



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

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DO EXTRATO
AQUOSO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA PADRONIZADOS
DE FOLHAS DE *Piper aduncum* L. DE MANAUS, AM.**

MARNYCE LIMA PERES

MANAUS

2012



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

MARNYCE LIMA PERES

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DO EXTRATO
AQUOSO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA PADRONIZADOS
DE FOLHAS DE *Piper aduncum* L. DE MANAUS, AM.**

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

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

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Peres, Marnyce Lima

P437e Estudo da ação cardiovascular do extrato aquoso e da fração butanólica padronizados de folhas de *Piper aduncum* L. de Manaus, AM / Marnyce Lima Peres. - Manaus: UFAM, 2012.
104 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

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

1. *Piper aduncum* – Componentes químicos 2. Fitoquímica 3. *Piper aduncum* – Atividade farmacológica 3. Plantas medicinais I. Lapa, Antonio José (Orient.) II. Tanae, Mirtes Midori (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 582.672 (043.3)

MARNYCE LIMA PERES

**ESTUDO DA AÇÃO CARDIOVASCULAR DO EXTRATO
AQUOSO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA PADRONIZADOS
DE FOLHAS DE *Piper aduncum* L. DE MANAUS, AM.**

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

29 de Junho de 2012

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio José Lapa – UNIFESP/SP
Presidente da Banca

Prof.Dr.Luis Carlos Abech D'Ângelo – UEA/AM
Titular

Prof. Dra.Simone da Silva – CBA/AM
Titular

DEDICATÓRIAS

Ao meu filho Murilo Lima Peres, por me mostrar a magia no mundo, por ter me ensinado uma nova maneira de ver a vida e por consolar meu coração nos momentos difíceis...

Ao meu irmão e amigo Prof. Dr Marcelos Lima Peres, que por ter o dom da sabedoria enfrentou o mundo em busca de um sonho... Você sim é exemplo de vida para mim.

Ao orientador Prof.Dr. Antonio José Lapa por me fazer entender o que estava bom e o que ainda podia ser melhorado, também pela oportunidade do treinamento em ambientes tão variáveis, pela formação de recursos humanos, mas principalmente pela experiência de vida adquirida.

A co-orientadora, Prof. Dra Mirtes Midori Tanae, por sua doação, incentivo, amizade e respeito durante a realização deste trabalho, e principalmente por ter acreditado em mim...

Ao professor Dr Luiz Carlos Abech D'Ângelo, na persistência de tornar o laboratório, um ambiente acadêmico e acreditar em ser este, o menor caminho para o êxito.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter sido meu refúgio e fortaleza, socorro bem presente nas tribulações.

Aos meus pais Alonso Peres e Leonor Peres e aos meus irmãos Mayken, Mayara e Marden, todo meu amor, carinho e admiração.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Biotecnologia da UFAM, Andrezza Miná, Francianny Retroz, Jeffeson Moraes e Márcia Caroline Vilhena por termos compartilhado os conhecimentos adquiridos e os momentos de vitória.

Aos colegas de laboratório Danilo, Geane, Fabíola, Juliana, Karla, Kaori, Maciel, Siglia, Suzana, Tânia, Thaís, Thiago, Tony e Vânia, por toda a colaboração e respeito.

Aos bioteristas Antônio, Celina, Cláudia, Leandro, Rosângela e Stener, por terem o dom do carinho, cuidado e respeito com os animais e mostrarem-se sempre dispostos em colaborar com nossos experimentos.

Aos professores do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, Dr. Afonso Caricatti, Dra. Caden Souccar, Dra. Maria Teresa de Lima e Valderez Bastos, da Universidade Federal de Santa Catarina, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, pelo comprometimento e disponibilidade em transmitir o conhecimento científico.

Ao Professor Dr. Ary Idalgo por ter disponibilizado seu tempo para me auxiliar na coleta e herbarização da *Piper aduncum*.

Ao coordenador da Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM, Dr. Edmar Vaz de Andrade pela responsabilidade e oportunidade para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos colaboradores do Centro de Biotecnologia da Amazônia, em especial ao Dr. Imar Araújo e a toda administração.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Todas as pessoas grandes foram um dia crianças, mas poucas se lembram disso.”

(Saint-Exupéry)

RESUMO

Piper aduncum (Piperaceae), nativa da região Amazônica, é conhecida como pimenta-de-macaco e aperta-ruão. É utilizada popularmente no tratamento de hemorragias, hemorroidas, diarreia, dor de dente e inflamação. Estudos fitoquímicos relatam o isolamento e identificação de mais de 47 compostos de *P. aduncum*, sendo o dilapiol (fenilpropanoide) o principal componente. No entanto, estudos farmacológicos com extratos padronizados ou substâncias isoladas são escassos e não há relatos na literatura científica da padronização química quantitativa dos extratos de *Piper aduncum* estudados. Considerando essas informações, este estudo propõe a investigação científica de extratos padronizados de *P. aduncum* avaliando a farmacodinâmica e os efeitos desses extratos no sistema cardiovascular e na musculatura lisa. Folhas de *P. aduncum* foram coletadas no minicampus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A infusão do pó das folhas secas em água destilada originou o extrato aquoso (EA), que após partição em n-butanol originou a fração butanólica (FBut). EA e FBut foram padronizados em CLAE – UV 260 nm obtendo-se 9 picos principais com TR e amplitudes características no espectro de referência. A FBut foi purificada em CLAE preparativa, resultando 6 frações (F1 a F6). Nos testes biológicos, camundongos tratados com o EA (1 g/kg) por via oral não apresentaram efeitos que os diferenciavam dos animais controle tratados com água. Com a injeção intraperitoneal da FBut (0,2 e 0,5 g/kg), os animais apresentaram leve diminuição da deambulação e sedação nas primeiras 2 h após a injeção da FBut. Em ratos anestesiados, a injeção endovenosa do EA (1, 3 e 10 mg/mL) produziu hipertensão proporcional às doses; este efeito não foi observado com a injeção da FBut. A administração prévia do prazosin (1 mg/kg, e.v) inverteu o efeito do EA para hipotensão, sendo novamente revertido para hipertensão na presença do propranolol. A injeção endovenosa de adrenalina (ADR 0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL) produziu efeito bifásico (hipertensão e hipotensão) na dependência da dose. Com a injeção prévia do prazosin, a ADR e o EA produziram hipotensão, que foi revertida para hipertensão após administração de propranolol. Em átrio direito isolado de rato, EA e FBut aumentaram a frequência de batimentos. Em átrio esquerdo isolado de rato, EA e FBut aumentaram a amplitude de contração; este efeito foi bloqueado pelo propranolol (10^{-6} M), indicando ação inotrópica positiva mediada por receptores β_1 adrenérgicos. A atividade da Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo esquelético de coelho não foi inibida pela FBut. Em ducto deferente de rato (DDR), a FBut inibiu a contração máxima da noradrenalina de 35% sem alterar a CE_{50} , indicando antagonismo do tipo não-competitivo e excluindo uma ação bloqueadora α -adrenérgica. Em DDR pré-contráido com ATP, a FBut inibiu o efeito do ATP nos receptores purinérgicos P_1 . Em DDR estimulado eletricamente, a FBut diminuiu a amplitude das contrações de 60%, sugerindo um bloqueio de canais de cálcio do tipo L da musculatura lisa, ou uma atividade anestésica local nas terminações nervosas simpáticas. Entretanto, o influxo de cálcio através de canais tipo L em culturas de células uterinas e de cardiomiócitos de ratos não foi alterado na presença da FBut. Os resultados mostraram que o EA produz hipertensão por ativação de receptores α_1 -adrenérgicos, hipotensão por ativação de β_2 -adrenoceptores, inotropismo positivo e taquicardia por estimulação de receptores β_1 -adrenérgicos. Esses resultados indicam que o extrato de *P. aduncum* contém adrenalina, ou composto com atividade idêntica, com atividade vasoconstritora capaz de interromper um sangramento, como mencionado no uso popular.

PALAVRAS-CHAVE: *Piper aduncum*, pimenta-de-macaco, sistema cardiovascular, musculatura lisa.

ABSTRACT

Piper aduncum (Piperaceae), native in the Amazonian Region, is known as pimenta-de-macaco and aperta ruão. It is popularly used to treat hemorrhage, hemorrhoids, diarrhea, tooth pain and inflammation. Phytochemical studies relate the isolation and identification of more than 47 compounds from *P. aduncum*; dilapiol (phenylpropanoid) is the main compound. However, pharmacological studies with standardized extracts and isolated compounds are scarce and there are no scientific paper showing a quantitative chemical standardization of *Piper aduncum* extracts. Considering these information, the goal of this project was to investigate the pharmacodynamics and the cardiovascular effects of *P. aduncum* standardized extracts in rodents. Plant leaves were collected at Federal University of Amazonas – UFAM. The infusion of the dried powdered leaves originated the aqueous extract (AE), which after partition in butanol yielded the butanolic fraction (BuF). AE and BuF standardized in HPLC-UV 260 nm showed 9 major peaks with characteristic retention times and peak amplitudes. BuF was purified in preparative HPLC, yielding 6 fractions (F1 to F6). Pharmacological studies showed that mice orally treated with AE (1 g/kg) did not show any different effect comparatively to the control water treated animals; BuF intraperitoneally injected (0.2 and 0.5 g/kg) caused slight sedation and quietness in the first 2 h after treatment. In anesthetized rats, i.v. injection of AE (1, 3 and 10 mg/mL) produced dose related hypertension. Previous treatment with prazosin (1 mg/kg, i.v.) inverted the AE effect to hypotension, which was blocked and reverted again to hypertension after injection of propranolol. In control conditions, adrenaline injection (ADR 0.1, 0.3 and 1.0 µg/mL) produced a biphasic effect (hypertension and hypotension), dependent on the injected dose and AE (1, 3 and 10 mg/mL) produced hypertension. After prazosin treatment, ADR and AE both produced hypotension which was reverted to hypertension after propranolol treatment. In isolated rat left atria, incubation of either AE or BuF increased the contraction force; the effect was blocked by propranolol (10^{-6} M), indicating a positive inotropic effect mediated by β_1 -adrenergic receptors. In rat isolated right atrium, AE and BuF increased the heart rate, but the Ca^{2+} -ATPase enzyme activity *in vitro* was not inhibited by BuF. In rat vas deferens, BuF inhibited noradrenaline maximal contraction by 35%; EC_{50} was not changed, showing a non-competitive antagonistic interaction and excluding a α -adrenergic blockade by the plant extracts. Similarly, in the rat vas deferens pre-contracted with ATP, incubation of BuF inhibited the effect of ATP on purinergic P_1 receptors. In electrically stimulated vas deferens, BuF inhibited the contraction amplitude by 60%, suggesting either a L-type calcium channel blockade or a local anesthetic effect on the sympathetic nerve terminals. On rat uterus cell cultures and cardiomyocytes cells, however, the calcium influx was not changed by BuF incubation. The results show that the AE of *P. aduncum* may produce hypertension by α_1 -adrenergic receptor activation, may produce hypotension by β_2 -adrenoceptor activation and tachycardia plus positive inotropic effect by β_1 -receptor activation. The data indicate that the AE may contain adrenaline, or a compound with the same pharmacological activity, which might produce vasoconstriction to interrupt bleeding, as mentioned in folk use.

Key words: *Piper aduncum*, pimenta-de-macaco, cardiovascular system, smooth muscle.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - <i>Piper aduncum</i> L.....	28
Figura 02 (a) - Substâncias isoladas de <i>Piper aduncum</i> L.....	30
Figura 02 (b) - Substâncias isoladas de <i>Piper aduncum</i> L.....	31
Figura 03 - Área de coleta das folhas de <i>Piper aduncum</i> L.....	44
Figura 04 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de <i>Piper aduncum</i> em CLAE.....	64
Figura 05 - Fluxograma de obtenção do extrato aquoso (EA), fração aquosa (FA), fração butanólica e fracionamento da FBut de <i>Piper aduncum</i> L.....	65
Figura 06 – Perfis cromatográficos das frações purificadas F1 a F6 da FBut de <i>P. aduncum</i> em CLAE.....	66
Figura 07 – Efeito tratamento prévio (1h) de <i>P. aduncum</i> no trânsito intestinal avaliado pela distância percorrida pelo carvão ativado em relação ao comprimento total do intestino do camundongo.....	68
Figura 08 – Curvas concentração-efeito de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-3} M) em jejuno de rato na ausência e na presença da FBut de <i>Piper aduncum</i>	69
Figura 09 – Registro da motilidade de jejuno de rato na ausência e na presença da FBut de <i>Piper aduncum</i>	70
Figura 010 - Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) em ducto deferente de rato na ausência e na presença da FBut de <i>Piper aduncum</i>	71
Tabela 01 - Efeito máximo e concentração efetiva média (CE_{50}) obtidos de curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) na ausência e na presença da FBut de <i>Piper aduncum</i> L. nas concentrações indicadas.....	71
Figura 11 - Registro das contrações do ducto deferente de rato produzidas pela adição cumulativa e pela estimulação elétrica transmural na ausência e na presença da FBut de <i>Piper aduncum</i> . Experiência típica.....	72
Figura 12 - (A) Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) na porção prostática de ducto deferente de rato na ausência e na presença da FBut ou F1 de <i>Piper aduncum</i>	72
Figura 13 – (A) Efeito da FBut de <i>Piper aduncum</i> (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) e das (B) frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na contração do ducto deferente de rato estimulado eletricamente.....	73

Figura 14 - Efeito da FBut de <i>Piper aduncum</i> (30, 100 e 300 µg/mL) na contração do ducto deferente de rato induzida por ATP (1mM).....	74
Figura 15 - Efeito pressórico do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> (1, 3 e 10 mg/kg e.v) em ratos normotensos anestesiados.....	75
Figura 16 – Efeito pressórico da noradrenalina (Nor) e do extrato aquoso (EA) de <i>P. aduncum</i> (10mg/kg, e.v) antes e depois da injeção do prazosin e do propranolol em ratos normotensos anestesiados.....	76
Figura 17 – Efeito pressórico do extrato aquoso (EA) de <i>Piper aduncum</i> (3,0 mg/kg, e.v) na ausência e na presença do prazosin e/ou propranolol em ratos normotensos anestesiados.....	77
Figura 18 – (A) Efeito do EA (10, 30, 100 e 300 µg/mL) e da (A) FBut (10, 30 e 100µg/mL) de <i>P. aduncum</i> na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato.....	78
Figura 19 – Contração do átrio esquerdo de rato ao estímulo elétrico (1Hz, 2ms). (A) Efeito do EA (10, 30, 100 e 300 µg/mL). (B) Efeito do EA (300 µg/mL) em condição controle e na presença do propranolol (10 ⁻⁶)M. (C) Efeito da FBut (10, 30, 100 e 300 µg/mL).....	79
Figura 20 – Atividade da Ca ²⁺ obtida de músculo esquelético de coelho. (A) Controle positivo com tapsiargina, bloqueador específico da SERCA. (B) Efeito da FBut de <i>P. aduncum</i> na atividade da Ca ²⁺ ATPase.....	80
Figura 21 – Efeito da FBut ((10, 30 e 100 µg/mL) de <i>P. aduncum</i> na concentração de cálcio citosólico livre em células de útero mantidas em cultura (A) e em cultura de cardiomiócitos (B).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
ADR	- Adrenalina
ANOVA	- Análise de variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMPc	- Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	- Trifosfato de adenosina
BPM	- Batimentos por minuto
CBA	- Centro de Biotecnologia da Amazônia
CEP	- Comitê de Ética em Pesquisa
[Ca ²⁺]	- Concentração intracelular de Ca ²⁺
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência analítica
CLAE-Prep	- Cromatografia líquida de alta eficiência Preparativa
DAG	- Diacilglicerol
DC	- Débito cardíaco
DDR	- Ducto deferente de rato
D-MEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
d-TC	- d-tubocurarina
EA	- Extrato aquoso
CE ₅₀	- Concentração efetiva 50%
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- Ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol-tetraacético
E _{max}	- Efeito máximo
FA	- Fração aquosa
FBut	- Fração butanólica
FC	- Frequência cardíaca
F1	- Fração 1
F2	- Fração 2
F3	- Fração 3
F4	- Fração 4
F5	- Fração 5

F6	- Fração 6
FLIPR	- Fluorescent imaging plate reader
GMPC	- Monofosfato cíclico de 3', 5' guanosina
GTP	- Trifosfato de guanosina
HBSS	- Solução salina balanceada de Hank
Hz	- Hertz
IP ₃	- Trifosfato de inositol
i.p	- Intraperitoneal
LC	- Limite de confiança
LNV	- Líquido nutritivo de vesícula
MOPS	- Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NA	- Noradrenalina
NO	- Óxido nítrico
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PA	- Pressão arterial
PBS	- Tampão fosfato salino
PLC	- Fosfolipase C
PKA	- Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	- Proteína quinase dependente de cálcio
PKG	- Proteína quinase dependente de GMPC
PROP	- Propranolol
PRZ	- Prazosin
RP	- Resistência periférica
RS	- Reticulo sarcoplasmático
RyR	- Receptor de rianodina
SERCA	- Ca ²⁺ -ATPase do retículo sarcoplasmático
UNIFESP	- Universidade Federal de São Paulo
VDCC	- Canais de cálcio dependentes de voltagem
TRPC	- "Transient receptor potential channel"
v.o	- Via oral

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE ABREVEATURAS	11
SUMÁRIO	13
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1 A espécie <i>Piper aduncum</i> L.	28
3.2 Os componentes químicos da espécie	29
3.3 As atividades biológicas de extratos de <i>Piper aduncum</i> L.	32
3.4 A neurotransmissão simpática e a musculatura lisa do ducto de rato (DDR)	34
3.4.1 Mecanismos de contração do músculo liso.....	35
3.4.2 Simpatomiméticos e Simpatolíticos.....	37
3.4.2.1 Os simpatomiméticos.....	37
3.4.2.2 Os simpatolíticos.....	39
4 MATERIAL	43

4.1 Material botânico.....	44
4.2 Material biológico.....	45
4.3 Material químico.....	45
4.3.1 Fármacos, reagentes e solventes.....	45
4.3.2 Composição das soluções.....	46
5 MÉTODOS.....	48
5.1 Métodos fitoquímicos.....	49
5.1.1 Preparação do extrato aquoso das folhas de <i>P. aduncum</i> (infuso 2,5%).....	49
5.1.2 Preparação da fração butanólica (FBut).....	49
5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica).....	49
5.1.4 Purificação da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep).....	50
5.2 Atividade farmacológica.....	51
5.2.1. Triagem farmacologica geral – Teste hipocrático.....	51
5.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> em músculo liso.....	52
5.2.2.1 Trânsito intestinal.....	52
5.2.2.2 Jejuno de rato	52
5.2.2.3 Ducto deferente de rato (DDR)	53
5.2.2.4 Ducto deferente de rato (DDR) estimulado eletricamente.....	53
5.2.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> no músculo cardíaco.....	55

5.2.3.1 Registro da pressão arterial em ratos anestesiados.....	55
5.2.3.2 Efeito na frequência de batimentos em átrio direito isolado de rato.....	55
5.2.3.3 Efeito na força de contração em átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente.....	56
5.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na atividade da Ca ²⁺ -ATPase (SERCA 1).....	57
5.2.4.1 Isolamento da Ca ²⁺ -ATPase.....	57
5.2.4.2 Medida da atividade da Ca ²⁺ -ATPase.....	58
5.2.4.3 Determinação do teor de proteína.....	59
5.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na medida do cálcio citosólico livre em culturas primárias de células de útero e cardiomiócitos.....	59
5.2.5.1 Cultura de músculo cardíaco de rato.....	59
5.2.5.2 Cultura de útero de rato.....	60
5.2.5.3 Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria.....	61
5.3 Análises estatísticas.....	61
6 RESULTADOS.....	62
6.1 Métodos Fitoquímicos.....	63
6.1.1 Extrato aquoso (EA).....	63
6.1.2 Fração butanólica (FBut).....	63
6.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE-analítica).....	63
6.1.4 Purificação da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep).....	65
6.1.5 Perfil cromatográfico das frações purificadas F1 a F6 da FBut de <i>P. aduncum</i> em cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE-analítica).....	66

6.2.1 Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1968; MALONE; ROBICHAUD, 1962).....	67
6.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> no músculo liso.....	68
6.2.2.1 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> no trânsito intestinal.....	68
6.2.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P.aduncum</i> no jejuno de rato.....	69
6.2.2.3 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na motilidade de jejuno isolado de rato.....	70
6.2.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P.aduncum</i> no ducto deferente de rato.....	71
6.2.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P.aduncum</i> nas contrações tônicas induzidas por noradrenalina e nas contrações obtidas por estímulo elétrico do ducto deferente de rato.....	72
6.2.2.6 Efeito da fração butanólica (FBut) e das frações (F1 A F6) de <i>P.aduncum</i> nas contrações obtidas pelo estímulo elétrico em ducto deferente de rato (DDR).....	73
6.2.2.7 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P.aduncum</i> na contração induzida por ATP exógeno na porção prostática do ducto deferente de rato.....	74
6.2.3 Efeito no músculo cardíaco.....	75
6.2.3.1 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na pressão arterial em ratos anestesiados.....	75
6.2.3.2 Efeito do prazosin (bloqueador α -1adrenérgico) e do propranolol (bloqueador β -adrenérgico) no efeito do extrato aquoso (EA) de <i>P.duncum</i> na pressão arterial de ratos anestesiados.....	76
6.2.3.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> em átrio direito de rato.....	78
6.2.3.4 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de <i>P.aduncum</i> em átrio esquerdo de rato.....	79
6.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na atividade da Ca^{2+} -ATPase	80

(SERCA) de músculo esquelético.

