumam ser divididos em etapas sequenciais. A primeira etapa do estudo é a seleção do material a ser testado; é essencial garantir a uniformidade química e a estabilidade do produto a ser utilizado durante todo o ensaio. Nesse sentido, os estudos envolvendo as plantas medicinais oferecem dificuldades já na fase preliminar. Primeiramente, porque é comum a confusão botânica entre espécies afins; em segundo lugar, porque exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, ou de locais diferentes, não têm necessariamente a mesma atividade

biológica e; em terceiro lugar, porque é difícil controlar quimicamente um extrato vegetal em virtude do grande número de substâncias normalmente presentes (LAPA *et al.*, 2000).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (TWARDOWSCHY, 2007). Desta forma, o melhoramento dos métodos de triagem farmacológica tem proporcionado a descoberta de novas drogas (PERAZA *et al.*, 2007).

Segundo WANG *et al.*, (2009), a padronização química de extratos vegetais é realizada através de métodos de partição em solventes de polaridades diferentes, separação e purificação cromatográfica em diferentes suportes, identificação química instrumental com técnicas variadas de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas, entre outras.

A padronização de extratos polares por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) é um método rápido e eficaz, pois mantém a mistura de compostos de polaridades distintas extraídas no chá (infusão), o que facilita o estudo da atividade farmacológica e a obtenção dos compostos ativos (TANAE *et al.*, 2007).

Inúmeras espécies são conhecidas por suas propriedades terapêuticas em muitas culturas, constituindo um poderoso arsenal de ervas que são usadas para diversos fins, a exemplo do pau-amargo (*Quassia amara*) que tem mostrado eficácia em diversos tipos de infecções, anemia, malária e distúrbios gastrintestinais.

No Brasil, esta espécie é encontrada na fronteira do Estado do Maranhão (Brasil) com a Guiana. É popularmente conhecida na América Latina como amargo, pau-amargo, quassia de caiena, quassia amarga, quabo, pau-tenente, simaruba, pau-quassia, murubá, murupá e quina (TOMA *et al.*, 2002; PARVEEN *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, a casca e as folhas de *Q. amara* são utilizadas como medicamento, pois são ricos em princípios biologicamente ativos (PARVEEN *et al.*, 2003).

Esta planta é fonte de vários compostos que incluem alcaloides β -carbonila, 6-cantín e esteroides (β -sitosterol, stigmasterol e campesterol), assim como os compostos amargos conhecidos como quassinoides, um grupo de substâncias que pertencem à classe dos terpenos. Atividades farmacológicas estão associadas aos triterpenos quassinoides, tais como, antimalárica, antineoplásica, antiviral, antiofídica, antifertilidade, anti-hipertensiva e propriedades amebicida, inseticida, larvicida e vermífuga (DUKE, 1992; AJAIYEGBA *et al.*, 1999; TOMA *et al.*, 2002).

A observação do efeito narcótico (sedação, hipnose) da *Q. amara* pelo uso popular do extrato ou infusão e para o tratamento de várias doenças sugere que esta espécie pode conter algum composto analgésico e/ou antiedematogênico (DUKE, 1992).

A atividade antimalárica dos extratos metanólico e hexânico desta planta foi estudada em camundongos *in vivo*, e a atividade antiviral também foi relatada (AJAIYEGBA *et al.*, 1999; APERS *et al.*, 2002).

A partir da medicina popular indicando o uso da planta como anti-hipertensiva, decidiu-se avaliar a ação da fração butanólica (FBut) padronizada e das frações purificadas no sistema cardiovascular de roedores. Para isso, foram realizados testes *in vivo*, preparações isoladas *in vitro*, estudos enzimáticos, da farmacodinâmica secundária, dos efeitos sistêmicos e de seu(s) mecanismo(s) de ação.

2. *Objetivos*

2.1 Objetivo Geral

- Estudar os efeitos dos extratos padronizados e frações purificadas de *Quassia amara* L. (pau-amargo) na pressão arterial e na contração do músculo liso e esquelético de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter o extrato aquoso (EA) a partir das folhas de *Quassia amara* como indicado na medicina popular (infuso 2,5%).
- Obter a fração butanólica (FBut) semipurificada do EA.
- Purificar a fração butanólica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Estudar o espectro farmacológico geral *in vivo* dos extratos padronizados:
 - Realizar triagem farmacológica para detectar possíveis efeitos centrais dos extratos padronizados.
- Estudar a ação dos extratos padronizados e das frações purificadas da *Quassia amara* L. na pressão arterial de ratos e os mecanismos de ação envolvidos.
- Determinar o mecanismo de ação dos extratos padronizados na musculatura lisa e esquelética.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 *Quassia amara* L.

3.1.1 Descrição botânica

A *Quassia amara* L. (Figura 01), uma representante da família Simaroubaceae, é um arbusto de 2-5 m de altura, dotada de copa estreita e rala. Possui folhas compostas tri ou penta-folioladas, de raque e pecíolo alados, de 10-15 cm de comprimento, folíolos cartáceos, glabros, de cor mais clara na face inferior, de 4-6 cm de comprimento e inflorescências em racemos terminais, com flores vermelhas vistosas (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 01- *Quassia amara* L. *in situ* (Manaus, AM). Foto: Francianny Retroz.

3.1.2 Distribuição geográfica

Simaroubaceae é uma grande família botânica com distribuição pantropical, incluindo cerca de 20 gêneros e 100 espécies. No Brasil, ocorrem seis gêneros e cerca

de 30 espécies. O interesse econômico da família concentra-se no uso medicinal de algumas espécies que possuem compostos amargos e no uso da madeira (SOUZA; LORENZI, 2008).

Quassia amara L. cresce tipicamente em regiões tropicais da América (do México a Amazônia Brasileira) em altitude abaixo de 500 m. Esta planta cresce preferencialmente em ambientes úmidos, mas pode ser encontrada em floresta seca próximo a barrancos (GONÇALVES *et al.*, 2005; LÓPEZ; PÉREZ, 2008).

3.1.3 Sinonímia

A *Q. amara*, uma Simaroubaceae, geralmente apresenta-se como árvore ou arbusto, tendo como característica marcante um sabor bastante amargo em seu córtex. Assim, muitas espécies dessa família (*Quassia amara*, *Picrasma excelsa*, *Jamaica quassia*) são conhecidas há mais de um século, por conterem substâncias amargas, denominadas de “quassina”, nome emprestado a toda essa classe de compostos estruturalmente relacionados, denominados quassinoides (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Essa espécie é conhecida popularmente na América Central por vários nomes diferentes, dentre eles pode-se citar: amargo, pau-amarelo, pau-quassia, quassia, quassia-amarga, quassia-decaierna, quina, quina-quina, quinarana, hombre grande, hombron, guabito amargo, guabo amargo, quini, (COE; ANDERSON, 2005; LOPEZ SAEZ; PEREZ SOTO, 2008; MORTON, 1981)

Segundo Grandtner (2005), existem algumas sinonímias desta espécie como, *Quassia alatifolia* Stokes, *Quassia officinalis* Rich.

3.1.4 Etnofarmacologia

A *Quassia amara* é utilizada na medicina tradicional como antianêmica, antibiótica, antiparasitária, antimalárica, na hipertensão, e em doenças hepáticas e digestivas, especialmente nas úlceras gástricas (DUKE, 1992; RAJI; BOLARINWA, 1997; GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011; TOMA *et al.*, 2002). Algumas tribos na Nicarágua utilizam essa planta no tratamento de mordedura de cobra (HERNANDEZ-GALICIA *et al.*, 2002; LÓPEZ; PÉREZ, 2008). É também utilizada popularmente como antidiabética na Costa Rica e na Guatemala (DEFILIPPS *et al.*, 2004; VAN ANDEL; WESTERS, 2010)

3.1.5 Composição química

Esta planta contém altos níveis de constituintes fitoquímicos bioativos amargos, incluindo os quassinoides, descritos na literatura por possuir atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina, antiparasitária contra pediculose e propriedades anti-inflamatórias (FERRARI; DIEHL, 2011; RAJI; BOLARINWA, 1997).

Os quassinoides constituem uma classe de substâncias encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae, sendo este um importante parâmetro de classificação taxonômica. Quimicamente, são considerados triterpenos com alto padrão de oxigenação, e ampla faixa de atividades biológicas descritas (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Vários compostos foram isolados do extrato diclorometânico da folha de *Quassia amara* (Figura 02), tais como simalicalactona D (SkD, (1), picrassina B (2), picrassina H (3), neoquassina (4), quassina (5), picrassina I (6) e picrassina J (7). Estudos demonstraram que a atividade biológica e a citotoxicidade desta planta podem ser atribuídas à simalicalactona D (HOUËL *et al.*, 2009).

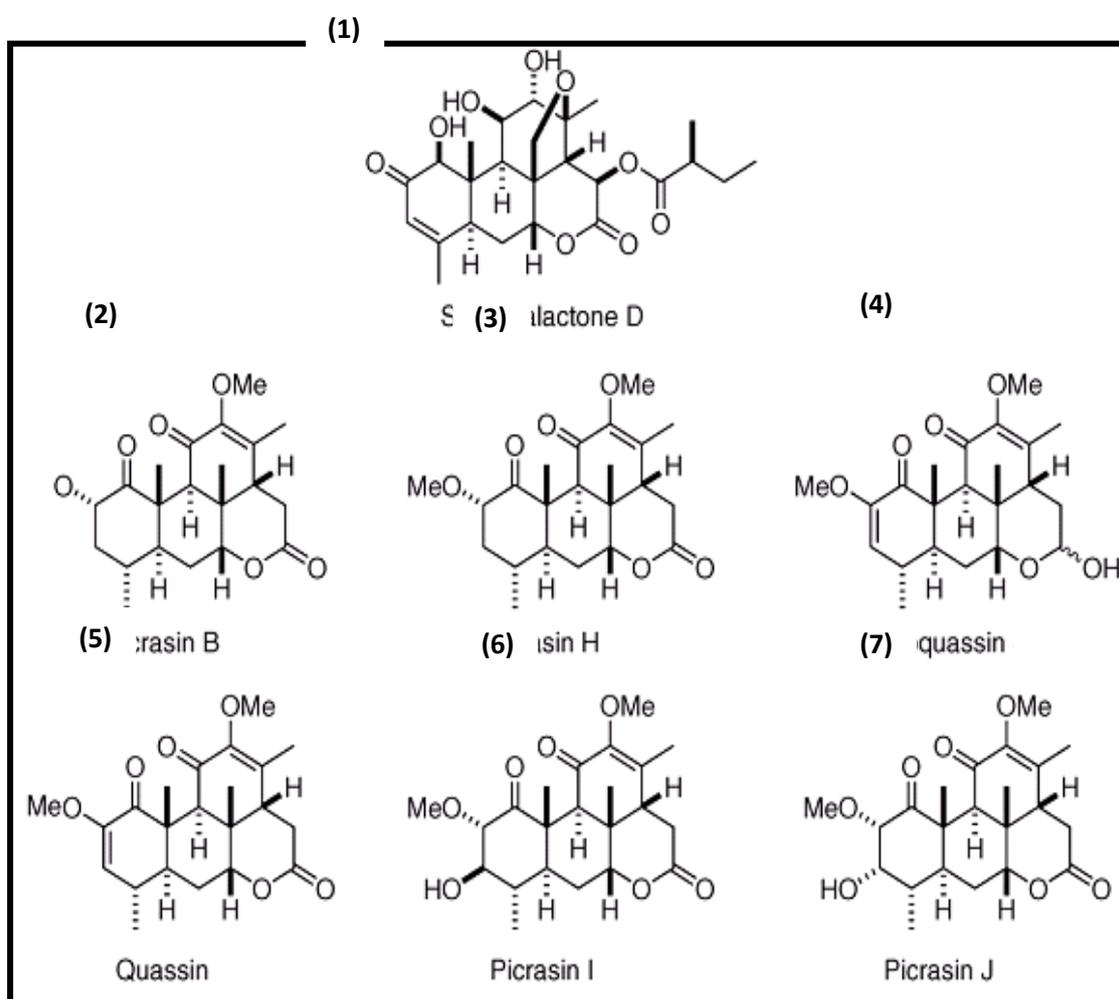


Figura 02 – Quassinoides isolados do extrato da folha de *Quassia amara* L.

A simalicalactona E (SkE) (Figura 03), um novo quassinoide extraído das folhas de *Quassia amara* inibiu o crescimento do *Plasmodium falciparum* cultivado *in vitro* em 50% na concentração de 24 a 68 nM, independentemente da sensibilidade do parasita à cloroquina.

Esse composto mostrou-se menos tóxico que a simalicalactona D (SkD) (CACHET *et al.*, 2009).

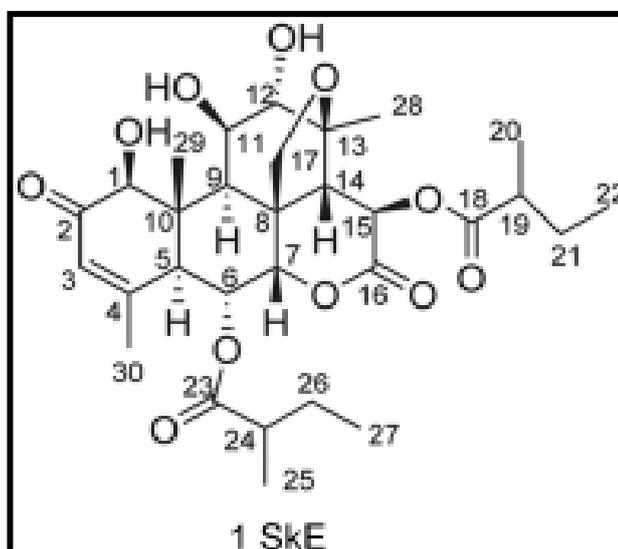


Figura 03 – Estrutura química da simalicalactona E (SkE).

3.1.6 Estudos toxicológicos

TOMA *et al.* (2002) realizaram estudos de toxicidade com os extratos etanólico 70%, etanólico 100%, diclorometânico e hexânico de *Quassia amara*, administrados por via oral e intraperitoneal em camundongos, com doses de até 5000 mg/kg e 1000 mg/kg, respectivamente. Nessas condições, demonstraram que não houve sinais de toxicidade e/ou morte dos animais, sugerindo a alta segurança destes extratos.

3.1.7 Estudos farmacológicos

Bertani *et al.*, (2006) isolaram e caracterizaram a SkD presente no extrato das folhas frescas de *Quassia amara* como o composto responsável pela atividade antimalárica *in vitro* (contra o *Plasmodium falciparum*) e *in vivo* (em roedores), com IC₅₀ de 10 nM contra cepas FcB1 de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina. A inibição de 50% do parasita de roedor (*Plasmodium yoelii yoelii*) (DE₅₀) foi de 3.7 mg/kg/dia, por via oral. Estas descobertas reforçam as informações do uso popular do extrato vegetal desta planta como antimalárico.

Extratos padronizados de *Quassia amara* revelaram um importante efeito antiulcerogênico em modelos agudos de indução de úlceras. Estes efeitos foram relacionados a um aumento na barreira gástrica de muco e dos compostos sulfidrílicos não-protéicos (GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011)

Segundo Toma *et al.* (2002), os extratos etanólico 70%, etanólico 100%, diclorometânico e hexânico de *Quassia amara* apresentaram atividade antiulcerogênica em testes *in vivo* em camundongos. Os principais compostos relacionados a esta ação foram os quassinoides, e o mecanismo deste efeito está, provavelmente, relacionado ao aumento da síntese de fatores citoprotetores, como as prostaglandinas e muco.

Raji & Bolarinwa (1997) mostraram que a administração oral de quassina reduziu os níveis plasmáticos de testosterona em ratos machos, e conseqüentemente promoveu uma ação antifertilidade nos animais. Outro estudo sugere que o extrato clorofórmico da casca de *Quassia amara* possui ação seletiva no trato reprodutivo masculino, revelando ter potencial uso como agente antifertilidade (PARVEEN, *et al.*, 2003).

Vários estudos relatam que os quassinoides possuem atividade inseticida agindo na regulação do crescimento do inseto (TADAHIKO *et al.*, 2005). Evans & Kaleysa (1992), sugeriram que a ação inseticida dos quassinoides deve-se à inibição da enzima tirosinase, que desempenha um importante papel na esclerotização da cutícula do inseto. A inibição da síntese desta proteína é provavelmente o mecanismo de ação inseticida descrito (CUENDET *et al.*, 2004; LIAO *et al.*, 1976).

Toma *et al.* (2003), avaliaram a possível atividade sedativa e antiedematogênica dos extratos etanólico 70%, etanólico 100%, diclorometânico e hexânico de *Q. amara* administrado por via oral e intraperitonealmente em camundongos. A administração oral destes extratos não mostrou efeito significativo em nenhum experimento, mas quando administrado pela via intraperitoneal, o extrato hexânico diminuiu o edema de pata e mostrou efeito sedativo. O mecanismo desta ação não está elucidado, mas os resultados sugerem que esses efeitos podem estar relacionados aos quassinoides (quassina e neoquassina) que estariam produzindo efeitos sedativo e relaxante muscular ou psicomimético. Considerando esses resultados, os autores sugerem que a *Q. amara* poderia ser uma nova droga com potencial para o tratamento da dor.

Verma *et al.*, (2010) relataram que o extrato metanólico de *Quassia amara* mostrou atividade inibitória *in vitro* nos mediadores pró-inflamatórios NO, COX-2, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (J774).

Um estudo preliminar realizado por Ferrari & Diehl (2011) demonstrou a segurança e a eficácia de gel tópico com 4% de extrato hidroglicólico de *Quassia amara* para o tratamento de todos os níveis de rosácea. Pacientes afetados por esta doença

experimentaram redução significativa na vermelhidão, eritema, pápulas, pústulas e telangiectasia, após seis semanas de tratamento.

Em outro estudo recente, triterpenoides (principal composto ativo do extrato de *Quassia amara*) diminuíram a inflamação na pele em modelo de psoríase em camundongos com mutação hipomórfica do gene CD18 (WANG *et al.*, 2009).

Em dissertação recente de mestrado do nosso grupo, onde foram estudadas as atividades farmacológicas geral e específica do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *Quassia amara* em roedores, foram observadas atividades: anti-inflamatória, antinociceptiva, antiúlcera, antissecretora ácida, inibição das atividades da $H^+-K^+-ATPase$ e $Ca^{2+}-ATPase$, e aumento da amplitude de contração do diafragma estimulado eletricamente. No músculo liso vascular, a FBut relaxou a musculatura proporcionalmente às concentrações, sendo bloqueadas por L-NAME; em veia porta isolada, a FBut reduziu a contração máxima produzida pelo $CaCl_2$ (BARROS, 2010).

3.2 Contração do músculo estriado

Os fenômenos de motilidade representam uma propriedade intrínseca indispensável a toda forma de vida. Nos vertebrados, correr, saltar, caminhar, nadar e voar dependem da ação da musculatura estriada esquelética. Alguns movimentos involuntários, como batimentos cardíacos e a constrição de artérias são dependentes, respectivamente, da atividade da musculatura estriada cardíaca e lisa. O músculo cardíaco e a musculatura lisa apresentam células dotadas de estruturas diferentes e características funcionais distintas daquelas observadas no músculo esquelético (MOSS; HOFMANN, 1992; STEVENS; LOWE, 1995).

3.2.1 Contração do Músculo Estriado Esquelético

A contração do músculo estriado esquelético em condições fisiológicas é controlada pela atividade do Sistema Nervoso Central através da inervação motora (motoneurônio), e depende de uma série de integrações para que seu papel na motricidade seja exercido de modo coordenado (ESSIN; GOLLASCH, 2009).

