



UFAM

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

Farmacologia da *Cecropia sciadophylla* Mart. Nativa da Amazônia: Efeitos Antiúlcera Gástrica e na Musculatura Esquelética Correlacionados com a Atividade da H⁺, K⁺-ATPase e da Ca⁺²-ATPase.

LUCINEI ALVES MACIEL

MANAUS
2010



UFAM

Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

**Farmacologia da *Cecropia sciadophylla* Mart. Nativa da
Amazônia: Efeitos Antiúlcera Gástrica e na Musculatura
Esquelética Correlacionados com a Atividade da H⁺, K⁺-ATPase e
da Ca⁺²-ATPase.**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Lapa

MANAUS
2010

LUCINEI ALVES MACIEL

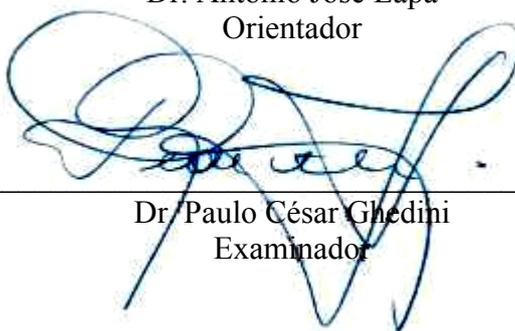
Farmacologia da *Cecropia sciadophylla* Mart. Nativa da Amazônia: Efeitos Antiúlcera Gástrica e na Musculatura Esquelética Correlacionados com a Atividade da H^+ , K^+ -ATPase e da Ca^{+2} -ATPase.

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

Aprovado pela Comissão avaliadora no dia 30 de novembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antônio José Lapa
Orientador



Dr. Paulo César Ghedini
Examinador

Dr. Fábio Tonissi Moroni
Examinador

Este trabalho, dedico:

À minha mãe *Maria Lúcia Miquelito*, por nunca me deixar desistir de meus sonhos. À minha esposa, *Zenaide Aparecida Figueiredo* pela compreensão e apoio incondicional em todos os momentos.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Amazonas.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia.

À Fundação Amazônica de Defesa da Biosfera.

Ao Professor Dr. Antônio José Lapa, pela orientação, amizade e abrir novos caminhos em minha vida profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela qualidade das disciplinas ministradas.

Aos funcionários e amigos do Setor de Produtos Naturais do Departamento de farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, pelos ensinamentos e oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

À equipe do biotério pela amizade, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelo auxílio técnico e zelo pelos animais.

A todos os técnicos do Laboratório de Farmacologia do CBA, pela amizade, paciência e momentos de alegria, tornando mais leve o ambiente de trabalho.

Aos verdadeiros amigos do Laboratório de Farmacologia do CBA e aos que seguiram outros rumos, por fazerem com que todo esse período pudesse ser muito mais agradável.

A todos na minha família que, mesmo à distância, sempre me apoiaram.

Às pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a concretização de mais esta etapa de minha formação.

Meus sinceros agradecimentos.

*Nenhum conhecimento tem
valor se não for transmitido,
difundido e compartilhado. Quem
reparte o conhecimento com as
outras pessoas, não divide, soma!*
André Prado

RESUMO

Espécies do gênero *Cecropia* conhecidas como embaúba, são usadas na medicina popular para pressão alta, bronquite, úlcera, diabetes, artrite e outras afecções endêmicas regionais. Alguns autores mencionam atividade antimalárica de algumas espécies. Com o objetivo de comparar a atividade de uma espécie amazônica sem estudo farmacológico anterior, o presente trabalho descreve a *Cecropia sciadophylla* Mart, sua coleta e extração, o critério de padronização química e purificação do extrato aquoso (EA) das folhas. A obtenção da fração butanólica (FBut) semi-purificada e a farmacologia desses extratos, enfatizando as ações no sistema nervoso central, a ação antinociceptiva, a ação pressórica, a ação muscular e a atividade gastrointestinal também são descritos neste trabalho. O chá das folhas a 2,5% (EA) particionado com n-butanol originou a FBut mais estável, concentrada e ativa, conservando o mesmo perfil cromatográfico em CLAE. Da FBut foram isoladas 26 frações com tempos de retenção bem definidos que foram preparadas para estudos moleculares futuros. Alguns compostos já foram identificados: catequina, quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo e 2"-O-ramnosilvitexina. A triagem farmacológica geral dos extratos em camundongos evidenciou hiperatividade e aumento da motricidade, não descritas com outras espécies de *Cecropia*, mas o efeito tipo-antidepressivo detectado foi comum às demais. As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória foram pouco consistentes, talvez em vista da ação estimulante central. A injeção endovenosa de FBut produziu hipotensão sem interferir com a ação da noradrenalina ou com a atividade cardíaca. *In vitro* a FBut relaxou o tônus induzido por noradrenalina apenas na aorta com endotélio íntegro, indicando ação vasodilatadora dependente da síntese de óxido nítrico. O tratamento prévio de ratos com FBut protegeu a mucosa gástrica contra úlceras por stress e as produzidas por etanol; este efeito foi correlacionado com diminuição da acidez livre da secreção gástrica e com inibição *in vitro* da atividade da H^+ , K^+ -ATPase da mucosa gástrica de suíno. No músculo diafragma de roedores, a FBut potencializou a contração ao estímulo direto da fibra muscular; este efeito foi correlacionado com a inibição da Ca^{+2} -ATPase extraída de músculo esquelético de coelho, mas não à inibição da acetilcolinesterase.

Palavras-chave: *Cecropia sciadophylla*; H^+ , K^+ -ATPase; Ca^{+2} -ATPase

ABSTRACT

Species of the genus *Cecropia* known as embaúba, are used in the folk medicine to treat hypertension, bronchitis, gastric ulcer, diabetes, arthritis and other regional endemic affections. Several authors have mentioned the anti-malarial activity of some species. With the aim to compare the activity of an Amazonian species without previous pharmacological study, the present work describes the *Cecropia sciadophylla* Mart, its collect and extraction, the chemical standardization criteria and the purification of the leaves aqueous extract (AE). The obtention of the semi-purified buthanolic fraction (BuF) and the pharmacological effects of these extracts, emphasizing the actions in the central nervous system, the antinociceptive effect, the action in the arterial blood pressure, the muscular action and the gastrointestinal activity are also described in this work. Partition of the aqueous extract of the leaves 2,5% (AE) with n-butanol originated the BuF, more stable, more concentrated and more active, with the same chromatographic fingerprint of AE in the HPLC. For future molecular studies, 26 fractions with well defined retention times were isolated from BuF; some of them were already identified: catechin, quercetin-3-O- β -glucopyranoside and 2'' -O-ramnosilvitexin. The general pharmacological screening of the extracts in mice showed hyperactivity and increased motricity, not described in other *Cecropia* species, but the anti-depressive effect was common to the others. The antinociceptive and the anti-inflammatory effects were poorly consistent, perhaps by the central stimulating activity. The intravenous injection of BuF produced hypotension without interfering with the noradrenalin action or with the cardiac activity. *In vitro*, the BuF relaxed the adrenergic tonus only in the intact endothelium aortic rings, indicating vasodilatory action dependent on the NO synthesis. Previous treatment of rats with the BuF protected the gastric mucosal against cold stress- and ethanol-induced ulcers; this effect was correlated with the reduction of the gastric secretion acidity and the *in vitro* inhibition of the H⁺, K⁺-ATPase activity. In rodents isolated diaphragm, the BuF potentiated the direct elicited twitches of the muscle fiber; this effect was correlated to the inhibition of the Ca⁺²-ATPase activity, but not by the acetylcholinesterase inhibition.

Keywords: *Cecropia sciadophylla*; H⁺. K⁺-ATPase; Ca⁺²-ATPase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos isolados da <i>C. glaziovii</i> Sneth por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	29
Figura 2 - Acoplamento excitação-contração do músculo esquelético	38
Figura 3 – Imagem de satélite mostrando área urbana de Manaus-AM, com representação de marcação em GPS do local de coleta.	47
Figura 4 - Fluxograma da obtenção do extrato aquoso (EA) e fracionamento da fração butanólica (FBut) de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.....	53
Figura 5 - Cromatografia em camada delgada: Revelação em lâmpada de luz Ultravioleta 330 nm.....	55
Figura 6 - Perfil cromatográfico da FBut de <i>C. sciadophylla</i> em CLAE preparativa.....	56
Figura 7 - Perfis cromatográficos evidenciando as 26 frações isoladas da FBut de <i>C. sciadophylla</i> em CLAE analítica.....	58
Figura 8 - Estruturas químicas de compostos isolados e identificados da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i>	60
Figura 9 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no tempo de permanência sobre a barra no teste do Rota rod com camundongos.	89
Figura 10 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no número de cruzamentos no teste do campo aberto em camundongos..	90
Figura 11 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no tempo de permanência de camundongos no centro do campo aberto.....	90

Figura 12 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no teste do campo aberto em camundongos, mostrando o número de autolimpezas.	91
Figura 13 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no teste do campo aberto em camundongos, mostrando o numero de levantares.....	91
Figura 14 - Efeito do extrato aquoso de <i>C. sciadophylla</i> no teste do sono induzido por pentobarbital em camundongos	92
Figura 15 - Efeito do extrato aquoso de <i>C. sciadophylla</i> no sono induzido por éter etílico em camundongos	93
Figura 16 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no tempo de latência para imobilidade e no tempo total de imobilidade no teste de suspensão pela cauda em camundongos.	94
Figura 17 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no tempo de latência para imobilidade e no tempo total de imobilidade no teste de natação forçada em camundongos	95
Figura 18 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no teste da formalina em camundongos	96
Figura 19 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	97
Figura 20 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no número total de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos	98
Figura 21 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no teste da retirada da cauda em camundongos.	99

Figura 22 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> em camundongos no teste da placa quente	100
Figura 23 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no teste do edema de pata induzido por carragenina 2% em ratos.....	101
Figura 24 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no número total de leucócitos no lavado peritoneal em ratos.	102
Figura 25 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na pressão arterial de ratos anestesiados.....	103
Figura 26 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> nas respostas pressóricas à noradrenalina em ratos anestesiados	104
Figura 27 – Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no relaxamento de anéis de aorta de rato com e sem endotélio.....	105
Figura 28 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse a 4 °C - número de úlceras gástricas.	106
Figura 29 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse a 4 °C - índice de lesão gástrica	106
Figura 30 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a administração de etanol 75% - número de úlceras gástricas.....	107
Figura 31 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos à administração de etanol 75% - índice de lesão gástrica	108

Figura 32 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> no volume de secreção gástrica produzida pela mucosa de camundongos.....	109
Figura 33 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> sobre a acidez livre (pH) da secreção ácida gástrica produzida pela mucosa de camundongos.	110
Figura 34 - Efeito da fração butanólica <i>C. sciadophylla</i> sobre a acidez total (mEq[H ⁺]/L/4h) da secreção gástrica produzida pela mucosa de camundongos	110
Figura 35 - Efeito da fração butanólica <i>C. sciadophylla</i> sobre a atividade da enzima H ⁺ , K ⁺ -ATPase em relação à droga controle SCH 28080	111
Figura 36 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na contração do diafragma de rato sob estímulo direto.....	112
Figura 37 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na contração de diafragma de ratos sob estímulo indireto na presença de D-tubocurarina	113
Figura 38 - Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> na contração de diafragma de rato sob estímulo direto na presença de D-tubocurarina.....	113
Figura 39 - Efeito da fração butanólica <i>C. sciadophylla</i> sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em relação ao padrão neostigmina. Efeito da fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i> sobre a atividade da enzima Ca ⁺² -ATPase em relação ao padrão tapsigargina.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da triagem farmacológica no comportamento em camundongos tratados com o extrato aquoso de <i>C. sciadophylla</i>	87
Tabela 2 - Resultados da triagem farmacológica no comportamento em camundongos e testes específicos de atividade no sistema nervoso central em camundongos tratados com a fração butanólica de <i>C. sciadophylla</i>	88