6.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de <i>P. aduncum</i> na concentração de cálcio citosólico livre em culturas primárias de útero e cardiomiócitos de rato.....	81
7. DISCUSSÃO.....	82
8. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	90
REFERÊNCIAS.....	94

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Há registros sobre o emprego de plantas medicinais na civilização egípcia e nos escritos de filósofos gregos. Na idade média, os monges beneditinos já cultivavam plantas medicinais nos jardins dos mosteiros (MEZ-MANGOLD, 1971).

Ainda hoje, as plantas medicinais são usadas como forma alternativa ou complementar aos medicamentos da medicina tradicional. Elas são amplamente comercializadas em farmácias, mercados populares e encontradas em quintais residenciais, por razões sociais ou econômicas devido ao difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que aproximadamente 70% a 95% da população dos países em desenvolvimento da Ásia, África, América Latina e Oriente Médio, dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WHO, 2011).

Dessa forma, usuários de plantas medicinais mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo diversas áreas da pesquisa de fitoterápicos, enriquecendo o conhecimento da flora medicinal mundial. Estima-se que cerca de 25% das drogas comercializadas atualmente foram direta ou indiretamente originadas de fontes botânicas (QUEZADA *et al*, 2005).

Devido ao grande uso de produtos de origem vegetal na medicina popular, tornou-se imprescindível a investigação científica sob o ponto de vista químico-farmacológico nesta área, a fim de que se possa comprovar a potencialidade medicinal destas plantas.

Porém, o uso tradicional, folclórico e mesmo o conhecimento popular de inúmeras espécies vegetais não são suficientes para validar eticamente o uso das plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. O uso de plantas ou ervas medicinais deve ser feito com muito critério, haja vista que as mesmas possuem mais de um princípio ativo e podem levar à intoxicação daqueles indivíduos que desconhecem os efeitos indesejáveis por elas causados.

Os estudos farmacológicos e toxicológicos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos.

Desta forma, pesquisadores foram conduzidos a buscar substâncias naturais com possíveis propriedades terapêuticas para realização de estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos que, criteriosamente, favoreçam com maior probabilidade, a descoberta de novas substâncias bioativas, e assim, validá-las cientificamente.

Nos últimos 10 anos, o desenvolvimento de novos medicamentos com as técnicas usuais de triagem farmacológica de muitos produtos sintéticos, não tem dado os resultados esperados (SAMS-DODD, 2005). A diminuição do número de novos compostos promissores é preocupante em todas as áreas, daí a necessidade de se padronizar os extratos aquosos (chás) usualmente utilizados na medicina popular, o que facilitaria o estudo da atividade farmacológica e a obtenção dos compostos ativos (purificação).

Recentemente, TANAE *et al*, (2007) descreveram um método rápido e eficiente para padronização de extratos polares por HPLC, baseando-se na preservação da mistura de compostos de polaridades distintas extraídas no chá (infusão), favorecendo a obtenção dos compostos ativos (purificação bio-orientada). Os estudos com o extrato padronizado foram planejados para a detecção experimental de um grande espectro de ação farmacológica, desde testes gerais *in vivo* por administração oral dos extratos, até o estudo das frações purificadas em preparações isoladas e em enzimas.

A *Piper aduncum* L., uma planta conhecida popularmente como “pimenta de macaco”, é amplamente utilizada na medicina popular para tratar inflamações e dores de estômago (LUSTOSA *et al*, 2007). Pertence à família Piperaceae, considerada a mais importante da ordem das Piperales.

A família Piperaceae pertence à superordem Nymphaeiflorae, ordem Piperales e possui cerca de 2500 espécies distribuídas em cinco gêneros, de distribuição tropical e subtropical, com hábitos predominantemente herbáceos e centro de diversidade localizado nas Américas Central e do Sul (DAHLGREN, 1980, MEDEIROS, 2007; JARAMILLO; MANOS, 2001; YUNCKER, 1958).

O Brasil possui uma grande diversidade de Piperaceae, com mais de 500 espécies, concentradas principalmente nas Florestas Amazônica e Atlântica, distribuídas nos gêneros *Piper*, *Peperomia* e *Manekia* (ARIAS *et al*, 2006; JARAMILLO; MANOS 2001; YUNCKER 1972).

O gênero *Piper* é um dos maiores da família, com cerca de 260 espécies, concentradas principalmente na Floresta Amazônica, que abriga aproximadamente 140 espécies (JARAMILLO; MANOS, 2001; MAIA *et al*, 1998).

O nome latino *Piper* é originário da palavra grega “peperi” que por sua vez deriva do árabe “barbary” significando pimenta do reino (GUIMARÃES, 1978). A espécie mais popular e largamente usada como condimento é a *P. nigrum*, porém, muitas outras espécies possuem atividades farmacológica, inseticida, ou outros usos de interesse econômico (AGRA *et al*, 2007; AMORIM *et al*, 2007; BRANDÃO *et al*, 2006; 2008).

A maioria das espécies desse gênero tem uso na medicina tradicional desde tempos antigos, e além de despertar o interesse químico por vários tipos de componentes secundários (SENGUPTA; RAY, 1987) vem sendo um estímulo para a pesquisa farmacológica. São

atribuídas às espécies de *Piper* propriedades medicinais como antimicrobiana, cicatrizante, analgésica, anti-hemorrágica, adstringente, entre outras (para revisão ver KOKOSKA *et al*, 2005).

Estudos fitoquímicos mostraram que o gênero *Piper* possui neolignananas, alcaloides, lignanas, lactonas, chalconas, fenilpropanoides monolignoides (apiol, miristicina, eugenol, safrol, dímeros de fenilpropanoides e dilapiol), amidas, flavonoides, cromanas e óleos essenciais (AHMAD; TAWAN, 2002; BENEVIDES *et al*, 1999; FAZOLIN *et al*, 2005; LUSTOSA *et al*, 2007; MA *et al*, 2004; SENGUPTA; RAY, 1987;).

Várias espécies de *Piper* apresentam componentes químicos de interesse farmacológico, podendo ser citadas: atividades antitumoral de algumas amidas e hipotensora de *Piper tuberculatum* Jacq. atividade inseticida de piperona de *Piper futokadzura* Sieb., de amidas de *Piper nigrum*, além de alcaloides e amidas de *Piper longum* (PARK *et al*, 2002; SIMÕES *et al*, 2000; SUNG-EUN LEE, 2000; YANG *et al*, 2002). Atividade simpaticomimética direta de catecolaminas de *P.marginatum* Jacq. (D'ÂNGELO *et al*, 1994) e atividade contra *Leishmania amazonensis* de chalconas isoladas de *Piper aduncum* (TORRES-SANTOS *et al*, 1999).

As espécies *Piper sarmentosum* e *Piper hispidum* apresentaram efeito antimalárico (JENETT-SIEMS *et al*, 1999; NAJIB NIK A RAHMAN *et al*, 1999).

Existem poucos trabalhos demonstrando a atividade farmacológica da espécie *P.aduncum*. A maioria dos estudos enfoca as atividades antimicrobiana, repelente e o efeito larvicida do óleo volátil juntamente com diferentes extratos preparados a partir de diversas espécies de *Piper*. Estudos fitoquímicos da *P.aduncum* relatam o isolamento de mais de 47 substâncias, enquanto que os estudos detalhando seus efeitos farmacológicos são escassos, fazendo-se necessária uma maior investigação científica para se validar o uso popular da planta.

A *Piper aduncum* L. (*Arthante adunca* Miq.), é conhecida popularmente na Amazônia e na Mata Atlântica como pimenta de macaco e aperta-ruão, respectivamente. Porém, apresenta outras sinonímias populares como erva de jaboti, jaborandi-do-mato, matico-falso, pimenta de fruto-ganchoso, pimenta longa, tapa buraco, falso-jaborandi e aduncum (COIMBRA, 1958; CORREA, 1984; LORENZI, 2002). É utilizada na medicina popular de diversos países como adstringente, estimulante digestivo, diurético, antimalárico, sedativo, laxante, bebida refrescante e no tratamento de hemorroidas, gonorreia, leucorreia, hemorragias menstruais, diarreia, disenterias e dor de dente. Outros pesquisadores relataram o uso da espécie contra dor de estômago e também como repelente de insetos (para revisão ver POHLIT *et al*, 2006). O chá feito das folhas e raízes é utilizado para tratar diarreia, disenteria, náuseas, úlceras, infecções genito-urinárias e também é usada tradicionalmente para o controle do sangramento, como anti-hemorrágico (BENNETT *et al*, 2002; FRANCIS, 2003; POHLIT *et al*, 2006). Também Orjala *et al*. (1993a) relataram seu uso tradicional como antisséptico para cortes na pele e Jantan *et al* (2005) descreveram seu uso como hemostático ("para-sangramento").

Essa planta é considerada uma espécie passível de cultivo e de grande importância para o desenvolvimento da Amazônia por suas propriedades medicinais e por ser uma fonte sustentável de matérias-primas químicas para o aproveitamento industrial.

Com base nestas informações populares, foi proposto estudar as atividades responsáveis pelos efeitos hemostáticos, os efeitos na musculatura lisa (laxante ou antidiarreico) e os efeitos na preparação neuromuscular esquelética (atividade anestésica local).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar os efeitos farmacológicos da *Piper aduncum* L. no sistema cardiovascular e na musculatura lisa não vascular de ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar e padronizar o extrato aquoso (EA) de *P. aduncum* e sua fração butanólica (FBut) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Avaliar a ação do EA e da FBut na musculatura cardíaca, na pressão arterial e na musculatura lisa não-vascular;
- Avaliar a ação das frações purificadas da FBut na musculatura lisa não vascular;
- Avaliar a ação da FBut no trânsito intestinal;
- Avaliar a ação da fração butanólica (FBut) no influxo e na mobilização de íons cálcio em culturas primárias de útero e cardiomiócitos de rato .

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie *Piper aduncum* L.

Piper aduncum L. (Figura 1) é encontrada em regiões de clima quente das Américas tropicais. Trata-se de um arbusto que chega a atingir 2 metros de altura com folhas simples, inteiras, cartáceas, opacas em ambas as faces, ásperas na página superior, com a inferior finamente pubescente, de 10 a 17 cm de comprimento. Possui flores pequenas e discretas, reunidas em espigas alongadas, densas e curvas de 7 a 14 cm de comprimento. Multiplica-se por sementes (CORREA, 1984; LORENZI, 2002).



Figura 01 - *Piper aduncum*

Fonte: <http://laflor.ifas.ufl.edu/Weeds%20of%20CR/cd/MALEZAS/FLORES/Piper-aduncum.jpg>

No Brasil, a *Piper aduncum* L. é encontrada na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica, onde habitualmente prefere as clareiras e margens ensombradas dessas matas úmidas. Entretanto, na Amazônia esta espécie também é considerada oportunista invadindo áreas desflorestadas, crescendo rapidamente em solo areno-argiloso e com alta radiação solar; apresenta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas (ALMEIDA *et al*, 2009; SOUSA *et al*, 2008).

3.2 Os componentes químicos da espécie

Das folhas de *P. aduncum* foram isolados cromenos (8-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila; 2,2-dimetil-2H-cromeno-6-carboxilato de metila; 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno-6-carboxilato de metila e ácido 2,2-dimetil-2H-1-cromeno-6-carboxílico), derivados do ácido benzoico (ácido 3-(3-7-dimetil-2-6-octadienil)-4-metoxibenzoico, aduncumeno e 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) benzoato de metila, di-hidrochalconas (2,6-dihidroxi-4-metoxi-di-hidrochalcona, 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-di-hidrochalcona e piperaduncina B), flavonoides (genkwanina-8-C-D-glucopiranosídeo e genkwanina-8-C-D-manopiranosil-(16)-D-glucopiranosídeo); fenilpropanoide (dilapiol); derivados do ácido p-hidroxibenzoico; monoterpenos (aductinas A–E); aduncamida (ALMEIDA *et al*, 2009; BALDOQUI *et al*, 1999; MORANDIM, 2004, ORJALA *et al*, 1993, 1993 a,b) (Figura 2a,b).

O perfil químico do óleo essencial de *P. aduncum* tem sido amplamente estudado e perfis distintos têm sido descritos em diferentes partes do mundo. Interpretações botânicas errôneas e tempos de coleta variados levam a algum grau de polimorfismo químico. O perfil de amostras da Bolívia tem como principal constituinte o 1,8-cineol, enquanto no Panamá a espécie é rica em sesquiterpenos (cariofileno e aromadendreno). O quimiotipo frequentemente

encontrado nas Américas, Sudeste Asiático e Oceania tem como constituinte predominante o dilapiol, mais registrado em espécies da Amazônia (ARZE *et al.*, 2008; BIN JANTAN *et al.*, 1994; DE MORAIS *et al.*, 2007; GOTTLIEB *et al.*, 1981; KASSIM; SMITH, 1979; PINO *et al.*, 2004; RALI *et al.*, 2007; VILA *et al.*, 2005).

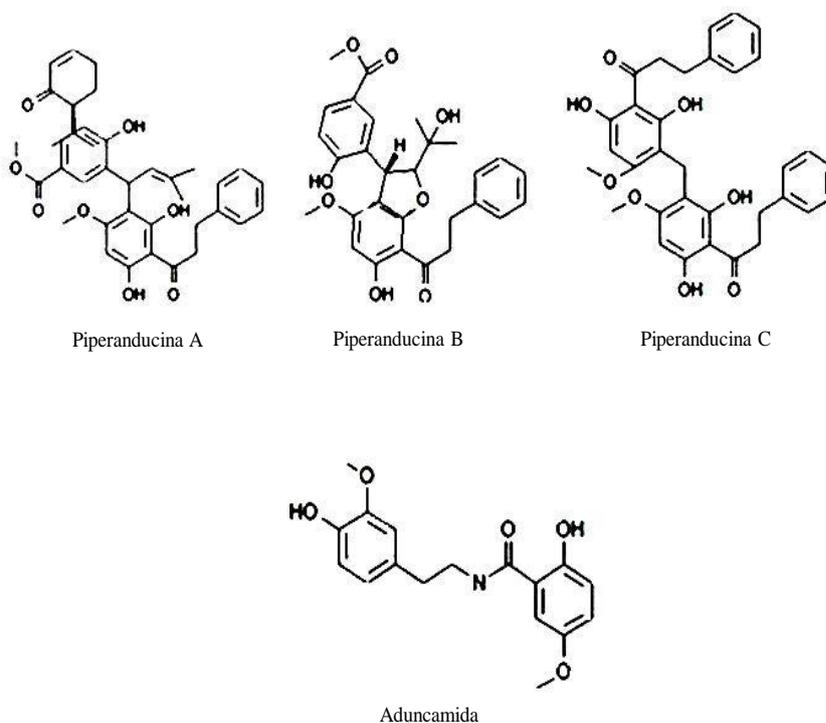


Figura 02 a- Substâncias isoladas de *Piper aduncum* L.

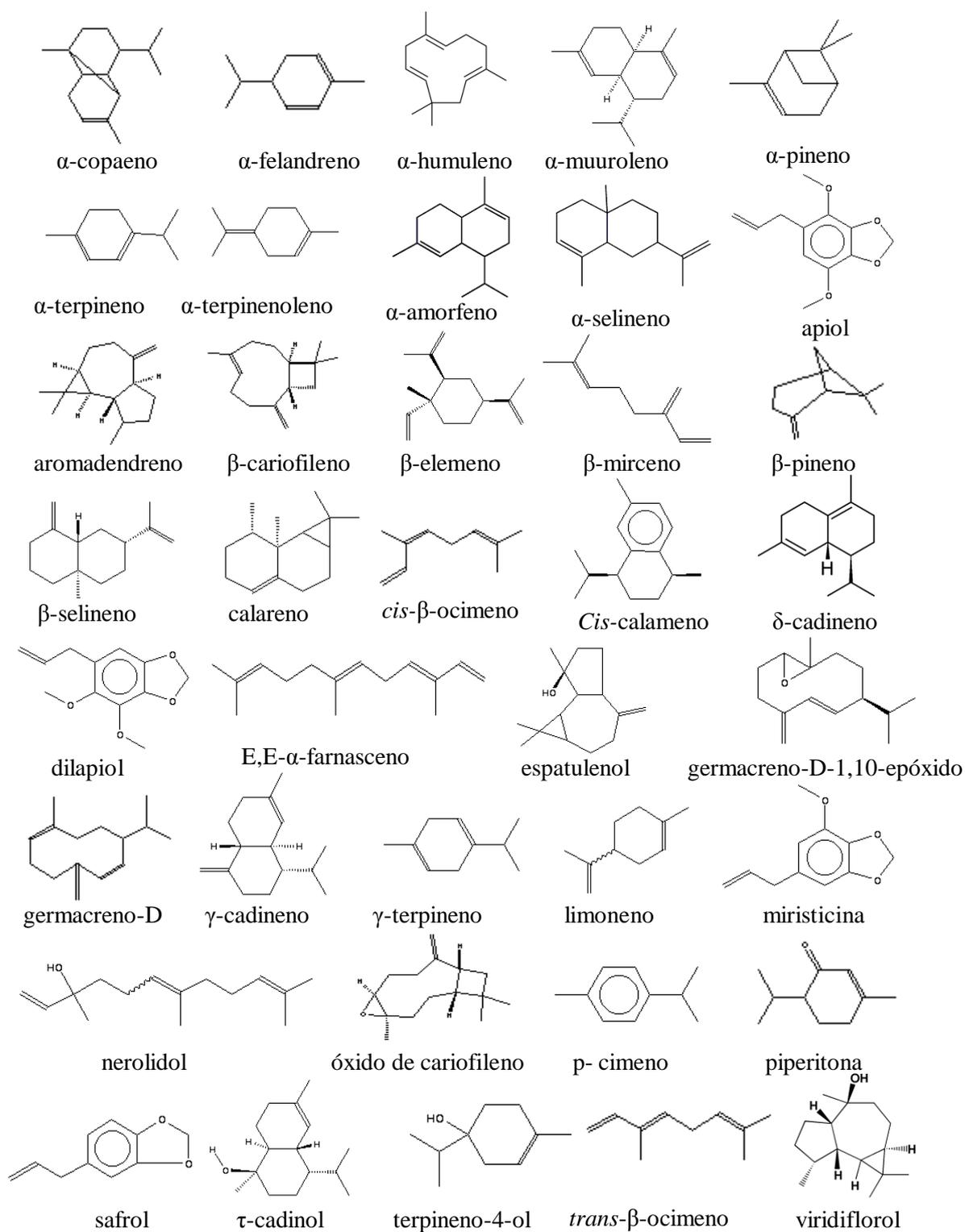


Figura 02b- Substâncias isoladas de *Piper aduncum* L.

3.3 As atividades biológicas de extratos de *Piper aduncum* L.

A revisão da literatura indicou poucos estudos farmacológicos em ratos e baixa toxicidade dos extratos de *P. aduncum*. A maioria dos trabalhos mostram ações antimicrobianas, moluscicida, antiprotozoária e inseticida *in vitro*.

Camundongos tratados com óleo obtido das partes aéreas de *P. aduncum* apresentaram toxicidade variável com DL₅₀ de 2.400 ± 191,7 mg/kg, o que classificaria o óleo de *P. aduncum* como xenobiótico de baixa toxicidade, de acordo com a Organização da Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2001). O tratamento sub-agudo de ratos com doses repetidas do óleo de *Piper aduncum* (30 dias, com doses de 120 e 240 mg/kg/dia, v.o.) produziu alterações mínimas no hematológico e bioquímica plasmática indicando a segurança de uso nas doses utilizadas (SOUSA *et al*, 2008).