Em músculo estriado esquelético, o mecanismo de acoplamento excitação-contracção é definido como o processo pelo qual, eventos elétricos presentes na superfície celular desencadeiam a liberação de íons cálcio existentes em estruturas intracelulares (ASHLEY *et al*, 1991; RÍOS; PIZARRO., 1991).

O desencadeamento e decurso desse mecanismo ocorrem quando o potencial de ação gerado no motoneurônio trafega e alcança a região pré-sináptica, causando uma alteração no potencial de membrana. Esta alteração ativa canais de cálcio voltagem-

dependentes, e promovem o influxo de Ca^{2+} para o interior do terminal nervoso, resultando em um aumento da concentração destes íons no interior do botão sináptico (LEVITAN; KACZMAREK, 1997).

Este aumento da concentração intracelular de cálcio será responsável pela exocitose de vesículas sinápticas contendo o mediador químico acetilcolina, que será então liberado na fenda sináptica. Os íons cálcio interagem quimicamente com as vesículas sinápticas, e este processo é fundamental para que ocorra a liberação da acetilcolina na fenda sináptica (ESSIN, K.; GOLLASCH, M., 2009).

A acetilcolina difunde-se na fenda sináptica até os seus receptores, denominados receptores nicotínicos, presentes na membrana pós-sináptica (MATSUKAWA *et al.*, 2002).

A ligação do neurotransmissor ao receptor promove um aumento da condutância do canal que permitirá o influxo de íons sódio a favor do seu gradiente eletroquímico. Como esse canal não é seletivo ao íon sódio, efluxo de íons potássio também ocorrerá através dos mesmos. O influxo de Na^+ será maior que o efluxo de K^+ porque o gradiente eletroquímico do Na^+ é maior do que para o K^+ (DULHUNTY, 2006).

O resultado de tais eventos manifesta-se pela despolarização da membrana pós-sináptica e logo em seguida uma repolarização. Isso produz variações rápidas do potencial de membrana - potenciais de ação, que se propagarão com grande velocidade para toda fibra muscular, através dos quais, os sinais neurais são transmitidos (DULHUNTY, 2006).

O sarcolema das fibras musculares esqueléticas é dotado de invaginações que projetam-se perpendicularmente ao eixo longitudinal da fibra. Tais invaginações constituem o sistema tubular transverso (túbulos T), que é de fundamental importância

para que a onda de despolarização, que percorre o sarcolema, atinja regiões mais internas da célula muscular, ou seja, propague-se para o centro da fibra (MOSS; HOFMANN, 1992).

Nas membranas dos túbulos T, existem proteínas que são sensíveis à variação de potencial transmembrana, que promove alterações conformacionais em proteínas específicas denominadas receptores diidropiridínicos (RDHP) ou canais lentos de íons cálcio (canais do tipo L), que atuam como sensores de voltagem (BERRIDGE *et al.*, 2000).

Os receptores DHP estão intimamente associados às proteínas presentes na membrana da cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (RS). Devido à grande afinidade do alcaloide rianodina por essas proteínas, essas são denominadas receptores rianodínicos ou receptores de rianodina (RyR). Os RyR funcionam como canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático (BERRIDGE *et al.*, 2000).

A onda de despolarização, que percorre o sarcolema, alcança os túbulos T e causa modificações conformacionais dos RDHP, as quais determinam alteração na condutância dos receptores de rianodina, promovendo assim, a saída de Ca^{2+} dos estoques situados na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (LEONG; MACLENNAN, 1998; DULHUNTY *et al.*, 2002). Esses receptores são os responsáveis pelo primeiro passo no mecanismo de acoplamento excitação-contração e suas principais características estão ilustradas na Figura 04.

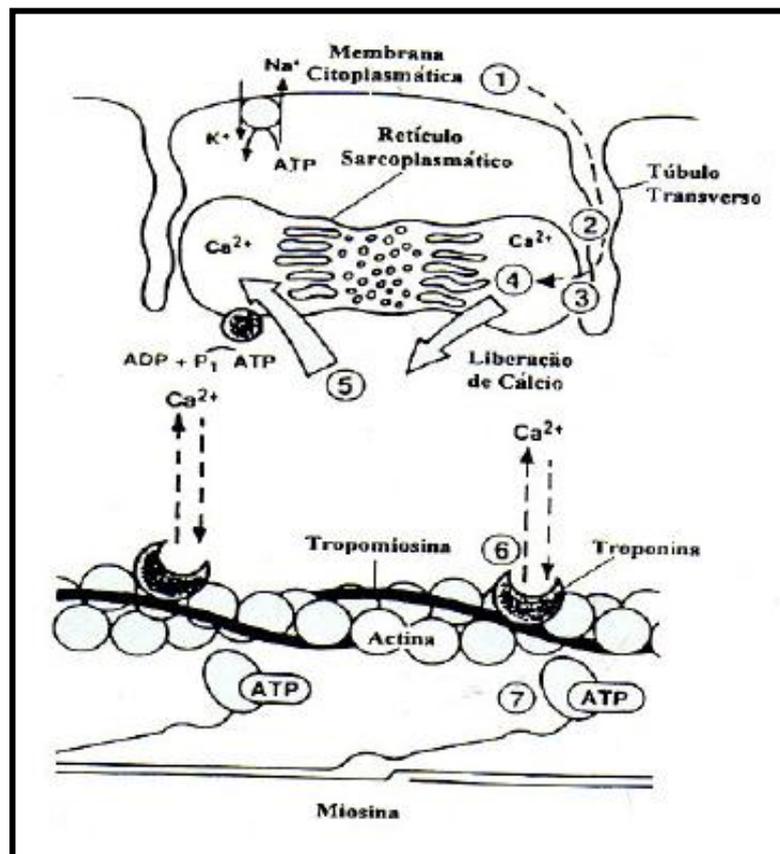


Figura 04 – Eventos relacionados ao fenômeno da contração muscular. Os números indicam os eventos relacionados com o processo: 1- excitação da membrana plasmática (sarcolema); 2- despolarização do sistema tubular transverso; 3- acoplamento entre o sensor de voltagem (receptores diidropiridínicos) e a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático por meio dos canais de cálcio (receptores rianodínicos); 4- liberação do íon cálcio pelo retículo sarcoplasmático; 5- recaptação dos íons Ca^{2+} através da bomba de cálcio dependente de ATP (Ca^{2+} -ATPase) localizada na membrana do retículo sarcoplasmático; 6- ligação do Ca^{2+} à troponina e 7- ligação da miosina com a actina, hidrólise do ATP, desenvolvimento de força pelas pontes cruzadas .

Fonte: FITTS, R.H.; MEZTGER, J. M. Mechanisms of muscular fatigue. In: Principle of exercise biochemistry. Karger: Basel. v. 27, p. 121-229, 1988.

A alteração da condução desses canais promove o aumento da concentração intracelular do íon cálcio, levando à ativação das proteínas responsáveis pela contração muscular (EBASHI, 1980; KLEIN *et al.*, 1999).

O cálcio liberado do retículo sarcoplasmático liga-se aos sítios de afinidade presentes na molécula de troponina C, promovendo uma modificação conformacional de sua estrutura. Com isso, esta ligação altera a posição do complexo troponina-tropomiosina sobre a actina, descobrindo seus pontos ativos e permitindo que ocorram

interações cíclicas da cadeia pesada da miosina (pontes cruzadas) com os filamentos finos de actina, resultando em produção de força e/ou encurtamento dos sarcômeros (BERRIDGE *et al.*, 2000).

O relaxamento muscular ocorre após a interrupção da liberação de íons cálcio pela repolarização da membrana do túbulo T (desativação do sensor de voltagem) ou por uma inativação do sensor durante as despolarizações de longa duração (MELTZER *et al.*, 1995).

Os íons cálcio, no músculo esquelético, são recaptados para o retículo sarcoplasmático através da atividade de uma enzima Ca^{2+} -ATPase (SERCA - *Sarcoendoplasmic Reticulum Ca}^{2+}*ATPase) dependente de Mg^{2+} , que mantém o estoque interno de íons cálcio às custas da hidrólise de ATP durante o relaxamento muscular (MAHANEY *et al.*, 2008).

Assim, essa recaptação maciça de cálcio para o retículo sarcoplasmático produz depleção quase total dos íons cálcio no líquido que banha as miofibrilas, permitindo assim, a dissociação dos íons cálcio da troponina C e a consequente desativação das pontes cruzadas (MACLENNAN *et al.*, 1997).

O cálcio recaptado pela Ca^{2+} -ATPase é direcionado para a cisterna terminal do RS onde permanece, em sua maior parte, ligado a calsequestrina, uma glicoprotéina que liga-se fracamente a esses íons e participa da sua estocagem (FRANZINI-ARMSTRONG; JORGENSEN, 1994).

No músculo esquelético, a ativação do mecanismo excitação-contração não depende diretamente do influxo de íons cálcio do meio extracelular, algo que é observado no músculo cardíaco. Em músculo esquelético, a principal fonte desse íon para a ativação das proteínas do sistema contrátil seria do retículo sarcoplasmático

(ASHLEY *et al.*, 1991). Entretanto, há diferenças quanto a este mecanismo no músculo cardíaco, que tem efeitos importantes sobre as características da contração muscular cardíaca.

3.2.2 Contração do Músculo Estriado Cardíaco

Na fibra muscular cardíaca, o potencial de ação é provocado pela abertura de dois tipos de canais: os canais rápidos de sódio e os canais lentos de cálcio. Esta segunda população de canais é a responsável pela manutenção do longo período de despolarização, fator determinante do platô verificado no potencial de ação de uma fibra muscular cardíaca (BERS, 2002).

Outra contribuição dos canais lentos de cálcio é a provisão de cálcio para o meio intracelular, o que interfere diretamente no processo contrátil da fibra muscular cardíaca, quando comparada à contração da fibra esquelética (BERS, 2002).

A segunda diferença funcional entre as fibras musculares cardíacas e as fibras musculares esqueléticas, que ajuda a explicar o potencial de ação prolongado e seu platô é que, imediatamente após o início do potencial de ação, ocorre uma diminuição da permeabilidade da membrana aos íons potássio em cerca de cinco vezes, efeito que não se observa nas fibras musculares esqueléticas. Esta permeabilidade reduzida faz com que o efluxo de íons K^+ durante o platô do potencial de ação diminua acentuadamente, impedindo o retorno precoce da voltagem do potencial de ação para o seu valor de repouso (GUYTON; HALL, 2002).

Durante o potencial de ação cardíaco, o Ca^{2+} que entra na célula através dos canais de cálcio do tipo L (receptores diidropiridínicos - RDHP), localizados na

membrana do túbulo T, desencadeia a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores de rianodina (BERRIDGE, 2004) (Figura 05).

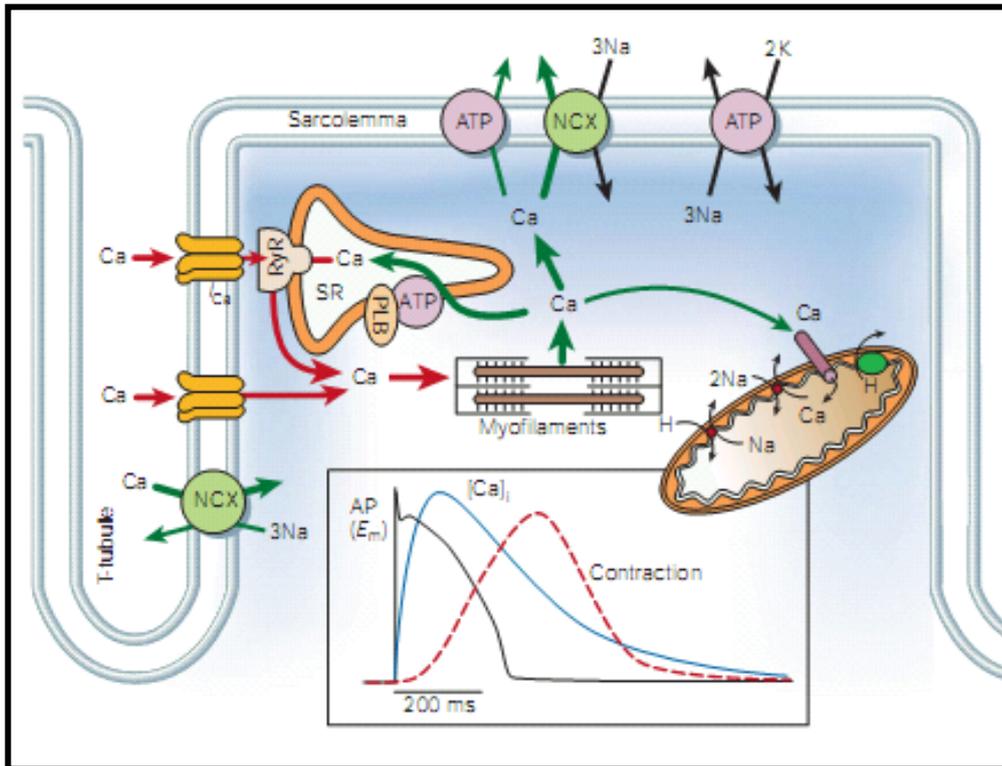


Figure 05 - Transporte do Ca^{2+} em miócitos ventriculares. A figura mostra a evolução temporal de um potencial de ação, a mobilização do Ca^{2+} e a medida da contração em miócitos ventriculares de coelho à 37°C .

Fonte: BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, vol. 415, p. 198-205, 2002.

A combinação do influxo de Ca^{2+} e do Ca^{2+} que é liberado do retículo sarcoplasmático aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} livre, permitindo aos íons Ca^{2+} ligar-se à troponina C dos miofilamentos, que em seguida, produz a contração muscular. Para que ocorra o relaxamento da fibra muscular, a concentração de cálcio intracelular deve diminuir, permitindo a dissociação do Ca^{2+} ligado à troponina (BERRIDGE, 2004).

Ao final do platô do potencial de ação, o influxo de íons cálcio para o interior das fibras musculares é interrompido subitamente e os íons cálcio presentes no

sarcoplasma são rapidamente transportados para fora do citosol por quatro vias: Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Ca^{2+} -ATPase do sarcolema ou sistema uniporte mitocondrial de Ca^{2+} . Como consequência, a contração cessa até que ocorra um novo potencial de ação (INESI *et al.*, 2005).

Este mecanismo de acoplamento excitação-contração é o mesmo para o músculo esquelético, mas há um segundo efeito que é bem diferente. Além dos íons cálcio liberados no sarcoplasma pelas cisternas do retículo sarcoplasmático, grande quantidade de íons cálcio extracelular também se difunde dos túbulos T para o sarcoplasma, portanto, o mecanismo mais aceito é o Ca^{2+} induzindo a liberação de Ca^{2+} (Ca^{2+} - *induced Ca²⁺-release* - *CICR*). Então, sem esse influxo de cálcio através dos túbulos T, a força de contração do músculo cardíaco seria consideravelmente reduzida, pois o retículo sarcoplasmático do músculo cardíaco não é tão desenvolvido quanto o dos músculos esqueléticos e não armazena cálcio suficiente para proporcionar contração completa (XU *et al.*, 1993).

Por conseguinte, tanto a quantidade de íons cálcio no sistema de túbulos T, como a disponibilidade de íons cálcio para provocar a contração do músculo cardíaco, dependem diretamente da concentração de íons cálcio no líquido extracelular (BERS, 2002).

3.3 Contração do músculo liso

O músculo liso contém tanto filamentos de actina como de miosina, ambos com características químicas semelhantes às dos filamentos de actina e de miosina do músculo esquelético. Todavia, não contém troponina, de modo que o mecanismo para o controle da contração é inteiramente diferente. Além disso, existem diferenças importantes entre a organização física do músculo liso e a do músculo esquelético, bem como diferenças no acoplamento excitação-contração, no controle do processo da contração pelos íons cálcio, na duração da contração e na quantidade de energia necessária para o processo contrátil (PROVEN *et al.*, 2006).

Como o músculo liso não contém troponina, a proteína reguladora que é ativada pelos íons cálcio para promover a contração do músculo esquelético é a calmodulina. Embora essa proteína seja semelhante à troponina, por reagir com quatro íons cálcio, difere no modo como desencadeia a contração. A calmodulina faz isso por ativar as pontes cruzadas de miosina (BILLINGTON; PENN, 2003).

A contração inicia-se através da ligação de agonistas a receptores específicos associados à proteína G, que determina a ativação da fosfolipase C, gerando os segundos mensageiros trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ liga-se a seus receptores específicos no retículo sarco/endoplasmático levando à liberação de cálcio, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que geralmente induz efeitos promotores da contração muscular como, por exemplo, a fosforilação de canais de cálcio do tipo L e influxo desses íons (BERRIDGE; IRVINE, 1984; DEL VALLE-RODRIGUEZ, 2006).

Os íons cálcio ligam-se à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina, que ativa a quinase da miosina de cadeia leve (MLCK- *myosin light-chain kinase*), uma enzima fosforiladora. Uma das cadeias leves de cada cabeça de miosina, chamada de cadeia leve regulatória de miosina (RCL), fica fosforilada em resposta à MLCK, o que resulta em contração muscular (WRAY; BURDYGA, 2010) (Figura 06).

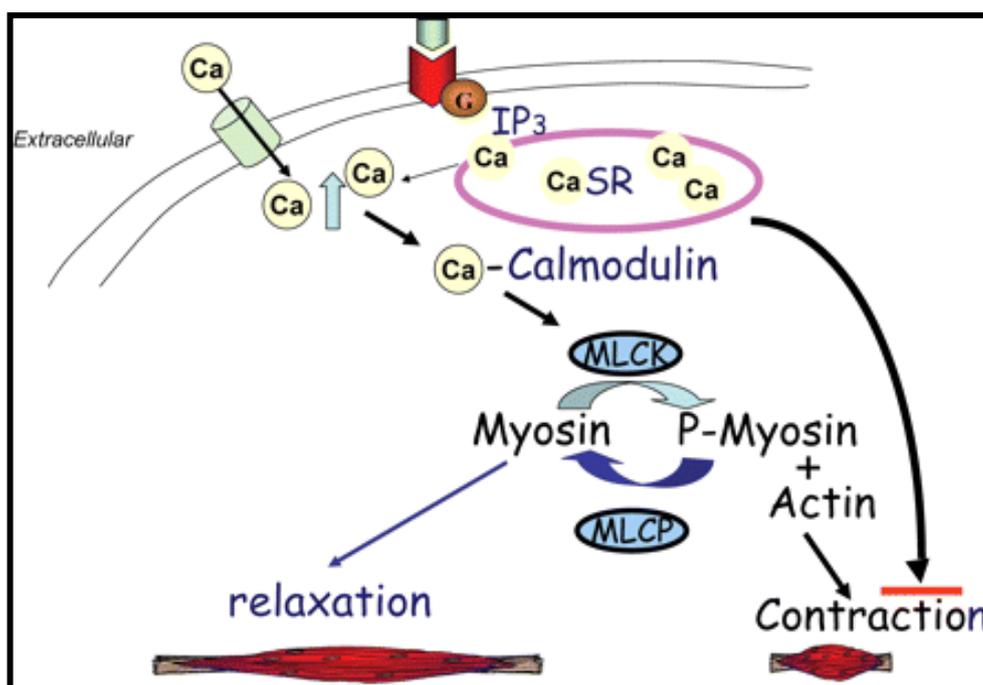


Figure 06 – Contração do músculo liso. Os íons cálcio ligam-se à calmodulina formando o complexo cálcio-calmodulina que ativa a MLCK levando à contração muscular.
 Fonte: WRAY, S. **Insights into the uterus**. Exp Physiol, v. 92, n. 4, p. 621-631, 2007.

Quando há a diminuição da concentração de cálcio intracelular, ocorre a menor fosforilação da RLC, que associada à desfosforilação da RLC determinada pela miosina fosfatase (MP - *myosin phosphatase*, também conhecida como MLCP - *myosin light-chain phosphatase*), fazem com que a miosina adquira a conformação inicial, impossibilitando a interação com a actina e determinando o relaxamento muscular (FISHER, 2010).