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AT-1	Receptor de angiotensina 1
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK	Bradicinina
CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CLAE analit	Cromatografia líquida de alta eficiência analítica
CLAE Prep	Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
DHP	Dihidropiridina
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DZP	Diazepam
EA	Extrato aquoso
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	Fração aquosa
FBut	Fração butanólica
GMPc	Monofosfato cíclico de 3', 5' guanosina
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
IP3	Trifosfato de inositol
LC	Limite de confiança

LNV	Líquido nutritivo de vesícula
NO	Óxido nítrico
Nor	Noradrenalina
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Pressão arterial
PM	Peso molecular
PPT	Potencial de placa motora
RS	Retículo sarcoplasmático
RYR	Receptor de rianodina
SERCA	Do inglês “Sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium”
SNC	Sistema nervoso central
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. Introdução.....	22
2. Revisão de Literatura.....	30
2.1. Família Cecropiaceae	31
2.2. Cálcio e a fibra muscular esquelética	33
2.3. Junção neuromuscular	34
2.4. Retículo Sarcoplasmático	35
2.5. Acoplamento Excitação-Contração	36
2.6. ATPases tipo P	38
3. Objetivos.....	43
3.1. Objetivos Específicos	44
4. Material.....	45
4.1. Material Botânico	46
4.2. Animais.....	48
4.3. Material Químico.....	49
4.3.1. Solventes, reagentes e sais.....	49
4.3.2. Drogas.....	49
4.3.3. Soluções e reagentes.....	50
4.4. Obtenção do extrato aquoso e fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.	52

4.5. Análise cromatográfica do extrato.....	54
4.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos e frações da <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.....	54
4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-prep).....	55
4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica.....	57
4.6. Identificação química instrumental dos compostos isolados de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.....	59
4.6.1. Ressonância magnética nuclear.....	59
4.6.2. Espectrometria de Massas.....	59
4.6.3. Estruturas químicas das frações isoladas e identificadas de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart.....	59
5. Métodos.....	61
5.1. Métodos farmacológicos para avaliação da atividade do extrato aquoso e fração.....	62
5.1.1. Teste geral de atividade farmacológica – Teste Hipocrático.....	62
5.1.2. Avaliação da temperatura corporal.....	63
5.1.3. Teste do campo aberto.....	63
5.1.4. Avaliação do desempenho motor - Teste do Rota-rod.....	64
5.1.5. Avaliação do Sistema Nervoso Central.....	66
5.1.5.1. Teste do labirinto em cruz elevado.....	66
5.1.5.2. Teste da suspensão pela cauda.....	66
5.1.5.3. Teste do desespero comportamental – Natação forçada.....	67

5.1.5.4. Teste do sono induzido por barbitúrico	68
5.1.5.5. Teste do sono induzido por éter etílico.....	68
5.1.6. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. em ratos e camundongos	69
5.1.6.1. Teste da placa quente.....	69
5.1.6.2. Teste da retirada da cauda	69
5.1.6.3. Teste da formalina	70
5.1.6.4. Teste de contorções abdominais	70
5.1.7. Avaliação da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. na atividade anti-inflamatória.....	72
5.1.7.1. Edema induzido por injeção intra-plantar de carragenina	72
5.1.7.2. Peritonite induzida pela carragenina.....	72
5.1.8. Avaliação da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. no Sistema Cardiovascular.....	74
5.1.8.1. Registro da pressão arterial de ratos anestesiados	74
5.1.8.2. Preparação de anéis de aorta torácica de rato	74
5.1.9. Avaliação do extrato de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. na atividade anti-úlcero-gênica.....	76
5.1.9.1. Indução de lesões gástricas por estresse	76
5.1.9.2. Indução de lesões gástricas por etanol 75%	76
5.1.9.3. Avaliação da atividade anti-secretora ácida – Método da ligadura pilórica.....	77

5.1.10. Avaliação da atividade da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. na junção neuromuscular	78
5.1.10.1. Preparação nervo frênico - músculo diafragma de rato	78
5.1.11. Avaliação do efeito do extrato butanólico de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. na atividade das enzimas Acetilcolinesterase, Ca ⁺² -ATPase e H ⁺ ,K ⁺ -ATPase de mamífero.....	79
5.1.11.1. Isolamento da Ca ⁺² -ATPase	79
5.1.11.2. Determinação da atividade enzimática da Ca ⁺² -ATPase de mamífero.....	80
5.1.11.3. Isolamento de microssomas gástricos e da H ⁺ -K ⁺ -ATPase gástrica	80
5.1.11.4. Determinação da atividade enzimática da H ⁺ ,K ⁺ -ATPase de mamífero	81
5.1.11.5. Isolamento da acetilcolinesterase	82
5.1.11.6. Determinação da Atividade enzimática da acetilcolinesterase de mamífero.....	82
5.1.11.7. Determinação da concentração de proteínas	84
5.1.12. Análises Estatísticas	85
6. Resultados.....	86
6.1. Efeitos do extrato aquoso e fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> Mart. no sistema nervoso central.....	87
6.1.1. Teste geral de atividade farmacológica	87
6.1.2. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste do rota rod.....	89
6.1.3. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste do campo aberto	89

6.1.4. Efeito do extrato aquoso de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste do sono induzido por barbitúrico	92
6.1.5. Efeito do extrato aquoso de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste do sono induzido por éter etílico.....	93
6.1.6. Efeito do extrato aquoso de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste de suspensão pela cauda	94
6.1.7. Efeito do extrato aquoso de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste de natação forçada.....	95
6.2. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	96
6.2.1. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste da formalina	96
6.2.2. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1% em camundongos.....	97
6.2.3. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste da retirada da cauda.....	99
6.2.4. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste da placa quente	100
6.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	101
6.3.1. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste do edema de pata induzido por carragenina	101
6.3.2. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no teste de migração celular induzida por carragenina	102
6.4. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> no sistema cardiovascular de ratos	103
6.4.1. Registro da pressão arterial de ratos anestesiados	103

6.4.2. Preparação de anéis de aorta torácica de rato	104
6.5. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> em modelos de úlcera gástrica.....	105
6.5.1. Lesões gástricas por estresse	105
6.5.2. Indução de lesões gástricas por etanol 75%	107
6.5.3. Atividade da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> na secreção gástrica em camundongos.....	109
6.6. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> na atividade da H ⁺ , K ⁺ -ATPase de mamífero	111
6.7. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> na contração do músculo diafragma de rato	112
6.7.1. Preparação nervo frênico - músculo diafragma	112
6.8. Efeito da fração butanólica de <i>Cecropia sciadophylla</i> nas atividades das enzimas Ca ⁺² -ATPase e Acetilcolinesterase de mamífero	114
7. Discussão	115
8. Conclusão	125
9. Referências Bibliográficas.....	127

1. Introdução

As plantas medicinais, os extratos vegetais e seus análogos são boas fontes para a pesquisa de novos medicamentos. Estas substâncias ativas são em grande parte metabólitos secundários de plantas, e muitas, quando isoladas, podem tornar-se protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos. Moléculas bioativas podem ser desenvolvidas em drogas de grande relevância na área farmacêutica por processos de fracionamento e isolamento, seguido de síntese de análogos com base na modificação molecular (ITOKAWA *et al.*, 2008).

Observando o pequeno número de novos compostos que superam as etapas pré-clínicas e clínicas no desenvolvimento de medicamentos a síntese química de novas substâncias passou a exigir investimentos elevados demais. É possível entender a corrida das indústrias farmacêuticas multinacionais pela procura de novas substâncias bioativas de origem vegetal. Nos países onde a indústria farmacêutica se baseia na química sintética, nos últimos 25 anos, de 25 a 30 % dos novos medicamentos aprovados são de origem natural ou derivados de produtos naturais (VIEGAS Jr *et al.*, 2006; NEWMAN; CRAGG, 2007).

O Brasil é o país com a maior parte da floresta Amazônica no seu território nacional e conta com grande diversidade de plantas utilizadas no tratamento e prevenção de doenças endêmicas desta região pelas populações locais e de regiões vizinhas. A biodiversidade amazônica é propícia para estudos de plantas medicinais porque, estima-se, pelo menos 20% da biodiversidade mundial está nela concentrada (LEWINSOHN; PRADO, 2005). Desse manancial, as plantas vasculares da Floresta amazônica sempre foram as mais estudadas, mas poucas áreas foram exploradas botanicamente e a grande maioria das espécies continua sem qualquer estudo químico ou biológico, o que dificulta o conhecimento das espécies presentes e suas relações filogenéticas (RIBEIRO *et al.*, 1999). Diversos levantamentos etnobotânicos e bibliográficos sobre estas plantas já foram realizados, porém, até o presente momento,

nenhuma droga foi desenvolvida a partir dessa riqueza natural do país. Na Amazônia, as endemias se estabelecem nesse ecossistema que dá subsistência e proteção ao homem e aos vetores de propagação das doenças. É esperado que as comunidades recorram às práticas diversas para prevenir ou tratar essas enfermidades. O uso de plantas é muito comum e arraigado nessa medicina popular. No entanto, fora da concepção sócio-antropológica da comunidade de origem, o uso empírico e as informações assim originadas, podem ter importância e significados diferentes. A probabilidade dos sinais relacionados à prática terapêutica popular serem indicativos primários de uma ação farmacológica pouco definida, sentida apenas pelo usuário, é grande. Por isso a prática popular deve ser avaliada cientificamente antes da recomendação ou suporte oficial do uso, pois talvez os efeitos sejam desencadeados por algum comprometimento vital. As técnicas farmacodinâmicas modernas permitem esse estudo, já incorporado à maioria das normas éticas dos órgãos internacionais de vigilância e controle da saúde.

Grande parte da população dos países em desenvolvimento utiliza plantas medicinais no tratamento de doenças parasitárias. O desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos envolve custos muito elevados, desta forma, a triagem de extratos e moléculas de plantas, selecionadas a partir do conhecimento tradicional das populações, a medicina popular apresenta-se como estratégia promissora e menos dispendiosa (CALIXTO, 2000). Esforços para a procura de novas drogas para tratar malária são muito importantes, sobretudo em países como o Brasil onde ainda existem muitas áreas endêmicas. (KRETTLI *et. al.*, 2001).

A malária é a endemia mundial mais preocupante neste momento, seja por causa da incidência elevada, do insucesso momentâneo na obtenção de uma vacina eficaz (PIMENTEL *et al.*, 2007) ou do desenvolvimento crescente da resistência do plasmódio à maioria dos medicamentos conhecidos; portanto, é prioritário investir na obtenção de novos produtos com essa atividade, eficazes e baratos para serem acessíveis às populações de baixa renda.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde há entre 300 e 500 milhões de novos casos de malária no mundo todos os anos, principalmente na África, a Ásia, Ilhas do Pacífico Sul e América do Sul, que causam ao menos 3 milhões de mortes. A transmissão da malária no Brasil está essencialmente limitada aos Estados da região amazônica. As características geográficas determinam as maiores dificuldades na oferta de serviços de saúde, que, somado às difíceis condições de vida da população, favorecem a disseminação da malária (PAHO, 2008).