A atividade antinociceptiva avaliada com o teste de contorções induzidas por ácido acético em camundongos tratados com óleo essencial das partes aéreas (100 mg/kg, v.o.) não foi comprovada. Da mesma forma, os testes da atividade mutagênica não indicaram genotoxicidade do óleo (GUERRINI *et al*, 2009).

O óleo volátil obtido dos frutos mostrou ação antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* com MIC (concentração inibitória mínima) de 10 µg (NAVICKIENE *et al*, 2006).

Atividade bactericida foi demonstrada com a piperaduncina (PARMAR *et al*, 1997), com o extrato etanólico contra *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium intracellulare* (OKUNADE *et al*, 1997) e com a aduncamida contra o *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (ORJALA *et al*, 1993).

Cromenos isolados das folhas de *P. aduncum* apresentaram atividade tripanossomicida contra epimastigotas de *Trypanossoma cruzi* (BATISTA JR *et al*, 2008; ORJALA *et al*, 1993).

Os derivados prenilados do ácido benzoico (metil 3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoato; 4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-ácido benzoico (ácido nervogênico); benzoato de metil 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) e o dilapiol isolados das folhas de *P. aduncum* apresentaram ação moluscicida (ORJALA *et al*, 1993 e 1993a).

Valadeau *et al*. (2009) demonstraram pela primeira vez, a atividade antiplasmódio *in vitro* do óleo essencial de folhas de *P. aduncum*. Substâncias com atividades antiprotozoária isoladas de outras espécies de Piper como chalconas, amidas e derivados prenilados de ácido aromático, apresentaram também atividade antiplasmódio (FLORES *et al*, 2008; PORTET *et al*, 2007; RUKACHAISIRIKUL *et al*, 2002, 2004).

O extrato aquoso das folhas apresentou atividade inseticida para larvas de segundo instar de *Aedes atropalpus* e contra *Sitophilus zeamais* (BERNARD *et al*, 1995; ESTRELA *et al*, 2006). O dilapiol, a miristicina, o apiol e compostos terpênicos como a piperitona também demonstraram este efeito (ALMEIDA *et al*, 2009; VIDAL *et al*, 2008). O dilapiol, foi tóxico ainda contra larvas e pupas de *Anopheles darlingi*, diminuindo sua sobrevivência e reprodução, e contra *Aedes aegypti* (RAFAEL *et al*, 2008). Também mostrou atividade larvicida e inseticida contra *Anopheles marajoara* e *Aedes aegypti* com 100% de mortalidade das larvas após 48 h de exposição, na concentração de 100 ppm (ALMEIDA *et al*, 2009).

A 2',6'-di-hidroxi-4'-metoxichalcona (DMC), isolada da inflorescência de *P. aduncum*, diminuiu *in vitro* a viabilidade de promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Este efeito não afetou a resposta proliferativa dos linfonodos ou sua viabilidade, demonstrando que o DMC é seletivamente tóxico aos parasitas, mas não às células de mamíferos (TORRES-SANTOS *et al*, 1999 a,b).

3.4 A Neurotransmissão simpática e musculatura lisa do ducto deferente de rato (DDR)

O sistema nervoso simpático controla múltiplas funções fisiológicas por meio de mecanismos pré e pós-sinápticos envolvendo alvos farmacológicos protéicos como receptores, canais iônicos, transportadores e enzimas.

As disfunções simpáticas pré e pós-sinápticas na fisiopatogenia da hipertensão arterial mostradas em estudos experimentais e clínicos contribuíram para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e estudos da fisiofarmacologia da transmissão autonômica em tecidos ricos em inervação simpática.

O ducto deferente (DDR) tem sido utilizado como modelo para estudo de diferentes aspectos da neurotransmissão simpática, desde a co-transmissão adrenérgica envolvendo a liberação conjunta de noradrenalina, de ATP e de neuropeptídeo Y, à neuromodulação pré e pós-juncional (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2010; WANIGASEKARA *et al*, 2003; MAJCEN *et al*, 1984).

No DDR de mamíferos chama a atenção a exuberante inervação simpática. O ducto deferente é densamente innervado por fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares do nervo hipogástrico, juntamente com algumas fibras nervosas colinérgicas (FERRY, 1967; HUKOVIC, 1961). Essas características fazem do DDR uma preparação não-vascular importante para o estudo de substâncias com atividade simpatomimética que interferem diretamente com a contração do músculo liso (LAPA *et al*, 2008).

A distribuição assimétrica da inervação autonômica do DDR tem importantes implicações na neurotransmissão, visto que a estimulação elétrica transmural dos terminais nervosos simpáticos produz respostas contráteis com perfil distinto na porção prostática e

epididimal, onde predominam as inervações purinérgica e adrenérgica, respectivamente (SNEDDON; MACHALY, 1992).

3.4.1 Mecanismos de contração do músculo liso

O músculo liso é encontrado principalmente nas paredes dos órgãos ocos (vasos, bexiga e útero) e tubos (ureteres e bronquíolos), onde sua contração muda a forma do órgão. O músculo liso vascular é o principal responsável pelo tônus basal do sistema cardiovascular e importante para a manutenção da homeostase. Alterações dessa musculatura estão ligadas a diversas doenças, tais como hipertensão arterial, infarto do miocárdio, asma e acidentes vasculares cerebrais. Portanto, o estudo do mecanismo de acoplamento excitação-contração no músculo liso é fundamental para a compreensão e o tratamento de doenças desse sistema (PAIVA; FARIAS, 2005).

No músculo liso, a transmissão do sinal originado na membrana plasmática para promover a contração, é feita através de acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico, ambos levando ao aumento do cálcio intracelular. O primeiro é devido à despolarização da membrana, ativando canais de cálcio voltagem-dependentes (do tipo L); e o segundo resulta da interação de agonistas como noradrenalina, endotelina-1 e angiotensina-II com proteínas receptoras localizadas na membrana da célula, ligadas à proteína G (WYNNE *et al*, 2010; VOROTNIKOV *et al*, 2002; COLLIER *et al*, 2000).

A ativação desses receptores ativa a fosfolipase C liberando o inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ libera cálcio do retículo sarcoplasmático e o DAG causa a ativação da proteína quinase C (PKC), aumentando a condutância dos canais de cálcio transmembranais. O cálcio intracelular, ao ligar-se à calmodulina, altera a sua conformação, permitindo sua interação com a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), deslocando a

sequência autoinibitória da MLCK que fosforila a cadeia leve regulatória da miosina (RLC). Esta fosforilação da RLC determina que os sítios de alta afinidade para actina, presentes na cabeça da miosina, fiquem disponíveis para interação (PAIVA; FARIAS, 2005; PFITZER, 2001; DILLON, 1981).

A exposição dos sítios ativos promove a ligação da miosina com a actina, seguida pela mudança do ângulo de orientação do complexo actomiosina, o que promove o deslizamento de um filamento sobre o outro produzindo a formação de pontes cruzadas. O desenvolvimento da tensão do músculo depende da ativação da miosina pela fosforilação direta e da ativação da actina, pela saída do complexo tropomiosina/ caldesmon, induzida pela cálcio/calmodulina (BERRIDGE, 2004; BERRIDGE *et al*, 2003).

A energia gasta nesse processo vem do ATP liberado pela miosina ATPase após sua interação com a actina. A quantidade de tensão gerada é diretamente proporcional ao número de pontes cruzadas formadas, que por sua vez, é proporcional à concentração intracelular de cálcio. Quando a concentração intracelular de cálcio diminui, a RLC é desfosforilada pela MLCK. No estado desfosforilado, a miosina ainda pode interagir com a actina, mas as uniões são chamadas pontes trancadas (*latch-bridges*) e não pontes cruzadas (*cross-bridges*). As contrações do músculo liso são do tipo tônicas, desenvolvendo-se lentamente e mantendo um tônus constante, com pouco consumo de ATP (MURPHY, 2000; HARTSHORNE *et al*, 1999; LUKAS, 1998).

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

3.4.2 Simpatomiméticos e simpatolíticos

3.4.2.1 Os simpatomiméticos

O sistema nervoso simpático é um sistema de gasto de energia e sua função geral é a adaptação do organismo para as atividades corpóreas, pois o estímulo deste sistema conduz a uma resposta de luta ou fuga, em situações de alerta física ou psíquico-emocional, caracterizada por um aumento da frequência cardíaca, da pressão arterial e da respiração, assim como, do aumento do fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos e midríase.

Os simpatomiméticos são considerados bases fracas que imitam os efeitos dos hormônios fisiológicos adrenalina e noradrenalina, que por sua vez são também conhecidas como aminas simpaticomiméticas ou catecolaminas endógenas (FERREIRA, 1999; MALAMED, 1997).

A ativação do fluxo simpático, em situações de alerta físico ou psíquico emocional, também causa secreção das catecolaminas endógenas pela medula supra-renal (SILBERNAGL, 2003).

Os simpatomiméticos contraem a maioria das arteríolas e veias, podendo ser utilizados localmente para reduzir hemorragias, descongestionar mucosas, diminuir a difusão de drogas tais como anestésicos locais, e reduzir a formação de humor aquoso para diminuir a pressão intra-ocular no glaucoma (BRODY, 2006; COSTANZO, 2007).

O efeito vasoconstritor da adrenalina foi observado pelos fisiologistas no início do século XX. Em 1909, Dale e Dixon injetaram extrato de carne putrificada, onde existem catecolaminas, em animais experimentais e observaram um aumento da pressão arterial. O uso da adrenalina no choque foi relatado na primeira guerra mundial, mas a falta de monitorização adequada da pressão arterial impediu uma avaliação fidedigna de seu efeito.

No final de 1940, os clínicos começaram a administrar adrenalina e noradrenalina em humanos e relataram os potentes efeitos cardiovasculares (FILHO, 2001).

Ao longo da última metade do século passado, ficou claro que as ações da noradrenalina (Nor) e adrenalina (Ad) são mediadas por múltiplos subtipos de receptores adrenérgicos, cada um codificado por genes distintos, agrupados em quatro famílias (α_1 , α_2 , β_1 , β_2). Os receptores adrenérgicos são encontrados na maioria dos tecidos do corpo. A ativação dos receptores α por uma droga simpaticomimética produz uma resposta que inclui a contração do músculo liso dos vasos sanguíneos (DOCHERTY, 1998). Já a ativação dos receptores beta produz relaxamento do músculo liso (vasodilatação e broncodilatação) e a estimulação cardíaca (aumento da frequência cardíaca e da força de contração).

Os agonistas que interagem diretamente nos receptores adrenérgicos, conhecidos como simpatomiméticos de ação direta, mimetizam alguns dos efeitos da ativação do sistema nervoso simpático, por ligação e ativação de subtipos específicos de receptor.

Os simpatomiméticos de ação indireta não ativam os receptores diretamente, mas facilitam a liberação de noradrenalina dos neurônios simpáticos ou bloqueiam a sua recaptura neuronal de alta afinidade. Para exercer esse efeito, uma amina simpaticomimética deve penetrar previamente no neurônio noradrenérgico. Drogas não-polares, lipossolúveis, podem difundir-se pela membrana neuronal, enquanto substâncias polares, hidrossolúveis, dependem de captação ativa de alta afinidade do transportador de Nor.

Dentre as aminas simpaticomiméticas comumente usadas como vasoconstritores, a adrenalina é a mais potente. Quando atua sobre receptores adrenérgicos, provoca vasoconstrição periférica; sobre os β_2 provoca vasodilatação na musculatura esquelética e broncodilatação; e sobre os β_1 causa aumento da frequência cardíaca (FERREIRA, 1999; MALAMED, 1997; SALOMÃO, SALOMÃO, 1996).

3.4.2.2. Os Simpatolíticos

Os inibidores do sistema simpático ou simpatolíticos são os fármacos que inibem a transmissão adrenérgica em locais distintos, desde o sistema nervoso central até a célula efetora (vasos, coração, rins, etc.), localizada na periferia. Esses inibidores podem ser classificados de acordo com o local onde ocorre a inibição do sistema simpático. Desse modo, têm-se os agonistas dos receptores alfa 2 (que agem essencialmente no sistema nervoso central), antagonistas dos receptores beta (que atuam tanto no sistema nervoso central, como na periferia), os bloqueadores dos receptores nos gânglios adrenérgicos (ganglioplégicos) e neurônios pós-ganglionares, e finalmente, os que bloqueiam o fluxo simpático essencialmente na periferia (TAVARES, PLAVNIK, 1998).

Os primeiros antagonistas bloqueavam os receptores alfa (fentolamina) ou beta (propranolol), enquanto atualmente, existem drogas que bloqueiam especificamente receptores α_1 (prazosina), α_2 (ioimbina) ou β_1 (metoprolol), e atuam como antagonistas competitivos que inibem direta ou indiretamente, de modo seletivo, certas respostas da atividade nervosa simpática da adrenalina, da noradrenalina e de outras amins simpaticomiméticas e conseqüentemente diminuindo a pressão arterial.

O protótipo de droga que bloqueia o receptor α -adrenérgico é a fentolamina, o que significa que o bloqueio pode ser sobrepujado pelo aumento da concentração de agonista. O bloqueio dos receptores α com esta droga promove leve diminuição da pressão sanguínea, porém é acompanhado por aumento reflexo da frequência cardíaca.

Os bloqueadores alfa1 são fármacos que diminuem a pressão arterial por bloquearem os receptores alfa1 nas arteríolas e vênulas, levando a potente vasodilatação arterial. A alta seletividade apresentada pelos receptores alfa1 parece explicar a menor taquicardia causada por esses agentes quando comparados à fentolamina, um alfabloqueador não-seletivo.

A teratozina, a doxazosina e o prazosin são exemplos de antagonistas seletivos de receptores α_1 -adrenérgicos com perfis farmacológicos similares, porém com algumas diferenças farmacocinéticas. Pelo bloqueio de receptores α_1 -adrenérgicos em arteríolas e veias, tais fármacos reduzem a resistência vascular periférica e baixam a pressão sanguínea e por isso são usadas no tratamento da hipertensão. Estes causam menos taquicardia do que os α antagonistas não-seletivos, pois os receptores α_2 , que reduzem a liberação de Nor, não são bloqueados por tais fármacos. Antagonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos também relaxam a musculatura lisa da próstata e bexiga e por isso, aliviam a retenção urinária na hiperplasia prostática (TAVARES, PLAVNIK, 1998; BRODY, 2006).

Resultados de estudos em animais indicam que o efeito hipotensor do prazosin é devido à vasodilatação que é dependente de dois componentes discerníveis de ação da droga: (1) relaxamento direto do músculo liso vascular e (2) interferência com a função simpática periférica ao receptor alfa-adrenérgico. (CAMBRIDGE, D.; *et al*, 1977; CONSTANTINE, 1975).

Os betabloqueadores adrenérgicos foram inicialmente usados para tratar arritmias e angina, mas posteriormente foram avaliados como medicação anti-hipertensiva, e se consagraram nos anos 1980 e 1990 como uma das principais medicações para o tratamento da hipertensão arterial. Com relação aos efeitos no sistema cardiovascular, inibem as respostas cronotrópicas, inotrópicas e vasoconstritoras à ação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina nos receptores beta-adrenérgicos (PETERSON, 2006).

Essencialmente, existem três classes de betabloqueadores: os que bloqueiam os receptores beta1 e beta 2 inespecificamente, aqueles que bloqueiam preferencialmente os receptores beta1 aos beta2 e aqueles que apresentam atividade simpatomimética intrínseca. Há, no entanto, outra classe de betabloqueadores, que apresenta antagonismo alfa1 concomitante. Todos os três estão ligados às proteínas Gs, que, por sua vez, estão unidas à adenilato ciclase. A ligação do neurotransmissor aos receptores provoca aumento na concentração do segundo mensageiro celular, monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Na mesma direção, os efetores do AMPc incluem proteína quinase dependente de AMPc (PKA), que medeia alguns dos eventos intracelulares após a ligação do hormônio. O efeito final da ativação do receptor depende da sua localização no órgão-alvo. (BORTOLOTTI; CONSOLIM-COLOMBO, 2009, MAPETERSON, 2007; TAVARES, PLAVNIK, 1998)

Os beta-bloqueadores inespecíficos bloqueiam tanto os receptores adrenérgicos β_1 , encontrados principalmente no miocárdio, quanto os β_2 , encontrados no músculo liso, nos pulmões, nos vasos sanguíneos e em outros órgãos. Em consequência, apresentam efeitos periféricos mais acentuados como aumento da resistência arterial periférica e broncoconstrição. Os exemplos mais utilizados desta categoria são propranolol, nadolol e timolol.

O propranolol é o protótipo dos betabloqueadores inespecíficos e, inicialmente, diminui a pressão arterial por diminuir o débito cardíaco. A longo prazo, o débito cardíaco

retorna ao normal e a resistência periférica total diminui, mantendo a pressão arterial baixa. A menor resistência periférica é atribuída ao bloqueio dos receptores beta no sistema nervoso central e à menor secreção de renina pelos rins, uma vez que a inervação adrenérgica para o aparelho justaglomerular ocorre por estimulação dos receptores beta1.

Os betabloqueadores cardiosseletivos como metoprolol e atenolol bloqueiam apenas os receptores beta 1 adrenérgicos, presentes em maior parte no coração, no sistema nervoso e nos rins e, portanto, sem os efeitos de bloqueio periférico indesejáveis. No entanto, são 50 a 100 vezes menos potentes do que o propranolol.

Os betabloqueadores com atividade simpatomimética intrínseca como o pindolol e acebutolol possuem atividade agonista parcial. Assim, diminuem a pressão arterial por reduzir a resistência vascular periférica e deprimem menos o débito e a frequência cardíaca do que os outros betabloqueadores, por estimular, mais do que bloquear, os receptores beta 2.

Os betabloqueadores com antagonismo alfa1 (ação vasodilatadora) manifestam-se por antagonismo ao receptor alfa 1 periférico, como o carvedilol e o labetalol, e por produção de óxido nítrico, como o nebivolol. A pressão arterial diminui com o labetalol devido à redução da resistência periférica total, sem alterações significantes da frequência cardíaca e do débito cardíaco. Devido ao bloqueio concomitante beta e alfa, o labetalol é indicado no tratamento da hipertensão do feocromocitoma e nas emergências hipertensivas.

4 MATERIAL

4.1 Material botânico

O material vegetal utilizado no presente estudo foram folhas de *P. aduncum*. As folhas foram coletadas no Mini Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e determinada sua geoposição a 3°06'01.01" de latitude e 59°58'37.68" de longitude (Figura 3) em dezembro de 2010. A planta à ocasião da coleta mostrava-se abundantemente florida, propiciando assim o fornecimento de material para identificação e confecção de exsicata, que foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM) sob número NH-8705. As folhas foram secas à sombra e ao abrigo da luz por 5 dias. Após secagem, as folhas foram trituradas e estocadas em sacos plásticos protegidos da luz e umidade.



Figura 03 - Área de coleta das folhas de *Piper aduncum* L. Mini campus da Universidade Federal do Amazonas, Manaus/AM, nas coordenadas: latitude 3°06'01.01" e longitude 59°58'37.68". Fonte: MapLink Tele Atlas, 2011.

4.2 Material Biológico

Nos testes farmacológicos foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos e fêmeas adultos pesando 250 - 300 g e camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) adultos pesando 30-45 g, fornecidos pelo biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Também foram utilizados coelhos albinos pesando entre 1,5 e 2,0 kg de fornecedores credenciados. 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

4.3.1 Fármacos, reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados nesse estudo foram de grau analítico ou espectrofotométrico: Acetilcolina (Sigma-Brasil), acetonitrila (Merck - Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec - Brasil), ácido bórico (Synth - Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear - Brasil e Vetec - Brasil), ácido fosfórico 85% P.A (C.P.Q), adrenalina, agarose (Conda-Low EEO), albumina de soro bovino, atropina (Sigma), bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), butanol (Synth - Brasil), D-tubocurarina (Sigma - Brasil), colagenase tipo IA, cloreto de magnésio P.A (Merck - EUA), cloreto de potássio (Vetec - Brasil), cloreto de sódio P.A (Merck - Brasil), EDTA (Fluka - Suíça), estreptomicina, éter etílico P.A (Nuclear -Brasil), EGTA (Sigma), glicose P.A (C.P.Q), ionóforo A23187 (Sigma-Brasil), noradrenalina (Sigma), penicilina, pentobarbital (sigma), prazosin (Sigma), probenecida, propranolol (Sigma),

sacarose P.A (Queel-Brasil), soro de cavalo, soro fetal bovino, tapsigargina (Sigma), tris-HCl (Sigma), tris maleato (Sigma), trifostato de adenosina (Sigma), tripsina , verapamil .