Para manter baixa a concentração de cálcio intracelular, a célula estoca a maior parte do cálcio dentro do retículo endo/sarcoplasmático através da SERCA (ATPase do retículo endo/sarcoplasmático) e transporta o restante para o meio extracelular através da ação da ATPase da membrana plasmática (PAMCA) mantendo a homeostasia do cálcio intracelular (FLOYD; WRAY, 2007).

3.3.1 Endotélio vascular

As células do endotélio vascular atuam não apenas como barreira passiva entre o plasma e o líquido extracelular, mas também é fonte de numerosos mediadores químicos potentes que controlam o tônus vascular. Estas substâncias controlam ativamente a contração e/ou relaxamento do músculo liso subjacente (VANHOUTTE; TANG, 2008).

Os fatores de contração e relaxamento liberados pelas células endoteliais incluem o óxido nítrico (NO), metabólitos do ácido aracdônico (derivados das cicloxigenases, lipoxigenases e monoxigenases), espécies reativas de oxigênio e peptídeos vasoativos (FÉLETOU *et al.*, 2010).

O NO ou fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF - *endothelium-derived relaxing factor*) é sintetizado a partir da L-arginina pela NO sintase (NOS), que é ativada pelo Ca^{2+} na presença de calmodulina e outros cofatores. O Ca^{2+} que entra na célula pela chegada de um potencial de ação ou pela abertura de canais de Ca^{2+} devido à estimulação de receptores muscarínicos é o responsável pela ativação da NOS e síntese do NO (BREDT; SNYDER, 1990).

O NO sintetizado no endotélio difunde-se livremente através das membranas celulares do músculo liso ativando a guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (GMPC), que atua como segundo mensageiro (VANHOUTTE, 2009).

O consequente aumento de GMPC afeta proteínas quinases que levam ao relaxamento da musculatura lisa vascular devido a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} livre ou diminuição da sensibilidade ao Ca^{2+} (TODA; OKAMURA, 2003) (Figura 07).

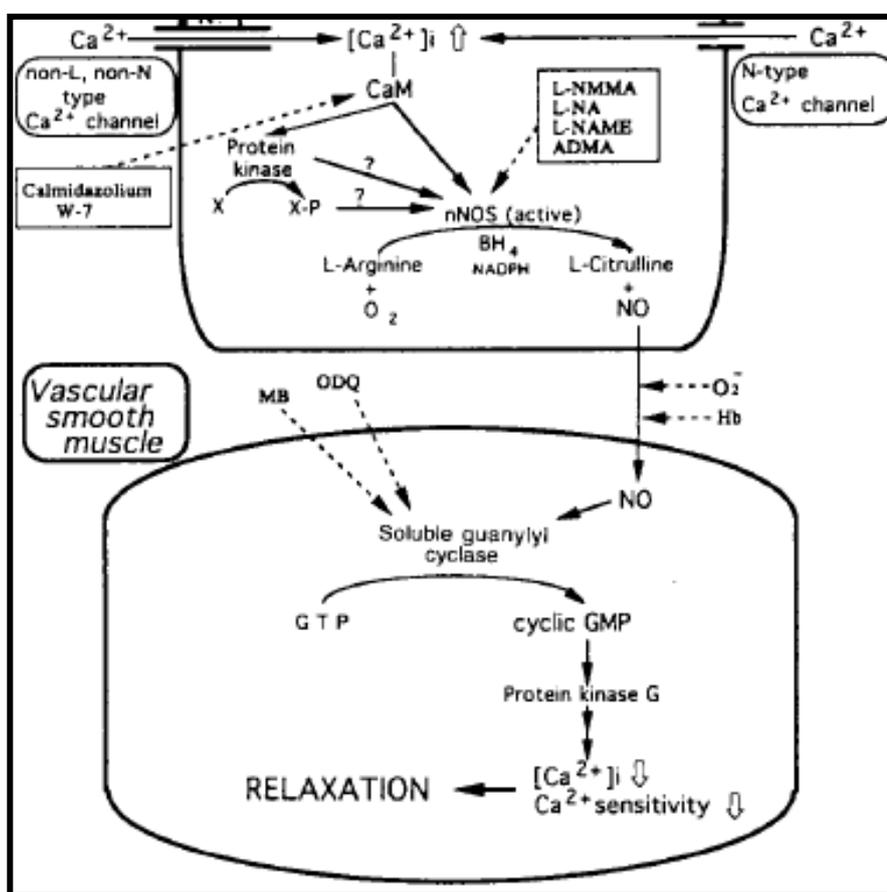


Figure 07 – Representação esquemática da regulação da guanilato ciclase (GMPC) pelo óxido nítrico (NO) sintetizado no endotélio. O NO formado difunde-se para a célula do músculo liso, ativa a guanilato ciclase solúvel que transforma GMP em GMPC levando ao relaxamento muscular.

Fonte: TODA, N.; OKAMURA, T. The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels. **Pharm Rev.**, vol. 55, n. 2, p. 271-324, 2003.

3.4 Pressão Arterial

A pressão arterial é o produto do débito cardíaco pela resistência periférica ao fluxo sanguíneo ($PA = DC \times RP$). O controle da PA depende de uma série de fatores físico-químicos, bioquímicos e fisiofarmacológicos. Em condições normais, sem perda de sangue e manutenção do volume sistólico, o débito cardíaco está relacionado à força de contração ventricular e à frequência cardíaca ($DC = f \times FC$), enquanto a resistência periférica depende do tônus do músculo liso vascular (TORGNARINI; MOUDS, 1997).

A variação que ocorre no tônus vascular depende de fatores funcionais. Dentre esses fatores, destacam-se: 1) a atividade simpática gerada centralmente e modulada por aferências de diferentes reflexos; 2) substâncias vasopressoras ou vasodepressoras circulantes ou produzidas pelas células da musculatura lisa ou endotelial (IRIGOYEN *et al.*, 2005). Esse conjunto de fatores contribui para a manutenção da pressão arterial mantendo o equilíbrio hemodinâmico.

Alterações nos mecanismos de regulação desses sistemas fisiológicos podem levar a desajustes que determinam o desenvolvimento de patologias como a elevação da pressão arterial. O aumento persistente da resistência periférica vascular é uma condição patológica comum na hipertensão primária (RAMCHANDRA *et al.*, 2005).

Baseado no exposto acima, os efeitos que as alterações fisiológicas podem causar sobre a pressão arterial, constituem um caso interessante para estudos de substâncias que apresentam ação sobre o sistema cardiovascular.

Diante dos resultados obtidos anteriormente pelo grupo, este trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos da atividade da fração butanólica de *Quassia amara* L. no sistema cardiovascular de roedores.

4. Material

4.1 Material botânico

As folhas de *Quassia amara* L. foram coletadas no município de Manicoré, Amazonas, Brasil, (Coordenadas: W: 61°17'44.49"; S: 5°48'06.80") pelos alunos de mestrado Januário Macedo Viana Júnior e Rodrigo Oliveira da Silva, com orientação do Prof. Dr. Ari de Freitas Hidalgo (Figura 08).

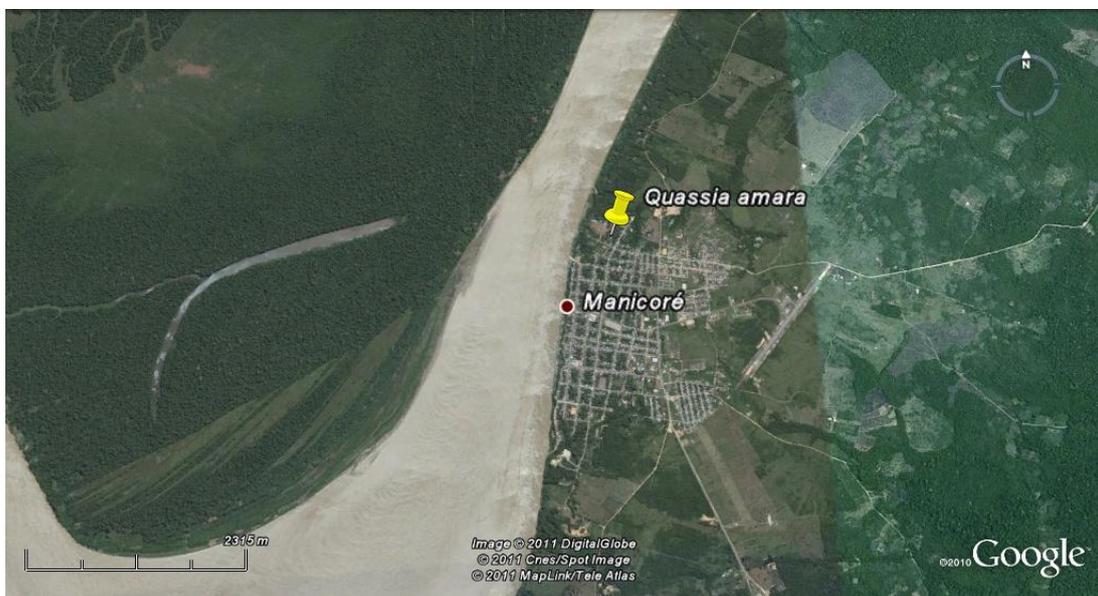


Figura 08 – Área de coleta (folhas) da planta *Quassia amara* L. no município de Manicoré/AM, nas coordenadas Longitude: 61°17'44.49" e Latitude: 5°48'06.80" (marcador amarelo). Fonte: <http://maps.google.com.br>. (Acesso em 22/08/2011).

Para a confecção da exsicata, foram coletadas plantas que continham estruturas reprodutivas (flores e frutos), para facilitar a identificação. As amostras férteis foram prensadas entre folhas de jornal alternadas com placas de papelão em grades de madeira e secas em estufa a 40°C. Após a desidratação, as prensas foram retiradas e o material vegetal seco foi amarrado apenas no jornal e guardado com naftalina, em ambiente com temperatura e umidade baixas.

O material vegetal foi identificado e classificado pela Prof^a. M^a Rosalba Bilby - Curadora do Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM). A exsicata foi incorporada ao acervo do referido herbário, sob registro n° 8708.

4.2 Material biológico

Nos testes farmacológicos foram utilizados ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando 250 – 400 g, camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, entre 30 – 40 g, machos ou fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA e coelhos New Zealand White (*Oryctolagus cuniculus*) adultos pesando entre 1,5 – 2 kg do biotério da UNIFESP.

Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo os Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de Animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFESP (CEP/EPM 0760/07).

4.3 Material químico

Todo o material químico utilizado no trabalho foi adquirido de revendedores credenciados.

4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais

Acetonitrila grau CLAE (Merck-Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec-Brasil), ácido fosfórico 85 % P.A (C.P.Q), ácido sulfúrico P.A (Nuclear-Brasil), bicarbonato de sódio P.A.

(C.P.Q), butanol P.A.(Synth), cloreto de sódio P.A. (Merck-Brasil), cloreto de potássio P.A. (Vetec-Brasil), cloreto de magnésio P.A. (Merck-Brasil), cloreto de cálcio P.A. (Merck-Brasil), EDTA (Sigma), EGTA (Sigma), éter etílico P.A. (Nuclear-Brasil), fosfato monossódico P.A. (Merck-Brasil), glicose P.A. (C.P.Q), hidróxido de sódio P.A. (Reagen-Brasil), molibdato de amônio (Reagen-Brasil), tris-maleato (Sigma).

4.3.2 Drogas

- Acetilcolina (Sigma-USA), albumina de soro bovino, atropina (Sigma-USA), calcimicina (Sigma), colagenase, d-tubocurarina (Sigma), estreptomicina, Flipr® Calcium-4-assay kit (Molecular Devices), líquido de Türk, L-NAME (Sigma), loading buffer (Fura-4), noradrenalina (Sigma), penicilina, pentobarbital (Sigma), prazosin (Sigma), probenecida, soro de cavalo e soro fetal bovino (Gibco), tapsigargina (Sigma), tripsina, verapamil.

4.3.3 Soluções e Reagentes

As soluções nutritivas e reagentes foram preparados imediatamente antes do uso controlando-se o pH.

4.3.3.1 Soluções utilizadas nos estudos

- **Líquido Nutritivo Tyrode:** NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM; MgCl₂.6H₂O 1,0 mM; NaHCO₃ 15,0 mM; NaH₂PO₄.H₂O 1,0 mM; CaCl₂.2H₂O 2,0 mM; glicose 11,0 mM.
- **Líquido Nutritivo para vesícula (LNV):** NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO₃ 15 mM; NaH₂PO₄ 0,4 mM; glicose 5,5 mM; CaCl₂ 1,8 mM.

- **Solução Nutritiva de Krebs:** NaCl 119 mM; KCl 4,6 mM; MgCl₂ 1,2 mM; NaHCO₃ 15 mM ; NaH₂PO₄ 1,2 mM ; CaCl₂ 1,5 mM ; glicose 11,0 mM.
- **Líquido para pletismômetro:** NaCl 0,1% + Extran 10%
- **Salina (NaCl 0,9%)**
- **Tampão PBS-hep:** pH 7,4 contendo heparina 5 UI/mL
 - Solução A: NaH₂PO₄ . H₂O 0,2 M
 - Solução B: NaH₂PO₄ . 7H₂O 0,2 M
 - 19 mL da solução A + 81 mL da solução B

4.3.3.2 Soluções utilizadas no isolamento e na determinação da atividade da Ca²⁺-ATPase

- **Solução I:** MOPS 10 mM, sacarose 10%, EDTA 0,1 mM, pH 7,0
- **Solução II:** MOPS 10 mM, KCl 0,6 M, pH 7,0
- **Solução III:** MOPS 10 mM, sacarose 30%, pH 7,0
- **Tampão para medidas da atividade da Ca²⁺-ATPase:** Tris-maleato 50 mM, pH 7.4; MgCl₂ 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionóforo calcimicina (A23187) 10 μM (solução estoque 0,2 mM em dimetilsulfóxido); CaCl₂ 1,008 mM (Ca²⁺ livre = 17,5 μM). A mesma solução tampão é utilizada para determinar a atividade da Mg²⁺-ATPase, excluindo-se o CaCl₂.
- **Solução ácida de molibdato de amônio:** 4,58 g de molibdato de amônio + 23,8 mL de H₂SO₄) em 1 L de água destilada. O reagente de molibdato de amônio é preparado com 15 mL da solução ácida e 0,36 g de ácido ascórbico (Hossein *et al*, 1993).

4.3.3.3 Soluções utilizadas na avaliação de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em cardiomiócitos de ratos e útero de rata em cultura

- **D-MEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (mg/L):** Gibco Life Technologies: $CaCl_2$ 200; $Fe(NO_3)_3$ 0,1; KCl 400; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200; NaCl 6400; NaH_2PO_4 125; $NaHCO_3$ 3700; L-arginina HCl 84; L-cistina 62570; L-glutamina 548; glicina 30; L-histamina HCl H_2O 42; L-isoleucina 105; L-LEUCINA 105; L-lisina HCl 146; L-metionina 30; L-fenilefrina 66; L-serina 42; L-treonina 95; L-triptofano 16; L-tirosina 104,2; L-valina 94; pantotenato de cálcio 4; ácido fólico 4; inositol 7200; nicotinamida 4; piridoxal HCl 4; riboflavina 0,4; tiamina HCl 4; glicose 1000; piruvato de sódio 110; vermelho de fenol 15. Foram adicionados gentamicina 40; cloreto de colina 4; D-glucose 3500.
- **Solução salina tamponada de Hank (HBSS) (mM):** KCl 5,4; KH_2PO_4 0,4; NaCl 136,9; Na_2HPO_4 0,34; D-glucose (1 mg/mL), $NaHCO_3$ 4,2 mM.

5. Métodos

I. Análise Fitoquímica

5.1 Obtenção dos extratos de *Q. amara*: extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut)

Folhas de *Quassia amara* (200 g) foram secas a sombra, em temperatura ambiente e moídas em moinho de facas tipo Croton (Modelo MA 580 - Marconi), no Laboratório de Farmacotécnica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas. O pó das folhas foi armazenado em sacos plásticos, ao abrigo da luz e umidade.

O extrato aquoso (EA) foi obtido por infusão do pó a 2,5 % com água destilada a 70 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Após filtragem, concentração e liofilização, o EA (25 g) foi dissolvido em 700 mL de água destilada e extraído em funil de separação com porções de 300 mL de butanol, por 3 vezes, dando origem à fração butanólica (FBut) e fração aquosa (FAq), que foram concentradas e liofilizadas.

5.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

A padronização e purificação dos extratos e frações de *Q. amara* L. em CLAE foi realizada pela Dra. Mirtes Midori Tanae.

O EA, a FBut e as frações (F1 a F6) de *Q. amara* foram padronizados em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas injetoras LC-20AT, módulo de comunicação CBM-20A e detector UV-VIS SPD-10A, operando a 210 nm. O sistema estava acoplado a um computador, sendo operado por software Shimadzu LC solution, versão 1.21, SP1.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila de 5 a 45% em 30 min, em coluna analítica C18 (250 x 0,46 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 1,0 mL/min. A amostra foi dissolvida em água/acetonitrila 5%, filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 20 µL.

5.1.2 Purificação da FBut de *Quassia amara* L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep)

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 210 nm.

A fase móvel consistiu em gradiente linear de água/acetonitrila de 5 a 45% 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 6 frações, cada uma delas compostas por um “pool” de picos com tempos de retenção que variaram de 4,6 a 36,6 min.

II. Análise Farmacológica

5.2 Métodos para Detecção de Ação no Sistema Nervoso Central

Os experimentos foram realizados sempre no mesmo período do dia para evitar influências do ciclo circadiano/ultradiano. Os animais foram ambientados às condições experimentais antes dos experimentos.

Os testes foram realizados segundo descrição do livro “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais” (LAPA *et al.*, 2003), com adaptações quando necessárias.

5.2.1 Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1964)

Os comportamentos e suas intensidades foram registrados de acordo com a metodologia proposta por Irwin. Camundongos, machos ou fêmeas, foram divididos em grupos: controle (água, 10,0 mL/kg), experimental EA ou experimental FBut tratados com dose de 1,0 g/kg (n=3/grupo), por via oral (gavagem, por cânula intragástrica) ou por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram colocados em caixas-moradia e feita a análise comportamental aos 30 min, 1, 2, 3 e 24 horas após os tratamentos.

O teste de observação geral ou teste hipocrático consiste no preenchimento de uma tabela de acordo com a resposta comportamental aos estímulos provocados ao animal sendo observados: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, cromodacriorreia, secreção brônquica, convulsões e mortes.

5.3 Avaliação do Efeito na Atividade Cardiovascular

5.3.1 Avaliação da ação da fração butanólica (FBut) e frações (F1-F6) de *Q. amara* na pressão arterial de ratos anestesiados

Ratos normotensas adultas foram anestesiadas com pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram fixadas em decúbito dorsal em placa de cortiça, canulando-se a veia íliaca para a administração das drogas e da FBut. A artéria carótida foi utilizada para registrar a pressão arterial. As variações pressóricas foram registradas por um transdutor de pressão conectado ao aparelho PowerLab (ADInstruments) que transmite os dados registrados para um computador utilizando software Chart 7 Pro.

A FBut dissolvida em salina 0,9 % foi injetada e.v. na doses de 1, 3 e 10 mg/kg (n=4). Como a FBut produziu respostas hipotensoras, alguns animais foram injetados com atropina (1,0 mg/kg, e.v.) ou prazosin (1,0 mg/kg, e.v.), 3 min antes de uma nova dose da FBut.

Em todos os animais, a atividade vascular foi testada com acetilcolina (0,1 µg/kg, e.v.) e noradrenalina (0,3 µg/kg, e.v.), injetadas antes e após a FBut.