As principais drogas desenvolvidas para o tratamento de malária e usadas até o momento, incluem os derivados alcalóides da quina e artemisinina, que foram descobertos com base no uso tradicional e dados etnobotânicos (WEISNAR *et al.*, 2003). A resistência dos parasitos às drogas antimaláricas surge como um dos maiores desafios a se enfrentar para o controle da malária. Calcula-se que 62% dos casos de malária por *Plasmodium falciparum*, no mundo, apresentem algum perfil de resistência às drogas antimaláricas de uso habitual (KHAN, 2004; WHO, 2008)

Algumas drogas mostram seu efeito antimalárico prevenindo a polimerização de heme tóxico liberado durante proteólise da hemoglobina no vacúolo digestivo do Plasmódio (FRANCIS *et al.*, 1997). A polimerização de heme é uma reação de alongamento através de proteínas ricas em histidina. Evidências indicam que as quinolinas inibem a polimerização de heme que é liberado durante a degradação de hemoglobina (TRIPATHI *et al.*, 2004). Estudos com inibidores indicam um papel da cisteína proteases no Plasmódio que libertam o parasito dos eritrócitos do hospedeiro. A cisteína é necessária para o início de fases invasivas ao compartimento intracelular e sugere que processo semelhante ao mecanismo protease-dependente aconteça durante a saída do parasito do estágio hepático. (ALY; MATUSCHEWSKI, 2005).

Estudos com agonistas de receptores 5-HT apresentaram inibição de crescimento contra vários *P. falciparum* de diferentes fenótipos de resistência e seu efeito antimalárico é aditivo quando usado em combinação com cloroquina contra cloroquina isolada. Em um ensaio de "patch clamp" o agonista estudado bloqueou um canal de superfície de membrana, sugerindo que agonistas de receptores de serotonina são uma nova classe de antimaláricos com alvo nos canais de membrana (LOCHER *et al.*, 2003).

A atividade antiparasitária de alguns compostos foi relacionada a mecanismos de ação envolvendo canais iônicos, enzimas, receptores, sistemas transportadores além de mecanismos de sinalização intracelular. Por exemplo, a eficácia contra *Plasmodium falciparum* do ácido scopaldúlcico A, um diterpeno isolado de *Scoparia dulcis*, foi atribuída à inibição da bomba de próton da membrana plasmática do parasito (RIEL *et al.*, 2002a, 2002b). Existem evidências que ATPases de *Plasmodium falciparum* relacionadas com o transporte de cálcio no parasito humano (PfATPase4 e PfATPase6) guardam grande analogia com a Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático de mamíferos (BECKER; KIRK, 2004; DYER *et al.*, 1996; KIMURA *et al.*, 1993). Nesse sentido, o conhecimento de que vários mecanismos envolvidos na regulação do Ca^{+2} intracelular no *Plasmodium sp* assemelham-se aos mecanismos caracterizados em células de mamíferos, demonstram a importância da homeostase do Ca^{+2} na regulação e no crescimento do parasito, constituindo potenciais alvos de ação antiparasitária, onde o crescimento do parasito no eritrócito é inibido por vários ionóforos bloqueadores de canais de Ca^{+2} e por antagonistas de calmodulina (GARCIA, 1999).

As enzimas são importantes alvos moleculares para este estudo, pois são responsáveis por completar o ciclo de vida do parasito no hospedeiro. As ATPases são responsáveis pela manutenção do pH intracelular do vacúolo digestivo do plasmódio, transporte da membrana plasmática, regulam o potencial de membrana, entre outras funções (MARCHESINI *et al.*,

2005; GAZARINI *et al.*, 2007). Essas evidências indicam que o teste de atividade em preparações de H⁺, K⁺-ATPase gástrica pode ser indicativo de potencial eficácia antiparasitária. Dentre os potenciais alvos a serem considerados, os mecanismos reguladores do Ca⁺² intracelular, dentre eles a Ca⁺²-ATPase, têm importância crucial para os diferentes ciclos do parasito na célula hospedeira. Justifica-se, portanto, a identificação de compostos que possam discriminar alvos moleculares do hospedeiro daqueles essenciais à sobrevivência do parasito.

Na flora brasileira, as plantas medicinais são promissoras do ponto de vista farmacológico, mas são pouco conhecidas e estudadas. Com base em conhecimentos etnobotânicos, produtos são comercializados com fins terapêuticos sem que estudos sobre sua eficácia e segurança tenham sido feitos e comprovados (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Várias plantas utilizadas na medicina popular para tratar febre e malária revelaram atividade antimalárica em culturas de *P. falciparum*, algumas vezes confirmada *in vivo* em camundongos infectados com o *P. berghei* (KRETLI *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2004). Atividades análogas têm sido obtidas com terpenos, lignanas, chalconas, auronas, flavonóides, naftoquinonas e quinonas, a maioria *in vitro* (KAYSER *et al.*, 2003, ANDRADE-NETO *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Muitas plantas que foram consideradas sem atividade contra a malária, devido à ausência da atividade *in vitro* contra o Plasmodium podem ter outros mecanismos de ação ou mesmo serem utilizadas no tratamento de sintomas da malária (BOTSARIS, 2007).

Levantamentos etnobotânicos das espécies de plantas utilizadas no tratamento de febres em geral e com atividade antimalárica, especificamente, apresentam espécies do gênero *Cecropia* (MILLIKEN, 1997; BOTSARIS, 2007; ANDEL; WESTER, 2010).

Estudos do Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), órgão da Fundação Oswaldo Cruz sediado em Belo Horizonte, usam frações e moléculas de

plantas medicinais com intensa atividade antimalárica experimental em laboratório, com ênfase nas espécies *Bidens pilosa* (picão preto), *Cecropia sp* (embaúba), *Alomyia* (mata-pasto) e outras (KRETTLI, 1998).

Há muitas espécies próximas relacionadas de *Cecropia* (incluindo *C. sciadophylla*, *C. palmata*, *C. pachystachya*, *C. hololeuca* e *C. obtusifolia*) que podem ter localizações geográficas diferentes, contudo todas são similares na aparência, na composição química, e em uso medicinal tradicional. Plantas do gênero *Cecropia*, já foram parcialmente estudadas e apresentam constituintes com atividade inibidora da bomba de próton (SOUCCAR *et al.*, 2008) e/ou dos mecanismos reguladores do Ca^{+2} intracelular (LAPA *et al.*, 1999). Das espécies *Cecropia hololeuca* Miq., *C. pachystachya* Tréc., *C. glaziovii* Sneth. foram identificados principalmente catequinas, epicatequinas, procianidinas e flavonóides como, isoorientina, isovitexina e isoquercitrina (DELLA MONACHE *et al.*, 1998; LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; TANAE *et al.*, 2007a).

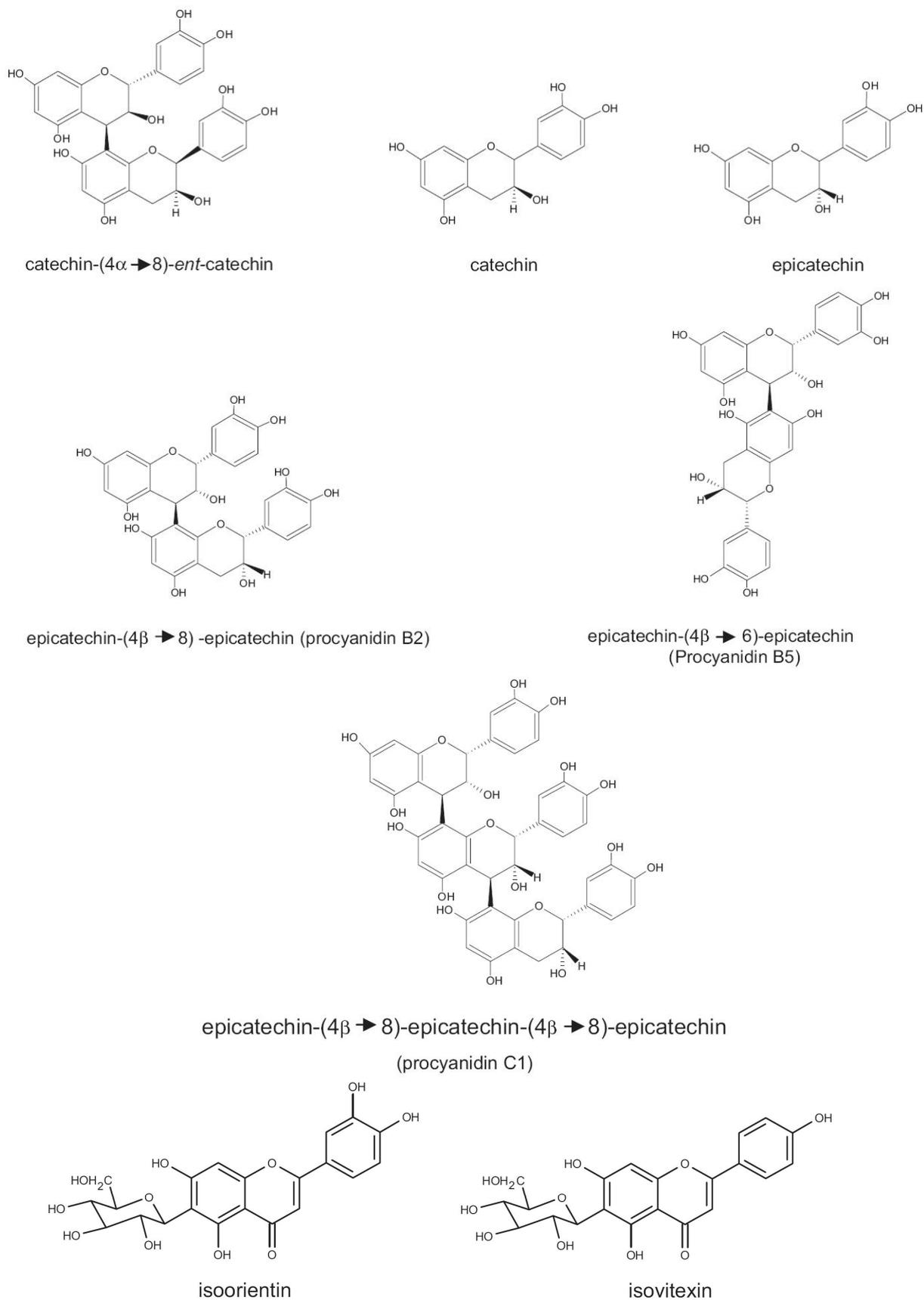


Figura 1 - Compostos isolados da *C. glaziovii* Sneath por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da fração butanólica obtida do extrato aquoso das folhas (Tanae *et al.*, 2007a)

2. Revisão de Literatura

2.1. Família Cecropiaceae

Conhecidas popularmente como embaúba, imbaúba, umbaúba e também árvore da preguiça por terem seus frutos e brotos apreciados por esse animal. São árvores leves atingindo de 4 a 12 metros, de folhas simples, lobuladas; com ramificação somente na altura superior do tronco. Apresentam nodos no tronco do tipo bambu, onde as formigas fazem os seus ninhos (mirmecófitas). Pouco exigentes quanto ao solo, são muito comuns em áreas desmatadas, em recuperação (RIBEIRO *et al.*, 1999)

Um importante papel ecológico desempenhado pelas cecropias é como plantas pioneiras que aparecem preferencialmente em espaços florestais com altos níveis de luz. São árvores de crescimento rápido, associadas normalmente com as fases iniciais da regeneração da floresta tropical em sucessão (WHITMORE, 1996; ALVAREZ-BUYLLA; MARTINEZ-RAMOS, 1992). Por sua abundância de sementes, que podem ficar dormentes por até cinco anos (CHARLES-DOMINIQUE, 1986) e sua rápida dispersão por áreas recentemente transformadas, a regeneração de clareiras nas florestas é facilitada por espécies de cecropias. Suas infrutescências servem de alimentos para muitos vertebrados, pássaros, morcegos e macacos que atuam como agentes de dispersão dessas sementes (LOBOVA *et al.*, 2003).