4.3.2 Composição das soluções

D-MEM (mg/L): Gibco Life Technologies: CaCl_2 200; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,1; KCl 400; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 H₂O 42; L-ISOLEUCINA 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; gentamicina 40; cloreto de colina 4; D-glucose 3500.

Líquido nutritivo de Tyrode: NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 mM; NaHCO_3 15,0 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,0 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mM; glicose 11,0 mM.

Líquido nutritivo para vesícula (LNV): NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO_3 15 mM; NaH_2PO_4 0,4 mM; glicose 5,5 mM; CaCl_2 1,8 mM.

Reagente de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio; 23,8 mL de ácido sulfúrico para 1 L de água destilada, 15 mL dessa solução para 0,36 g de ácido ascórbico.

Tampão de reação para Ca^{2+} -ATPase: tris-maleato 50 mM, pH 7.4; MgCl_2 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionóforo A23187 10 μM ; CaCl_2 1 mM, ATP 5 mM.

Soluções para a extração de Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético

Solução I: MOPS 10 mM, sacarose 10%, EDTA 0,1 mM, pH 7,0

Solução II: MOPS 10 mM, KCl 0,6 mM, pH 7,0

Solução III: MOPS 10 mM, sacarose 30%, pH 7,0

Solução de HBSS (mM): KCl 5,4; KH₂PO₄ 0,4; NaCl 136,9; Na₂HPO₄ 0,34; D-glucose (1mg/mL); NaHCO₃ 4,2 mM.

Tampão para dosagem de proteína: tris/HCl 100 mM; pH 7,4; trizma base 12,1 g; HCl 6 N 13,8; EDTA 200 mM, pH 8,0.

Reagente de Bradford: Coomassie Brilliant Blue 0,01%; etanol 4,7% e ácido fosfórico 8,5%.

5 MÉTODOS

5.1 Métodos fitoquímicos

5.1.1 Preparação do extrato aquoso das folhas de *P. aduncum* (infuso a 2,5%)

O pó (250g) das folhas secas da planta foi extraído por infusão em água destilada a 72 °C, com agitação a cada 10 minutos, durante 30 minutos, dando origem ao extrato aquoso (EA). O EA foi filtrado, concentrado em rotaevaporador a vácuo a 50°C e liofilizado, calculando-se o rendimento. O pó obtido foi mantido em dessecador e ao abrigo da luz.

5.1.2 Preparação da fração butanólica (FBut)

O EA (7,5 g) foi suspenso em 500 mL de água e extraído em funil de separação com porções de 300 mL de butanol, por três vezes. Desse processo de partição foram obtidas as frações butanólica (FBut) e aquosa (FA), que foram concentradas em rotaevaporador a 50°C, liofilizadas e mantidas em dessecador.

5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

A padronização e purificação dos extratos e frações de *P. aduncum*, em CLAE foram realizadas pela Dra. Mirtes Midori Tanae.

O EA e FBut de *P. aduncum* 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.

5.1.4 Purificação da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* 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 duas 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 8,0 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.

5.2 Atividade farmacológica

5.2.1 Triagem farmacológica geral – Teste hipocrático (IRWIN, 1968; MALONE; ROBICHAUD, 1962)

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, secreção brônquica, convulsões e mortes.

Camundongos machos ou fêmeas foram divididos em grupos (n=6) e tratados por via oral ou intraperitoneal. No primeiro, o grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o grupo experimental com EA (1 g/kg, v.o.). No segundo, um animal controle foi injetado com salina (0,9%, i.p.), em volume igual ao da maior dose do extrato, e o grupo experimental com FBut (200 e 500 mg/kg, i.p). Após os tratamentos, os efeitos gerais foram observados e a análise da resposta comportamental dos animais realizada aos 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após os tratamentos. As observações foram continuadas após 24 horas para verificação de efeitos residuais, recuperação ou morte dos animais.

5.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P.aduncum* em músculo liso

5.2.2.1 Trânsito Intestinal

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo) e mantidos em jejum de 16 horas. Decorridos 60 minutos dos tratamentos foi administrada uma suspensão de carvão ativado (5%, 0,1 mL/10g, v.o) em todos os animais. Após 30 minutos, os animais foram mortos sob anestesia etérea e o intestino delgado totalmente removido. A distância percorrida pelo carvão no grupo controle e nos grupos tratados com FBut foi medida relativamente ao comprimento total do intestino delgado.

5.2.2.2 Jejuno de Rato

Ratos adultos foram anestesiados com éter e mortos por deslocamento cervical. Em seguida, foram fixados em placa de cortiça. A luz intestinal do jejuno isolado foi lavado com Tyrode e os tecidos circunjacentes foram retirados. Cerca de 2 cm do órgão foi posicionado em cuba de contração contendo Tyrode carbogenado (O₂ 95% e CO₂ 5%) a 30° C, sob tensão de 1 g e pH 7,4. Após estabilização por 30 minutos, foram feitas curvas concentração-efeito de acetilcolina (10⁻⁸ a 10⁻⁴ M) antes e após 15 minutos da incubação da FBut na concentração de 100 µg/mL. Em algumas preparações, seguiu-se o protocolo descrito acima, porém, após a estabilização por 30 minutos foram incubadas cumulativamente as concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/mL de FBut).

As contrações isométricas do órgão foram registradas com auxílio de um transdutor de força conectado a um aparelho Power Lab (AD Instruments), operado por software ChartPro5.

5.2.2.3 Ducto deferente de rato (DDR)

Ratos machos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Os ductos deferentes foram removidos e transferidos para placa de Petri contendo líquido nutritivo para vesícula (LNV) a 30°C. Os tecidos conectivos e vasos sanguíneos foram removidos e a secreção luminal lavada com o líquido nutritivo. A porção prostática foi isolada e montada em cuba de vidro contendo LNV e mistura carbogênica a 30 °C, sob tensão de 1,0 g. Após estabilização por 30 minutos, foram realizadas curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) antes e 10 minutos após a incubação da FBut nas concentrações de 30 e 100 µg/mL ou curvas concentração simples de ATP (1 mM) na ausência e na presença de FBut 300 µg/mL.

5.2.2.4 Ducto deferente de rato (DDR) estimulado eletricamente

Ratos machos foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical. Os ductos deferentes foram removidos e dissecados conforme descrito acima. A porção prostática foi isolada e amarrada em haste de vidro contendo dois eletrodos de platina paralelos e imersos em cuba para órgão isolado contendo 5 mL de LNV carbogenado a 30 °C. Uma das extremidades do DDR foi presa a um transdutor de força ML T050/D (ADInstruments-USA) para registro das contrações. O transdutor foi conectado a um amplificador acoplado ao sistema de aquisição de dados digitais Powerlab 4/25(ADInstruments-USA) e operado por

computador, utilizando software LabChart versão 6.1.3 para a digitalização dos dados. Para estimulação elétrica do DDR, o eletrodo foi conectado a um estimulador elétrico (Grass SD9, USA).

A preparação foi submetida à tensão de 1 g e após 30 minutos foram feitas curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M). Após lavagem, o órgão foi estimulado com pulsos de 0,2 Hz, 60 V e 2 ms. Após 30 minutos de estabilização, a FBut 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi incubada por 10 minutos. O estímulo elétrico foi interrompido e foi realizada nova curva cumulativa de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) na presença da FBut.

Em algumas preparações, seguiu-se o protocolo descrito acima, porém, após 30 minutos da estabilização das contrações obtidas por estimulação elétrica foi incubada durante 15 minutos a fração F1 na concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Também foram testadas as frações (F1 a F6) nas concentrações de 1, 3, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou FBut (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no ducto deferente de rato após 30 minutos da estabilização da estimulação transmural.

5.2.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* no músculo cardíaco

5.2.3.1 Registro da pressão arterial em ratos anestesiados

Ratos normotensas foram anestesiadas com uma mistura de pentobarbital (50 mg/kg, i.p) e uretana (600 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram fixadas em decúbito dorsal, canulando-se a veia íliaca para a injeção de drogas e a artéria carótida para o registro da pressão arterial. As variações pressóricas foram medidas com um transdutor de pressão e registradas em um computador, utilizando software Chart 5 Pro (AD Instruments). Nessas preparações, foram obtidas curvas dose-resposta à FBut (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) ou EA (1, 3 e 10 mg/kg) e aos agonistas padrão noradrenalina ou adrenalina (0,1; 0,3 e 1 µg/kg, e.v.). Após a escolha da dose média do EA e dos agonistas padrão, os efeitos foram comparados em doses injetadas antes e após o bloqueio com prazosin (1 mg/kg, e.v.) e/ou propranolol (1 mg/kg, e.v.) .

5.2.3.2 Efeito na frequência de batimentos em átrio direito isolado de rato

Ratos machos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após toracotomia, o coração foi removido e imerso em líquido nutritivo. O átrio direito isolado foi montado em cuba de 5 mL com Tyrode aquecido a 35 °C e aerado continuamente com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂), sob tensão inicial de 1 g. Após 30 minutos de estabilização, o EA (10, 30, 100 e 300 µg/mL) ou FBut (10, 30 e 100 µg/mL) foram incubados cumulativamente em concentrações crescentes a cada 10 min. Os batimentos foram registrados através de transdutor isométrico (GRASS-FT), em Powerlab 4/25(AD Instruments-USA). Os resultados foram apresentados em batimentos por min (BPM) e

comparados à frequência de batimentos basal (controle) antes da incubação do EA ou FBut.

Em algumas preparações foi testada a FBut (100 µg/mL) na ausência e na presença de propranolol (10^{-6} M). Os resultados foram apresentados como porcentagem de BPM das contrações antes e após a adição da FBut.

5.2.3.3 Efeito na força de contração em átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente

Ratos machos foram anestesiados superficialmente com éter e mortos por deslocamento cervical. Após toracotomia, o coração foi removido e imerso em líquido nutritivo. O átrio esquerdo isolado foi montado em cuba de 5 mL com Tyrode aquecido a 35°C e aerado continuamente com mistura carbogênica (95% O₂ + 5% CO₂), sob tensão inicial de 1 g.

O órgão foi estimulado eletricamente com frequência de 1 Hz e duração de 2 ms, através de eletrodos de platina imersos na cuba. As contrações foram registradas por um transdutor isométrico (GRASS-FT) e digitalizadas em Powerlab 4/25 (ADInstruments-USA). Após 30 minutos de estabilização, o EA (10, 30, 100 e 300 µg/mL) ou FBut (10, 30 e 100 µg/mL) foram incubados. Somente uma concentração foi testada por preparação. Em algumas preparações, o EA (300 µg/mL) ou FBut (100 µg/mL) foram testados na ausência e na presença de propranolol (10^{-6} M). Os resultados foram apresentados como porcentagem da amplitude basal (controle) das contrações antes da adição do EA ou da FBut.

5.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P aduncum* na atividade da Ca²⁺-ATPase (SERCA 1)

5.2.4.1 Isolamento da Ca²⁺-ATPase

A Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (SERCA 1) foi extraída dos músculos da coxa de coelho (1,5-2 kg) pelo método descrito por Kosk-Kosicka (1999). Todas as etapas foram realizadas a 4°C. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital (> 100 mg/kg, i.p.) de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. Os músculos das duas coxas foram removidos e transferidos para béquer contendo EDTA 0,1 mM, dissecados e lavados uma vez com água destilada gelada. Os músculos foram cortados e homogeneizados em tampão MOPS (170 g: 510 mL solução I), pH 7,0 por 5 min e o homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em gaze e o filtrado centrifugado a 40.000 x g por 90 minutos. O *pellet* foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e o material foi 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 suspenso na solução III e mantido em freezer -80 °C até a realização dos ensaios de atividade enzimática.

5.2.4.2 Medida da atividade da Ca²⁺-ATPase

A atividade da Ca²⁺-ATPase foi determinada de acordo com o método de Fiske e Subbarow (1925) adaptado, utilizando microplaca transparente de fundo chato de 96 poços. A velocidade de hidrólise enzimática do ATP foi determinada colorimetricamente por quantificação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP em função do tempo (MURAKAMI *et al.*, 1992). As amostras membranares contendo 0,6 µg de proteína em tampão tris-maleato 50 mM foram incubadas na ausência e na presença de FBut (3, 10, 30 e 100 µg/mL) em volume final de 75 µL/poço. A reação foi iniciada com 7,5 µL de ATP 30 mM a 37°C. Após 10 min, a reação foi interrompida com 25 µL de TCA 50% sob banho de gelo. Adicionou-se 200 µL de reagente de molibdato de amônio (15 mL/0,36 g de ácido ascórbico, segundo Hossein *et al.*, 1993) e incubou-se a 37 °C por 10 minutos. A tapsigargina (0,01 a 1,0 µM) foi utilizada como controle positivo. As leituras das absorbâncias foram feitas a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

5.2.4.3 Determinação do teor de proteína

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

5.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na medida do cálcio citosólico livre em culturas primárias de células de útero e cardiomiócitos de rato

5.2.5.1 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.

5.2.5.2 Cultura de útero de rata

Ratas adultas foram superficialmente anestesiadas com éter e exsanguinadas por incisão da carótida; a cavidade abdominal foi aberta, o útero retirado e transferido 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 ressuspensão em 10 mL de D-MEN; o processo de lavagem foi repetido por 4 vezes. O *pellet* obtido foi suspenso em D-MEN 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.

5.2.5.3 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 FBut (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.

5.3 Análises Estatísticas

Os resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram expressos como médias \pm erros padrão das médias, com exceção dos valores de CE₅₀ e CI₅₀ que foram expressos como médias geométricas e limite de confiança (LC) superior e inferior.

Nos testes para comparação dos efeitos dos compostos estudados foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.0

6 RESULTADOS

6.1 Métodos fitoquímicos

6.1.1 Extrato aquoso (EA)

A extração a quente do pó das folhas secas de *P. aduncum* (infuso 2,5%) forneceu um extrato castanho escuro de odor característico e amargo com pH 5,9 e rendimento de 15%. O liofilizado obtido do EA forneceu um pó, não higroscópico, de coloração e aroma semelhantes ao infuso.

6.1.2 Fração butanólica (FBut)

A fração butanólica obtida por partição do extrato aquoso apresentou coloração castanho-claro, de odor irritante e rendimento de 26%, em relação ao extrato aquoso. O liofilizado resultou em um pó de coloração e de aroma semelhantes ao EA.

6.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

O EA apresentou 8 picos principais com tempos de retenção de 2,9; 3,5; 8,0; 13,8; 15,7; 26,9; 24,8 e 29,0 minutos, com áreas representando 13,4; 8,0; 2,5; 10,2; 8,8; 17,6; 2,4 e 1,9%, respectivamente, do total do cromatograma. A FBut apresentou 9 picos principais com tempos de retenção de 2,9; 3,5; 8,0; 14,1; 16,3; 18,3; 18,9; 21,05 e 28,9 minutos, com áreas representando 7,3; 2,5; 1,8; 5,6; 17,6; 13,9; 7,4; 10,9 e 1,7%, respectivamente, do total do cromatograma (Figura 5).

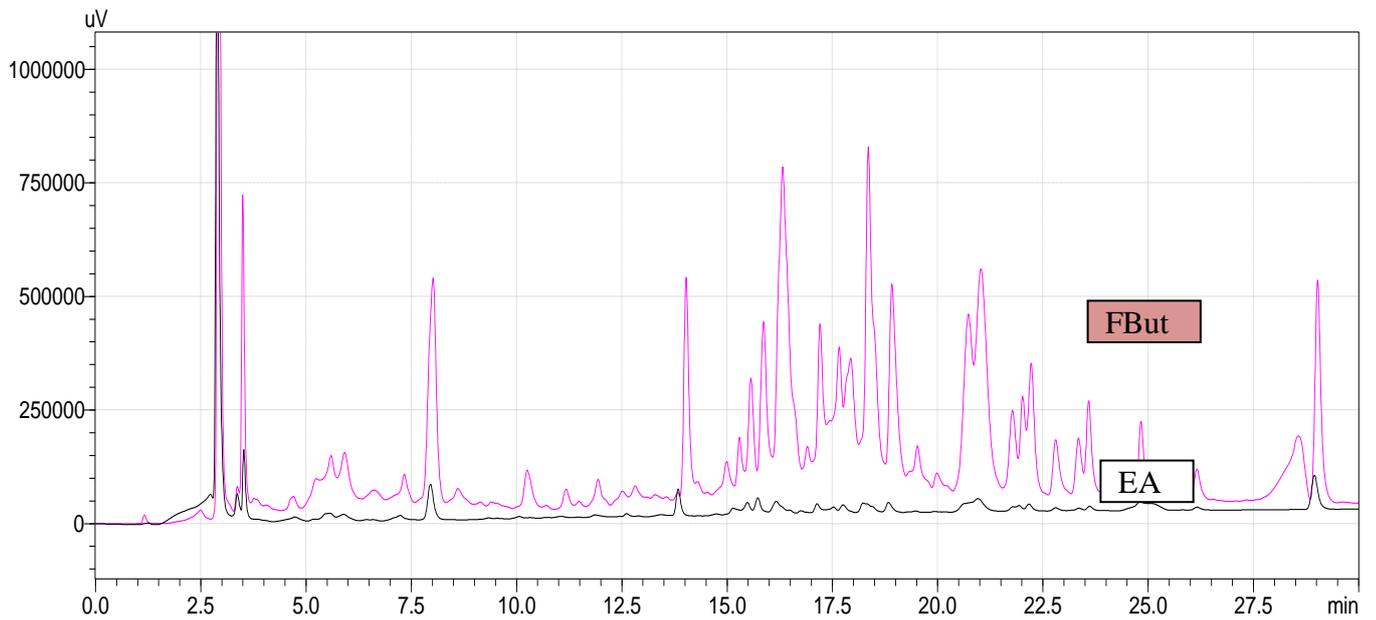


Figura 04- Perfil cromatográfico do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de *Piper aduncum* em CLAE utilizando gradiente linear de água/acetonitrila 5 a 45% em 30 min, em coluna analítica C18 (25 x 0,46 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 μ m, fluxo constante de 1,0 mL/min e λ 210nm.

6.1.4 Purificação da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-Prep)

A purificação da FBut em CLAE-prep resultou em 6 frações com rendimento ponderal de: F1 9,8%, F2 9,2%, F3 8,1%, F4 8,8%, F5 9,2% e F6 6,5% relativamente à FBut. (Figura 05).

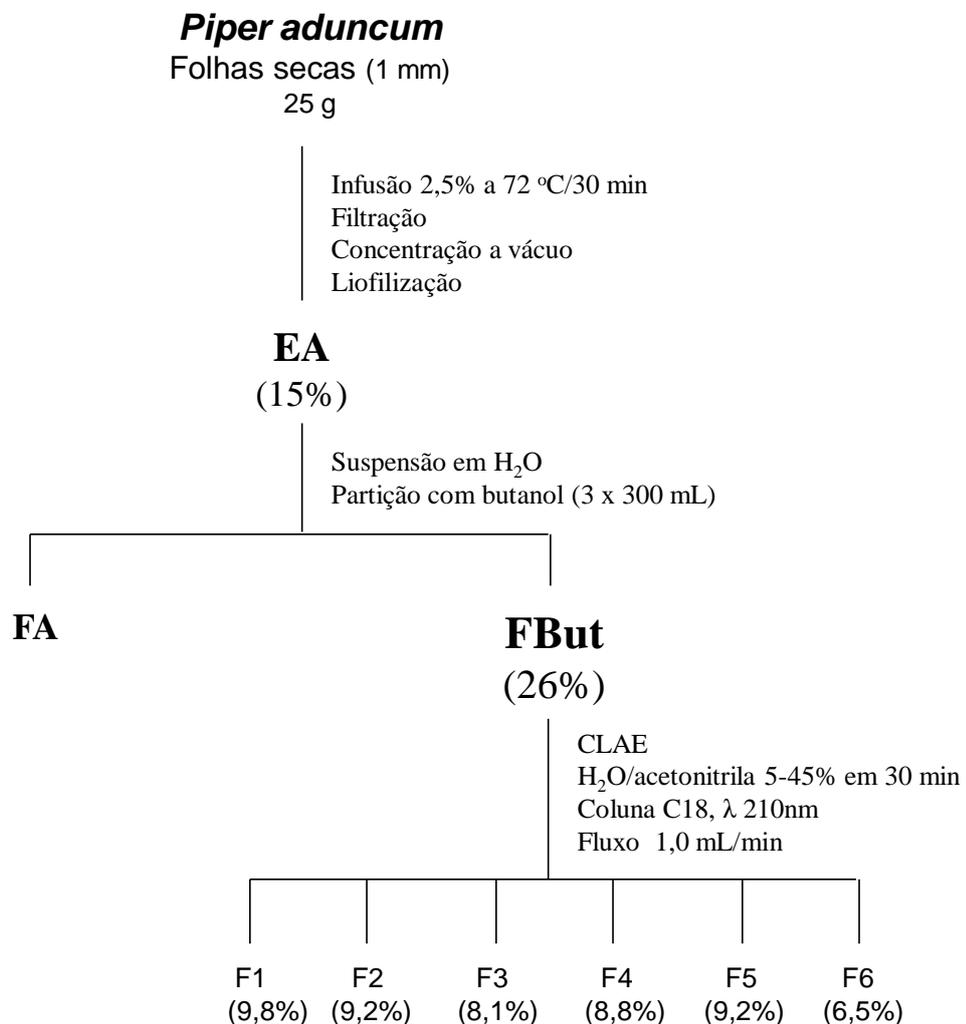


Figura 05 - Fluxograma de obtenção do extrato aquoso (EA), fração aquosa (FA), fração butanólica e purificação da FBut de *Piper aduncum* L. em CLAE. Os rendimentos do EA, da FBut e das frações isoladas (F1 a F6) foram calculados em relação às folhas secas moídas, ao EA e à FBut, respectivamente.