Para verificar quais frações purificadas de *Q. amara* (F1, F2, F3, F4, F5 e F6) eram responsáveis pelo efeito hipotensor da FBut foram dissolvidas em salina 0,9 % e injetadas endovenosamente nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg (n=3).

5.3.2 Avaliação da ação do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* na frequência de contração do átrio direito e na força de contração do átrio esquerdo de rato

Ratos foram anestesiados com éter etílico, mortos por deslocamento cervical e o coração retirado rapidamente através de toracostomia. Após remoção do pericárdio, os átrios foram isolados. O átrio direito apresentou batimentos espontâneos e foi utilizado para verificar *in vitro* a ação sobre a frequência do marcapasso. A preparação não serviu, no entanto, para evidenciar ação inotrópica porque a força de contração é dependente e inversamente proporcional à frequência cardíaca. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio, sob tensão inicial de 1 g.

O átrio esquerdo, ao contrário, não mostrou atividade própria. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio, e ligada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g. A contração muscular foi estimulada com pulsos transmuralis supramáximos com duração de 2 ms e frequência de 1 Hz.

Após 30 minutos de estabilização, a tensão de estiramento para contração máxima foi ajustada. Nessas condições, o EA (10, 30, 100 e 300 µg/mL, n=4) ou a FBut (10, 30 e 100 µg/mL, n=4), foram incubados em concentrações cumulativas crescentes no átrio direito. No átrio esquerdo somente uma concentração foi testada por preparação, registrando-se os efeitos por 30 minutos após a incubação do extrato.

5.3.3 Avaliação da ação das frações (F1-F6) de *Q. amara* em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).

Para avaliar a ação das frações (F1-F6) na musculatura lisa vascular, ratos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após exsanguinamento, a aorta torácica foi removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-bicarbonato para dissecação.

Anéis de aorta torácica de aproximadamente 2 mm de comprimento foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba para órgão isolado com capacidade para 2 mL, contendo solução nutritiva de Krebs a 35 °C aerada com carbogênio (O₂ 95 % CO₂ 5 %), pH 7,4. A destruição do endotélio vascular, quando necessária, foi realizada mecanicamente pela introdução e giro de uma haste metálica intraluminalmente na aorta. Após 30 minutos de estabilização, a presença de endotélio foi testada observando-se o relaxamento induzido pela incubação de acetilcolina (10^{-6} M) em anéis previamente contraídos por noradrenalina (10^{-7} M). O efeito de concentrações cumulativas das frações (3, 10, 30 e 100 µg/mL) foi testado em preparações com e sem endotélio, previamente contraídas por noradrenalina (10^{-7} M).

Os efeitos foram medidos em g de tensão e expressos em percentagem da contração máxima produzida por noradrenalina 10^{-7} M.

5.4 Avaliação da ação no músculo esquelético e na junção neuromuscular

5.4.1 Músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto

Ratos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após incisão no gradeado costal o músculo diafragma foi removido e transferido para placa de Petri para a dissecação fina e colocação das amarras. O diafragma foi posicionado verticalmente em uma cuba de vidro com capacidade para 5 mL, contendo líquido nutritivo Tyrode à 30°C carbogenado (95% O₂ e 5% CO₂) sob tensão de 1 g e pH 7,4. As contrações isométricas foram obtidas por estímulo direto (2 ms; 0,1 Hz e voltagem supramáxima) através de eletrodos bipolares imersos na cuba. O registro das contrações foi realizado com um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 7. Os efeitos produzidos pela FBut (10, 30 e 100 µg/mL, n=4) foram observados durante 30 min de incubação em concentrações individuais, após a adição de d-tubocurarina (10⁻⁵ M).

5.4.2 Músculo diafragma de rato estimulado indiretamente - Preparação músculo/nervo frênico

Ratos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após incisão no gradeado costal, o conjunto músculo diafragma/nervo frênico foi removido e transferido para o líquido nutritivo de Tyrode carbogenado (O₂ 95% e CO₂ 5%) à 30°C. O nervo foi colocado entre eletrodos bipolares imersos na cuba e ligados a um estimulador (0,5 ms; 0,1 Hz e voltagem supramáxima). O órgão foi amarrado pela porção tendinosa a um transdutor Power Lab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software

Chart Pro 7. Os efeitos produzidos pela FBut (10, 30 e 100 µg/mL, n=4) foram observados durante 30 min. Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.5 Avaliação da fração butanólica (FBut) da *Q. amara* na atividade da Ca²⁺-ATPase

5.5.1 Isolamento da Ca²⁺-ATPase

A Ca²⁺-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 e o material utilizado foi mantido em baixa temperatura. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital sódico (> 100 mg/kg) 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 (500 mL), dissecados e lavados uma vez com água destilada gelada. Os músculos foram cortados e homogeneizados em tampão MOPS (170 g : 510 mL da 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 x g por 90 minutos. O precipitado resultante foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e mantido em câmara fria por 40 minutos. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 15.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 40.000 x g por 90 minutos. O *pellet* final foi ressuspenso e homogeneizado em homogeneizador de vidro e o material foi conservado em freezer -80 °C até a realização dos ensaios de atividade enzimática.

5.5.2 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. O complexo proteína–corante tem alto coeficiente de extinção, o que permite uma medida precisa da quantidade de proteína das amostras. O ensaio foi feito em triplicata, incubando-se as amostras com reagente de Bradford. A leitura foi realizada 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).

5.5.3 Medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase

A medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase foi realizada de acordo com o método de Fiske e Subbarow (1966) 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 do 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 (1, 3, 10, 30 e 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 minutos a 37 °C e interrompida com 25 µL de TCA 50% sob banho de gelo. Adicionou-se 200 µL de solução ácida de molibdato (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 realizadas a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$.

5.6 Avaliação da ação no músculo liso

5.6.1 Avaliação da atividade da FBut de *Q. amara* em ducto deferente de rato estimulado eletricamente

Ratos adultos foram anestesiados com éter etílico, mortos por deslocamento cervical e os ductos deferentes foram removidos para um recipiente contendo líquido nutritivo de vesícula (LNV).

O músculo foi preso a uma haste e posicionado em uma cuba de vidro de 5 mL contendo LNV a 30 °C aerado com uma mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). As contrações foram obtidas por estimulação elétrica de um eletrodo bipolar de platina com pulsos de 2 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima. Após estabilização, doses da FBut (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, n=4) ou frações (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$, n=4) foram incubadas por 30 minutos. Apenas uma concentração foi testada por preparação.

5.6.2 Avaliação da atividade da FBut de *Q. amara* em curvas cumulativas de noradrenalina em ducto deferente de rato

Ratos machos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Os ductos deferentes foram removidos e transferidos para recipiente contendo líquido nutritivo de vesícula (LNV) para colocação das amarras.

O músculo foi posicionado em uma cuba contendo LNV borbulhado com mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂) à 30 °C, pH 7,4. Para o registro das contrações, as amarras foram fixadas a uma haste de vidro e a um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 7.

Após 30 minutos de estabilização, foram realizadas curvas de contração à adição cumulativa de noradrenalina (10⁻⁸ a 10⁻³ M), antes e 10 min após a incubação da FBut (10, 30 e 100 µg/mL, n=4). Somente uma concentração foi testada por preparação.

As contrações em porcentagem da contração máxima produzida pelo agonista nas curvas controles foram relacionadas aos logaritmos negativos das concentrações molares de cada agonista. Das curvas concentração-efeito obtidas, foram determinadas a CE₅₀ (concentração efetiva 50 %) e o valor do efeito máximo.

5.7 Avaliação da atividade da FBut de *Q. amara*, na concentração de cálcio intracelular ([Ca²⁺]_i) em cardiomiócitos de ratos e em útero de rata.

5.7.1 Cultura de músculo cardíaco de rato

Ratos recém-nascidos (1 dia de vida) machos ou fêmeas foram mortos por inalação de gás carbônico; a cavidade torácica foi aberta e o coração retirado. Após dissecação em solução de HBSS, o músculo cardíaco ventricular foi picado com tesoura fina durante 20 min e incubado por 1 h em solução com colagenase, CaCl₂ e albumina bovina a 37°C e 5% CO₂. Após o período de incubação, as células foram homogeneizadas com pipeta Pasteur de ponta fina, centrifugadas (2500 rpm, 5 min, 23°C) e o sobrenadante desprezado. A colagenase foi lavada das células por ressuspensão e centrifugação sucessivas em HBSS, nas mesmas condições anteriores. Foram adicionados às células 10 mL de meio de cultivo D-MEM,

acrescido de 10% de soro de cavalo, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de 10 μ M. As células do filtrado foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de $0,4 \times 10^6$ células em placas de 35 mm cobertas com colágeno. No terceiro dia pós-plaqueamento, o meio de cultivo foi trocado para D-MEM acrescido de 10% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados até a confluência das células (quinto dia de cultura) e utilizadas após 6 a 7 dias de cultivo.

5.7.2 Cultura de útero de rata

Ratas adultas foram superficialmente anestesiadas com éter e exsanguinadas por incisão da carótida; a cavidade abdominal foi aberta, os úteros retirados e transferidos para placa contendo HBSS para dissecação fina. Os órgãos foram cortados em pedaços menores, o tecido adiposo foi desprezado e as camadas serosa e circular foram descamadas com bisturi. Os úteros foram lavados com HBSS (4x) e adicionada tripsina (15 min, 37°C, com agitação a cada 5 min). Após novas lavagens com HBSS (4x), os órgãos foram delicadamente picados durante 30 min, foi adicionada colagenase seguida por incubação a 37°C por 1,5 h com agitação a cada 5 min. O homogenato foi centrifugado (2500 rpm, 10 min), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspensado em 10 mL de D-MEM; o processo de lavagem foi repetido por 4 vezes. O *pellet* obtido foi suspenso em D-MEM acrescido de 10% de soro fetal de cavalo e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Após contagem em placa de Neubauer, as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 a 10^6 células/placa. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C,

5% CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados e utilizadas após 15 dias de cultivo.

5.7.3 Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria

Para os ensaios de influxo de cálcio foram utilizadas microplacas de 96 poços, FLIPR[®] *Calcium-4 assay kit* (Molecular Devices) e KCl 70 mM para abertura dos canais de cálcio. Cardiomiócitos ou células de útero em cultura foram plaqueadas nas microplacas 24 h antes do experimento na densidade de 40.000 e 20.000 células/poço, respectivamente, e incubadas a 37°C. Decorridas 24 h, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 100 µL da mistura: *loading buffer* (Fura-4) + probenecida + HBSS. Após 50 min de incubação a 37°C, foram adicionados 10 µL da fração testada (10, 30 e 100 µg/mL) ou do controle positivo verapamil (100 µM), em triplicata. As placas foram incubadas por mais 10 min e em seguida, lidas em leitor de placas FlexStation[®] (Molecular Devices) com λ_{ex} 494 nm e λ_{em} 525 nm. Os resultados foram expressos pelas diferenças entre as fluorescências máxima e mínima (Δ RFU) obtidas durante 3 min de leitura/poço, a partir da pipetagem de KCl 70 mM.

5.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos testes *in vivo* foram expressos como médias \pm erro padrão ou no caso das EC₅₀, como média geométrica e limites de confiança. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de ANOVA e Dunnet e consideradas significativas para $p < 0,05$. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do pós- teste de Bonferroni.

Para análise estatística foi utilizado software Graphpad Prisma, versão 5. As Figuras e Tabelas foram confeccionadas utilizando-se o programa Microsoft Excel 2007. Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ serviram para caracterizar o grau de significância estatística.

6. Resultados

I. Análise Fitoquímica

6.1 Obtenção dos extratos: extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut)

O EA foi obtido a partir do método de infusão a 2,5% com água destilada. Após filtração e concentração em rotaevaporador, o EA concentrado foi submetido à partição com butanol obtido-se a fração butanólica (FBut) e a fração aquosa (FAq). Os rendimentos foram 24 % (EA), 47% (FBut) e 52% (FAq).

6.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

O EA apresentou 7 picos principais com tempos de retenção de 3,2; 4,7; 6,5; 8,6; 19,0; 19,6; e 20,5 com áreas representando 20,6; 10,4; 1,7; 1,8; 6,1; 7,1 e 3,1%, respectivamente, do total do cromatograma. A FBut apresentou 7 picos principais com tempos de retenção de 3,2; 8,5; 17,2; 18,2; 18,9; 19,7 e 20,4, com áreas representando 13,4; 1,3; 3,8; 5,1; 6,2; 10,5 e 10,5 do total do cromatograma (Figura 09).

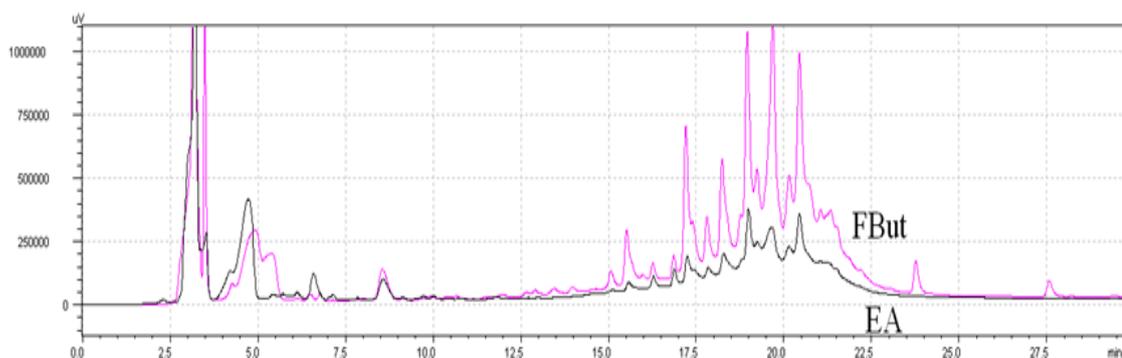


Figura 09 - Perfis cromatográficos do EA e FBut de *Q. amara* em CLAE analítica, utilizando coluna C18, gradiente de água/acetoneitrila 5 a 45% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 210 nm.

A FBut foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que levou ao isolamento de 6 frações (F1 a F6), cada uma delas contendo um *pool* de picos com tempos de retenção entre 3,0 e 28,0 min. (Figura 10).

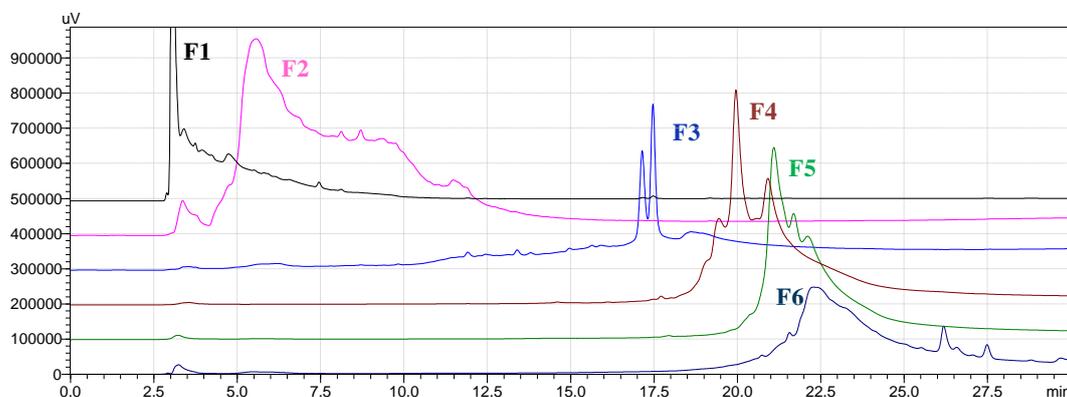


Figura 10 - Perfis cromatográficos das frações F1 a F6 purificadas da FBut de *Q. amara* em CLAE analítica, utilizando coluna C18, gradiente de água/acetonitrila de 5 a 45% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 210 nm.

6.1.2 Purificação da FBut de *Quassia amara* L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep)

A purificação da FBut em CLAE-prep resultou em 6 frações com rendimentos: **F1** 10,0%, **F2** 6,2%, **F3** 10,1%, **F4** 12,0%, **F5** 14,5% e **F6** 13,3% (Figura 11).

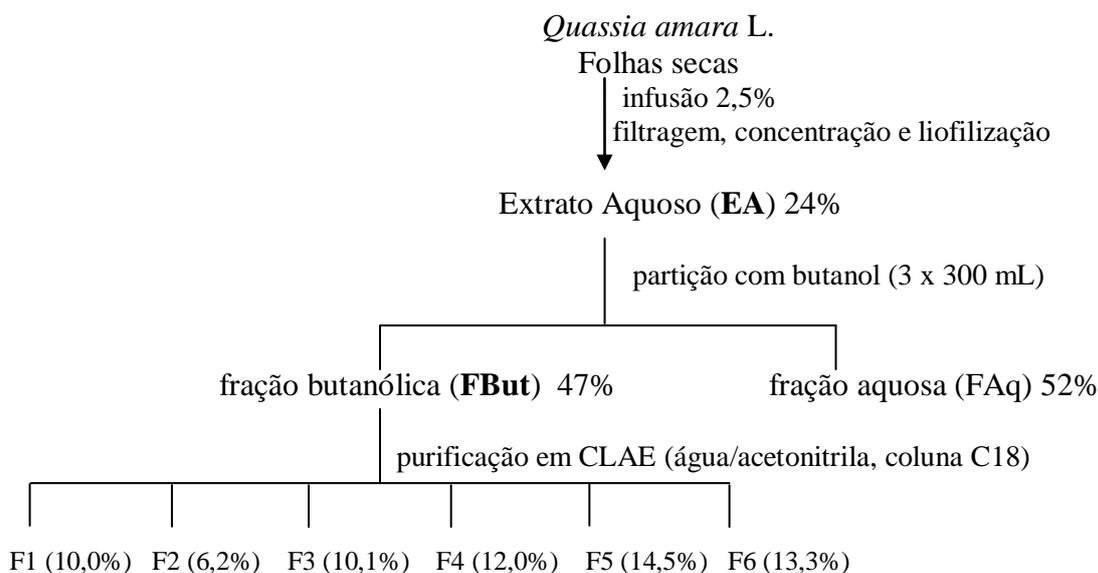


Figura 11 - Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações de *Quassia amara* L. relativamente à FBut.

II. Análise Farmacológica

6.2 Efeito do Extrato Aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de *Q. amara* no Sistema Nervoso Central

6.2.1 Efeito do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de *Q. amara* (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin)

No teste geral de atividades, o EA e a FBut solúveis em água foram administrados em dose única elevada de 1,0 g/kg, v.o. Os camundongos tratados com o EA (n= 3) por via oral não apresentaram sinais evidentes de atividade farmacológica do extrato: a motilidade e a deambulação não foram alteradas nas 3 horas iniciais ou 24 h após administração do EA. Sinais de ataxia, incoordenação motora, inquietação, sedação, 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. Doses menores de EA não foram estudadas em vista da ausência de qualquer sinal indicativo da ação do extrato. Nenhum animal morreu no período de observação.

Os animais tratados com 1,0 g/kg de FBut por via oral apresentaram sinais de sedação, anestesia caracterizada pela perda parcial ou total da sensibilidade e cianose após 60 minutos de tratamento. Este efeito perdurou até os 120 min de observação, quando o comportamento do animal tratado não se diferenciou dos animais controles (água, 10,0 mL/kg). Outros sinais de ação depressora (hipnose, ptose, ataxia), ação estimulante do SNC (hiperatividade, irritabilidade ao toque), ou atividade autonômica (piloereção, diarreia, salivação, micção exagerada) não foram observados. Após 24 h de observação, não houve morte.

A administração intraperitoneal de 1,0 g/kg de FBut diminuiu a deambulação, a frequência respiratória e induziu sedação (quietação), anestesia e cianose intensas após 60 minutos. Esta dose foi letal para 100% dos animais após 120 minutos de tratamento.