As folhas são usadas na medicina tradicional na forma de infusão com diversas aplicações descritas para diferentes espécies. Pesquisas publicadas apontam para atividades farmacológicas como: anti-hipertensivas, broncodilatadoras, anti-secretoras ácidas gástricas (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007; DELARCINA *et al.*, 2007; SOUCCAR *et al.*, 2008, TANAE *et al.*, 2007) (b), hipoglicemiantes (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001), diuréticas, analgésicas, antiinflamatórias (PEREZ-GUERRERO *et al.*, 2001), anti-depressivas (ROCHA *et al.*, 2002) e antioxidantes (SILVA *et al.*, 2007).

Estudos descritos com remédios utilizados tradicionalmente como anti-maláricos tem revelado plantas que produzem indol, alcalóides de isoquinolinas, sesqui-, di- e tri- terpenos, flavonóides e outras substancias que apresentaram atividade *in vitro* contra *P. falciparum* (FREDERICH *et al.* 1999; PHILLIPSON, 1999; MUHAMMAD *et al.*, 2004)

Foi descrita por KRETTLI *et al.* (2001) a atividade anti-*P. falciparum in vitro* de vários compostos fenólicos, atividade que foi comprovada *in vivo*, em camundongos infectados com *P. berghei*, parasito da malária em roedores. Compostos semelhantes foram isolados de diferentes espécies de *Cecropia* (procianidinas, catequinas, epicatequinas e flavonóides como isoorientina, isovitexina), como descritos por TANAE *et al.* (2007), LACAILLE-DUBOIS *et al.* (2001) e DELLA MONACHE *et al.* (1998).

Extratos de *Cecropia pachystachya* foram testados para a atividade de antimalárica contra *P. falciparum* e *P. berghei* em camundongos. O extrato etanólico de caule, raiz, e folhas reduziram a parasitemia de camundongos infectados com malária. Dois compostos foram isolados do extrato das raízes e quimicamente caracterizados como beta-sitosterol e ácido tormentico. Embora ambos os compostos fossem ativos na parasitemia em camundongos, somente o ácido tormentico inibiu o crescimento em culturas do *P. falciparum*. cloroquina-resistentes, reduzindo a parasitemia de forma dose-resposta (UCHOA *et al.*, 2010).

Trabalhos que avaliaram a relevância direta da histamina em patologias de malária e sua associação com a severidade de doença demonstraram os efeitos danosos das respostas inflamatórias associadas à histamina em infecção de malária. Então, suprimir os efeitos biológicos da histamina pode apresentar-se como uma estratégia nova para reduzir a severidade das infecções com parasitos de *Plasmodium* (BEGHDADI, 2008). Em estudos com cobaias com broncoespasmos induzidos por histamina, onde foram registradas a pressão e a frequência respiratória, o tratamento com extrato de *C. glaziovii* reduziram a incidência de

broncoespasmos. Os efeitos dos tratamentos foram bloqueados por propanolol. Estes efeitos foram atribuídos à atividade β -adrenérgica do extrato de cecropia por interação não-competitiva com a histamina (DELARCINA *et al.*, 2007).

2.2. Cálcio e a fibra muscular esquelética

O cálcio é um dos elementos químicos essenciais mais abundantes no organismo humano. Está distribuído entre três principais compartimentos: osso, líquido intracelular e líquido extracelular. Cerca de 99 % desse cálcio encontram-se nos ossos, principalmente sob a forma de hidroxapatita, que é um cristal complexo contendo cálcio, fosfato e água. Uma porcentagem menor que 0,5 % do cálcio ósseo encontra-se na forma de cristais amorfos ou solubilizado. Essa pequena reserva de cálcio está em equilíbrio dinâmico com cálcio extracelular e é importante para a manutenção das concentrações plasmáticas desse íon.

No meio intracelular existem cerca de 10g de cálcio e a maior parte está ligada às proteínas ou armazenada nas mitocôndrias e no retículo sarcoplasmático. Sob condições basais, as concentrações citosólicas de cálcio são muito pequenas, variando de 10 a 100 nM. Esses níveis reduzidos de cálcio são mantidos através de bombas localizadas na membrana, que transportam ativamente o cálcio do citosol para o líquido extracelular, as mitocôndrias e o retículo sarcoplasmático. Em muitas células, as concentrações citosólicas de cálcio aumentam acentuadamente, caso haja estimulação da célula, e essa elevação do cálcio desencadeia uma resposta funcional característica para cada tipo celular, p.ex., contração muscular ou secreção hormonal (MOFFETT *et al.*, 1993; HALL; GUYTON, 2002).

São reconhecidos dois tipos de fibras musculares esqueléticas: músculo vermelho (ou de contração lenta) e o músculo branco (ou de contração rápida). O músculo Vermelho tem uma rica provisão de sangue, numerosas mitocôndrias e muita mioglobina, de onde deriva a

cor vermelha, oxida ácidos gordurosos como sua fonte primária de energia. Embora contraia lentamente, é capaz de atividade por longo prazo sem fadiga considerável. Em contraste, o músculo branco tem uma provisão de sangue mais limitada, poucas mitocôndrias e um baixo conteúdo de mioglobina. Depende quase completamente da degradação anaeróbia de glicogênio para sua provisão de energia e é capaz de contrações muito fortes, rápidas, mas por curto período de tempo. Sua habilidade para resintetizar ATP por fosforilação oxidativa é limitada porque estas fibras têm menos mitocôndrias e vasos capilares que as fibras vermelhas e assim eles cansam rapidamente. A maioria dos músculos de esqueleto é uma combinação dos dois tipos, mas um tipo normalmente predomina. Os dois tipos de fibras são adaptados para propósitos diferentes e executam funções diferentes. Em humanos, a perna e músculos que apóiam o peso do corpo e mantêm postura devem se contrair por longos períodos de tempo sem fadiga. Estes músculos tendem a ter uma alta proporção de fibras vermelhas. Os músculos usados com mais intermitência, como nos braços, devem poder produzir contrações musculares fortes, rápidas por um curto período, nestes as fibras brancas predominam (HALL; GUYTON, 2002).

2.3. Junção neuromuscular

Para cada fibra muscular há uma junção neuromuscular situada próximo ao centro desta, o potencial de ação propaga-se em direção às extremidades. Desta forma, é possível que ocorra a contração simultânea de todos os sarcômeros. A chegada de um potencial de ação à região pré-sináptica, gerado no motoneurônio, leva à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem e ao influxo de Ca^{+2} para o meio intracelular. O aumento das concentrações intracelular de Ca^{+2} é responsável pela exocitose de vesículas sinápticas

contendo o neurotransmissor acetilcolina (ACh), que é liberado na fenda sináptica (HUGHES *et all*, 2006).

Parte da ACh liberada é rapidamente hidrolisada pela AChE e outra parte se difunde na fenda sináptica, interagindo com os receptores nicotínicos pós-juncionais. A interação da ACh com seus receptores leva à abertura do canal iônico, permitindo o influxo de cátions, principalmente de Na^+ , dando origem à despolarização local e transitoria da região da placa motora terminal, denominada potencial de placa terminal (PPT). Atingindo o limiar de excitabilidade da fibra muscular, esses potenciais se propagam tanto longitudinalmente quanto radialmente ao longo das invaginações do sarcolema atingindo as regiões das tríades, induzindo a liberação do Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático e ativando o processo contrátil (HILLE, 1992).

A contração muscular é um processo que depende da concentração de Ca^{+2} livre no citoplasma e que no músculo estriado se encontra regulada principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS) que funciona como um armazém com altas concentrações de Ca^{+2} e possui canais de Cálcio voltagem-dependentes (FILL; COPPELO, 2002).

2.4. Retículo Sarcoplasmático

O retículo sarcoplasmático (RS) é um grande sistema de membranas intracelulares que envolvem cada miofibrila, com a forma de uma cisterna cheia de cálcio. O RS do músculo esquelético é composto por duas regiões morfológica e funcionalmente distintas: o RS juncional e o RS livre. A membrana do RS juncional contém o receptor de rianodina (RyR), que são canais de Ca^{+2} com projeções em sua superfície que interage com o receptor diidropiridínico (DHPR) - partículas contidas na região juncional dos túbulos T, que se originam do sarcolema - formando estruturas denominadas como tríades. Estas estão

envolvidas na transmissão do estímulo excitatório a partir da superfície da membrana para o RS, promovendo a liberação do Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático. Os túbulos T estão organizados de forma perpendicular ao RS e às miofibrilas, formando uma rede transversal e reticulada no interior da fibra muscular. Funcionalmente, os túbulos T, comunicam-se com o meio extracelular transversalmente ao longo da fibra muscular. O RS livre contém o transportador Ca^{+2} -ATPase como seu principal componente de membrana. É geralmente, dividido por cavidades nas laterais (cisternas), e nos túbulos longitudinais, que diferem na composição das proteínas. As cisternas contêm proteínas de ligação de Ca^{+2} (calsequestrina, calreticulina, proteínas de alta afinidade de ligação de Ca^{+2} , etc.) que podem servir como locais de armazenamento para o Ca^{+2} acumulado (JORGENSEN *et al*, 1977; MARTONOSI; PIKULA, 2003).

Na membrana dos túbulos T são encontrados os receptores dihidropiridínicos (RDHP) que atuam como sensores de voltagem. Internamente o retículo sarcoplasmático está relacionado com o armazenamento intracelular de íons cálcio no músculo estriado esquelético, bem como com sua liberação, através de canais específicos, denominados receptores rianodínicos (FRANZINI-ARMSTRONG; JORGENSEN, 1994) e com sua recaptação por meio de uma Ca^{+2} -ATPase (IKEMOTO, 1982).

2.5. Acoplamento Excitação-Contração

O acoplamento excitação-contração envolve duas proteínas principais: o receptor de dihidropiridina, na membrana da fibra muscular, e o receptor de rianodina do retículo sarcoplasmático. Os mecanismos moleculares de acoplamento excitação-contração difere entre os músculos cardíacos e esqueléticos.

A despolarização da membrana na superfície de células musculares iniciados pelo impulso nervoso (SPERELAKIS; GONZALES-SERRATOS, 2001; WAHLER, 2001) é conduzida para o interior da fibra muscular através de extensões da superfície membrana chamada túbulos transversais T (HEINY, 2001). O acoplamento excitação-contração envolve duas proteínas principais: o receptor de dihidropiridina, na membrana da fibra muscular, e o receptor de rianodina do retículo sarcoplasmático (FRANZINI-ARMSTRONG, 1999).