6.1.5 Perfil cromatográfico das frações purificadas F1 a F6 da FBut de *P. aduncum* em cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE-analítica)

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 19,0 min. (Figura 06).

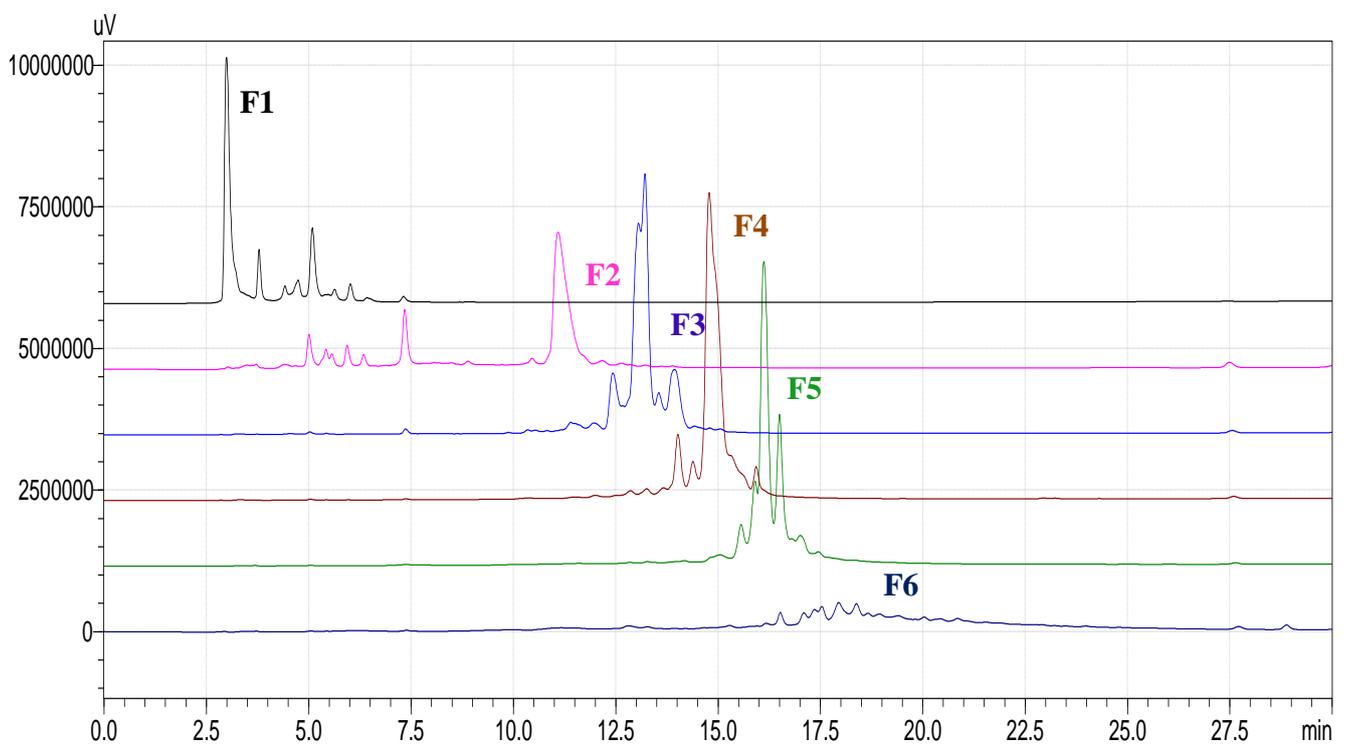


Figura 06. Perfis cromatográficos das frações purificadas F1 a F6 da FBut de *P. aduncum* em cromatografia líquida de alta eficiência analítica, utilizando coluna C18, gradiente de água/acetoneitrila de 5 a 45% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 210 nm.

6.2 Atividade farmacológica

6.2.1 Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1968; MALONE; ROBICHAUD,1962)

Durante o teste geral de atividades, os camundongos tratados com o EA na dose de 1g/kg, por via oral, não apresentaram sinais que os diferenciasssem dos animais controle tratados com água. Após 24 h do início do teste, não houve morte entre os animais tratados com EA.

Os camundongos tratados por via intraperitoneal (200 e 500 mg/kg) apresentaram diminuição do número de bolos fecais e da atividade exploratória e sedação nas primeiras 2 h após a injeção da FBut. Após 24 h do início do teste, não foram observados efeitos residuais ou morte dos animais.

6.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* no músculo liso

6.2.2.1 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* no trânsito intestinal

A distância percorrida pelo carvão ativado (5 %, 0,1 mL/10 g, v.o.) no grupo controle (5 mL/kg, v.o.) foi de $50,0 \pm 3,0$ % do comprimento total do intestino delgado (n=6/grupo). Os grupos de camundongos tratados 1 hora antes com EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg (v.o.) tiveram a distância percorrida pelo carvão de $40,8 \pm 8,0$ %; $37,4 \pm 5,0$ % e $31,4 \pm 3,0$ %, respectivamente. Apenas a dose maior inibiu o trânsito intestinal relativamente ao grupo controle (Figura 07).

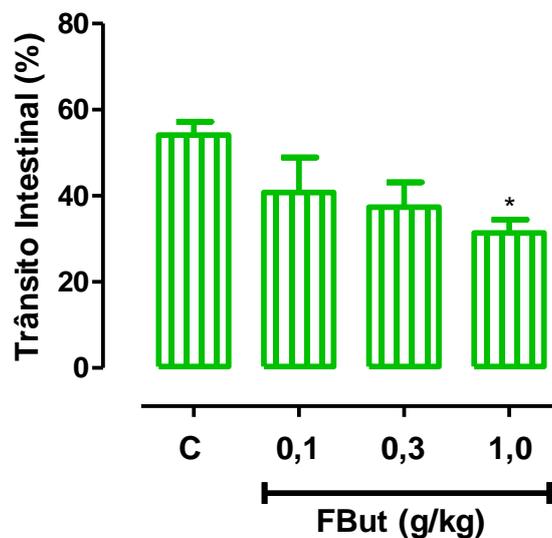


Figura 07 – Efeito do tratamento prévio (1 h) de *P. aduncum* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no trânsito intestinal de camundongos (n= 6) avaliado pela distância percorrida pelo carvão ativado (5 %, 0,1 mL/10g, v.o.) em relação ao comprimento total do intestino do camundongo.

O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). As colunas e barras correspondem às médias \pm erros padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$ (ANOVA de 1 via) em relação ao controle.

6.2.2.2 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* no jejuno de rato

A incubação de acetilcolina (ACh) (10^{-8} a 10^{-4} M) em preparações de jejuno isolado de rato produziu contrações proporcionais às concentrações com CE_{50} de $0,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

A incubação da FBut $100 \mu\text{g/mL}$ 10 min antes da adição de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) não modificou a curva de contração da acetilcolina. Nessas condições, a EC_{50} foi de $0,85 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (Figura 08).

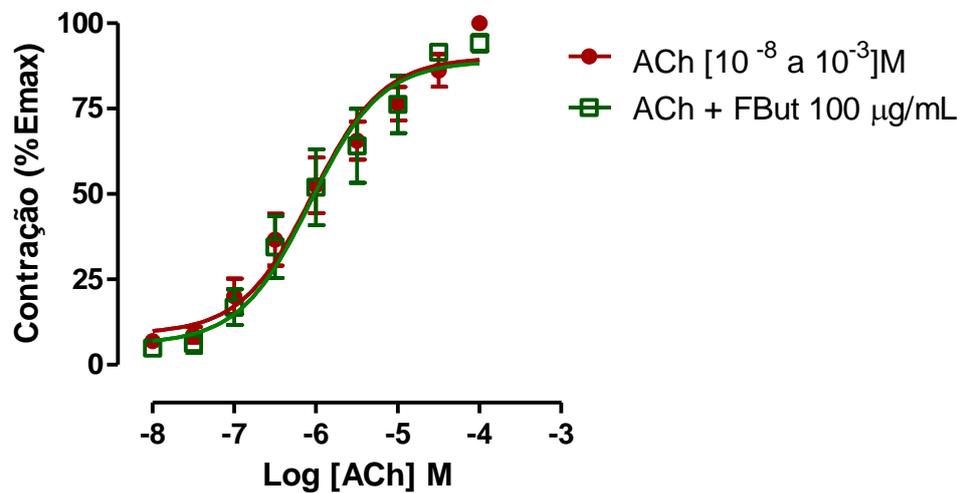


Figura 08 – Curvas concentração-efeito de acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) em jejuno de rato na ausência e na presença da FBut de *Piper aduncum* ($100 \mu\text{g/mL}$) a 30°C . Dados expressos como médias \pm erros padrão ($n = 4$).

6.2.2.3 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na motilidade de jejuno isolado de rato

A incubação de FBut (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) em preparações de jejuno isolado de rato produziu diminuição do tônus basal e da motilidade em até 100% com a maior concentração (Figura 09).

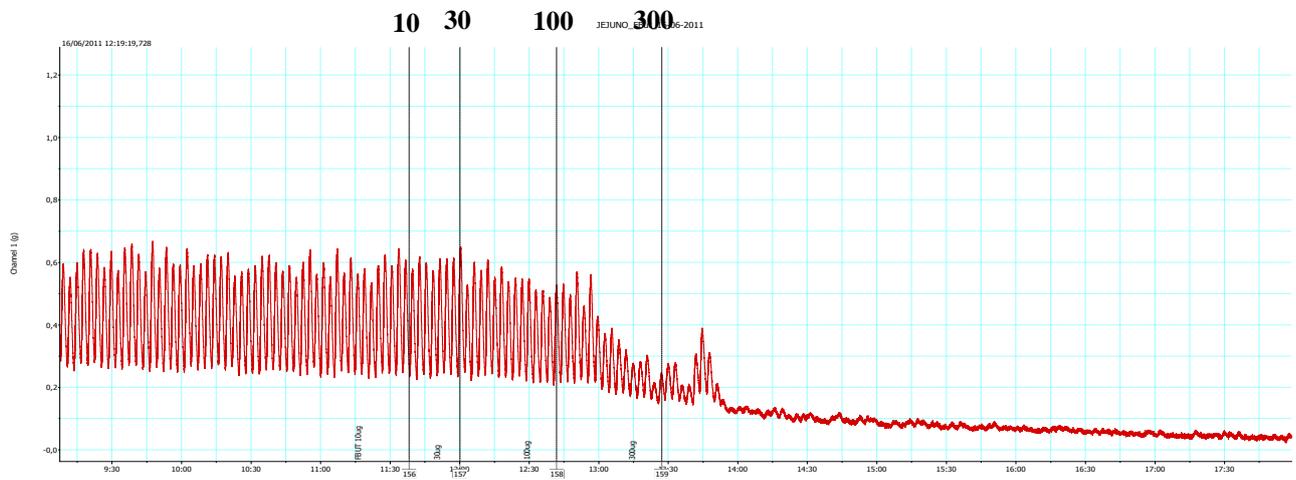


Figura 09 – Registro da motilidade de jejuno de rato na ausência e na presença da FBut de *Piper aduncum* (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) a 30 °C. Notar a diminuição acentuada da motilidade a partir das concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$. Experiência típica.

6.2.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* no ducto deferente de rato

A incubação de noradrenalina (NA) (10^{-8} a 10^{-3} M) em preparações de ducto deferente de rato produziu contrações proporcionais às concentrações com CE_{50} de $3,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$.

Na presença da FBut 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ incubada 10 min antes da adição de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M), as CE_{50} foram de $3,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e $2,5 \pm 3,0 \mu\text{M}$ ($p > 0,05$) respectivamente, com diminuição de 35% da contração máxima na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ comparativamente ao controle ($p < 0,01$) (Figura 10, Tabela 01).

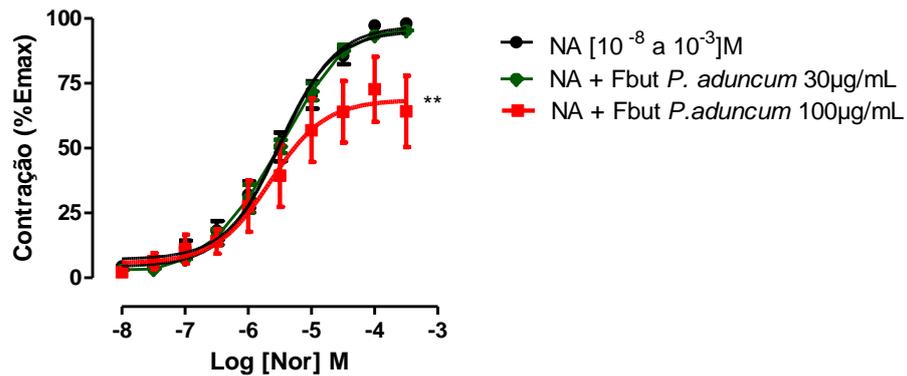


Figura 10 – Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) em ducto deferente de rato na ausência e na presença da FBut de *Piper aduncum* (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) a 30 °C. Dados expressos como médias \pm erros padrão ($n = 4$). ** $p < 0,01$ (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett).

Tabela 01 – Efeito máximo e concentração efetiva média (CE_{50}) obtidos de curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) na ausência e na presença da FBut de *Piper aduncum* L. nas concentrações indicadas

	FBut ($\mu\text{g/mL}$)		
	0	30	100
Emax (%)	100	95	65 ^{**}
CE_{50} (μM)	3,5 (LC 2,5-3,5)	3,0 (LC 2,5-3,5)	2,5 (LC 1,0-3,0)

Valores da CE_{50} apresentados como médias geométricas e limites de confiança ($n=4$), ** $p < 0,01$ relativamente ao controle (ANOVA + Dunnett)

6.2.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* nas contrações tônicas induzidas por noradrenalina e nas contrações obtidas por estímulo elétrico do ducto deferente de rato (DDR)

A adição de noradrenalina em ducto deferente de rato produziu contrações proporcionais às concentrações (10^{-8} a 10^{-3} M) com CE_{50} de $0,35 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Figura 11).

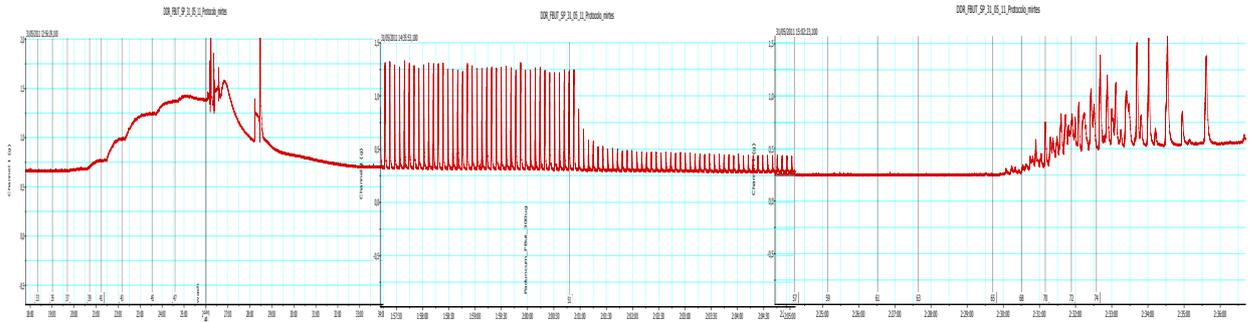


Figura 11 – Registro das contrações do ducto deferente de rato produzidas pela adição cumulativa e pela estimulação elétrica transmural na ausência e na presença da FBut de *Piper aduncum* ($300 \mu\text{g/mL}$) a 30°C . Experiência típica. Notar a inibição mais acentuada da contração ao estímulo elétrico que a inibição da contração à noradrenalina. Notar também a ritmicidade induzida pela noradrenalina na presença da FBut.

Na presença da FBut ($300 \mu\text{g/mL}$) e da F1 ($30 \mu\text{g/mL}$) incubadas 15 minutos da adição de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M), a CE_{50} foi de $0,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Figura 12).

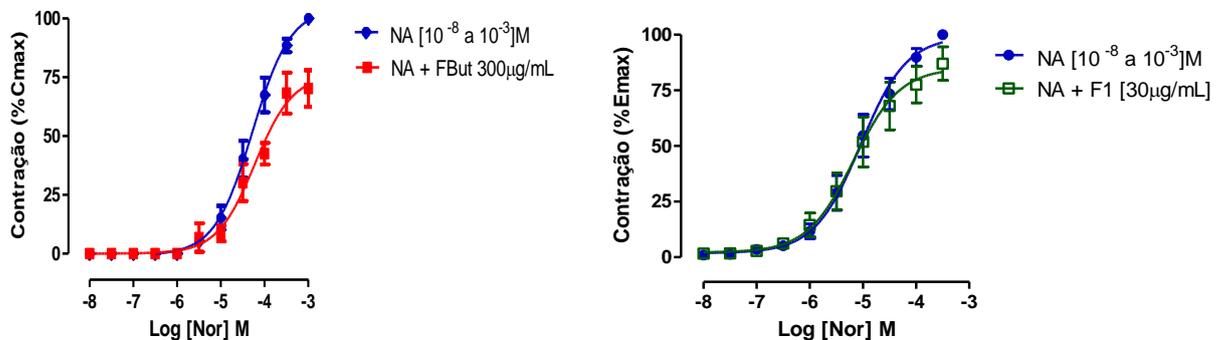


Figura 12 – (A) Curvas concentração-efeito de noradrenalina (10^{-8} a 10^{-3} M) na porção prostática de ducto deferente de rato na ausência e na presença de (A)- FBut ($300 \mu\text{g/mL}$) ou (B)- F1($30 \mu\text{g/mL}$) de *Piper aduncum* a 30°C . Dados expressos como médias \pm erros padrão ($n = 4$).

6.2.2.6 Efeito da fração butanólica (FBut) e das frações (F1 a F6) de *P. aduncum* nas contrações obtidas pelo estímulo elétrico em ducto deferente de rato (DDR)

A incubação de FBut (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) em preparações de DDR sob estimulação elétrica transmural produziu diminuição da amplitude das contrações em até 75% relativamente à contração basal antes da incubação.

A adição das frações (F1 a F6) em preparações de DDR mostrou que a fração F1 diminuiu em até 41% a amplitude da contração basal induzida eletricamente. As demais frações foram inativas nas mesmas concentrações.