6.3 Ação cardiovascular

6.3.1 Efeito da fração butanólica (FBut) e frações (F1-F6) de *Q. amara* na pressão arterial de ratos anestesiados

Ratos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.) apresentaram pressão arterial média de $112,3 \pm 7,1$ mm Hg após 30 min da anestesia (n= 4).

A injeção da FBut 1,0; 3,0 e 10,0 mg/kg, e.v., diminuiu a pressão arterial proporcionalmente às doses em 6,6; 8,4 e 12,5 mm Hg, respectivamente, com pico em 20 segundos e reversão à pressão basal em 3 minutos (Figuras 12 e 13). Nessas doses, a frequência cardíaca não foi alterada. A injeção da noradrenalina 0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v. aumentou a pressão arterial em $5,9 \pm 1,3$; $11,7 \pm 0,7$ e $17,8 \pm 1,8$ mm Hg, respectivamente (Figura 12). A injeção de acetilcolina 0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v. diminuiu a pressão arterial em $23,6 \pm 2,3$; $37,2 \pm 4,4$ e $44,9 \pm 3,7$ mm Hg, respectivamente (Figura 13). A hipotensão causada pela FBut (10,0 mg/kg, e.v.) não foi alterada pelo tratamento prévio do animal com atropina (1,0 mg/kg) ou prazosin (1,0 mg/kg) (Figuras 14 e 15).

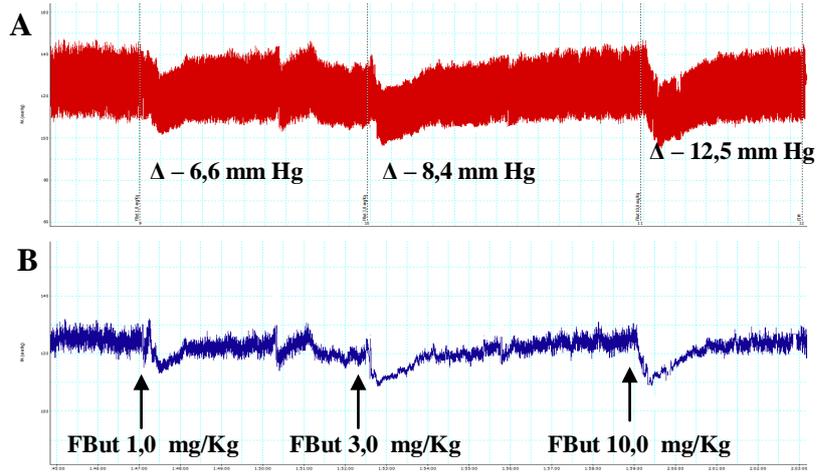


Figura 12 - Efeitos da FBut de *Q. amara* L. (1,0; 3,0 e 10,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.) (n= 4). Registro de uma experiência típica: (A) Δ= diferença entre a pressão arterial basal e a medida após injeção da fração teste e (B) registro da pressão arterial média.

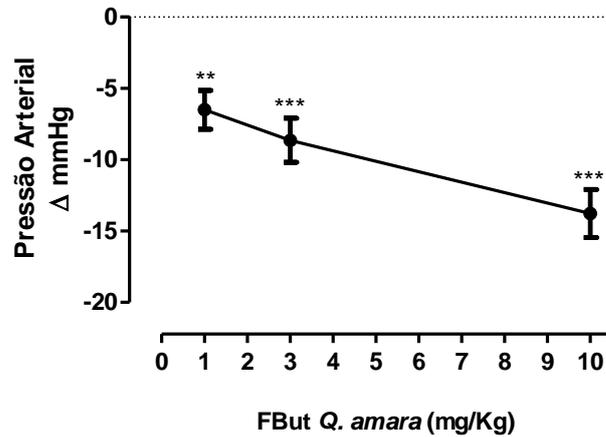


Figura 13 - Variação da pressão arterial (Δ mmHg) após injeção de FBut de *Q. amara* L. (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em concentrações crescentes em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias ± desvio padrão (n= 3). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Dunnett).

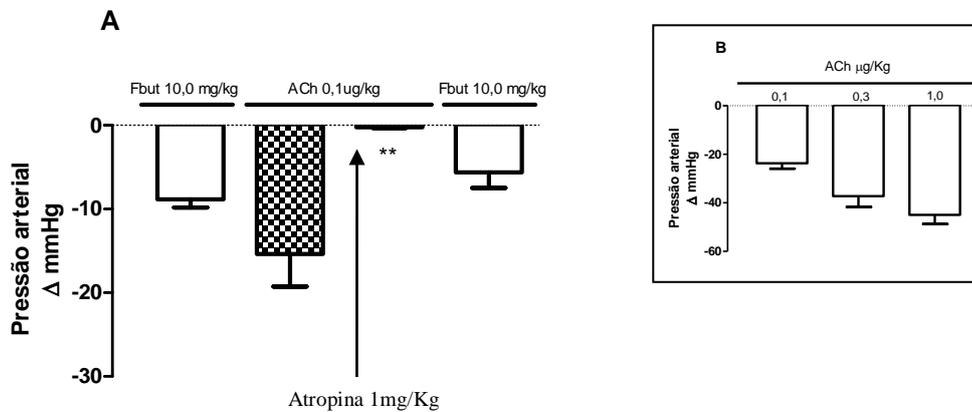


Figura 14 - (A) Variação da pressão arterial (Δ mmHg) após injeção de FBut de *Q. amara* L. (10 mg/kg, e.v.) antes e após a injeção de atropina (1mg/kg, e.v.) e (B) da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 μg/kg, e.v., controle) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias ± desvio padrão (n= 3). ** $p < 0,01$ (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Dunnett).

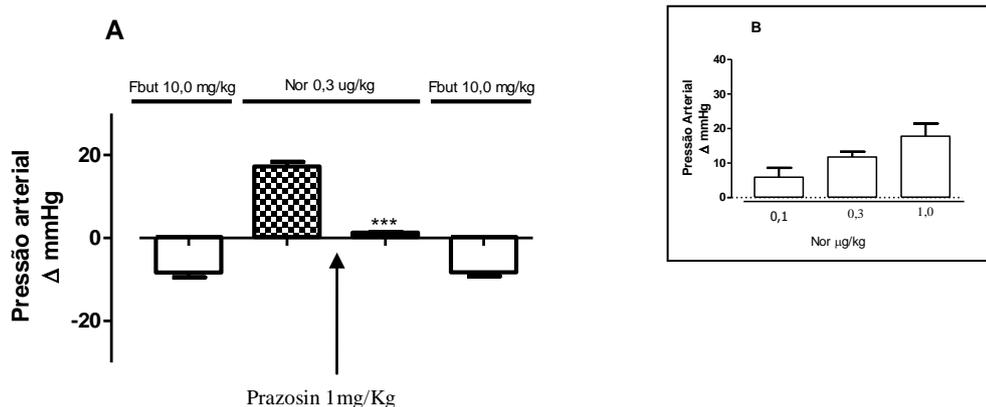


Figura 15 - (A) Variação da pressão arterial (Δ mmHg) após injeção de FBut de *Q. amara* L. (10 mg/kg, e.v.) antes e após a injeção de prazosin (1 mg/kg, e.v.) e (B) da injeção de noradrenalina (0,1; 0,3 e 1,0 μ g/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias \pm desvio padrão (n= 3). *** $p < 0,001$ (ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Dunnett).

A administração endovenosa das frações purificadas F1, F3 e F6 diminuiu a pressão arterial de forma dose-dependente (Figura 16). Na dose de 1,0 mg/kg, as frações F1, F3 e F6 diminuíram a pressão arterial em $7,6 \pm 1,3$; $2,3 \pm 0,3$ e $10,7 \pm 1,2$ mmHg, respectivamente. As frações F1, F3 e F6 (3,0 mg/kg) diminuíram a pressão arterial em $9,3 \pm 1,8$; $6,3 \pm 1,2$ e $17,7 \pm 2,3$ mmHg, respectivamente e $16,0 \pm 1,0$; $6,0 \pm 2,1$ e $50,3 \pm 5,8$ mmHg, respectivamente, na dose de 10 mg/kg.

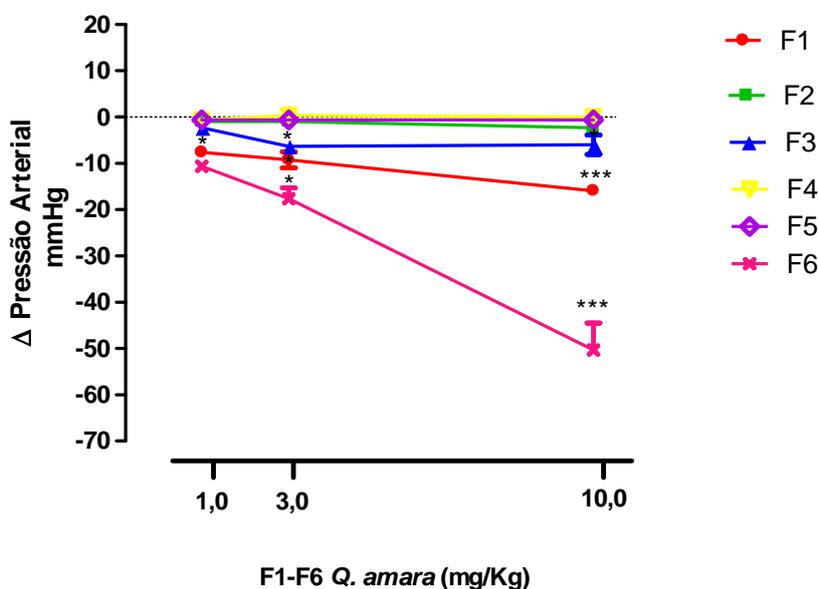


Figura 16 - Variação da pressão arterial (Δ mmHg) após injeção das frações (F1-F6) purificadas de FBut de *Q. amara* L. (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em doses crescentes em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias \pm desvio padrão (n= 3). * $p > 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA de 1 via seguida pelo teste de Dunnett).

6.3.2 Efeito das frações (F1-F6) de *Q. amara* em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).

Para avaliar a ação de extratos de *Q. amara* na musculatura lisa vascular, utilizamos preparações de anéis de aorta com e sem endotélio. A incubação de noradrenalina (10^{-7} M) contraiu a aorta e manteve o tônus contrátil (100 %) durante tempo maior que 30 min.

Nas preparações de anéis de aorta com endotélio intacto, a incubação de concentrações cumulativas das frações F1, F3, F4, F5 e F6 (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), a cada 10 minutos, relaxou o tônus das preparações pré-contraídas com noradrenalina 10^{-7} M, proporcionalmente às concentrações. As percentagens de relaxamento em relação ao tônus imediatamente após a incubação das frações F4, F5 e F6 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ foram de 68, 45 e 57 %, respectivamente. Na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, as frações F1, F3, F4, F5 e F6 apresentaram percentagem de relaxamento de 71, 30, 86, 84 e 85%, respectivamente. Com 100 $\mu\text{g/mL}$ as frações F1, F3, F4, F5 e F6 relaxaram o tônus em 87, 90, 91, 93 e 97 %, respectivamente (figura 17).

Os anéis de aorta sem endotélio contraíram à adição de noradrenalina (10^{-7} M) , mas não relaxaram à adição de acetilcolina (10^{-6} M).

Nesses, a incubação das frações F1-F6 (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não alterou o tônus produzido pela noradrenalina 10^{-7} M (Figura 17).

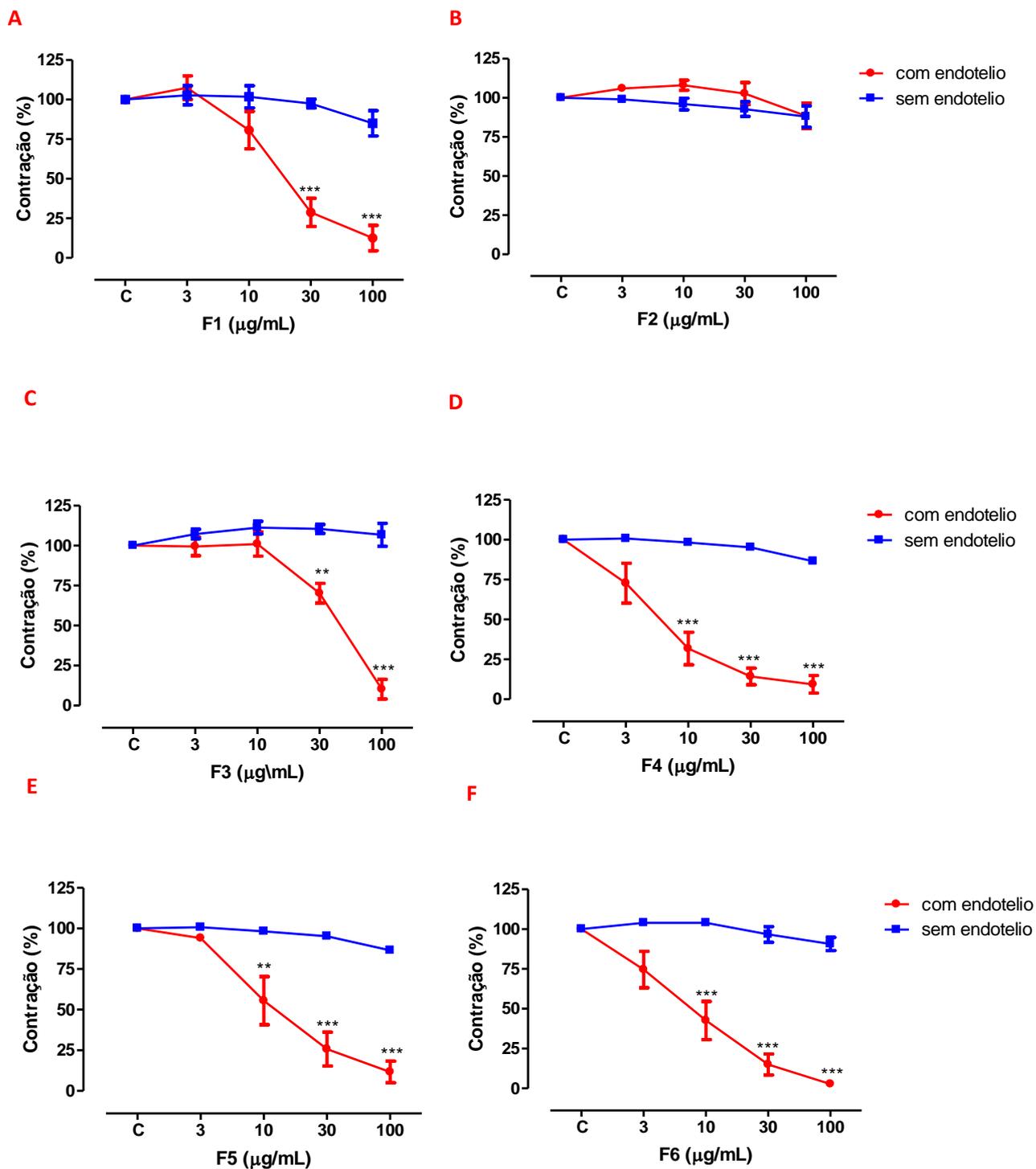


Figura 17 - Efeito da incubação cumulativa das frações F1 (A), F2 (B), F3 (C), F4 (D), F5 (E) e F6 (F) (3, 10, 30 e 100 µg/mL) de *Q. amara* em anéis de aorta de rato com e sem endotélio sob tônus induzido com noradrenalina 10^{-7} M (100%). Dados expressos como médias \pm erro padrão (n=4). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (ANOVA de 1 via e seguida pelo teste de Dunnett).

6.3.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* na frequência de contração do átrio direito isolado de rato e na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato

O átrio direito apresentou batimentos espontâneos com frequência variando de 210 a 270 bpm, após 30 minutos de estabilização a 35°C.

A incubação do EA (10 a 1000 µg/mL) e da FBut (10 a 100 µg/mL) não alterou o automatismo do átrio direito nas concentrações testadas (Figura 18).

Em átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima), o EA nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/mL e a FBut nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL aumentaram a força de contração do músculo cardíaco em 5; 14 e 43% ; e 18; 22 e 42%, respectivamente (Figura 19).

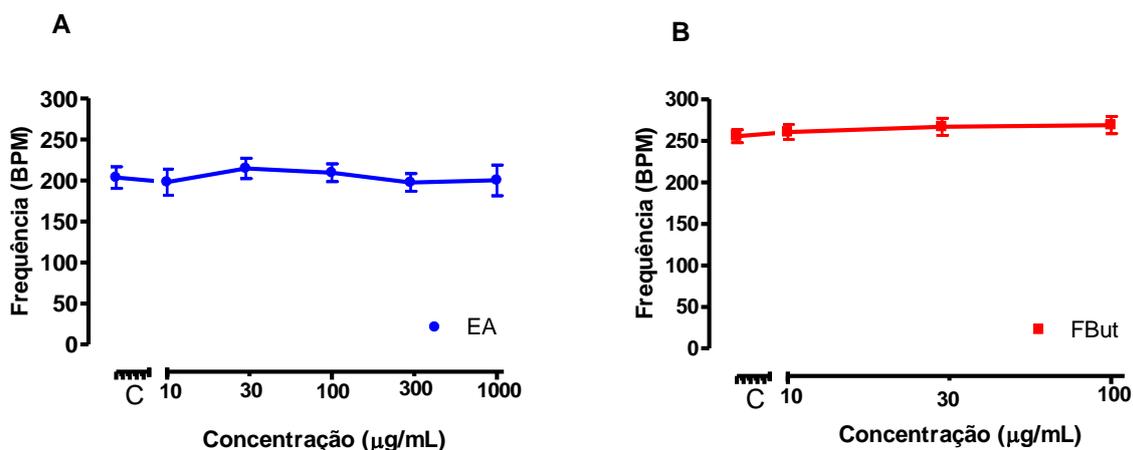


Figura 18 - (A) Efeito do EA (10 a 1000 µg/mL) e da (B) FBut (10 a 100 µg/mL) de *Q. amara* L na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. BPM = batimentos por minuto. Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 4), comparado ao controle (ANOVA de 1 via e seguida pelo teste de Dunnett).

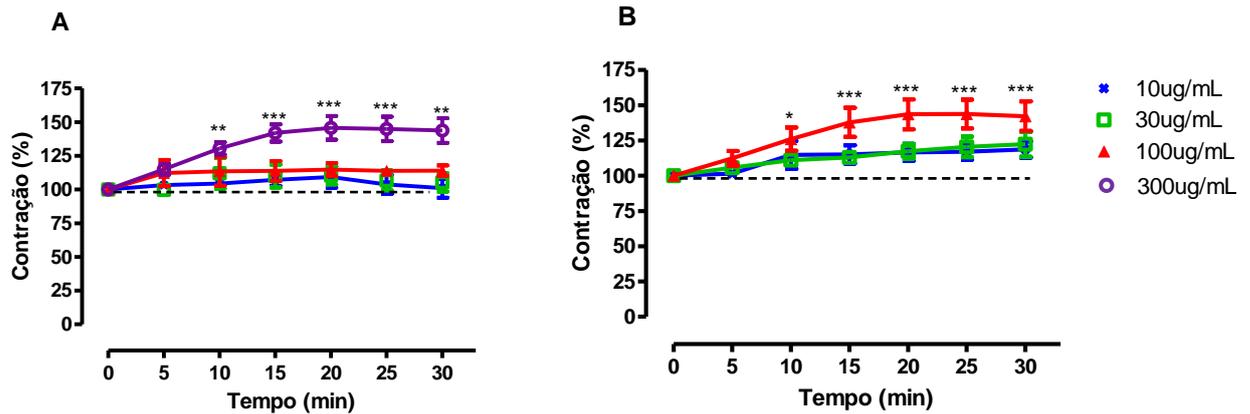


Figura 19 - (A) Efeito do EA (10 a 300 µg/mL) e da (B) FBut de *Q. amara* L. (10 a 100 µg/mL) em % da contração do átrio esquerdo isolado de rato estimulado eletricamente, a 35 °C. Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle antes da incubação (tempo= 0 minuto) (ANOVA de 2 via e pós-teste de Bonferroni).