No músculo esquelético, a despolarização do sarcolema produz alteração conformacional do receptor de dihidropiridina que detecta essa variação de voltagem e induz a liberação rápida de Ca^{+2} armazenado no RS para o citoplasma, via ativação direta dos receptores rianodínicos (RyRs) independentemente da concentração de Ca^{+2} extracelular. Segundo este modelo, o receptor de dihidropiridina atua como sensor de voltagem e a liberação do Ca^{+2} é induzida por contiguidade das duas estruturas (MEISSNER, 1994, 2001; FRANZINI-ARMSTRONG; PROTASI *et al.*, 1998; NIGGLI, 1999; MAR; MARKS, 2000; OGAWA *et al.*, 2002; PROTASI, 2002; BASSEL-DUBY; OLSON, 2003, 2006). O relaxamento muscular é desencadeado pela recaptção rápida do Ca^{+2} ativada por uma ATPase dependente de Ca^{+2} presente no retículo. Essa recaptção reduz a concentração citosólica de Ca^{+2} , possibilitando a dissociação dos íons cálcio da troponina C e a consequente desativação das pontes cruzadas (IKEMOTO, 1982; ZHAO *et al.*, 2005; STOKES; WAGENKNECHT, 2000).

No músculo cardíaco o processo de excitação depende da entrada de Ca^{+2} extracelular através de DHPRs (BERS, 2002). Que, por sua vez, ativam os RyRs causando a liberação de Ca^{+2} do RS para o citoplasma, um processo conhecido como liberação de Ca^{+2} induzido por Ca^{+2} (CICR). Também neste caso, a ativação de SERCA2 e trocadores de sódio / cálcio trazem de volta a concentração de Ca^{+2} aos níveis de repouso (DULHUNTY *et al.*, 2002). As principais proteínas do SR envolvidos em liberar e recaptar os sinais de Ca^{+2} são os RyRs, responsáveis pela liberação de Ca^{+2} e a bomba de Ca^{+2} -ATPase responsável pela recaptção

de Ca^{+2} , enquanto a calsequestrina, calreticulina, e uma série de outras proteínas citoplasmáticas de ligação ao Ca^{+2} fornecem o ambiente para armazenar Ca^{+2} no RS (MILNER *et al.*, 1992; BEARD *et al.*, 2004; DULHUNTY *et al.*, 2004).

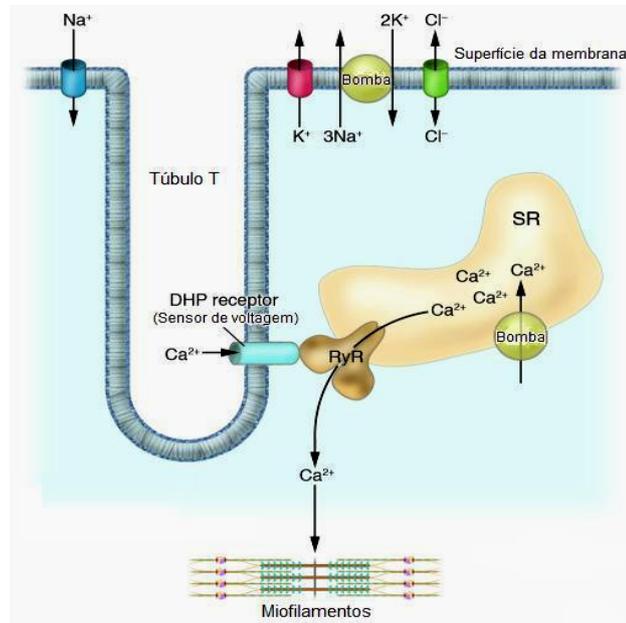


Figura 2 - Acoplamento excitação-contracção do músculo esquelético. A fibra muscular é excitada via nervo motor pela placa terminal e gera o potencial de ação que se propaga ao longo da superfície da membrana (sarcolema), penetrando pelo sistema tubular transverso. A proteína dihidropiridina (DHP), um receptor sensível à despolarização da membrana, altera sua conformação e ativa o receptor rianodínico (RyR), que libera Ca^{+2} do RS. O Ca^{+2} , então, se liga à troponina e ativa o processo de contracção (adaptado de JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005).

2.6. ATPases tipo P

As P-ATPases constituem uma das quatro classes (P, F, V e ABC) de ATPases responsáveis pelo transporte de íons ou moléculas através das membranas biológicas que são necessários para processos vitais como absorção, secreção, sinalização transmembranar, transmissão do impulso nervoso, acoplamento excitação-contracção, crescimento e diferenciação (PEDERSEN, CARAFOLI, 1987). Estas bombas são responsáveis por essas manifestações fundamentais da homeostase celular, como a manutenção do equilíbrio osmótico e composição iônica intracelular, quase todas as operações de transporte realizadas

pelas células dos tecidos epiteliais é acompanhada de alguma forma pela ação de uma ATPase tipo P (CAPLAN, 1997). Consistem em uma grande família de proteínas integrais de membrana que são responsáveis pelo transporte ativo de íons como K^+ , Na^+ , H^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} além de fosfolípides. As atividades enzimáticas destas bombas constituem alguns dos principais meios através dos quais todas as células animais convertem a energia contida no ATP em gradientes eletroquímicos que podem ser explorados por todos os tipos de vias metabólicas.

A família de transportadores ativos chamados ATPases tipo P é transportadora de cátions reversivelmente fosforilados pelo ATP como parte do ciclo de transporte; a fosforilação força uma mudança conformacional que tem importância na movimentação do cátion através da membrana. São denominadas P-ATPases devido à característica formação de um intermediário residual do ácido aspártico que é fosforilado em seu ciclo de reação que é crucial para sua atividade (STREHLER; TREIMAN, 2004; PEDERSEN, 2005).

São ATPases tipo P, amplamente distribuídas nos tecidos animais: A ATPase Na^+ , K^+ (um transportador para Na^+ e K^+), que estabelece e mantém o desequilíbrio existente entre a concentração de Na^+ , que é menor no interior da célula que no meio circundante, e a concentração de K^+ que é maior. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase mantém gradientes de concentração de Na^+ e K^+ entre a membrana celular ao transportar 3 íons Na^+ para fora das células e 2 íons K^+ para o interior destas, utilizando a energia da hidrólise do ATP (CRAMBERT *et al.*, 2000, MORTH *et al.*, 2007).

As Ca^{+2} -ATPases exercem função vital na homeostase e na sinalização do cálcio intracelular. Elas são responsáveis pela remoção do excesso de Ca^{+2} do citoplasma para o retículo sarcoplasmático ou para o meio extracelular, controlando dessa forma as concentrações locais de Ca^{+2} . A Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA, do inglês “sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium”) é uma enzima associada à membrana

intracelular, responsável pelo transporte de Ca^{+2} contra um gradiente de concentração à custa da energia resultante da hidrólise do ATP. A Ca^{+2} -ATPase dos músculos esquelético (SERCA1) e cardíaco (SERCA2) são responsáveis pela recaptção do Ca^{+2} liberado do retículo sarcoplasmático durante a contração muscular, produzindo o relaxamento muscular.

A H^+ , K^+ -ATPase gástrica, é uma ATPase tipo P responsável pela secreção de ácido gástrico. É uma proteína transmembranar localizada no sistema tubulovesicular da célula parietal da mucosa gástrica e é translocada para a membrana plasmática apical após estimulação hormonal, onde dirige a secreção do ácido clorídrico para o lúmen do estômago. A H^+ , K^+ -ATPase gástrica explora um mecanismo muito similar ao enzimático para catalisar a troca eletroneutra de prótons intracelular e íons potássio extracelular estimulada pela hidrólise de ATP, seguido pelo transporte passivo de Cl^- . Gerando assim um grande gradiente de próton associado à secreção de ácido gástrico (RABON; REUBEN, 1990). É expressa em menor proporção na face luminal do ducto coletor renal onde é responsável pela reabsorção de K^+ e pela secreção ácida (APELL, 2004).

A H^+ , K^+ -ATPase gástrica pode ser inibida por piridinas imidazolicas, como o 3-cianometil-2-metil-8-(fenilmetoxi) imidazo [1, 2 α] piridina (SCH 28080), um potente e reversível inibidor, que compete com o K^+ e se liga ao sítio de alta afinidade para o íon K^+ na bomba, inibindo especificamente a H^+ , K^+ -ATPase (BIEL *et al.*, 1987; MENDLEIN; SACHS, 1990; WAGNER *et al.*, 2004).

Para as três bombas, a estrutura de parte da proteína de membrana que desempenha a função de transporte de íons consiste de 10 segmentos transmembranares, cujas seqüências de aminoácido são bastante semelhantes. No entanto, diferenças específicas que foram encontradas nas seqüências de aminoácidos dizem respeito à carga e polaridade, a contabilização do diferentes propriedades funcionais, que podem ser resumidos por sua estequiometria de transporte: $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+ / 1\text{ATP}$ para o Na^+ , K^+ -ATPase, $2\text{H}^+ / 2\text{K}^+ / 1\text{ATP}$

para a H^+ , K^+ -ATPase e $2Ca^{+2} / 2H^+ / 1ATP$ para o Ca^{+2} -ATPase do RS (APELL, 2003; STREHLER; TREIMAN, 2004).

A Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é uma enzima intracelular transmembranar que utiliza a energia liberada do ATP para o transporte de Ca^{+2} contra um gradiente de concentração. Compreende uma cadeia polipeptídica simples de 994 resíduos de aminoácidos de massa 110 KDa (MARTONOSI; PIKULA, 2003).

Estudos de microscopia Eletrônica e difração revelaram que a ATPase inclui uma região ligada à membrana através de uma haste ligada a uma “cabeça” extramembranar, no meio citosólico. Foram obtidos cristais tridimensionais de RS ATPase nativa, gerando modelos estruturais em alta resolução da molécula de Ca^{+2} -ATPase no estado ligado, no estado de Ca^{+2} livre estável e de outros estados em condições análogas, resultando em vários intermediários do ciclo catalítico (TOYOSHIMA *et al.*, 2000, 2002, 2004; SORENSEN *et al.*, 2004).

A função fisiológica da SERCA é seqüestrar o Ca^{+2} citosólico através da membrana para compartimentos intracelulares. Esta bomba funciona enquanto houver ATP e Ca^{+2} presentes no citoplasma, e estabelece um gradiente de concentração de 10^4 vezes através das membranas.

De acordo com a teoria clássica E1/E2 (MOLLER *et al.*, 1996), os sítios transmembranares de ligação de Ca^{+2} têm alta afinidade e face no citoplasma na conformação E1 da enzima, e têm baixa afinidade e face na luz do RS (ou lado extracelular) na conformação E2. A transferência efetiva de Ca^{+2} ocorre entre os dois intermediários fosforilados, E1P e E2P, em troca de H^+ do lado luminal. Estequiometricamente a SERCA1a pode transferir dois Ca^{+2} por ATP hidrolisado para o RS e 2-3 H^+ em sentido contrário. O

contra transporte de H^+ e fluxos de íons através de canais de ânions e cátions do RS previnem grandes mudanças no potencial de membrana durante transporte Ca^{+2} (YU *et al.*, 1993).