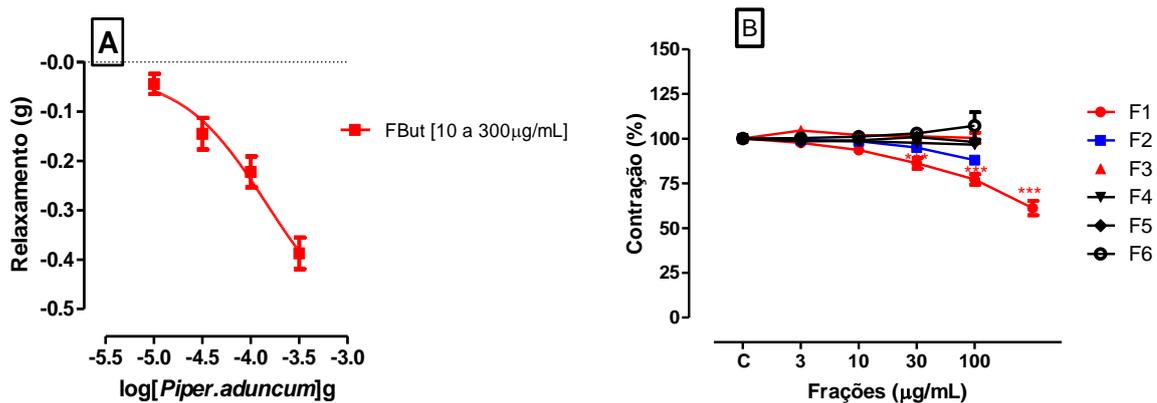


Figura 13: (A) Efeito da FBut (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) e das (B) Frações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na contração do ducto deferente de rato estimulado eletricamente. Os símbolos e barras representam as médias \pm erros padrão (n=4). ***p < 0,01 (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett)

6.2.2.7 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na contração induzida por ATP exógeno na porção prostática do ducto deferente de rato

A porção prostática do ducto deferente de rato respondeu à adição simples de ATP (1 mM) com contração média de $0,60 \pm 0,04$ g.

A incubação prévia da FBut (300 $\mu\text{g/mL}$) diminuiu a contração produzida pelo ATP (1 mM) de 67 % com média de $0,20 \pm 0,03$ g. Concentrações menores de FBut não alteraram o efeito do ATP. (Figura 14).

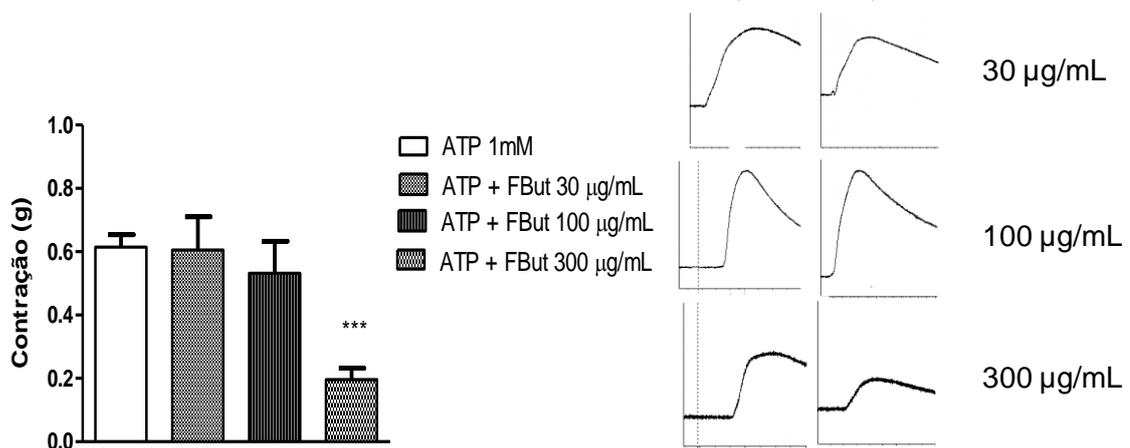


Figura 14 - Efeito da FBut de *Piper aduncum* (30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) na contração do ducto deferente de rato induzida por ATP (1 mM) a 30 °C. A FBut foi incubada 10 min antes da adição do ATP. À direita, experiências típicas mostrando a contração à adição de ATP. Os histogramas à esquerda representam médias \pm erros padrão (n = 4). *** p < 0,001 (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett)

6.2.3 Efeito no músculo cardíaco

6.2.3.1 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na pressão arterial em ratos anestesiados

A administração do EA (1, 3 e 10mg/mL) aumentou a pressão arterial proporcionalmente à dose, de 19 ± 2 , 26 ± 2 e 30 ± 4 mmHg (n=4). A FBut (1, 3 e 10mg/mL) não produziu alteração da pressão arterial comparável. Os efeitos obtidos com a injeção das 3 doses (5 ± 1 mmHg, média e desvio, n=3/dose) não foi diferente da ação da salina injetada no mesmo volume (Figura 15).

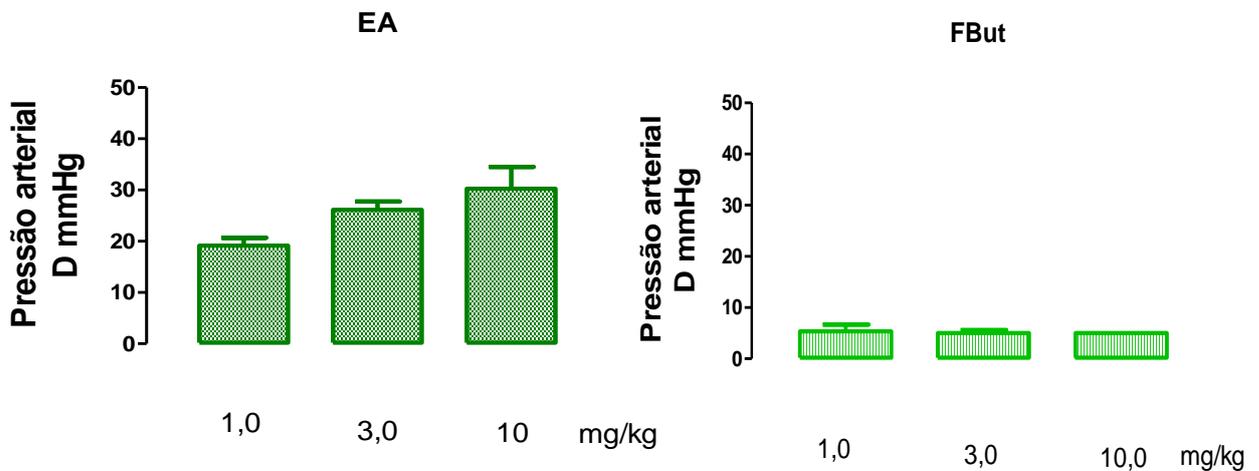


Figura15: Efeito pressórico do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* (1, 3 e 10mg/kg, e.v) em ratos normotensos anestesiados. As colunas à esquerda (EA) representam as médias \pm erros padrão (4 animais/ grupo) e as à direita (FBut) são médias \pm desvio, n=3)

6.2.3.2 Efeito do prazosin (bloqueador α -1 adrenérgico) e do propranolol (bloqueador β -adrenérgico) no efeito do extrato aquoso (EA) de *P. aduncum* na pressão arterial de ratos anestesiados.

A administração do EA de *P. aduncum* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos produziu hipertensão de $34,0 \pm 1,2$ mm Hg. A administração prévia de prazosin (1 mg/kg, e.v.), dose suficiente para inibir 50% do efeito da noradrenalina, bloqueou a hipertensão produzida pelo EA e inverteu o efeito do extrato para hipotensão de $19,0 \pm 0,9$ mm Hg. Nestes animais a administração de propranolol (1 mg/kg, e.v.), bloqueou a resposta hipotensora do EA, revertendo a hipertensão ($12,0 \pm 1,4$ mm Hg) a 35% da resposta ao extrato na ausência de bloqueio α 1-adrenérgico l. (Figura 16).

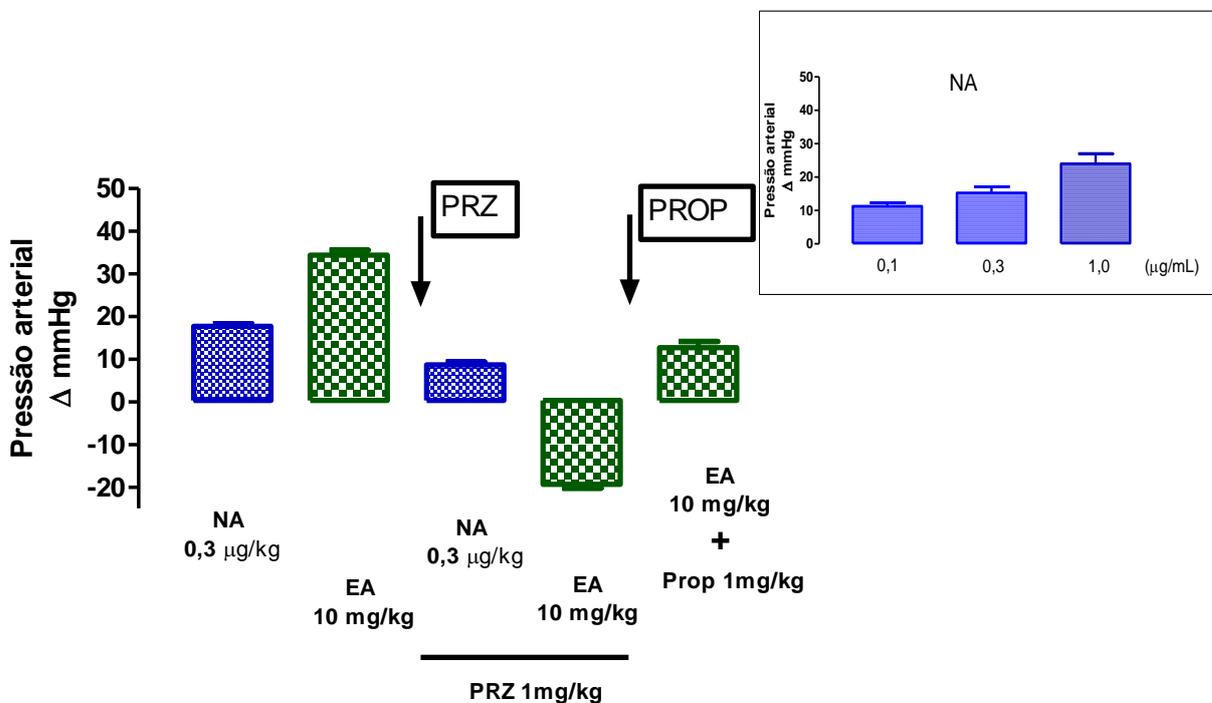


Figura 16: Efeito pressórico da noradrenalina (Nor) e do extrato aquoso (EA) de *P. aduncum* (10 mg/kg, e.v) antes e depois da injeção do prazosin e do propranolol em ratos normotensos anestesiados. A figura menor mostra a relação dose-resposta obtida com a injeção de noradrenalina utilizada como padrão de efeito α 1-adrenérgico. As colunas representam as médias \pm erros padrão (4 animais/ grupo).

A injeção de adrenalina produziu efeito bifásico relacionado às doses em ratos anestesiados. A dose de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ produziu hipertensão inicial de $6,2 \pm 1,5$ mmHg seguida de hipotensão de $16,2 \pm 1,0$ mmHg ($n=4$) (Fig. 18). Nas experiências utilizando a adrenalina como agonista padrão, a administração do EA de *P. aduncum* (3,0 mg/kg, e.v.) produziu hipertensão de $26,2 \pm 1,6$ mm Hg ($n=4$). Após a injeção de prazosin (1 mg/kg, e.v.) o EA produziu hipotensão de $8,0 \pm 1,6$ mm Hg ($n=4$). Ao mesmo tempo a resposta hipertensora inicial produzida pela adrenalina foi bloqueada e apenas hipotensão de $23,5 \pm 3,0$ foi registrada. Nesses animais, a injeção de propranolol (1 mg/kg, e.v.) bloqueou a hipotensão do EA e da adrenalina, revertendo a hipertensão a $4,7 \pm 0,2$ e $5,7 \pm 0,9$ mmHg, respectivamente (Figura 17).

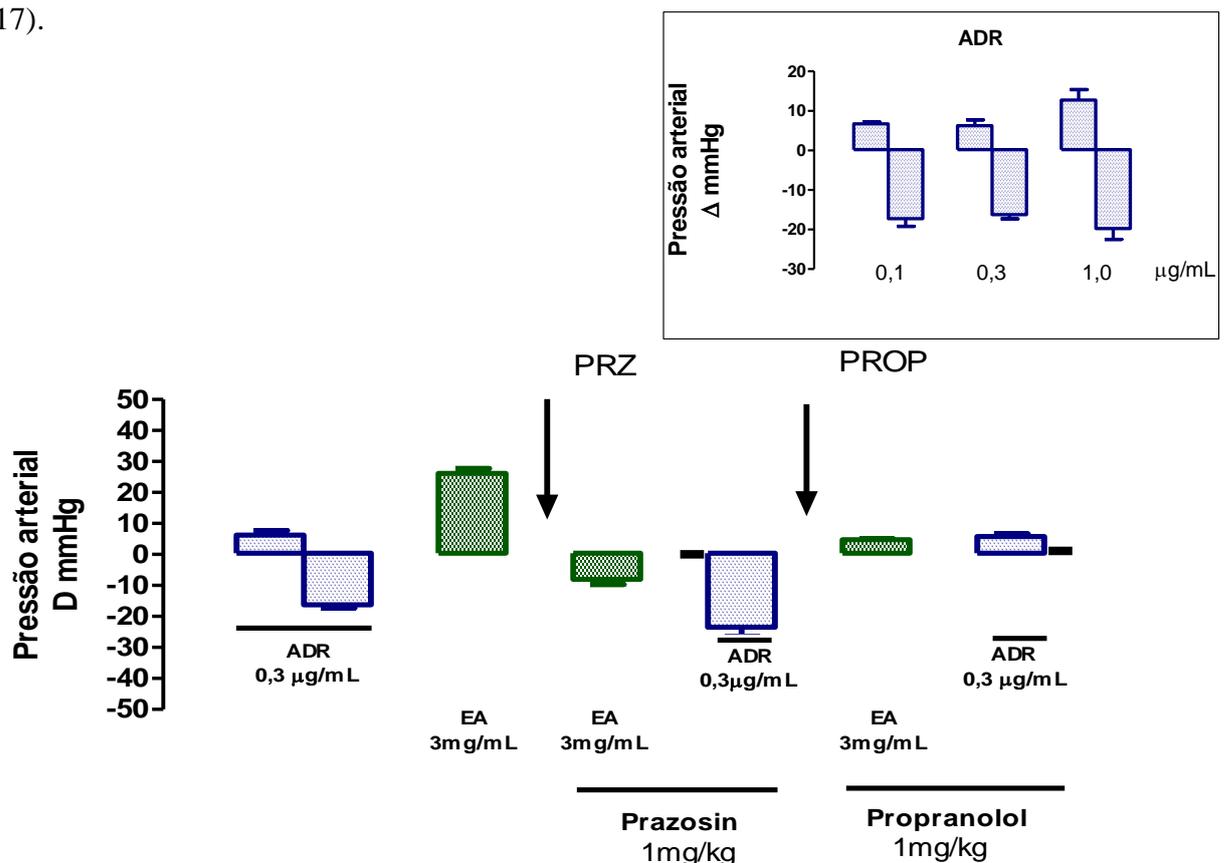


Figura 17: Efeito pressórico do extrato aquoso (EA) de *P. aduncum* (3,0 mg/kg, e.v) na ausência e na presença de prazosin e/ou propranolol em ratos normotensos anestesiados. As colunas representam as médias \pm erros padrão (4 animais/ grupo).

6.2.3.3 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* em átrio direito de rato

A incubação do EA (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) aumentou a frequência de batimentos do átrio direito de rato, proporcionalmente à concentração. A FBut (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) teve efeito semelhante (Figura 18).

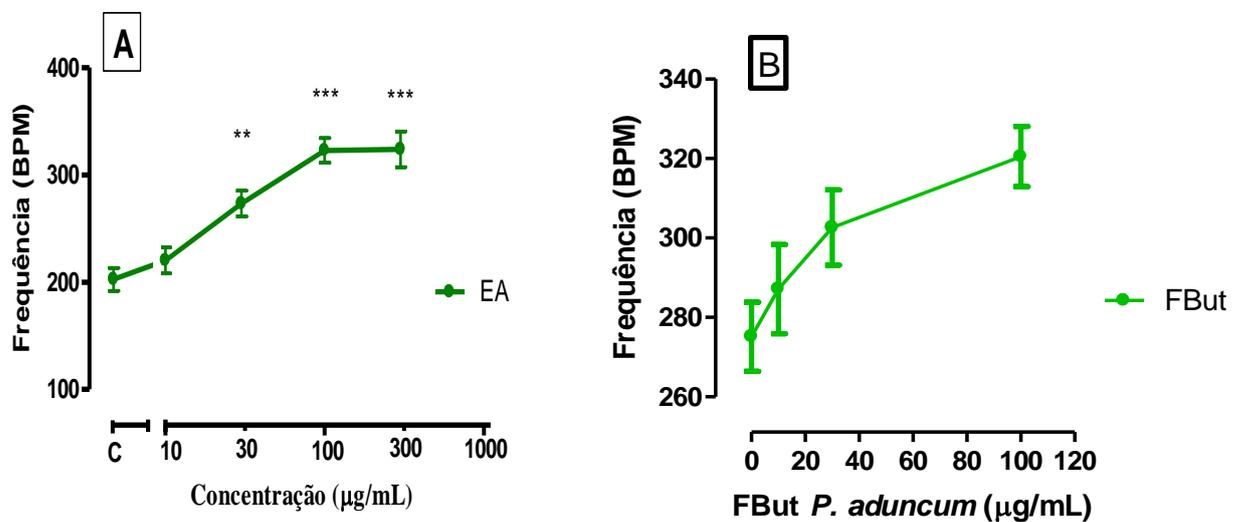


Figura 18 – (A) Efeito do EA (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) e da (B) FBut (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) de *P. aduncum* na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. BPM = batimentos por minuto. Dados em (A) expressos como médias \pm erros padrão ($n = 6$), comparado ao controle (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett).

6.2.3.4 Efeito do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P.aduncum* em átrio esquerdo de rato

A incubação do EA (10 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumentou a força de contração basal do átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente de 3% para 44%. O efeito inotrópico do EA 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi inibido na presença de propranolol (10^{-6} M). A FBut teve efeito semelhante em concentrações 10 vezes menores (Figura 19).

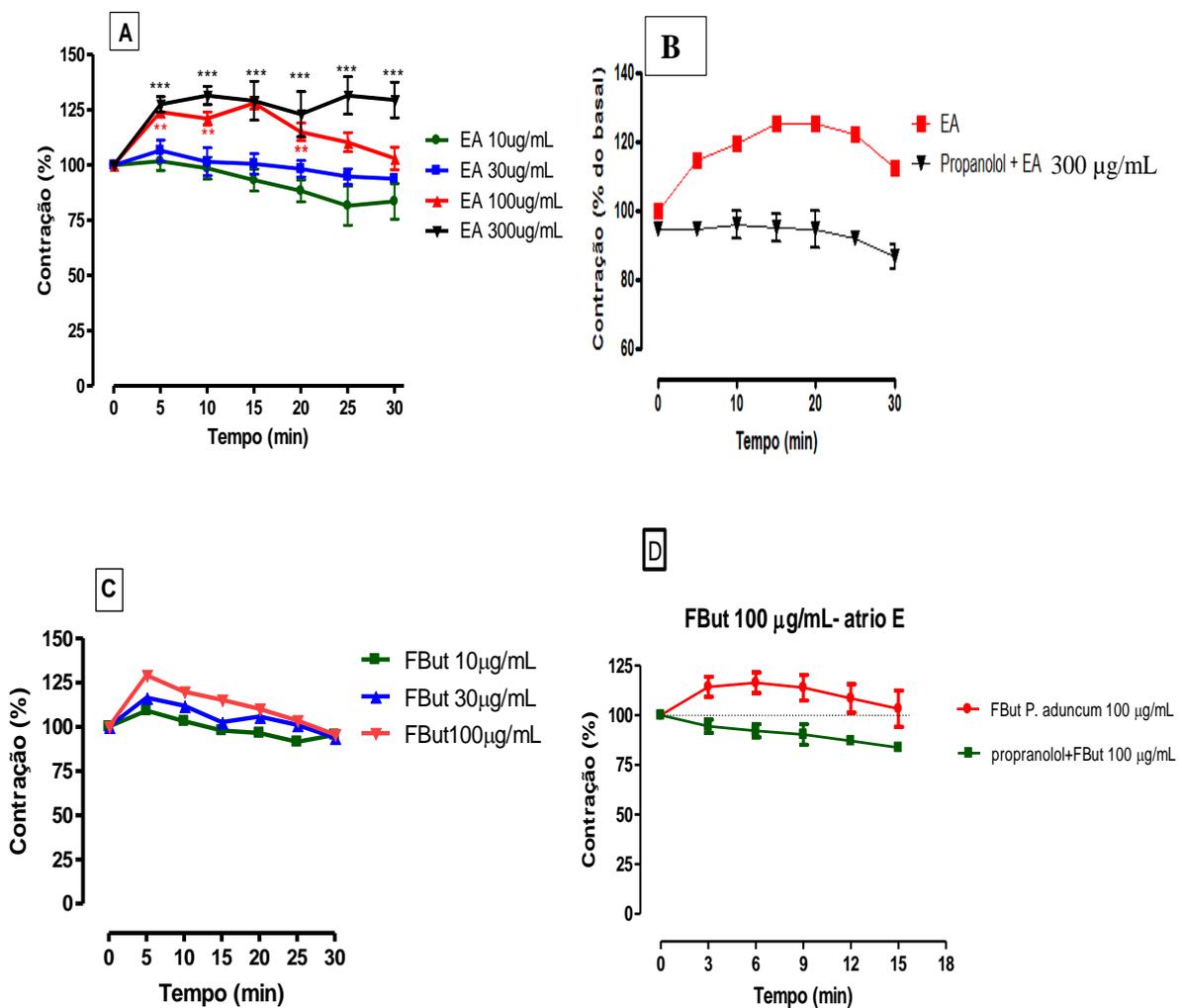


Figura 19 - Contração do átrio esquerdo de rato ao estímulo elétrico (1 Hz, 2 ms). (A) Efeito do EA (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Efeito do EA (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em condição controle e na presença do propranolol (10^{-6} M). (C) Efeito da FBut (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (D) Efeito da FBut (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em condição controle e na presença do propranolol (10^{-6} M). Os símbolos e barras representam as médias \pm erros padrão (n=4).