6.4 Ação na junção neuromuscular

6.4.1 Efeito da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* (10 e 100 µg/mL) em músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto

A incubação da FBut 30 e 100 µg/mL aumentou a amplitude de contração do diafragma estimulado eletricamente na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) de 5 % a 15 %, respectivamente em relação ao controle antes da incubação (tempo= 0 minuto) (Figura 20).

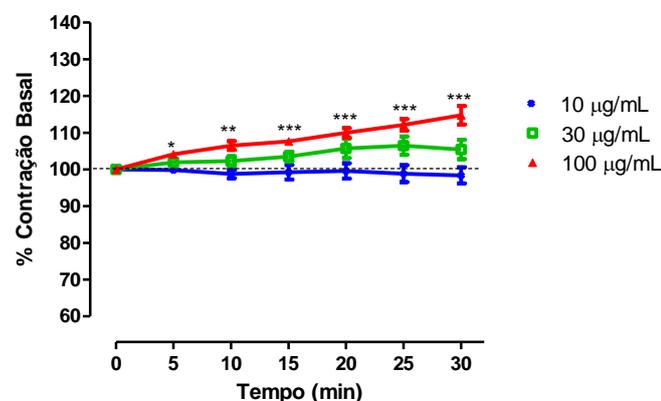


Figura 20 - Efeitos da FBut de *Q. amara* (10, 30 e 100 µg/mL) na contração do músculo diafragma de rato obtida com estimulação elétrica direta da fibra muscular, na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) a 30°C. Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle antes da incubação (tempo= 0 minuto) (ANOVA de 2 via e pós-teste de Bonferroni).

6.4.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* (10 e 100 µg/mL) em músculo diafragma de rato estimulado indiretamente - Preparação nervo frênico

A incubação da FBut 10, 30 e 100 µg/mL, potenciou a contração do diafragma obtida por estímulo direto do nervo frênico. Após 15 minutos de incubação, a contração do músculo diafragma retornou ao nível basal indicando que a potenciação não ocorre por facilitação da transmissão neuromuscular (efeito anticolinesterásico), mas sim, por ação direta na fibra muscular (Figura 21).

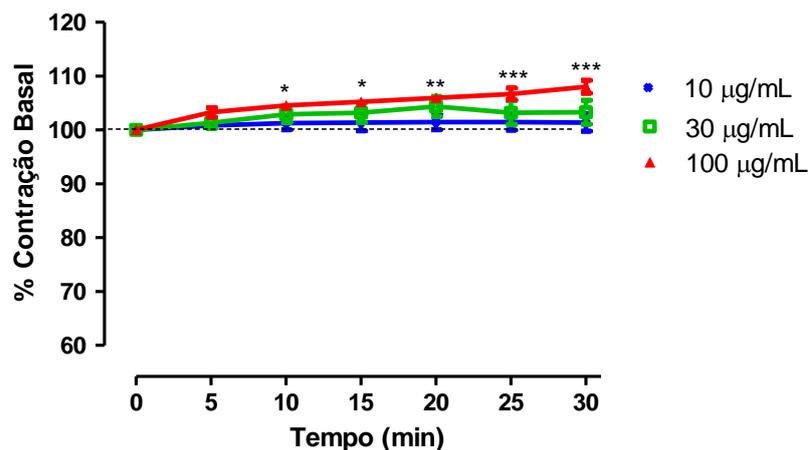


Figura 21 - Efeitos da FBut de *Q. amara* (10, 30 e 100 µg/mL) na contração do músculo diafragma de rato obtida com estimulação elétrica do nervo frênico a 30°C. Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle (tempo= 0 minuto) (ANOVA de 2 via e pós-teste de Bonferroni).

6.5 Avaliação da atividade da fração butanólica (FBut) da *Q. amara* na atividade da Ca^{2+} -ATPase

6.5.1 Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase

Para as medidas de inibição da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase, a tapsigargina (THG 0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 μM) inibidor específico da Ca^{2+} -ATPase - SERCA foi utilizada como controle positivo. Na presença de THG a Ca^{2+} -ATPase foi inibida proporcionalmente às concentrações com IC_{50} igual a 0,11 μM (LC: 0,08 – 0,38 μM , n= 3). A fração butanólica (FBut 1, 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), após incubação de 10 minutos, inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase com IC_{50} igual a 1,45 μM (LC: 0,77 a 2,70 μM , n= 3 em triplicata) (Figura 22).

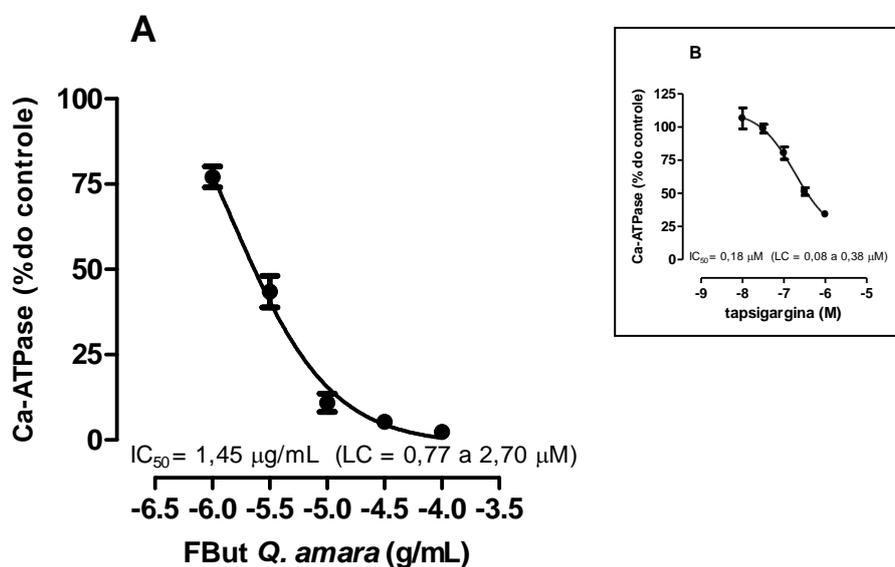


Figura 22 - (A) Efeito da FBut de *Q. amara* na atividade da Ca^{2+} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação a 37°C. (B) A tapsigargina (THG), inibidor específico da SERCA foi utilizada como controle positivo. Os símbolos e barras verticais representam as médias \pm desvio padrão (n= 3 em triplicata).

6.6 Ação no músculo liso

6.6.1 Efeito da fração butanólica (FBut) e frações (F1-F6) de *Q. amara* em ducto deferente de rato estimulado eletricamente

Em ducto deferente de rato estimulado eletricamente (0,2 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima), a FBut nas concentrações de 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu a força de contração em 17 e 40%, respectivamente, em 30 minutos de incubação. (Figura 23). Este efeito foi tempo e concentração-dependente.

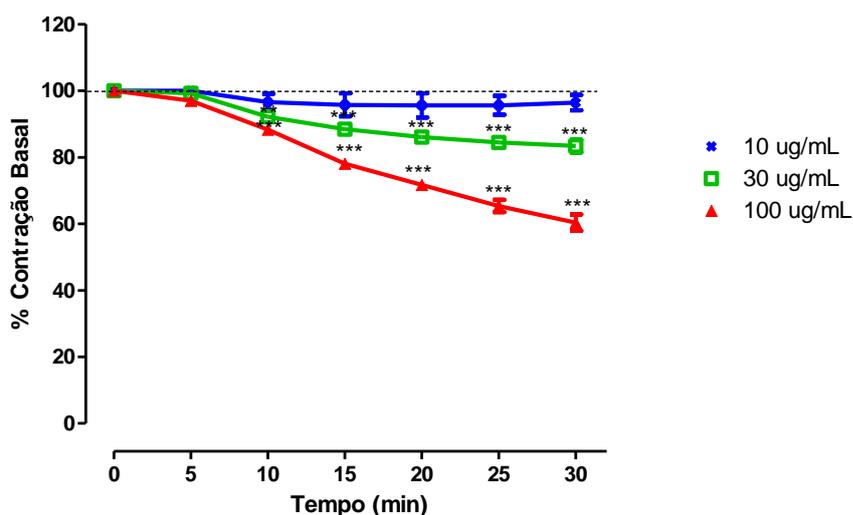


Figura 23 - Efeito da FBut de *Q.amara* L. (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na contração do ducto deferente de rato produzida por estimulação elétrica transmural do músculo liso. Dados expressos como médias \pm erro padrão (n= 4). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle (tempo= 0 minuto) (ANOVA de 2 via e pós-teste de Bonferroni).

A figura 24 mostra as frações responsáveis pela diminuição da força de contração no ducto deferente de rato estimulado eletricamente. A contração foi reduzida pelas F1, F3, F4 e F5 somente com a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. A percentagem de diminuição da F1e F3 foi de 17, 29, 38, 48%; e 7, 13, 17, 19 e 21%, respectivamente, em 30 minutos de incubação. E para F4 e F5 foi de 7, 8, 8 e 8%; e 7, 10 e 13%, respectivamente.

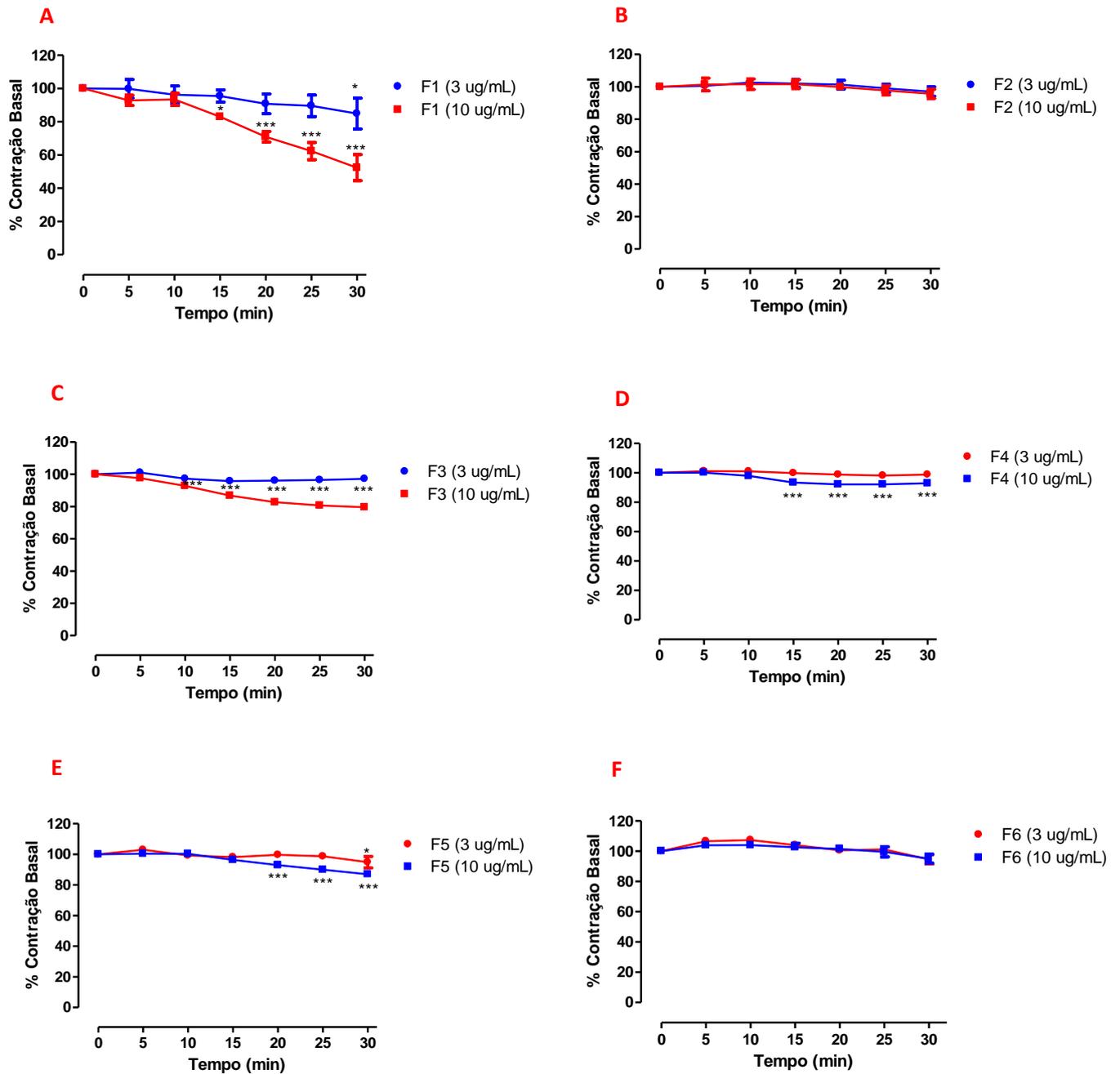


Figura 24 - Efeito das frações (F1-F6) de *Q.amara* L. (3 e 10 µg/mL) na contração do ducto deferente de rato produzida por estimulação elétrica do músculo liso. Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 4). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle (tempo= 0 minuto) (ANOVA de 2 via e pós-teste de Bonferroni)

6.6.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* em curvas cumulativas de noradrenalina em ducto deferente de rato (DDR)

A incubação da noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M,) produziu contrações proporcionais às concentrações. A CE_{50} da noradrenalina foi $5,5 \mu\text{M}$, (LC $5,0$ a $6,1 \mu\text{M}$). A FBut ($10, 30$ e $100 \mu\text{g/mL}$), incubada 20 min antes, diminuiu a contração máxima produzida no ducto deferente de rato pela incubação de noradrenalina, sem modificar a afinidade da droga por seus receptores (Figura 25, Tabela 01).

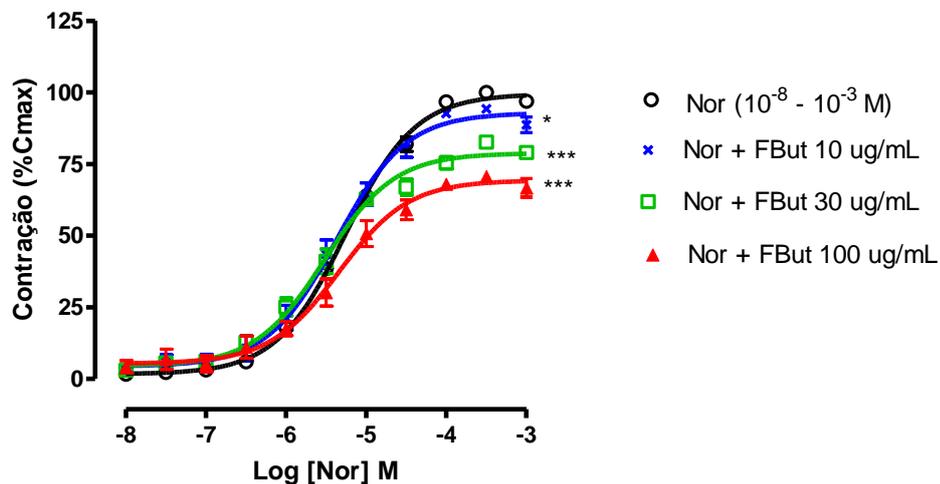


Figura 25 - Efeito da FBut de *Quassia amara* L ($10, 30$ e $100 \mu\text{g/mL}$) na contração do ducto deferente de rato, produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor 10^{-8} a 10^{-3} M), a 30°C . A FBut foi incubada 20 min antes da adição do agonista. Dados expressos como médias \pm erro padrão ($n=4$). $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (ANOVA de 1 via e pós-teste de Dunnett).

Tabela 01 - Efeito máximo (Emax%) e concentração efetiva média (EC₅₀) de noradrenalina (10⁻⁸ a 10⁻³ M) na ausência e após a incubação da FBut de *Quassia amara* L. nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL em DDR.

	EC ₅₀ µM (LCi-LCs)	Emax (%)
Noradrenalina	5,5 (5,0 – 6,1)	100
Nor + FBut 10 µg/mL	4,3 (3,3 – 5,5)	88*
Nor + FBut 30 µg/mL	3,1, (2,4 – 3,8)	79 ***
Nor + FBut 100 µg/mL	4,6 (3,2 – 6,4)	66 ***

Os valores da EC₅₀ são médias geométricas e limites de confiança (n= 4) * diferentes do controle (ANOVA de 1 via e pós-teste de Dunnett)

6.6.3 Avaliação da atividade da FBut na concentração de cálcio intracelular ([Ca²⁺]_i) em cardiomiócitos de ratos e útero de rata em cultura.

Para avaliar possíveis efeitos da FBut de *Q. amara* no influxo e na concentração de Ca²⁺ intracelular em células de útero de rata ou em cardiomiócitos de ratos neonatos mantidos em cultura e estimulados com KCl 70 mM, foram obtidas leituras da fluorescência emitida pelo Fura 4 incorporado nas células, na ausência e na presença de FBut nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL.

A incubação de Fbut não modificou a concentração de Ca²⁺ intracelular comparativamente ao verapamil (100 µM), controle positivo dos testes que, como esperado, produziu uma diminuição no influxo de Ca²⁺ de 60% e 55% do controle, respectivamente (Figura 26).

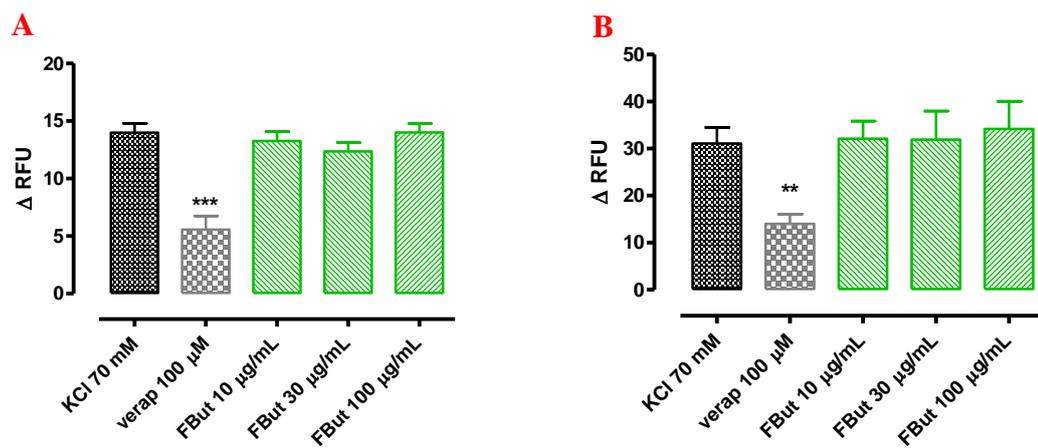


Figura 26 – Efeito da FBut de *Q. amara* L. (10, 30 e 100 μg/mL) na concentração de cálcio intracelular em útero de rata (A) e em cardiomiócitos de ratos neonatos (B). Dados expressos como médias ± erro padrão (n= 3 em duplicata). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (ANOVA de 1 via e pós-teste de Dunnett)

7. Discussão

A *Quassia amara* (Simaroubaceae) é utilizada na medicina popular como antianêmica, antibiótica, antiparasitária, antimalárica, anti-hipertensiva, em doenças hepáticas e digestivas, especialmente em úlceras gástricas. (DUKE, 1992; RAJI; BOLARINWA, 1997; GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011; TOMA *et al.*, 2002). O presente trabalho teve como objetivo específico estudar as ações farmacológicas do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *Quassia amara* L. no sistema cardiovascular.