As isoformas SERCA estão envolvidas em mecanismos de sinalização de Ca^{+2} para muitas funções biológicas, incluindo o acoplamento excitação-contração, o acoplamento excitação-secreção, a regulação da fosforilação e desfosforilação de proteínas, transcrição de genes, proteólise intracelular e mecanismos apoptóticos (GWATHMEY *et al.*, 1987).

SERCA é sensível a diversos compostos que apresentam diferentes graus de potência e inibição, e permitem estudos do mecanismo catalítico e de transporte, bem como das conseqüências da inibição da SERCA na função de células vitais que são dependentes da sinalização de Ca^{+2} (INESI *et al.*, 2005).

Um inibidor potente e específico é a tapsigargina (TG), uma lactona sesquiterpênica de origem vegetal (RASMUSSEM *et al.*, 1978). A inibição da TG possui caráter de longo alcance, envolvendo os sítios de fosforilação e de ligação do Ca^{+2} . Sua ligação forma um complexo que pode estabilizar a enzima em um estado Ca^{+2} -livre E2TG com características igual ou similar à forma cineticamente definida como conformação E2 da Ca^{+2} -ATPase (STOKES; LACAPERE, 1994; SAGARA *et al.*, 1992), diminuindo a mobilidade das hélices transmembrana (TOYOSHIMA; NOMURA, 2002; XU *et al.*, 2004).

3. Objetivos

O presente estudo visa avaliar as atividades da espécie *Cecropia sciadophylla* Mart. amazônica pouco referendada na literatura científica, e sem estudo farmacológico anterior, comparando as ações com as descritas para espécies de outros biomas.

3.1. Objetivos Específicos

- Padronização em CLAE do extrato aquoso de *C. sciadophylla*.
- Avaliação das ações farmacológicas do extrato aquoso e frações semi-purificadas no sistema nervoso central, em modelos de dor e inflamação, na ação pressórica, na contração muscular e na atividade gástrica.
- Analisar as ações na atividade da H⁺, K⁺-ATPase gástrica de mamíferos.
- Analisar as ações na atividade da Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático de mamíferos.

4. Material

4.1. Material Botânico

O material vegetal (folhas), do gênero *Cecropia* foi coletado na Estação Experimental de Silvicultura Tropical do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (EEST/INPA), na bacia do Rio Cueiras, área denominada núcleo ZF-2, com acesso situado no Km 45 da BR-174, Manaus, nas coordenadas: S 2° 32' 16.02", W 60° 2' 45.18", marcada em GPS (Figura 3).

Para a confecção das exsiccatas, foram coletadas plantas que continham folhas jovens e maduras e estruturas reprodutoras como flores e frutos, para facilitar a identificação. As amostras foram organizadas entre folhas de jornais alternadas com placas de papelão e amarradas entre grades de madeira para serem prensadas. Estas grades foram colocadas em uma caixa de papelão com uma lâmpada incandescente de 100W mantida suspensa sobre a tampa da caixa, com objetivo de manter as prensas das exsiccatas aquecidas e livres de umidade e possíveis contaminações por fungos durante o período de secagem. Após, a exsicata foi enviada ao Herbário do INPA, incluindo a ficha de coleta com as características do material botânico.

A exsicata montada foi incorporada ao acervo do Herbário do Instituto de Pesquisas da Amazônia INPA sob registro nº 230857. A espécie coletada foi identificada como *Cecropia sciadophylla* Mart, muito comum na região.



Figura 3 – Imagem de satélite mostrando área urbana de Manaus-AM. Ponto A (imagem superior) representa marcação em GPS do local de coleta da *Cecropia sciadophylla* Mart, nas coordenadas: S 2° 32' 16,02", W 60° 2' 45,18". Ramal de acesso pela vicinal ZF-2 à Estação Experimental de Silvicultura Tropical do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (EEST/INPA), na bacia do Rio Cueiras, área denominada núcleo ZF-2 (imagem inferior). Situada no Km 45 da BR-174, Manaus, Amazonas. Fonte: Google maps.

4.2. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) e camundongos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, mantidos sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C) e iluminação (ciclo de 12 horas) e com livre acesso à ração e água.

Coelhos albinos adultos de ambos os sexos, com peso variando entre 1 e 2 kg e porcos jovens com peso variando entre 20 e 40 kg, adquiridos de fornecedor credenciado.

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

4.3. Material Químico

4.3.1. Solventes, reagentes e sais

Acetona P.A (Nuclear-Brasil), acetonitrila grau HPLC (Merck-Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear-Brasil), ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec-Brasil), ácido fosfórico 85% P.A (C.P.Q), ácido bórico P.A (Synth-Brasil), ácido tricloroacético P.A (Synth-Brasil), ácido sulfúrico P.A (Nuclear-Brasil), albumina - BSA (Merck-Brasil), bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), butanol P.A (Nuclear-Brasil), cloreto de sódio P.A (Merck-Brasil), cloreto de potássio P.A (Vetec-Brasil), cloreto de magnésio P.A (Merck-Brasil), coomassie brilliant blue (Termo Scientific), etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), EDTA (Fluka-Brasil), EGTA (Chemical-USA), ficol (Sigma-Brasil), fosfato monossódico P.A (Merck-Brasil), glicose P.A (C.P.Q), hidróxido de sódio P.A (Reagen-Brasil), hidróxido de amônio P.A (ECIBRA-Brasil), HEPES (Sigma-Brasil), metanol P.A (Nuclear-Brasil), manitol P.A (Sigma-Brasil), molibdato de amônio (Reagen-Brasil), PIPES (Sigma-Brasil), sacarose P.A (Queel-Brasil), tris-maleato (Sigma-Brasil), trizma-base (Sigma-Brasil), trizma/HCl (Sima-Brasil).

4.3.2. Drogas

Acetilcolina (Sigma-Brasil), acetiltiocolina (Sigma-Brasil), atropina (Sigma-Brasil), ATP (Sigma-Brasil), calcimicina (Sigma-Brasil), carragenina (Sigma-Brasil), dexametasona (Sigma-Brasil), diazepam (Rambaxy S.A), d-tubocurarina (Sigma-Brasil), formalina (Rio-Química), imipramina (Sigma-Brasil), ionóforo A23187 (Sigma-Brasil), neostigmina (Sigma-Brasil), ouabaína (Sigma-Brasil), pentobarbital (Sigma-Brasil), ranitidina (Sigma-Brasil), SCH28080 (Schering-Plough), tapsigargina (Sigma-EUA).

4.3.3. Soluções e reagentes

Líquido Nutritivo Tyrode: NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM; MgCl₂.6H₂O 1,0 mM; NaHCO₃ 15,0 mM; NaH₂PO₄.H₂O 1,0 mM; CaCl₂.2H₂O 2,0 mM; glicose 11,0 mM.

Solução Nutritiva de Krebs-Bicarbonato: NaCl 119,0 mM; KCl 4,6 mM; MgCl₂.6H₂O 1,2 mM; NaHCO₃ 15,0 mM; NaH₂PO₄.H₂O 1,2 mM; CaCl₂.2H₂O 1,5 mM; glicose 11,0 mM.

Tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4: NaCl 140 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄.7H₂O 5 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM.

Solução tampão para lavagem pH 6,7: manitol 120 mM, PIPES/Trizma 5 mM, sacarose 40 mM, EDTA 1 mM.

Solução tampão de homogeneização pH 7,4: PIPES/Trizma 4 mM, sacarose 30 mM.

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

Tampão de reação para determinação da atividade da H⁺, K⁺-ATPase pH 7,4: Tris-HCl 50 mM; MgCl₂ 2,5 mM; KCl 20 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.

Tampão de reação para determinação da atividade da Ca^{+2} -ATPase pH 7.4: Tris-maleato 50 mM; MgCl_2 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionoforo A23187 10 μM ; CaCl_2 1,008 mM (Ca^{2+} livre = 17,5 μM).

Reagente de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio; 23,8 mL de H_2SO_4 P.A. para 1 L de água destilada; 15 mL dessa solução para 0,36 g de ácido ascórbico.

Tampão para dosagem de proteína pH 7,4: Tris/HCl 100 mM; EDTA 200 mM, NaCl 1 N

Reagente de Bradford: Coomassie Brilliant Blue 0,01 %; Etanol 4,7 % e Ácido Fosfórico 8,5 %.

4.4. Obtenção do extrato aquoso e fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* Mart.

Para o preparo do extrato, folhas de *Cecropia sciadophylla* Mart foram lavadas em água corrente, secas e armazenadas à temperatura ambiente em local seco e arejado por sete dias. Após o período de desidratação, as folhas foram pulverizadas em fragmentos de tamanho aproximado e não inferior a 1 mm.

Para a obtenção do extrato aquoso (EA) foi preparada infusão com 25,0 g do pó das folhas trituradas por litro de água destilada (2,5%), por 30 minutos à temperatura média de 75° C, com agitações a cada 10 minutos. Após filtração em papel filtro 1 Whatman®, o extrato foi concentrado em rotavapor acoplado à bomba de vácuo (RE47 – Yamato®) sob temperatura de 50 a 55 °C e liofilizado (liofilizador modelo ModuyoD – ThermoFisher®, acoplado à bomba de vácuo). Apresentando rendimento de 28 %.

Para a obtenção da fração butanólica, 8,0 g do EA foram dissolvidos em 600 mL de água destilada e particionados em funil de separação com porções de 300 mL de butanol, por 3 vezes. Desse processo, foram obtidas as frações butanólica (FBut) e aquosa (FA), que foram concentradas e liofilizadas. Apresentando rendimento de 15,4 % para a FBut.

As frações secas (aquosa e butanólica) foram submetidas aos ensaios laboratoriais visando determinar os possíveis efeitos farmacológicos e os mecanismos de ação desses efeitos.

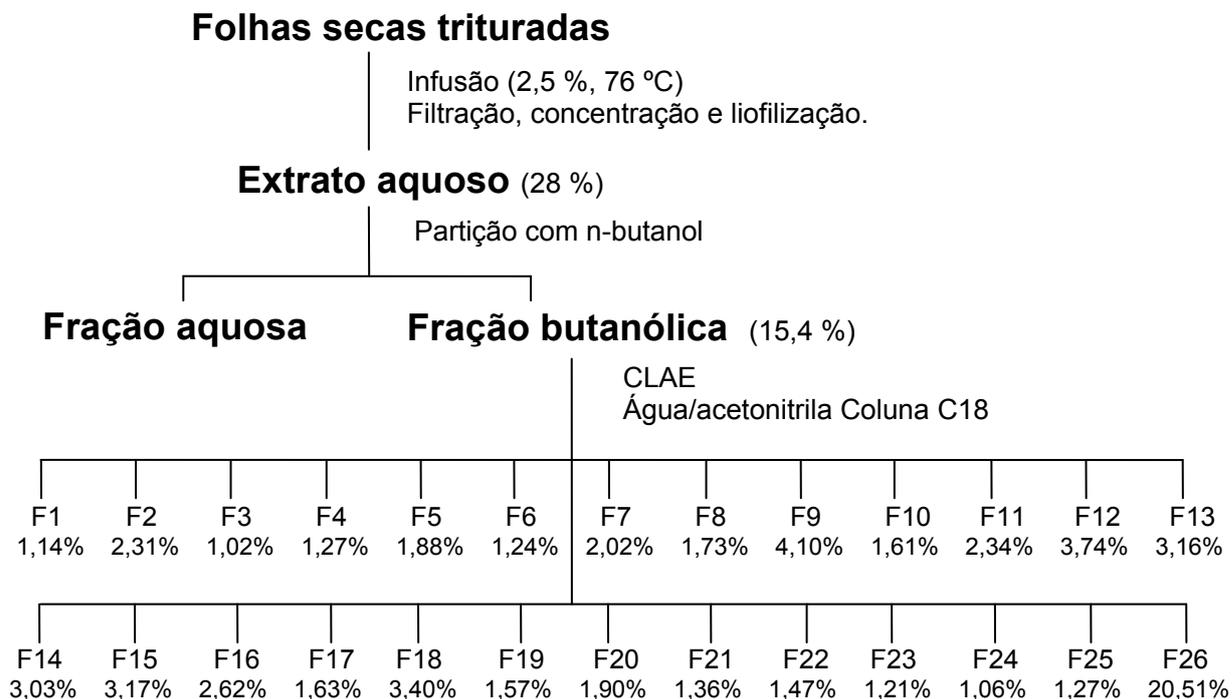
Cecropia sciadophylla Mart.