6.2.4 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na atividade da Ca^{2+} -ATPase (SERCA) de músculo esquelético

Para as medidas de inibição da atividade da Ca^{2+} -ATPase, a tapsigargina (0,01; 0,03; 0,1; 0,3; e 1,0 μM) foi utilizada como controle positivo e inibiu a Ca^{2+} -ATPase proporcionalmente às concentrações com IC_{50} igual a 0,18 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 min, não inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase (n=3 em triplicata) (Figura 20).

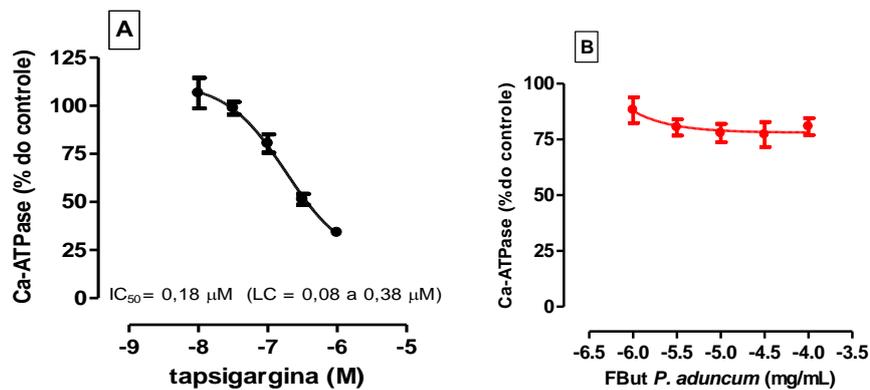


Figura 20 – Atividade da Ca^{2+} -ATPase obtida de músculo esquelético de coelho. (A) Controle positivo com tapsigargina, bloqueador específico da SERCA. (B) Efeito da FBut de *Piper aduncum* na atividade da Ca^{2+} -ATPase após 10 minutos de incubação a 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias \pm erros padrão (n=3 em triplicata).

6.2.5 Efeito da fração butanólica (FBut) de *P. aduncum* na concentração de cálcio citosólico livre em culturas primárias de útero e cardiomiócitos de rato

Em condições controle, o verapamil 100 μM inibiu o influxo e mobilização de íons cálcio estimulados pela adição de KCl 70 mM nas células uterinas e cardiomiócitos em cultura, de 45% e 50% respectivamente. Comparativamente, a incubação de FBut (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não alterou a concentração citosólica de cálcio medida após incubação de KCl 70 mM ($n=3$, em triplicata) (Figura 21).

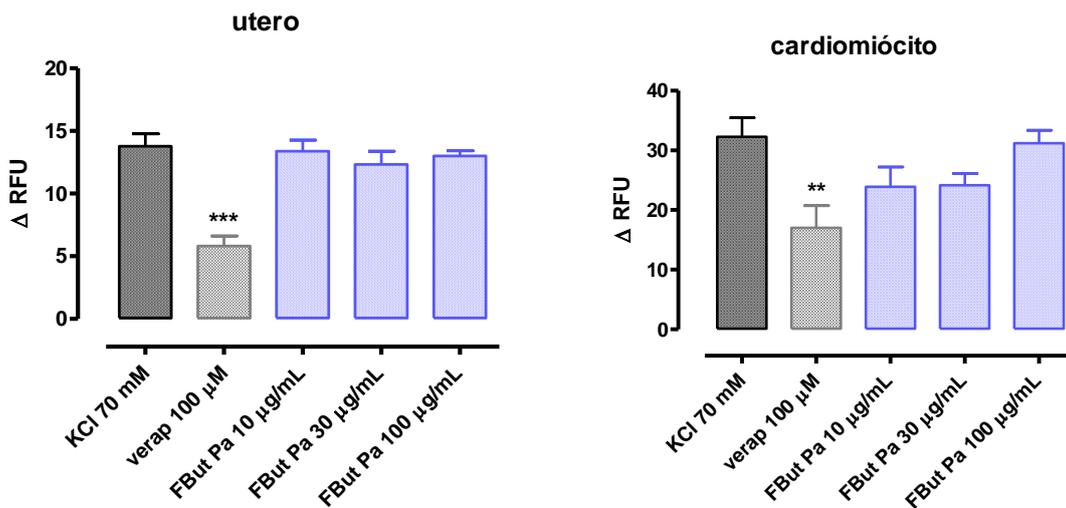


Figura 21 – Efeito da FBut (10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de *P. aduncum* na concentração de cálcio citosólico livre em células de útero mantidas em cultura (A), e em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (B). As colunas e barras representam as médias \pm erros padrão ($n = 3$, em triplicata). O KCl 70 mM foi utilizado para promover a abertura dos canais de cálcio e o verapamil (100 μM) como controle positivo de antagonista dos canais de cálcio tipo L.

7 DISCUSSÃO

A *Piper aduncum* L. é um semi-arbusto pertencente à família Piperaceae, predominantemente encontrada na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica onde é conhecida popularmente como “pimenta de macaco” e “aperta-ruão”, respectivamente. Habitualmente, a espécie prefere as clareiras e margens ensombradas dessas matas úmidas. Na Amazônia, apresenta rusticidade e elevada resistência às mudanças climáticas (ALMEIDA *et al*, 2009; SOUSA *et al*, 2008).

A planta em estudo foi coletada no Mini Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus, permitindo uma constante visualização do seu estado evolutivo, como desenvolvimento e floração. A localização foi propícia porque facilitou a obtenção de material para identificação e confecção da exsicata que foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Amazonas (HUAM).

Nesse trabalho, foram utilizadas as folhas secas trituradas. O pó submetido à extração aquosa a quente forneceu o extrato bruto (EA) de cor marrom escuro com rendimento de 15%. O EA foi inicialmente purificado através de partição com butanol como descrito por Tanae e al., (2007), originando a fração butanólica (FBut) com rendimento de 26% em relação ao EA; tanto o EA quanto a FBut foram solúveis em água, eliminando a necessidade de substâncias emulsificantes.

O estudo foi iniciado com a padronização do extrato realizada pela Dra. Mirtes Midori Tanae como pré-requisito para garantir a qualidade, segurança e repetitividade dos resultados fitoquímicos e terapêuticos.

A padronização da FBut em CLAE mostrou 9 picos principais com tempos de retenção de 2,9 a 28,9 min.. Comparativamente, o EA e a FBut em CLAE diferiram pela presença predominante no EA dos compostos polares eluídos nas primeiras frações e pela grande concentração dos demais compostos na FBut.

O estudo farmacológico do EA e das frações iniciou-se com a triagem da atividade farmacológica proposta por Irwin (1968), Malone e Robichaud (1962). Por meio da observação de comportamento e aspecto geral dos animais, verificamos que camundongos tratados com EA na dose de 1g/kg, v.o., não apresentaram efeitos que os diferenciavam dos animais controle tratados com água, talvez devido às barreiras biológicas desta via que impedem a absorção do extrato, apesar de ser a via mais comum utilizada na medicina popular. Sinais mais evidentes foram observados nos animais tratados com a FBut, na qual, a cromatografia mostrou, estavam 10-20 vezes mais concentrados os compostos de baixa e média polaridade extraídos das folhas com a infusão a quente. Mesmo assim, os efeitos observados foram poucos e de baixa intensidade, notadamente na deambulação reduzida dos animais que foram tratados com doses de FBut iguais às do EA injetadas por via intraperitoneal. Da comparação imediata dos efeitos verificou-se também que a eliminação dos bolos fecais foi menor nos tratados com FBut. Estes resultados indicaram que os extratos da planta podiam estar exercendo depressão pouco intensa do sistema nervoso central (sedação) e inibição da movimentação intestinal (ação relaxante muscular). Certamente a segurança do uso agudo era grande, pois a administração i.p. produzia efeitos de pequena intensidade e passageiros.

Os estudos de atividades específicas dos extratos foram iniciados com a comprovação do efeito relaxante do músculo liso intestinal. Os estudos *in vivo* mostraram que a velocidade do trânsito intestinal foi diminuída nos animais tratados por gavagem com o EA 1,0 g/kg. No mesmo sentido, o teste *in vitro* mostrou que o extrato semipurificado (FBut) inibiu o tônus e a motilidade do jejuno de rato. No entanto, a resposta do músculo intestinal à acetilcolina não foi alterada na presença da FBut. Esses dados indicaram que o relaxamento do músculo intestinal produzido pelos extratos da *Piper aduncum* deve ocorrer por mecanismo que não envolve bloqueio de receptores muscarínicos.

Para estudar o mecanismo da ação relaxante da musculatura lisa, outros músculos lisos foram estudados. O ducto deferente do rato (DDR) é um dos órgãos periféricos mais densamente inervados pelo sistema nervoso simpático (BATRA *et al*, 1974; FALCK *et al*, 1965). Porém, a inervação autonômica que chega ao ducto deferente é tanto de origem simpática como parassimpática (CAMPOS, 1988; DIXON *et al*, 1998; KALECZYC, 1998; KIHARA *et al*, 1998). A maior parte da inervação simpática do DDR dirige-se para as camadas circular e longitudinal de musculatura lisa (MAJCEN, 1984; WANIGASEKARA *et al*, 2003).

A inervação parassimpática do ducto deferente é bem menos densa, limitando-se às camadas mucosa e subepitelial. As fibras pré-ganglionares do parassimpático e do simpático dirigem-se aos plexos pélvicos onde fazem sinapse com suas fibras pós-ganglionares, as quais se dirigem ao ducto deferente (DIXON *et al*, 1998; KEAST, 1995).

Em nossos experimentos, ductos deferentes contraídos à incubação de noradrenalina na presença da FBut mostraram inibição de 35% da contração máxima, sem alteração da CE_{50} . Estes resultados, indicaram um antagonismo FBut-Nor do tipo não-competitivo, isto é, como as contrações do ducto à noradrenalina foram inibidas de forma não-competitiva, foi possível excluir uma ação bloqueadora tipo α -adrenérgica. Também não foi observada potenciação do efeito simpatomimético pela FBut, excluindo que uma ação agonista α -adrenérgica fosse o mecanismo de inibição da motilidade intestinal nos animais tratados com o EA.

A contração do músculo liso ativada pela interação da acetilcolina com receptores M3 (no músculo liso intestinal), ou pela noradrenalina em receptores α 1-adrenérgicos (nos vasos e órgão de inervação simpática), é mediada pela ativação de proteínas G_q , que também ativam a fosfolipase C (PLC) da membrana celular, catalizando a liberação de trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) (TORGNARINI; MOUDS, 1997). O IP_3 produzido provoca a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares dos retículos endo/sarcoplasmático, resultando

em aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Juntos, o complexo Ca^{2+} -calmodulina e o DAG ativam a proteína quinase C (PKC), que fosforila e ativa canais de cálcio de membrana. Com o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, ocorre a contração do músculo liso (WALSH *et al*, 1994).

Na preparação do DDR, a estimulação elétrica transmural induz resposta contrátil bifásica, composta por um componente inicial rápido (contração fásica) seguido por um componente mantido (contração tônica) (BURNSTOCK, 1995, 1997, 2002). Existe farta documentação mostrando que a contração fásica ocorre após ativação de P2x-purinorreceptores pós-sinápticos pelo ATP e contração tônica por ativação dos α_1 -adrenoceptores pós-sinápticos pela noradrenalina. O efeito inibitório observado na presença dos extratos da Piper poderia ser devido a competição entre FBut e noradrenalina pelos α_1 -adrenoceptores pós-sinápticos, ou por competição entre FBut e ATP pelos receptores pós-sinápticos P2x.

A primeira possibilidade foi testada nas contrações tônicas induzidas pela noradrenalina e nas contrações obtidas pelo estímulo elétrico do DDR. Nesta preparação, a FBut não alterou a EC_{50} das curvas cumulativas de noradrenalina, mas diminuiu de aproximadamente 30% o efeito máximo de contração produzido pela incubação do agonista. Este efeito é compatível com uma possível ação intracelular, pois a ação bloqueadora α -adrenérgica foi excluída, como discutido anteriormente. A inibição de aproximadamente 60% das contrações obtidas por estimulação elétrica do DDR seria compatível tanto com uma atividade anestésica local nas terminações simpáticas como com bloqueio de canais de cálcio do tipo L no músculo liso.

Assim como a noradrenalina, o efeito do co-transmissor ATP também foi inibido na presença da maior concentração de FBut testada (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mas as experiências com doses simples de ATP não permitiram comparar a EC_{50} na ausência e na presença das frações e não

excluíram a inibição da afinidade do ATP por receptores do tipo P₁-purinérgicos (BRAIN *et al*, 2001; BURNSTOCK, 2002). No entanto, a ação concomitante da FBut inibindo os efeitos da noradrenalina e do ATP no DDR, parece indicar uma ação inibitória por um mecanismo comum aos dois agonistas, como, por exemplo, inibindo o influxo de íons cálcio durante a estimulação celular.

O influxo e a mobilização de íons cálcio em células uterinas mantidas em cultura primária não foram alterados na presença da FBut. O método do Fura 4, utilizado para medir a concentração de cálcio intracelular, se baseia na ligação quantitativa de cálcio livre a um corante cuja fluorescência é emitida em comprimento de onda que permite eliminar da medida a fluorescência de fundo do corante e a interferência de organelas celulares não diretamente envolvidas no controle da concentração do íon. As células uterinas em cultura despolarizadas na presença de KCl 70mM abrem canais de cálcio operados pela polaridade da membrana celular (canais tipo L) que, uma vez abertos durante a despolarização, permitem o influxo de cálcio de acordo com seu gradiente de concentração. Esses canais de cálcio são bloqueados por verapamil e análogos que, em nossas experiências, funcionaram como controles positivos do teste. Os resultados mostraram que a incubação prévia de FBut não interferiu com o influxo de cálcio e com a concentração de cálcio livre no citoplasma após mobilização dos depósitos intracelulares. Com esses resultados, as possibilidades de explicar a ação inibitória dos extratos da Piper no músculo liso ficaram reduzidas à interferência dos extratos com a ativação ou inibição de segundo-mensageiros. Estes estudos moleculares ainda não foram iniciados porque exigem a purificação dos compostos ativos. Nesse sentido as esperanças residem na purificação final da fração F1 da FBut, que nos estudos preliminares foi a única a inibir as contrações do DDR estimulado eletricamente.

O estudo da ação dos extratos continuou com a avaliação dos efeitos no sistema cardiovascular. Indicações do uso popular nesse sentido apontavam para uma ação anti-hemorrágica por aplicação tópica em ferimentos e em hemorróidas.

De fato, a injeção endovenosa do EA em ratos anestesiados produziu hipertensão relacionada à dose. Este efeito não foi observado com a injeção da FBut.

A hipertensão produzida pelo EA foi bloqueada depois do tratamentoo prévio do animal com prazosin, um bloqueador de receptores α_1 -adrenérgicos. Depois do prazosin o efeito do EA foi invertido para hipotensão. Resultados semelhantes foram obtidos com a adrenalina em experiências conhecidas desde os primórdios da Farmacologia quando Dale (1945) descreveu a inversão do efeito da adrenalina em animal tratado com alcalóides do ergot. A adrenalina tem afinidades para receptores α e β -adrenérgicos nos vasos sanguíneos e no coração, responsáveis por vasoconstrição e taquicardia, respectivamente. A maior afinidade da adrenalina por receptores β_2 -adrenérgicos nos vasos da musculatura esquelética faz com que a vasodilatação ocorra com doses baixas, ou que preceda o efeito bifásico de doses intermediárias, mas que também pode ser secundária à ação predominante de doses maiores que induzem primordialmente hipertensão arterial. A noradrenalina não tem afinidade por receptores β_2 -adrenérgicos e não produz vasodilatação (WALLER, 1990).

Utilizando os dois agonistas e bloqueadores seletivos dos receptores adrenérgicos majoritários, os resultados mostraram que o EA da Piper produz hipertensão por ativação de receptores α_1 -adrenérgicos. Da mesma forma que a adrenalina, mas diferentemente da noradrenalina, o bloqueio α -adrenérgico inverteu a ação do EA que produziu vasodilatação e hipotensão arterial. Também à semelhança da adrenalina, o bloqueio β -adrenérgico com propranolol impediu a hipotensão que foi revertida para hipertensão. As evidências mostram, portanto, que o extrato de Piper contém adrenalina, ou produto com atividade idêntica,

responsável por vasoconstrição que pode interromper um sangramento, como mencionado no uso popular.

A atividade simpaticomimética dos extratos da *Piper aduncum* foi comprovada em preparações isoladas do coração de ratos. No átrio esquerdo isolado de rato, os extratos da Piper aumentaram a amplitude de contração. Este efeito foi bloqueado pelo propranolol (10^{-6} M), indicando ação inotrópica positiva mediada por receptores β_1 adrenérgicos. O aumento da frequência de batimentos do átrio direito reforça as evidências de um efeito simpatomimético produzido pelo EA e pela FBut.

Portanto, esses resultados indicam que a ação cardíaca do EA e FBut de *P. aduncum* parece ser mediada por uma ação simpatomimética, provavelmente por composto com atividade semelhante à adrenalina, como já descrito anteriormente em *Piper marginatum* JACQ (D'ÂNGELO *et al.*, 1997).

O inotropismo produzido pelo EA e FBut da *P. aduncum* poderia ser explicado na vigência de bloqueio da recaptção de cálcio pela SERCA (sarcoplasmic reticulum calcium ATPase) do retículo sarcoplasmático. (BAVENDIEK *et al.*, 1996; BERCHTOLD *et al.*, 2000). No entanto, a Ca^{2+} -ATPase extraída de músculo esquelético de coelho não foi inibida pela FBut.

8 CONCLUSÃO

Na Floresta Amazônica, a *Piper aduncum* L. (Piperaceae) é encontrada habitualmente nas clareiras e margens ensombradas destas matas úmidas, onde é conhecida como “pimenta de macaco” e utilizada popularmente como cicatrizante, antimalárica, nos tratamentos de hemorroida e dor de dente.

O material vegetal foi coletado no Mini Campus da UFAM, identificado e herbarizado (NH8705).

O liofilizado das folhas de *P. aduncum* foi utilizado nos ensaios farmacológicos (cardiovascular e musculatura lisa não vascular) e fitoquímicos (partição/butanólica) onde a padronização do EA foi pré-requisito para garantir a segurança dos resultados.

A padronização comparativa do EA e da FBut em CLAE mostrou que as frações diferiram pela presença predominante no EA dos compostos polares eluídos nas frações iniciais e pelas grandes concentrações dos demais compostos na FBut.

A administração oral (v.o) do EA (1g/kg) em camundongos, não produziu efeitos comportamentais diferentes daqueles apresentados pelos animais controle, tratados com o veículo água.

A FBut (200 e 500 mg/kg) administrada pela via intraperitoneal (i.p) inibiu a deambulação, diminuiu a eliminação dos bolos fecais e a atividade exploratória e sedação nas primeiras horas.