Grande parte dos trabalhos com esta planta encontrados na literatura científica consultados no Pubmed, Scielo e Lilacs, estuda a atividade antimalárica (AJAIEYOBA *et al.*, 1999; BERTANI *et al.*, 2006; CACHET *et al.*, 2009; HOULËL *et al.*, 2009) de compostos isolados desta planta. Outros relatam ações sistêmicas como efeitos sedativo (TOMA *et al.*, 2003), antissecretor (TOMA *et al.*, 2003), antiulcerogênico (GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011; TOMA *et al.*, 2002), antiedematogênico (TOMA *et al.*, 2003), anti-inflamatório, antidiabético (HUSAIN *et al.*, 2011) antifertilidade (PARVEEN *et al.*, 2003; RAJI; BOLARINWA, 1997), atividade citotóxica (HOULËL *et al.*, 2009) e inseticida (TESORIERO *et al.*, 2003).

Vários compostos foram isolados da *Q. amara* como os alcaloides β -carbolina, alcaloides indólicos e os quassinoides (quassina, neoquassina, simalicalactona D e E, picrassins B, H, I e J) (CACHET *et al.*, 2009; .HOULËL *et al.*, 2009; BERTANI *et al.*, 2006). Esses compostos foram extraídos da planta com solventes de baixa polaridade; os estudos da ação farmacológica dos extratos da planta foram realizados sem a padronização química dos extratos utilizados, condição necessária para a comparação dos resultados obtidos.

A padronização de extratos de planta é um pré-requisito para a garantia da qualidade, assim como para a constância dos efeitos terapêuticos e de segurança. No presente trabalho, preocupamo-nos em padronizar quimicamente o extrato aquoso e as frações semi-purificadas

da *Q. amara*, seguindo o processo de fracionamento orientado pelas atividades farmacológicas obtidas.

Primeiramente, realizou-se a infusão em água destilada (2,5%) do pó das folhas secas de *Q. amara*. Após filtração, concentração e liofilização, o rendimento da extração foi de 24%. Na dependência dos eluentes utilizados na cromatografia de camada delgada (CCD), 2 a 6 manchas com diferentes R_fs foram observadas e nem sempre bem definidas. A semi-purificação inicial do EA foi realizada em butanol (1:1 v/v) o que originou a fração butanólica (FBut) com 47% de rendimento relativo ao EA.

O cromatograma em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da FBut mostrou coincidência da maioria dos picos observados no EA submetido ao mesmo procedimento. No entanto, a partir do tempo de retenção de 10 minutos da FBut, comparativamente ao EA, os picos foram 5 a 6 vezes maiores nesta fração semi-purificada.

Da FBut, posteriormente em CLAE, foram isoladas 6 frações (F1 a F6). Dessas frações observamos 7 picos principais com tempos de retenção de 3,2; 4,7; 6,5; 8,6; 19,0; 19,6; e 20,5 minutos, com áreas representando 20,6; 10,4; 1,7; 1,8; 6,1; 7,1 e 3,1% para cada pico, respectivamente.

Nos estudos farmacodinâmicos realizados até o momento, foram comparados os efeitos do EA e da FBut com metodologias descritas em “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais” com algumas modificações, visando uma melhor caracterização farmacológica destes extratos (LAPA *et al.*, 2003).

A triagem geral da atividade farmacológica foi iniciada com o método de observação, de IRWIN (1964) modificado a partir de Malone (1962), um teste preliminar com a finalidade de registrar as alterações comportamentais dos camundongos após o tratamento com EA e FBut. A administração do EA em dose única de 1,0 g/ kg, v.o., não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica nos animais. A administração oral da FBut (1,0 g/kg) produziu sinais de sedação, anestesia e cianose após 60 minutos de tratamento. Este efeito da FBut

perdurou até os 120 min, quando o comportamento do animal não se diferenciou dos animais controles. A administração sistêmica por via intraperitoneal da FBut (1,0 g/kg) diminuiu a deambulação, a frequência respiratória, produziu sedação, anestesia e cianose intensa após 60 minutos. Esta dose foi letal após 120 minutos de tratamento.

Estudo anterior com o extrato aquoso da casca de *Quassia amara* administrado nas doses de 250, 500, 750 e 1000 mg/kg por via oral, também não obteve sinais de toxicidade com nenhuma das doses testadas. A administração pela via intraperitoneal de 500 mg/kg produziu sinais de toxicidade aguda com recuperação após 24h, enquanto a dose de 1000 mg/kg foi letal para todos os animais em 24h (GARCÍA-GONZALEZ *et al.*, 1997). Esses resultados indicam que a utilização popular por via oral desses extratos parece ser segura e a administração parenteral pode ser letal quando em altas doses. Além disto, como o EA administrado por via oral não teve a mesma toxicidade da FBut pela mesma via, a utilização na medicina tradicional do chá com água quente parece ainda mais segura (GARCÍA-BARRANTES; BADILLA, 2011).

O estudo da atividade cardiovascular da FBut de *Q. amara* foi iniciado com a avaliação do seu efeito na pressão arterial de ratos anestesiados. A injeção da FBut (1,0; 3,0 e 10,0 mg/kg, e.v.) em ratos anestesiados produziu hipotensão rápida e passageira, proporcional à dose. Este efeito não foi acompanhado de alteração da frequência cardíaca. A repetição da administração da fração, no mesmo animal, não foi acompanhada de dessensibilização, isto é, a resposta foi repetida no mesmo animal sem alteração da sua intensidade. Durante a ação da fração, as respostas aos mediadores autonômicos principais, noradrenalina e acetilcolina, não foram alteradas, indicando que as vias de respostas ativadas por receptores α_1 adrenérgicos ou M_2 e M_3 muscarínicos, não foram comprometidas pela fração. Da mesma forma, a ação hipotensora da FBut (10,0 mg/kg) não foi alterada pelo tratamento prévio com os antagonistas muscarínico (atropina 1,0 mg/kg) e α -adrenérgico (prazosin 1,0 mg/kg). Estes

efeitos demonstraram que a hipotensão causada pela fração não foi produzida pela interação do extrato com receptores M_2 e M_3 muscarínicos ou α_1 adrenérgicos.

Este efeito hipotensor produzido pela FBut foi avaliado nas frações purificadas (F1-F6) nas doses de 1,0; 3,0 e 10,0 mg/kg, e.v. em ratos anestesiados. Observou-se que a F1, F2 e F6 demonstraram efeito hipotensor que foi proporcional a dose.

A pressão arterial é determinada pelo produto do débito cardíaco e da resistência periférica ao fluxo sanguíneo ($PA=DC \times RP$). O débito cardíaco está relacionado à força de contração ventricular e à frequência cardíaca, enquanto a resistência periférica depende do tônus do músculo liso vascular (TORGNARINI; MOULDS, 1997).

Dando continuidade aos estudos e, considerando os possíveis mecanismos de ação vasculares, a ação das frações purificadas (F1-F6) foi avaliada em anéis de aorta torácica de rato com tônus vascular induzido pela noradrenalina (10^{-7} M) *in vitro*.

A noradrenalina é o principal mediador simpático e vasoconstritor fisiológico e, outras substâncias como a angiotensina e endotelina também contribuem na manutenção do tônus vascular. O tônus vascular resulta da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos que estão acoplados à proteína G_s que ativa a fosfolipase C da membrana celular, com liberação dos segundo-mensageiros intracelulares trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 localizados na membrana do retículo sarcoplasmático/endo quando ativado libera Ca^{2+} para o citosol, e o DAG ativa quinases proteicas (proteínas quinases do tipo C, PKC) que fosforilam e ativam canais de cálcio da membrana, levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio livre, iniciando a contração do músculo liso vascular (BERRIDGE, 2008).

O relaxamento da musculatura lisa vascular produzido pela acetilcolina é dependente da liberação de óxido nítrico (NO) pela célula endotelial. A interação da acetilcolina com os receptores muscarínicos M_3 leva a ativação da sintase do óxido nítrico (NOS) endotelial, promovendo a síntese de NO, que se difunde para o músculo liso vascular e ativa uma

guanilato ciclase solúvel (GCs) estimulando a produção de monofosfato cíclico de 3',5' guanosina (GMPc) na musculatura. Esse segundo-mensageiro, por sua vez, ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) induzindo relaxamento vascular por mecanismos diversos, entre eles, desfosforilação direta da cadeia leve da miosina, e a redução da concentração de Ca^{2+} citosólico (CARVAJAL *et al.*, 2000; MURAD *et al.*, 1987; WEISBROD *et al.*, 1998).

Em nossas experiências, as frações F1, F3, F4, F5 e F6 relaxaram o tônus muscular produzido pela noradrenalina na aorta de rato com endotélio, mas o mesmo não foi observado com o tônus da aorta desprovida de endotélio, indicando um mecanismo dependente de NO na ação relaxante das frações purificadas.

Estudos realizados por BARROS (2010) demonstraram o efeito relaxante da FBut de *Quassia amara* em anéis de aorta de rato com endotélio que foi inibido com a incubação do L-NAME (bloqueador específico da NO sintase), indicando um mecanismo dependente de NO na ação relaxante deste extrato.

Dando continuidade ao estudo das ações farmacológicas da *Q. amara* no sistema cardiovascular, os efeitos do EA e da FBut foram avaliados em preparações isoladas de átrios direito e esquerdo de rato. Notou-se que as concentrações do EA (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) e as da FBut (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) testadas *in vitro* não alteraram o automatismo cardíaco do átrio direito, confirmando o que foi observado na frequência cardíaca *in vivo*, que não foi alterada na vigência da administração dos extratos. Entretanto, o EA e a FBut incubados no átrio esquerdo eletricamente estimulado *in vitro*, aumentaram o inotropismo cardíaco nas concentrações testadas.

Estudos complementares no músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto e indireto mostraram que a FBut aumentou a amplitude de contração do diafragma nos dois ensaios.

A potenciação da resposta contrátil do átrio esquerdo e do diafragma indicou que a FBut podia interferir na homeostasia intracelular de cálcio, facilitando o processo da excitação-contração na musculatura estriada.

É conhecido que o acoplamento excitação-contração envolve a propagação de um potencial de ação que é conduzido ao longo da membrana da fibra muscular em direção aos túbulos T acoplados ao retículo sarcoplasmático. A cisterna do retículo sarcoplasmático armazena o cálcio intracelular e é rico em canais de rianodina por onde flui o Ca^{2+} necessário para a contração muscular. As membranas do túbulo T contêm canais de cálcio sensíveis à voltagem (diidropiridínicos ou canais de cálcio do tipo L). Estes canais estão ligados mecanicamente a receptores de rianodina (receptores RyR) que libera Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático adjacente. Quando uma onda de despolarização se propaga pelo túbulo T, os receptores diidropiridínicos alteram sua conformação alostérica abrindo canais de RyR do retículo sarcoplasmático liberando o Ca^{2+} . O Ca^{2+} liberado, então, difunde-se no citosol dando início à contração muscular (BERRIDGE, 2004; PROVEN *et al.*, 2006).

Ca^{2+} -ATPases estão envolvidas em processos fundamentais para a homeostasia e sinalização do cálcio intracelular. O relaxamento da fibra muscular ocorre quando o retículo sarcoplasmático bombeia o Ca^{2+} do citosol de volta ao seu lúmen, utilizando a Ca^{2+} -ATPase denominada SERCA (*Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*) presente na membrana da organela; a diminuição do cálcio intracelular livre ocorre ainda através do trocador Na^+ - Ca^{2+} existente na membrana citoplasmática (BERRIDGE *et al.*, 2003; ESSIN; GOLLASCH, 2009) e, menos intensamente, por ação da PAMCA (*plasmatic membrane calcium ATPase*) que transporta o cálcio citoplasmático livre diretamente para o meio extracelular (KÜHLBRANDT, 2004).

O estudo da inibição da atividade ATPásica pelos extratos da *Q. amara* foi realizado em Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho isolada no laboratório seguindo o método

de Fiske e Subbarow (1966) adaptado para leitor de microplaca. A atividade da enzima foi testada com a tapsigargina (derivada da planta mediterrânea *Thapsia garganica*), inibidor específico da bomba de Ca^{+2} do retículo sarco/endoplasmático - SERCA (THASTRUP *et al.*, 1990; LYTTON *et al.*, 1991; TULUC *et al.*, 2005) utilizada como controle positivo. A CI_{50} da tapsigargina foi 0,18 μM (ou $\sim 0,12 \mu\text{g/mL}$). A FBut de *Q. amara* inibiu a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase com $\text{IC}_{50} = 1,45 \mu\text{g/mL}$; inibição total foi obtida com 30 $\mu\text{g/mL}$. A FBut, portanto, foi cerca de 10 vezes menos potente que a tapsigargina, o que para um extrato semi-purificado é altamente promissor.

A este efeito de inibição da Ca^{+2} -ATPase pode ser atribuído a potenciação da contração do átrio esquerdo e do músculo diafragma, pois com a inibição da enzima há um aumento na concentração de íons cálcio livre no citosol potenciando a contração do músculo (HERBETTE *et al.*, 1982).

O ducto deferente de rato (DDR) é um modelo clássico para o estudo de substâncias que interferem com os mecanismos colinérgico, noradrenérgico e purinérgico (WESTFALL; WESTFALL, 2001). A inervação simpática do DDR é mediada por dois co-transmissores: a noradrenalina e o ATP responsáveis pela contração das fibras lisas.

A noradrenalina interage com receptores α_1 -adrenérgicos e o ATP com receptores purinérgicos tipo P_2 . Os dois acoplados a proteína G_q ativam a fosfolipase C (PLC) da membrana celular. Sob ação da PLC e a hidrólise dos fosfolípidos de membrana ocorre a síntese dos segundos-mensageiros inositol trifosfato (IP3) e diacetilglicerol (DAG), que agem sinergicamente na contração do músculo liso, mobilizando Ca^{2+} do retículo e ativando a PKC, respectivamente. Sob ação do IP3 há, ainda, a fosforilação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem da membrana celular e conseqüente influxo de Ca^{2+} . A ativação dos receptores de IP3 no retículo endoplasmático também pode liberar Ca^{2+} e por um mecanismo retroalimentador, o Ca^{2+} livre no citoplasma promove a liberação de mais Ca^{2+} do retículo.

Interagindo com a calmodulina, o Ca^{2+} livre no citoplasma induz a ativação da $\text{PK}_{\text{Ca}^{2+}}$, que por sua vez, ativa a MCLK que desencadeia o deslizamento das miofibrilas actina e miosina resultando na contração muscular (BILLINGTON; PENN, 2003). A FBut de *Q. amara* não alterou a EC_{50} das curvas cumulativas de noradrenalina em ducto deferente de rato, mas diminuiu seu efeito máximo na contração. As frações purificadas responsáveis pela diminuição da força de contração no ducto deferente de rato estimulado eletricamente foram a F1, F3, F4 e F5.

A diminuição da contração máxima produzida pela noradrenalina não pode ser explicada por ação no sítio de ligação do agonista mediada por receptores α_1 - adrenérgicos porque a EC_{50} da noradrenalina não foi alterada na presença da FBut. Portanto, deve ser pensado em ação intracelular da FBut, inibindo o efeito contrátil. A inibição do influxo de Ca^{2+} pelos canais tipo L ativados pela despolarização celular foi estudada com a FBut da *Q. amara*, que não alterou a concentração citosólica de cálcio, não havendo, portanto, inibição do influxo de cálcio.

Em resumo, o presente trabalho apresentou resultados que mostram ação hipotensora, inotrópica positiva, potenciadora da contração da musculatura estriada e antinociceptiva dos extratos padronizados de *Q. amara*. O aumento da força de contração da musculatura estriada parece estar relacionado à diminuição da atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático. Na musculatura do DDR, a diminuição do efeito máximo contrátil produzido pela incubação de noradrenalinais, parece ocorrer por inibição de etapas intracelulares do mecanismo de acoplamento excitação-contração, pois a EC_{50} dos agonistas não foi alterada e o influxo de íons cálcio pelos canais do tipo L não foi inibido pelos extratos.

8. Conclusão

A *Quassia amara* L., uma planta da floresta neotropical, pertencente à família Simaroubaceae, é amplamente utilizada na medicina popular como antimicrobiana, antianêmica, antimalárica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória e para o tratamento de úlceras gástricas (AJAIYEGBA *et al.*, 1999; DUKE, 1992 TOMA *et al.*, 2002;).

A padronização química do extrato de *Q. amara* teve início com a partição do extrato aquoso (EA) em butanol (1:1 v/v) obtendo-se a FBut, que foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação em CLAE levou ao isolamento de seis frações (F1-F6).

O objetivo deste trabalho foi realizar um *screening* farmacológico geral dos extratos intermediários e estudar os efeitos da FBut de *Q. amara* L. (pau-amargo) no sistema cardiovascular. A espécie não conta com trabalhos científicos confirmando as ações hipotensora e inotrópica positiva.

As principais ações sistêmicas estão resumidas abaixo:

- 1) A administração oral do EA não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica nos animais. Os resultados mostram que a utilização popular do chá de *Q. amara* por via oral parece ser segura. A administração oral da fração FBut semi-purificada do EA produziu sinais de sedação, anestesia e cianose após 60 minutos de tratamento; a administração sistêmica da FBut por via intraperitoneal foi letal após 120 minutos.
- 2) A ausência de efeitos farmacológicos no teste geral no SNC realizado neste estudo reforça que a maioria dos compostos com ação tóxica por via parenteral não deve ter sido absorvida por via oral.
- 3) Na pressão arterial de ratos anestesiados, a FBut injetada por via endovenosa produziu hipotensão rápida e passageira, sem alterar o efeito hipertensor da noradrenalina, ou a

hipotensão produzida pela acetilcolina. Essa diminuição da pressão arterial não foi modificada pelo tratamento prévio com os antagonistas α -adrenérgico (prazosin) ou muscarínico (atropina). Esses dados mostraram que a hipotensão causada pela FBut não ocorre pela interação do extrato com receptores α_1 -adrenérgicos ou M_2 e M_3 muscarínicos. Provavelmente, o efeito hipotensor está relacionado à vasodilatação direta no músculo liso vascular, com diminuição da resistência periférica.

4) As frações purificadas F1, F3, F4, F5 e F6 relaxaram o tônus muscular produzido pela noradrenalina na aorta de rato, provavelmente por inibição da síntese de óxido nítrico (NO).

5) Em preparações de átrio isolado de rato, o EA e a FBut não alteraram o automatismo do átrio direito, mas aumentaram a amplitude de contração do átrio esquerdo de forma dose-dependente.

6) O EA e a FBut aumentaram a amplitude de contração do músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto ou indireto.

7) A potenciação da contração do átrio esquerdo e a do músculo diafragma produzida pela ação do EA e da FBut parece ser devido à inibição da homeostasia de cálcio intracelular durante o processo de excitação-contração.

8) A FBut de *Q. amara* inibiu a atividade enzimática da Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo esquelético de coelho. Esse efeito pode ser responsável pela potenciação da contração da musculatura estriada, pois a inibição dessa bomba retarda a recaptção, aumenta a

concentração eficaz de íons cálcio livres no citosol e prolonga o tempo de interação das miofibrilas contráteis, o que potencia a contração muscular.

9) Em ducto deferente de rato, a FBut reduziu a contração máxima produzida pela noradrenalina sem alterar a EC_{50} e sem inibir o influxo de Ca^{2+} pelo canais de cálcio do tipo L. Portanto, o efeito miorelaxante parece ser devido à inibição do efeito contrátil em alguma etapa intracelular.