Figura 4 - Fluxograma da obtenção do extrato aquoso (EA) e fracionamento da fração butanólica (FBut) de *Cecropia sciadophylla* Mart. Os rendimentos do EA, da FBut e das frações isoladas foram calculadas em relação às folhas secas trituradas, ao EA e à FBut, respectivamente.

4.5. Análise cromatográfica do extrato

Avaliação fitoquímica do extrato de folhas de *Cecropia sp.* detectaram a presença de polifenóis, taninos, esteróides, triterpenos, flavonóides e saponinas (LACAILLE-DUBOIS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007; TANAE *et al.*, 2007). Para a padronização química, o extrato aquoso foi particionado com n-butanol e as frações resultantes, fração aquosa (FA) e fração butanólica (FBut) foram concentradas e liofilizadas.

4.5.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos e frações da *Cecropia sciadophylla* Mart.

Para a CCD, foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck) eluídas em solução contendo butanol, ácido acético e água, na proporção 4 : 1 : 2. A placa foi revelada pela irradiação de lâmpada UV 330 nm (Figura 5).

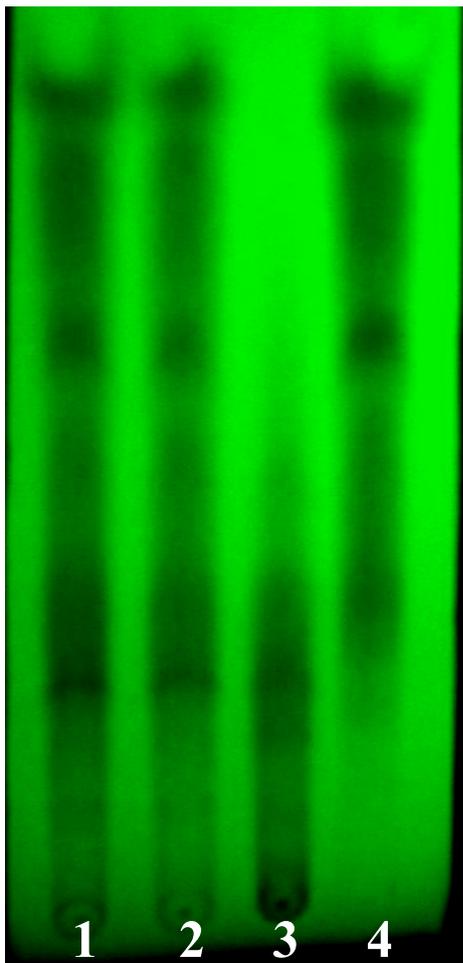


Figura 5 - Cromatografia em camada delgada: 1 Extrato etanólico; 2 Extrato Aquoso; 3 Fração aquosa e 4 Fração Butanólica de *C. sciadophylla*, utilizando solução de butanol, ácido acético e água (proporção 4 : 1 : 2) como fase móvel. Revelação em lâmpada de luz Ultravioleta 330 nm.

A cromatografia em camada delgada mostra que praticamente não houve diferença nas extrações realizadas com água (Extrato aquoso) e com etanol 50% (extrato etanólico). É evidenciada a separação de compostos polares, presentes na fração aquosa e apolares, presentes na fração butanólica. Ensaios farmacológicos confirmaram que os princípios ativos encontram-se na fração butanólica do extrato de *C. sciadophylla*.

4.5.2. Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-prep)

A purificação da FBut de *Cecropia sciadophylla* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa foi realizada pela Dra Mirtes Midori Tanae (UNIFESP).

A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada em alíquotas de 1 mL em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (Shimadzu). O sistema é constituído por 2 bombas injetoras (LC-8A), controlador da bomba injetora (SCL-8A), integrador (CR4A), coletor de frações (FCV-100B) e detector espectrofotométrico UV-Visível (SPD-6A), operando a 210 nm. A separação foi feita em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 4,6 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm, eluída com gradiente linear de água/acetonitrila de 10% a 20% em 45 minutos e acetonitrila 20% de 45 a 60 minutos com fluxo constante de 0,6 mL/min (Figura 6). O rendimento de cada fração foi calculado pela área do pico em relação à área total do cromatograma. Foram coletadas 26 frações a partir da FBut de *C. sciadophylla*, representadas pelos picos no cromatograma com área superior a 1% da área total do cromatograma. A Fbut possui 7 picos majoritários com tempos de retenção: 3,4; 13,9; 16,5; 18,9; 24,0; 27,3 e 28,3 min com áreas 5,7; 3,5; 7,5; 6,6; 12,4; 5,4 e 9,5% do total do cromatograma, respectivamente. Picos com áreas menores que 1% não foram coletados. As frações obtidas da purificação da Fbut em CLAE foram submetidas às análises de ¹³C-RMN e ¹H-RMN para identificação.

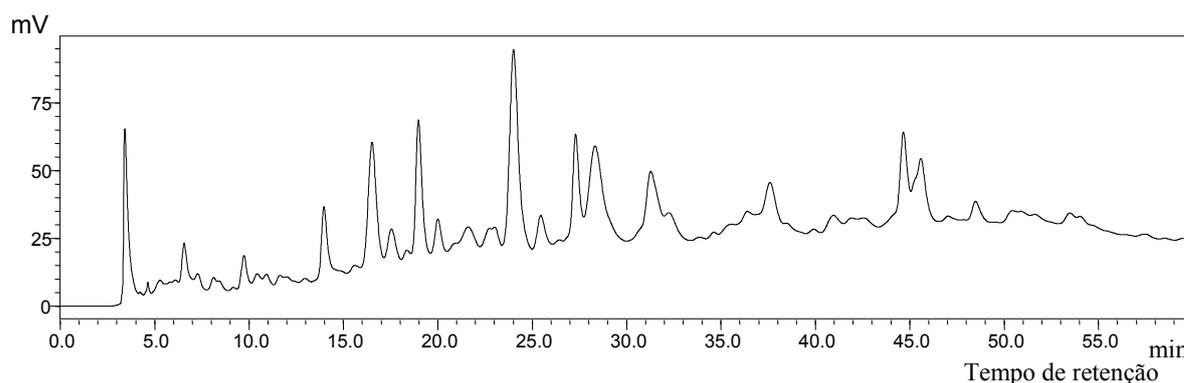


Figura 6 - Perfil cromatográfico da FBut de *C. sciadophylla* em CLAE preparativa, utilizando-se coluna C18, gradiente de água/acetonitrila de 10 a 20% em 45 min e acetonitrila a 20% de 45 a 60 min, fluxo de 0,6 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm.

4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica

A FBut e frações de *C. sciadophylla* isoladas em CLAE preparativa foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu) composto por duas bombas analíticas (LC-10AD), módulo de comunicação (CBM-10A) e detector UV-Visível (SPD-10A), operando a 210 nm. O sistema estava acoplado a um computador, sendo operado por software Shimadzu, versão 1.61, 3.84, CBM 10A.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila 10 a 20% em 30 minutos, em coluna analítica C18 (Phenomenex – USA), empacotada com partículas esféricas de 5 μm e fluxo constante de 1,0 mL/min. As amostras foram dissolvidas em água/ACN 10%, filtradas em filtro de poros com 0,22 μm (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 20 μL (Figura 7).

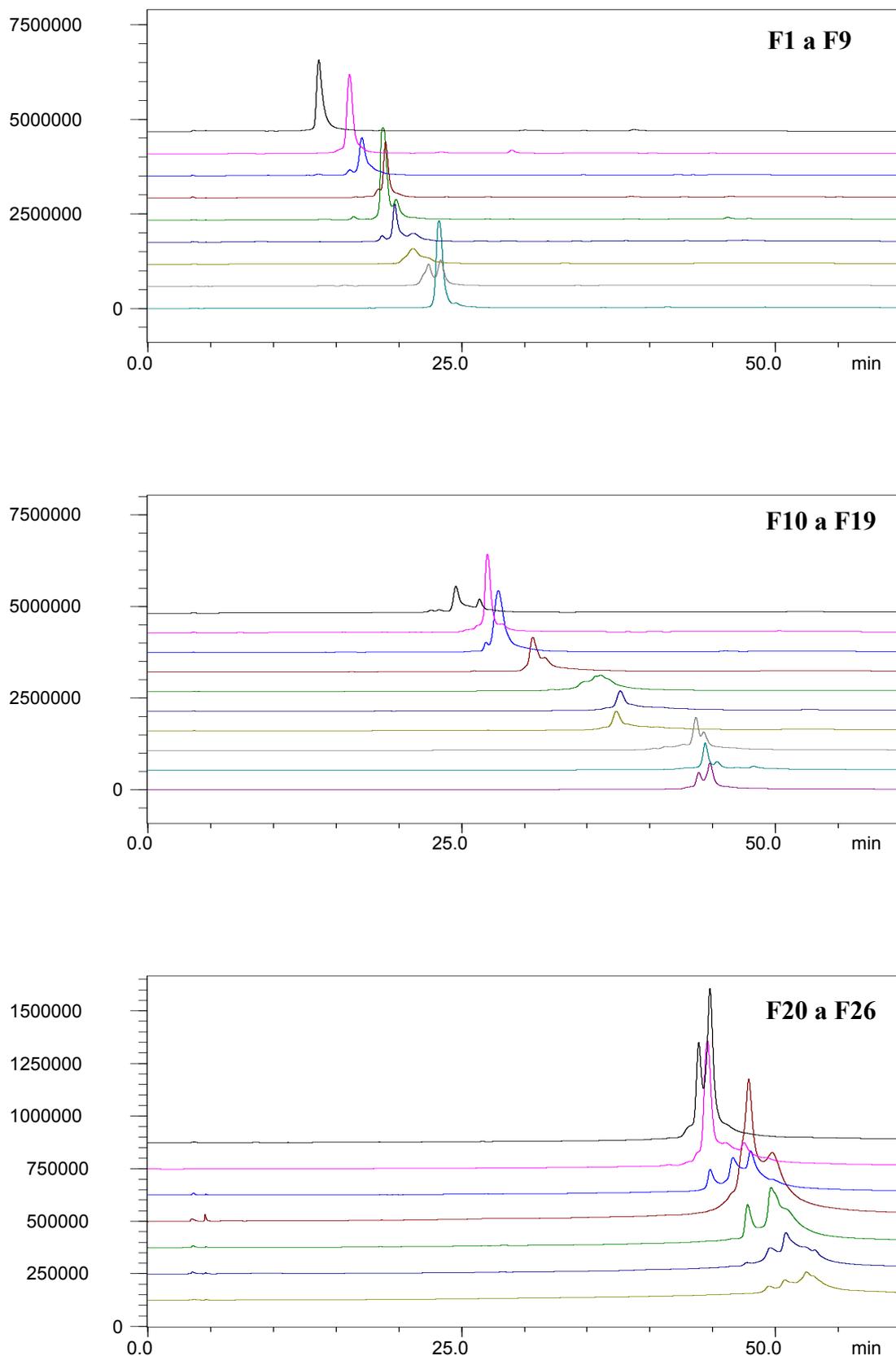


Figura 7 - Perfis cromatográficos evidenciado as 26 frações isoladas da FBut de *C. sciadophylla* em CLAE analítica, utilizando-se coluna C18, gradiente de água/acetonitrila de 10 a 20% em 30 min e acetonitrila 20% de 45 a 60 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm.