A velocidade do trânsito intestinal dos animais foi diminuída na dose 1g/kg de FBut pela via oral.

No jejuno isolado de rato a FBut (10, 30, 100 e 300 µg/mL) produziu diminuição do tônus basal e da motilidade em até 100% com a maior concentração, enquanto que a resposta do músculo intestinal à ACh (10^{-8} a 10^{-3} M) não foi alterada na presença da FBut (100 µg/mL).

O DDR contraído à incubação de NA (10^{-8} a 10^{-3} M) na presença da FBut (100 µg/mL) mostrou inibição de 35% da contração máxima sem alteração da CE_{50} .

Nas contrações tônicas induzidas pela NA e nas obtidas pelo estímulo elétrico do DDR, a FBut não alterou a EC_{50} das curvas de NA, mas diminuiu de $\pm 30\%$ o efeito máximo de contração produzido pelo agonista.

Na presença da FBut a estimulação elétrica do DDR foi reduzida em 60% da contração máxima.

No DDR, o efeito do ATP exógeno foi reduzido de 67% na presença da FBut (300 μ g/mL).

O influxo e a mobilização de cálcio em células uterinas e de cardiomiócitos de ratos (FURA-4) não foi alterado na presença da FBut.

A injeção endovenosa da NA (0,1; 0,3 e 1,0 μ g/mL) e do EA (1, 3 e 10 mg/mL) produziu hipertensão proporcional às doses utilizadas.

A administração prévia do prazosin (1 mg/kg, e.v) bloqueou a hipertensão induzida pela NA e inverteu o efeito do EA para hipotensão, a qual foi revertida para hipertensão na presença do propranolol.

A injeção endovenosa de ADR (0,1; 0,3 e 1,0 μ g/mL) produziu efeito bifásico (hipertensão e hipotensão) e o EA (1, 3 e 10 mg/mL) produziu hipertensão. Após a injeção do prazosin a ADR e o EA mostraram hipotensão, que foi revertida na presença do propranolol.

Neste trabalho foram estudadas as atividades do EA e da FBut no sistema cardiovascular e na musculatura lisa não vascular de ratos.

No átrio esquerdo isolado de rato, o EA (10, 30, 100 e 300 μ g/mL) e a FBut (10, 30, 100 μ g/mL) aumentaram a amplitude das contrações que foram bloqueadas pelo propranolol (10^{-6} M).

No átrio direto isolado de rato, o EA (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e a FBut (10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aumentaram a frequência dos batimentos cardíacos.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o EA apresentou ação simpatomimética, provavelmente por um composto semelhante à adrenalina e que a ação inibitória dos extratos da Piper no músculo liso dependem da purificação final da fração F1 da FBut.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. **Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil.** Rev. Bras. Farmacogn., v.17, p.114-140, 2007.

AHMAD, F. B.; TAWAN, C. **Phytochemical studies on *Piper umbellatum*.** ASEAN. Rev. Biodivers. Environ. Conserv.: ARBEC, p. 1-4, July/Sept. 2002.

ALMEIDA, R.R.P. et al. **Chemical Variation in *Piper aduncum* and Biological Properties of Its Dillapiole-Rich Essential Oil.** Chemistry & Biodiversity, v.6, p. 1427- 1433, 2009.

AMORIM, M. F. D. et al. Rev Bras Farmacogn. v.17, p. 448-454, 2007.

ARIAS, T.; POSADA, R.C.; BORNSTEIN, A. **New combinations in *Manekia*, an earlier name for *Sarcorrhachis* (Piperaceae).** v.16, p. 205-208, 2006.

ARZE, J.B.L. et al. **Essential oils from Bolivia.** VIII. Piperaceae: *Piper heterophyllum* Ruiz et Pavón, *P. aduncum* L. J. Ess. Oil Bearing-Pl., v. 11, p. 53, 2008.

BALDOQUI, D. C. et al. **New chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*.** Phytochemistry, v. 51, p.899-902, 1999.

BATISTA JR, J.M. et al. **Natural Chromenes and Chromene Derivatives as Potential Anti-trypanosomal Agents.** Biol. Pharm. Bull. ,v.31, n.3, p. 538—540, 2008.

BATRA, S.K. Sperm transport through vas deferens:review of hypotheses and suggestions for a quantitative model. Fert Steril. v.25, n.2: p186-202, 1974.

BAVENDIEK, U. et al. **Altered inotropism in the failing human myocardium.** Basic. Res. Cardiol, v.91, n. 2, p. 9-16, 1996.

BENNETT, B.C.; BAKER, M.A.; ANDRADE, P.G. **Ethnobotany of the Shuar of Eastern Ecuador.** New York: The New York Botanical Garden Press, p. 231, 2002.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. **Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*.** Phytochemistry, v. 52, n. 2, p.339-343, 1999.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. **Calcium signalling: Dynamics, Homeostasis and remodeling.** *Natural Biology*. v. 4, 2003.

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

BERCHTOLD, M.W.; BRINKMEIER, H.; MUNTENER, M. **Calcium ion in skeletal muscle: Its crucial role for muscle function, plasticity, and disease.** *Physiological Reviews*. v. 80, n.3, 2000.

BERNARD, C. et al. **Insecticidal defenses of Piperaceae from the Neotropics.** *J. Chem. Ecol.* v.21, p. 801 – 814, 1995.

BIN JANTAN, I. *et al.* **A comparative study of the essential oils of five Piper species from peninsular Malaysia.** *Flavour Fragr. J.*, v. 9, p.339, 1994.

BOOTMAN, M. D., BERRIDGE, M. J.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr. Biol.* **12**, R563–R565 (2002).

BORTOLOTTO, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. *Rev Bras Hipertens* vol.16(4):215-220, 2009.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 2488-54, 1976.

BRAIN, K.L *et al.* **Nicotine induces calcium spikes in single nerve terminal varicosities: a role for intracellular calcium stores.** *Neurosci.* v2, p. 395-403, 2001.

BRANDÃO, M. G. L.; COSENZA, G. P.; MOREIRA, R. A.; MONTE-MOR, R. L. M. **Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia.** *Rev. Bras. Farmacogn.* v.16, p. 408-420, 2006.

BRANDÃO, M. G. L. et al. **Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia.** *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 18, p. 127-134, 2008.

BURNSTOCK, G. Noradrenaline and ATP: Cotransmitters and Neuromodulators. *J Physiol Pharmacol.* v.46, n.4, p. 365-384, 1995.

BURNSTOCK, G. The past present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacol.* v.36, n.9, p. 1127-3, 1997.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Art Thromb Vasc Biol.* ed 22, v 3: p. 364-73, 2002.

BURNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Vas deferens: A model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends in Pharmacological Sciences.* v. 31, n. 3, p.131-139, 2010.

CAMBRIDGE, D.; DARVEY, M.J.; MASSINGHAM. **Prazosin, a selective antagonist of post-synaptic alpha-adrenoceptors.** *Br J Pharmacol.* ed 59, v 3, p 514–515, 1977.

CAMPOS, H.A. **A possible crossed histamine-containing path way adjacent to the sympathetic system of the rat vas deferens.** *J Pharmacol Exp Ther;* v. 244, n..3, p. 1121-7, 1998.

COIMBRA, R. *Notas de Fitoterapia*, 2. ed. Belém: CEJUP, p. 53, 1958.

COLLIER, M.L.; WANG, Ji, Y.-X.; KOTLIKOFF, M.I. **Calcium-induced Calcium Release in Smooth Muscle**. *J. Gen. Physiol.* v. 115, p. 653-662, 2000.

CORREA, M.P. *Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.* Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro Florestal, v. 1, p.138, 1984.

COSTANZO, L. S: *Fisiologia.* 4 ed.. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

DAHLGREN, R. M. T. **A revised system of classification of the angiosperms.** *Bot. J. Linn Soc,* v. 80, p.91-124, 1980.

D'ÂNGELO, L.C.A. Estudo farmacológico do “Malvaíco de Pernambuco”, *Piper marginatum* JACQ. Utilizado popularmente como antiinflamatório. 101f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Escola Paulista de Medicina, 1992.

DANGELO, L.C.A.; SOUCCAR, C. Pharmacology of *Piper marginatum* Jacq. A folk medicinal plant used as an analgesic, anti-inflammatory and hemostatic. *Phytomedicine*. v.4 n.1, p.33-40, 1997.

DE MORAIS, M.S. et al. **Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species**. *Biochem. Syst. Ecol.* v.35, p. 670, 2007.

DILLON, P. F.; AKSOY, M. O.; DRISKA, S. P.; MURPHY, R. A. **Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle**. *Science*, v. 211, n. 4481, p 495-497, 1981.

DIXON, J.S.; JEN, P.Y.; GOSLING, J.A. Structure and autonomic innervation of the human vas deferens: a review. *Microsc Res Tech*; v.42, n.6, p. 423-32, 1998.

DOCHERTY, J. R. **Subtypes of functional α_1 e α_2 adrenoceptors** (Review). *European Journal of Pharmacology*. v. 361. p1-15, 1998.

ESTRELA, J.L.V. et al. **Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais***. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 41, p. 217-222, 2006.

FALCK, B.; OWMAN, C.; SJÖSTRAND, N.O. Peripherally located adrenergic neurons innervating the vas deferens and the seminal vesicle of the guinea-pig. *Experientia*; v.15, n. 21, p.98-100, 1965.

FAZOLIN, M. et al. **Toxicity of *Piper aduncum* oil to adults of *Cerotoma tingomarianus* Bechyné (Coleoptera: Chrysomelidae)**. *Neotrop. Entomol.*, v. 34, n. 3, p. 484-489, 2005.

FILHO, J.M.; **Choque-Aspectos históricos**. *Socerj*. v. 14, p. 19, 2001.

FLORES, N et al. **Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their antiparasitic activity**. *J Nat Prod*, v. 71, p.1538, 2008.

FRANCIS J.K. *Piper aduncum* L. San Juan: INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL FORESTRY-UNIVERSITY OF PUERTO RICO. 3 p, 2003.

GOTTLIEB, O.R.M. et al. **Óleos essenciais da Amazônia VII**. *Acta Amazon*. v. 11, p.143-148, 1981.

GUERRINI, A., Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v. 27, p. 39–48, 2009.

GUIMARÃES, E.F.; ICHASO, C.L.; COSTA, C.G. Piperáceas 1. Ottonia, 2. Sarcorrhachis, 3. Potomorphe. In: R. Reitz (ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, p. 4-16, 1978.

HARTSHORNE, D. J.; ICHIKAWA, K.; ITO, M. ; NAKANO, T. **In Molecular Mechanisms and Their Disorder in Smooth Muscle Contraction**. Lands Bioscience, Austin, TX, USA, p. 31-46, 1999.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

IRWIN, S. **Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiological state of the mouse**. *Psychopharmacologia (Berl.)*, v.13, n. 03, p. 222-257, sep.1968.

JANTAN, I.; RAFI, I. A. A.; JALIL, J. **Platelet-activating factor (PAF) receptor-binding antagonist activity of Malaysian medicinal plants**. *Phytomedicine*, v.12, p. 88-92, 2005.

JARAMILLO, M. S.; MANOS, P. S. **Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae)**. *American Journal of Botany*, n. 88, p.706-716, 2001.

JENNETT-SIEMS, K. et al. **In vitro antiplasmodial activity of Central American Medicinal Plants**. *Tropical Medicine and International Health*. v. 4, n.9, p.611-615, 1999.

KALECZYC, J. Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microsc Res Tech*; v.42, n.6, p.409-22, 1998.

KIHARA, K.; SATO, K.; ISHIZAKA, K.; OSHIMA, H. Preservation of ejaculatory function by reconstruction of the canine hypogastric nerve. *J Neurosurg*; v.88, n.4, p.726-33, 1998.

KEAST, J.R. **Visualization and immunohistochemical characterization of sympathetic and parasympathetic neurons in the male rat major pelvic ganglion**. *Neuroscience*. v.66 n.3, p. 655-662, 1995.

KOKOSKA, L. et al. **Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District.** Journal of Ethnopharmacology, v. 99, p. 309-312, 2005.

KOSK-KOSICKA, D. Measurement of Ca²⁺-ATPase activity (in PMCA and SERCA1). Methods in Molecular Biology. Calcium Signaling Protocols. Totowa, NJ: Humana Press, v. 114, p. 343-354, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m333x257w8523148/section=93624&Page=1&1ocus=84>>. Acesso em 12 de junho de 2011.

LAPA, A.J., et al. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais. Ed. Lagoa. Porto Alegre – RS, p. 119, 2003.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas. Instituto Plantarum. p. 378, 2002.

LUKAS, T. J.; MIRZOEVA, S.; WATTERSON, D. M. **In Calmodulin and Signal Transduction** (VAN ELDIK, L. J.; WATTERSON, D. M., eds.) Academic Press, London-New York, p. 65-168, 1998.

LUSTOSA, F.L.F.; OLIVEIRA, S.C.C.; ROMERO, L.A. Efeito Alelopático de Extrato Aquoso de *Piper aduncum* L. e *Piper tectoniifolium* Kunth na Germinação e Crescimento de *Lactuca sativa* L. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 849-851, 2007.

MAIA, J. G. S; et al. **Constituents of the essencial oil of *Piper aduncum* L. growing in the Amazon Region**, J. Flavour Frag. v. 13, p.269-272, 1998.

MA, J. et al. **DNAdamaging oxoaporphine alkaloid from *Piper caninum***. J. Nat. Prod., v. 67, n. 7, p. 1162-1164, 2004.

MAJCEN, Z. Cholinesterases and choline acetyltransferase in the ductus deferens of the guinea-pig. Histochemistry;v.81, n.2, p.195-9, 1984.

MEDEIROS, E.S.; GUIMARÃES, E.F. **Piperaceae do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.** Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, n.25, p. 227-252, 2007.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C. **A hippocratic screen for pure or crude drug materiais.** Lloydia, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MEZ-MANGOLD, L. *Imagens da história dos medicamentos*. 1.ed. Basileia: Roche, 1971. 175p.

MORANDIM, A. A. Estudo químico, biológico e biossintético em *Piper aduncum* L. (Piperaceae). 192f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Araraquara, 2004.

Murakami, S. et al. **Inhibition of gastric H⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by quercetin.** *J Enzyme Inhib* v.5, p.293–298, 1992.

NAJIB NIK A RAHMAN, N. et al. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 64, n.3, p. 249-254, 1999.

NAVICKIENE, H. M. D *et al.* **Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*.** *Quim. Nova*, v. 29, n. 3, p.467-470, 2006.

ORJALA, J. et al. **Two chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*.** *Phytochemistry*, v.34, p. 813-818, 1993.

ORJALA, J. et al. **Aduncamide, A cytotoxic and Antibacterial β - Phenylethylamine-derived amide from *Piper aduncum*.** *Nat. Prod. Lett.*, v.2, p. 231 – 236, 1993.

OKUNADE, A. L. et al. **Antimicrobial Properties of the Constituents of *Piper aduncum*.** *Phytother. Res.*, v.11, p.142-144, 1997.

PAIVA, T.B.; FARIAS, N.C. **Mecanismos da contração do músculo liso vascular.** *Lloydia*, v. 12, n.2, p. 89-92, 2005.

PARK, I.K. et al. **Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species.** *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v.50, n.7, p.1896-1870, 2002.

PARMAR, V, S. et al. **Phytochemistry of the genus *Piper*.** *Phytochemistry*, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PFITZER, G. Invited review: **regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle.** *J. Appl. Physiol*, v. 91, n. 1, p. 497-503, 2001.

PINO, J.A. et al. ***Piper aduncum* L.: planta pluripotente e fonte de substancias fitoquímicas importantes.** J. Ess. Oil Res. v.16, p.124, 2004.

POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.S.; MAUSE, A. ***Piper aduncum* L.: Planta Pluripotente e fonte de substâncias fitoquímicas importantes.** Revista fitos, v.2, n.1, p.7- 18, 2006.

PORTET, B., FABRE, N., ROUMY, V., GORNITZKA, H., BOURDY, G., CHEVALLEY, S., SAUVAIN, M., VALENTIN, A., MOULIS, C., 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* 68, 1312–1320.

QUEZADA, F. et.al. *Biotechnology para el uso sostenible de la biodiversidad-capacidades locales y mercados potenciales*, Caracas, Venezuela, 2005.

RAFAEL, M.S. et al. Potential control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with *Piper aduncum* L. (Piperaceae) extracts demonstrated by chromosomal biomarkers and toxic effects on interphase nuclei. *Genetics and Molecular Research*. v 7, n 3:p. 772-781, 2008.

RALI, T. et al. **Volatile constituents of *Piper aduncum* and *Piper gibbilimum* C.DC (Piperaceae) from Papua New Guinea.** *Molecules*, v. 12, p.389–394, 2007.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. WHO. *Traditional medicines situation: global situation, issues and challenges*. Genera, 3 ed., 2011.

RUKACHAISIRIKUL, T.; et al. **Bornyl piperate, a new monoterpene ester from *Piper aff. pedicellatum* roots.** *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, n. 6, p. 760-761, 2004a.

RUKACHAISIRIKUL, T., et al. **Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 93, n. 2-3, p. 173-176, 2004b.

SALOMÃO, J.A.S. ; SALOMÃO, J.I.S.. *Manual ilustrado de anestesiologia*. São Paulo: Rolet Editorial, 1996.

SENGUPTA, S.; RAY, A. B. **The chemistry of *Piper* species: a review.** *Fitoterapia*, v.63, n.3, p.147-166, 1987.

SAMS-DODD, F. Target-based drug discovery: is something wrong? Review article. *Lindsay Drug Discovery Today*. v.10, n.2, p.139-147, jun., 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SMITH, R.M.; KASSIM, H. **The essential oil of *Piper aduncum* from Fiji**. *N. Z. J. Sci.* v.22, p.127-128, 1979.

SOUSA, P. J. C. et al. **Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L.** *Rev. bras. farmacognosia*. v.18, n.2, p. 217-221, 2008.

SUNG-EUN LEE, S.E. **Mosquito Larvicidal activity of piperoline, a piperidine alkaloid derived from long pepper, *Piper longum***. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v.16, n.3, p. 245-247, 2000.

TANAE, M.M. et al. **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.

TAVARES. A; PLAVNIK, F. L. Inibidores do sistema simpático. *HiperAtivo*. v. 5, n 2, p. 91-96, 1998.

TORGNARINI, D.P.; MOUNDS, R.F.W. Intracellular Ca^{2+} and contractile responses to α_1 -adrenoceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. *European Journal of Ethnopharmacology*, v.322, n.1, p.31-36, 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00142999>>. Acesso em: 18 janeiro de 2012.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. **The selective effect of 29, 69-dihydroxy-49-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis***. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.43, p.1234-1241, 1999.

YUNCKER, T.G. **The Piperaceae – family profile**. *Brittonia*, v.10, p.1-7, 1958.

YUNCKER, T.G. *The Piperaceae of Brazil – I. Piper, groups I, II, III e IV*. *Hoehnea*, São Paulo, v.2, 1972.

YANG, Y.C., et al. **A piperidine amide extracted from *Piper longum* L. fruit shows activity *Aedes aegypti* mosquito larvae.** Journal of Agricultural Food Chemistry. v.50, p.3765-3767, 2002.

VALADEAU, C. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. Journal of Ethnopharmacology.v.123, p. 413–422, 2009.

VIDAL, J. et al. **Efecto tóxico de *Argemone subfusiformis* Ownb. y *Tagetes patula* Link sobre larvas del IV estadio y pupas de *Aedes aegypti* L.** Rev. peru biol., Lima, v.15, n.2, 2008.

VILA, R. et al. **Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*.** Flavour Frag. J.,v. 20, p. 67–69, 2005.

VOROTNIKOV, A.V; KRYMSKY, M. A; SHIRINSKY, V. P. **Signal Transduction and Protein Phosphorylation in Smooth Muscle Contraction.** Biochemistry . v. 67, n.12, 2002.

WALLER, D.G.B. **Adrenoceptor partial agonists: a renaissance in cardiovascular therapy?** Br. J. Clin. Pharmac. v.30, p. 157-171, 1990.

WANIGASEKARA, Y.; KEPPER, M.E.; KEAST, J.R. **Immunohistochemical characterization of pelvic autonomic ganglia in male mice.** Cell Tissue Res: v. 311, n.2, p.175-85, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bulletin of the WHO. The World Medicines situation. Global situation, Issues and challenges, Geneva, 2011.

WYNNE, B.N. et al. **Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1.** J Am Soc Hypertens. v.3, n 2, p. 84–95, 2010.