Em conclusão, os resultados sugerem que compostos da *Quassia amara* produzem relaxamento do tônus vascular adrenérgico decorrente da ativação da via do NO endotelial. Esse efeito pode estar relacionado à hipotensão observada após injeção endovenosa da fração semi-purificada (FBut) em ratas anestesiadas. No entanto, a biodisponibilidade oral dos extratos e frações ativas de *Quassia amara* é baixa. Caso seja comprovada absorção eficaz por administração repetida do extrato, os efeitos descritos neste trabalho serão indicativos importantes da ação hipotensora relatada na medicina popular.

Referências

AJAIYEGBA, E. O.; ABALOGU, U. I.; KREBS, H. C.; ODUOLA, A. M. ***In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice.** J Ethnopharmacol, v. 67, p. 321–5, 1999.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, Â. M. C.; SANTOS, A. K. L. dos; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. ***Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década.*** Quim. Nova, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

APERS, S.; CIMANGA, K.; VANDEN BERGHE, D.; VAN MEENEN, E.; LONGANGA, A. O.; FORIERS, A.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. **Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *quassia africana*.** Planta Med, v.68, p.20-4, 2002.

ARCHER, J. Tests of emotionality in rats and mice: a review. Anim. Behav., v. 21, p.205-235, 1973.

ASHLEY, C. C.; MULLIGAN, I. P.; LEA, T. J. ASHLEY, C.C.; MULLIGAN, I.P.; LEA, T.J. **Ca⁺² and activation mechanism in skeletal muscle.** Quaterly Reviews of Biophysics, v. 24, n. 1, p. 1-73, 1991.

BARROS, J. S. Avaliação farmacológica geral e específica do extrato aquoso e fração butanólica de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) e efeito dos compostos isolados nas P-ATPases de mamíferos H⁺/K⁺-ATPase e Ca²⁺-ATPase. 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

BERRIDGE, M. J. **Smooth muscle cell calcium activation mechanisms.** J Physiol Rev., v. 586.21, p. 5047-5061, 2008.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. **Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 4, p. 517-529, 2003.

BERRIDGE, M. J. **Calcium signal transduction and cellular control mechanisms.** Biochimica et Biophysica Acta, n. 1742, p. 3-7, 2004.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. **Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction.** Nature, v. 312, p. 315-321, 1984.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. **The versatility and universality of calcium signalling.** Nature Rev. Mol. Cell Biol, v. 1, p. 11-21, 2000.

BERS, D. M. **Cardiac excitation–contraction coupling**. *Nature*, v. 415, p. 198-205, 2002.

BERTANI, S.; HOÛEL, E.; STIEN, D.; CHEVOLOT, L.; JULLIAN, V.; GARAVITO, G.; BOURDY, G.; DEHARO, E. **Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 108, p. 155-157, 2006.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. **Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle**. *Respiratory Research*, v. 4, n. 1, p. 23, 2003.

BOURIN, M.; CHENUA, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D. J. P. **A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests**. *Behavioural Brain Research*, v. 164, p. 266-269, 2005.

BOURIN; M.; PETIT-DEMOULIÈRE, B.; DHONNCHADHA, B. N.; HASCOET, M. **Animal models of anxiety in mice**. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 21, p. 567-574, 2007.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. **Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme**. *Proc Natl Acad Sci*, v. 87, p. 682-685, 1990.

CACHET, N.; HOAKWIE, F.; BERTANI, S., BOURDY, G.; DEHARO, E.; STIEN, D.; HOUEL, E.; GORNITZKA, H.; FILLAUX, J.; CHEVALLEY, S.; VALENTIN, A.; JULLIAN, V. **Antimalarial Activity of Simalikalactone E, a New Quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 10, p. 4393-4398, oct. 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Bio. Res.*, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. **Anti-inflammatory Compounds of Plant Origin. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor κ B (NF- κ B)**. *Planta Medica*, v. 69, p. 1-12, 2003.

CARLINI, E.A., CONTAR, J.D.P., SILVA-FILHO, A.R., DA SILVIERA-FILHO, N.G., FROCHTENGARTEN, M.L., BUENO, O.F.A. **Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals**. *J. Ethnopharmacol.*, v. 17, p. 37-64, 1986.

CARVAJAL, J. A.; GERMAIN, A. M.; HUIDOBRO-TORO, J. P.; WEINER, C.P. *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. J. C. Pharmacol*, v. 184, n. 3, p. 409-420, 2000.

COE, F.G., ANDERSON, G.J. **Snakebite ethnopharmacopoeia of eastern Nicaragua.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 303-323, 2005.

CUENDET, M.; CHRISTOV, K.; LANTVIT, D. D.; DENG, Y.; HEDAYAT, S.; HELSON, L.; MCCHESENEY, J. D.; PEZZUTO, J. M. **Multiple myeloma regression mediated by Bruceantin.** *Clin. Cancer Res*, v. 10, p. 1170-1179, 2004.

DEFILIPPS, R. A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. *Medicinal Plants of Guianas (Guyana, Surinam, French Guiana).* Department of Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution: Washington, D.C., p. 263-264, 2004.

DEL VALLE-RODRIGUEZ, A.; CALDERON, E.; RUIZ, M.; ORDONEZ, A.; LOPEZ-BARNEO, J.; URENA, J. **Metabotropic Ca²⁺ channel-induced Ca²⁺ release and ATP-dependent facilitation of arterial myocyte contraction.** *Proc Natl Acad Sci*, v. 103, p. 4316-4321, 2006.

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

DULHUNTY, A.F. **Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology Rev.*, v. 33, p. 763-772, 2006.

DULHUNTY, A. F.; HAARMANN, C. S.; GREEN, D.; LAVER, D. R.; BOARD, P. G.; CASAROTO, M. G. **Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 79, p. 45-75, 2002.

DUKE, J. *Handbook of Phytochemical Constituents of Grass Herbs and Other Economic Plants.* CRS Press, Boca Raton, FL, p. 654, 1992.

EBASHI, S. **Regulation of muscle contraction.** *Proc. R. Soc. Ser. B.*, n. 207, p. 256-286, 1980.

ESSIN, K.; GOLLASCH, M. Role of Ryanodine Receptor Subtypes in Initiation and Formation of Calcium Sparks in Arterial Smooth Muscle: Comparison with Striated Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 1, p. 15, 2009.

EVANS, D. A.; KALEYSA, R. R. **Effect of quassin on the metabolism of catecholamines in different life cycle stages of *Culex quinquefasciatus***. *Indian J. Biochem. Biophys.*, v. 29, p. 360-363, 1992.

FERRARI, A.; DIEHL, C. **Evaluation of the Efficacy and Tolerance of a Topical Gel With 4% Quassia Extract in the Treatment of Rosacea**. *J Clin Pharmacol*, p. 1-6, feb. 2011.

FÉLÉTOU, M.; KÖHLER, R.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived Vasoactive Factors and Hypertension: Possible Roles in Pathogenesis and as Treatment Targets. *Curr Hypertens Rep*, v. 12, p. 267-275, 2010.

FERRO, D. *Fitoterapia: Conceitos clínicos*. São Paulo: Atheneu, 2006.

FISHER, S. A. **Vascular smooth muscle phenotypic diversity and function**. *Physiol Genomics*, v. 42A, p. 169-187, 2010.

FITTS, R.H.; MEZTGER, J. M. **Mechanisms of muscular fatigue**. In: **Principle of exercise biochemistry**. Karger: Basel. v. 27, p. 121-229, 1988.

FLOYD, R.; WRAY, S. **Calcium transporters and signalling in smooth muscles**. *Cell Calcium*, v. 42, p. 467-476, 2007.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; JORGENSEN, A. O. **Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle**. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 56, p. 509-534, 1994.

GARCÍA-BARRANTES, P. M.; BADILLA, B. **Anti-ulcerogenic properties of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) standardized extracts in rodent models**. *J.Ethnopharmacol*, v. 34, p. 904-910, 2011.

GARCÍA-GONZALEZ, M. *et al.* **Pharmacologic activity of the aqueous wood extract from *Quassia amara* (Simarubaceae) on albino rats and mice**. *Rev. Biol. Trop.*, p. 44-50, 1997.

GRANDTNER, M.M. Elsevier's Dictionary of Trees. Foreign Language Study, v. 1, p. 736, 2005.

GONÇALVES, E.; VILHENA, R. C.; ROCHA, O. Anatomia foliar de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal e inseticida. Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi Ciências Naturais, v.1, p.9-18, 2005.

GOTTESMANN, C. **Brain inhibitory mechanisms involved in basic and higher integrated sleep processes.** Brain Research Reviews, v.45, p.230– 249, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 10ª ed. Guanabara Koogan, 2002.

HERBETTE, L.; MESSINEO, F. C.; KATZ, A. M. **The interaction of drugs with the sarcoplasmic reticulum.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., v.22, p.413-434, 1982.

HERNANDEZ-GALICIA, E., AGUILAR-CONTRERAS, A., AGUILAR-SANTA MARIA, L., ROMAN-RAMOS, R., CHAVEZ-MIRANDA, A. A., GARCIA-VEGA, L. M., FLORES-SAENZ, J. L., ALARCÓN-AGUILAR, F. J. **Studies on hypoglycemic activity of Mexican medicinal plants.** In: Proceedings of Western Pharmacology Society, v. 45, p. 118–124, 2002.

HOUËL, E.; BERTANI, S.; BOURDY, G.; DEHARO, JULIAN, E. V.; VALENTIN, A.; CHEVALLEY, S.; STIEN, D. **Quassinoid constituents of Quassia amara L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 126, p. 114-118, 2009.

HUSAIN, G. M., SINGH, P. N., SINGH, R. K.; KUMAR, V. **Antidiabetic activity of standardized extract of quassia amara in nicotinamide–streptozotocin-induced diabetic rats.** Phytother. Res., 2011.

INESI, G.; HUA, S.; XU, C.; MA, H.; SETH, M.; PRASAD, A. M.; SUMBILLA, C. **Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) inhibition.** Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 37, n. 6, 2005.

IRIGOYEN, M. C.; FIORINO, P.; DE ANGELIS, K.; KRIEGER, E. M. **Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios.** Rev Bras de Hipertensão, v. 12, p. 229-33, 2005.

IRWIN, S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: NODIN, J.H; SIEGLER P. E. (eds) Animal and clinical techniques in drug evaluation. Year book medical publishers, Chicago, p. 36-54, 1964.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. *Phytochemistry*, v. 57, n. 5, p. 621-623, 2001.

KLEIN, M.G.; LACAMPAGNE, A.; SCHNEIDER, M. F. **A repetitive mode of activation of discrete Ca²⁺ release events (Ca²⁺ sparks) in frog skeletal muscle fibres.** *Journal of Physiology*, v. 515.2, p. 391-411, 1999.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of p-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.5, p.282-295, abr. 2004.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA T.C.M. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais. Ed.: Lagoa. Porto Alegre – RS, p. 119, 2003.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O. & LIMA, T. C. M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000.

LEONG, P.; MACLENNAN, D. H. **Complex interactions between skeletal muscle ryanodine and dihydropyridine receptor proteins.** *Biochem, Cell Biol.*, v. 76, p. 682-694, 1998.

LEVITAN, I. B.; KACZMAREK, L. K. Electrical Properties of Neurons. In: *The Neuron: Cell and Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press, p. 43-117, 1997.

LIAO, L. L.; KUPCHAN, S. M.; HORWITZ, S. B. **Mode of action of the antitumor compound bruceantin, an inhibitor of protein synthesis.** *Mol. Pharmacol.*, v. 12, p. 167-176, 1976.

LÓPEZ, J.A.; PÉREZ, J. Etnofarmacología y actividad biológica de *Quassia amara* (Simaroubaceae): Estado de la cuestión. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 7, p. 234-246, 2008.

LOPEZ SAEZ, J.A.; PEREZ SOTO, J. **Etnofarmacología y actividad biológica de *Quassia amara* (Simaroubaceae): Estado de la cuestión.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 7, p. 234-246, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LYTTON, J.; WESTLIN, M.; HANLEY, M. R. **Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps.** J Biol Chem, v. 266, p. 17067-17071, 1991.

MACIEL, M.A.M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Quim Nova, v. 25, p. 429-438, 2002.

MACLENNAN, D. H.; RICE, W. J.; GREEN, N. M. **The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases.** The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 46, p. 28815-28818, 1997.

MAHANEY, J. E.; THOMAS, D. D.; FARRANCE, I. K.; FROELICH, J. P. **Intermolecular Interactions in the Mechanism of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1): Evidence for a Triprotomer.** Biochemistry, v. 47, p. 13711-13725, 2008.

MATSUKAWA, K.; SHIRAI, M.; MURATA, J.; TSUCHIGUCHI, H.; KOMINE, H.; NINOMIYA, I.; SHIMIZU, K. **Sympathetic cholinergic vasodilation of skeletal muscle arteries.** Jpn J Pharmacol, v. 88, p. 14-18, 2002.

MAYER, B. Mecanismos envolvidos nas ações antiúlcera e anti-secretora ácida dos extratos da *Salvia officinalis* L. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MELTZER, W.; HERRMANN-FRANK, A.; LÜTTGAU, H. CH. **The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibers.** Biochimia et Biophysica Acta, v. 1241, p. 59-116, 1995.

MONTGOMERY, K. C. **The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior.** J. Comp. Physiol. Psychol., v. 48, n.4, p. 254-60, 1955.

MURAD, F.; WALDMAN, S.; MOLINA, C.; BENNETT, B.; LEITMAN, D. **Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation.** Prog [Clin Biol Res.](#), v. 1, n. 249, p. 65-76, 1987.

MORTON, J.F. Atlas of medicinal plants of Middle America. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois, p. 389-390, 1981.

MOSS, R. L.; HOFMANN, P. A. **Cellular and molecular basis of muscle contraction.** Fundamental of Medical Cell Biology, v. 5b, p. 185-237, 1992.

NODARI, R. O. ; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, ed. por C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, e P. R. Petrovick, Florianópolis/Porto Alegre: Ed. UFSC/Ed. UFRGS, p. 11-24, 2003.

PARVEEN, S.; DAS, S.; KUNDRA, C. P.; PEREIRA, B. M. J. **A comprehensive evaluation of the reproductive toxicity of *Quassia amara* in male rats.** Reproductive Toxicology, v. 17, p. 45-50, 2003.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. **Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.** J. Neurosci. Methods, v. 14, n. 3, p. 149-67, 1985.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. **O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural.** Vittalle, Rio Grande, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2007.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research - Every progress in methodology is a progress in science. Planta Medica, v.69, n.6, p.491-495, 2003.

POLUNIN, M.; ROBBINS, C. A farmácia natural: Guia de medicamentos naturais. Londres: Dorling Kindersley, 1992.

PROVEN, A.; RODERICK, H. L., CONWAY, S. J.; BERRIDGE M. J.; HORTON; J. K.; CAPPER, S. J.; BOOTMAN M. D. **Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes.** Journal of Cell Science, v.119, n.16, p.3363-3375, 2006.

RAJI, Y.; BOLARINWA, A. **Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats – *in vivo* study.** Life Sciences, v. 61, n. 11, p. 1067-1074, 1997.

RAMCHANDRA, R.; BARRETT, C. J.; MALPAS, S. C. **Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. v. 32, p. 440-446, 2005.

RÍOS, E.; PIZARRO, G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Physiol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 849-908, 1991.

RODGERS, R. J., COLE, J. C. **The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology.** In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, p. 9-44, 1993.

RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; MARQUES, M.M.M.; AGUIAR, L.A.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S. **Atividade antioxidante e gastro-protetora de produtos naturais em animais experimentais.** *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, v. 10, n. 2, p.116-123, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para a identificação de famílias de Fanerógamas nativas e exóticas do Brasil*. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. Células Contráteis. In: *Histologia*. São Paulo: Manole, p. 57-61, 1995.

STÉRU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., SIMON, P. **The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.** *Psychopharmacology (Berl)*, v. 85, p. 367-370, 1985.

TADAHIKO, K.; XIU LIAN, J.; SAYAKA, F.; HIROYUKI, H.; TADAAKI, S.; KAZUO, K.; TAMOTSU, N.; YOSHIHISA, O. **Nematocidal quassinoids and bicyclic phosphorothionates: a possible common mode of action on the GABA receptor.** *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 81, p. 176-187, 2005.

TANAE, M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.; DE LIMA, T.C.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. **Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities.** *Phytomedicine*, v. 14, n.5, p.309-13, 2007.

TESORIERO, D.; MACCAGNANI, B.; SANTI, F.; CELLI, G. **Toxicity of three pesticides on larval instars of *Osmia cornuta*: preliminary results.** *Bulletin of Insectology*, v. 56, n. 1, p. 169-171, 2003.

THASTRUP, O.; CULLEN, P. J.; DROBAK, B. K.; HANLEY, M. R.; DAWSON, A. P. **Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 2466-2470, 1990.

TODA, N.; OKAMURA, T. **The Pharmacology of Nitric Oxide in the Peripheral Nervous System of Blood Vessels.** Pharmacol Rev, v. 55, p. 271–324, 2003.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. DE S.; ANDRADE, F. D. P.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS W.; SOUZA BRITO, A. R. M. **Antiulcerogenic Activity of Four Extracts Obtained from the Bark Wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae).** Biol. Pharm. Bull., v. 25, n. 9, p. 1151-1155, sept. 2002.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. DE S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ANDRADE, F.D.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M. **Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract.** Journal of Ethnopharmacology, v. 85, p. 19-23, 2003.

TORGNARINI, D.P.; MOULDS, R.F.W. **Intracellular Ca^{2+} 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.

TULUC, F.; BREDETEAN, O.; BRAILOIU, E.; MESHKI, J.; GARCIA, A.; DUN, N. J.; KUNAPULI, S. P. **The priming effect of extracellular UTP on human neutrophils: Role of calcium released from thapsigargin-sensitive intracellular store.** Purinergic Signalling, v. 1, p. 359-368, 2005.

TWARDOWSCHY, A. Vias envolvidas no mecanismo de ação do efeito gastroprotetor das cascas de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb (Bignoniaceae). 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós- Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VAN ANDEL, T; WESTERS, P. **Why Surinamese migrants in the Netherlands continue to use medicinal herbs from their home country.** J Ethnopharmacol., v. 127, p. 694-701, 2010.

VERMA, N; TRIPATHI, SK; SAHU, D; DAS, HR; DAS, RH. **Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages.** Mol Cell Biochem., v. 336, n. 1-2, p. 127-135, 2010.

VIEIRA, R.A.. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo). 2001. 82 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VANHOUTTE, P. M. **How we learned to say NO.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 29, p. 1156-1160, 2009.

VANHOUTTE, P. M.; TANG, E. H. C. **Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!** J Physiol, v. 586.22, p. 5295–5304, 2008.

WANG, H; SYROVETS, T; KESS, D. **Targeting NF- κ B with a natural triterpenoid alleviates skin inflammation in a mouse model of psoriasis.** J Immunol, v. 183, p. 4755-4763, 2009.

WRAY, S. **Insights into the uterus.** Exp Physiol, v. 92, n. 4, p. 621-631, 2007.

WRAY, S.; BURDYGA, T. **Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle.** Physiol Rev, v. 90, p. 113-178, 2010.

WEISBROD, R. M.; GRISWOLD, M.C.; YAGHOUBI, M.; KOMALAVILAS, P.; LINCOLN, T. M.; COHEN, R.A. **Evidence that additional mechanisms to cyclic GMP mediate the decrease in intracellular calcium and relaxation of rabbit aortic smooth muscle to nitric oxide.** British J. Pharmacol., v. 125, p. 1695-1707, 1998.

WESTFALL, T. D.; WESTFALL, D. P. **Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens.** J Pharmacol Toxicol Methods, v. 45, p. 109-122, 2001.

XU, A.; HAWKINS, C.; NARAYANANG, N. **Phosphorylation and Activation of the Ca²⁺-pumping ATPase of Cardiac Sarcoplasmic Reticulum by Ca²⁺-Calmodulin-dependent Protein Kinase.** Journal of Biological chemistry, v. 288, n. 12, 1993.