4.6. Identificação química instrumental dos compostos isolados de *Cecropia sciadophylla* Mart.

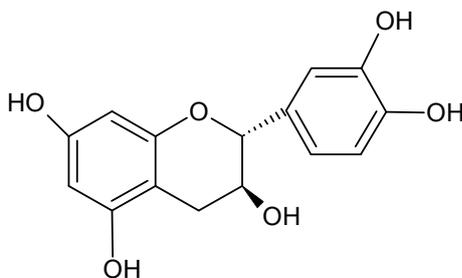
4.6.1. Ressonância magnética nuclear

Os compostos isolados de *C. sciadophylla* foram analisados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e carbono (^{13}C RMN) na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e da Universidade de São Paulo (USP). Os solventes utilizados foram metanol, água e dimetilsulfóxido deuterados.

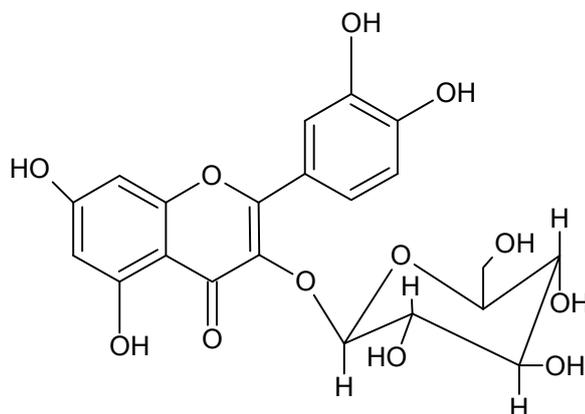
4.6.2. Espectrometria de Massas

Os compostos isolados de *C. sciadophylla* foram analisados por CLAE acoplada a espectrômetro de massas (LC-MS) na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os solventes utilizados foram água ultrapura (Nanopure Deionization System – USA), ácido fórmico e acetonitrila grau HPLC (Merck).

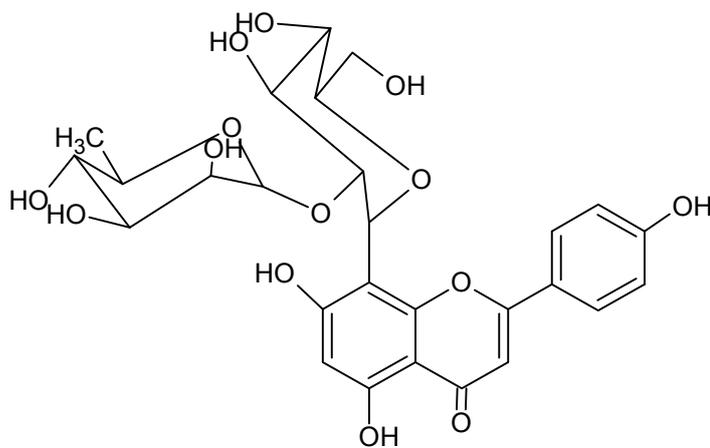
4.6.3. Estruturas químicas das frações isoladas e identificadas de *Cecropia sciadophylla* Mart.



(F5) catequina PM 289



(F22) quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo PM 464



(F18) 2''-O-ramnosilvitexina PM 578

Figura 8 - Estruturas químicas de compostos isolados e identificados da fração butanólica de *C. sciadophylla* Mart.

5. Métodos

5.1. Métodos farmacológicos para avaliação da atividade do extrato aquoso e fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* Mart.

Para o estudo geral da atividade farmacológica foram usados camundongos e ratos adultos, machos ou fêmeas, provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia. Os animais foram mantidos em sala com temperatura $23 \pm 1^\circ \text{C}$, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto na vigência dos experimentos. Todos os testes foram realizados seguindo descrição em “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais” (LAPA *et al.*, 2003) com as devidas adaptações.

5.1.1. Teste geral de atividade farmacológica – Teste Hipocrático

O teste de observação geral ou Teste Hipocrático consiste no preenchimento de uma tabela de acordo com a resposta comportamental aos estímulos padronizados provocados ao animal, sendo observado: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, resposta a estímulos nociceptivos, cromadocriorréia, secreção brônquica, convulsões, mortes, entre outros (IRWIN, 1968).

Os animais, camundongos machos ou fêmeas, foram divididos em grupos: controle, tratados com veículo, e experimental, tratados com extrato aquoso e fração butanólica. As doses foram variáveis em escala logarítmica, chegando ao máximo de 1 g/kg, v.o. (gavagem, por cânula intragástrica). Em seguida, os animais foram colocados em caixas-moradia e feita a análise comportamental no tempo de 30 minutos e em intervalos de uma hora durante 5 horas e 24 horas após administração dos tratamentos. Entre os intervalos, os animais foram

submetidos a testes de avaliação da atividade exploratória no campo aberto, desempenho motor no rota-rod.

5.1.2. Avaliação da temperatura corporal

O estudo da temperatura retal tem por objetivo avaliar, o efeito de uma substância natural ou sintética sobre a temperatura corporal (hipotermia ou hipertermia), que pode ser indicativo de mecanismo de ação, mas principalmente de ação inespecífica influenciando outro parâmetro fisiológico ou comportamental.

Os testes foram realizados com camundongos adultos machos e fêmeas albinos Swiss (30 – 40 g), n = 8 animais/grupo. O grupo experimental foi tratado com FBut 1,0 g/kg, v.o., o grupo controle recebeu veículo (água, volume máximo de 5 mL/kg, v.o) e o grupo controle positivo foi tratado com diazepam (1,5 mg/kg, i.p.). A temperatura retal dos animais foi medida com termômetro digital, antes e após os tratamentos.

5.1.3. Teste do campo aberto

Um animal ao ser colocado num ambiente ao qual não está habituado fica imóvel, porém alerta, durante um tempo, o que representa ansiedade por estar num ambiente desconhecido. Esta imobilidade reduz ou desaparece com a administração de drogas ansiolíticas. Assim, a movimentação do animal no campo aberto pode ser um indicador de exploração do ambiente. A quantificação da movimentação do animal torna-se um indicador de atividade exploratória. Um animal pode movimentar-se em um ambiente novo por outros motivos além da atividade exploratória, como tentar uma via de fuga. O tempo de exploração do animal tende a diminuir com o tempo, visto que o contato com a novidade passa a ser

contínuo, mostrando que o medo e a curiosidade diminuíram. Animais com medo exploram pouco o novo ambiente até que o medo cesse. O número de vezes em que o animal se levanta sobre as patas traseiras (“*rearing*”) também pode ser considerado uma resposta exploratória quando associada à auto-limpeza (“*grooming*”), dentre outras atividades.

No teste do campo aberto os animais, tratados com FBut 30, 100 e 300 mg/kg, v.o., uma hora antes do teste, foram colocados, durante 5 minutos, em uma caixa quadrada transparente de acrílico, com piso delimitado com pincel atômico, em áreas de tamanhos iguais. Tal artifício foi adotado para a contagem dos cruzamentos (passagem com as quatro patas de uma área para outra adjacente) e o número de levantares (com apoio ou não das patas dianteiras) realizado pelo animal durante o período de observação. Podem também ser registrados o número de bolos fecais, o tempo que o animal permanece parado ou dormindo, a movimentação e o tempo despendido na auto-limpeza.

5.1.4. Avaliação do desempenho motor - Teste do Rota-rod

O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em cinco compartimentos, com rotação de 12 rpm. Os animais, colocados individualmente no aparelho, foram treinados 24 horas antes do teste e antes da administração dos extratos, em sessões de 2 minutos de duração, selecionando-se os animais que permaneceram na barra giratória, avaliando a coordenação motora. Os animais foram tratados com FBut 30, 100 e 300 mg/kg, v.o., uma hora antes do teste.

Durante o experimento, as observações foram realizadas durante 1 minuto e foram registrados o tempo de permanência do animal na barra giratória (em segundos) e o número de quedas durante o teste, com três reconduções, no máximo, à barra. Este teste permitiu

avaliar se os tratamentos aplicados promoveram incoordenação motora nos animais, por sedação e/ou relaxamento muscular.

5.1.5. Avaliação do Sistema Nervoso Central

5.1.5.1. Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados de mesma medida, de acrílico transparente com chão opaco, opostos em forma de cruz grega. Os braços estão conectados por uma placa central (5 x 5 cm) e elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão.

Os testes foram realizados com camundongos machos e fêmeas albinos Swiss (30 - 40 g) adultos, n = 8/grupo. O grupo experimental foi tratado com FBut 1,0 g/kg, v.o., o grupo controle recebeu veículo (água, volume máximo de 5 mL/kg, v.o) e o grupo controle positivo foi tratado com diazepam (DZP) (1,5 mg/kg, i.p.). Os animais foram colocados na plataforma central com a cabeça voltada para um dos lados fechados e o seu comportamento observado durante 5 minutos.

As medidas comportamentais registradas basearam-se em: frequências de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados. Foram também avaliados comportamentos etológicos como o número de imersão de cabeça (“head-dipping”) e levantar (“rearing”), que avaliam a atividade exploratória e a postura de estiramento (“stretch attend postures”), que avalia a ação ansiolítica/ansiogênica.

5.1.5.2. Teste da suspensão pela cauda

O teste da suspensão pela cauda tem por objetivo avaliar os efeitos da ação dos antidepressivos em geral, que aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade dos animais.

Os testes foram realizados em camundongos machos e fêmeas albinos Swiss (30 – 40 g) adultos, n = 6/grupo. O grupo experimental foi tratado com FBut 100, 250 e 500 mg/kg, v.o., o grupo controle recebeu veículo (água, volume máximo de 5 mL/kg, v.o) e o grupo controle positivo foi tratado com imipramina (15 mg/kg, i.p.).

O procedimento experimental consistiu em suspender os animais pela cauda por um período de 5 minutos durante o qual foi registrado o tempo total de imobilidade e a latência para a apresentação deste comportamento, a partir do segundo minuto. Os antidepressivos em geral, aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo total de imobilidade dos animais.

5.1.5.3. Teste do desespero comportamental – Natação forçada

De forma semelhante ao teste de suspensão pela cauda, o teste da natação forçada avalia possíveis efeitos antidepressivos do extrato em estudo.

Os testes foram realizados em camundongos machos e fêmeas albinos Swiss (30 – 40 g) adultos, n = 6/grupo. O grupo experimental foi tratado com FBut v.o., o grupo controle recebeu veículo (água, volume máximo de 5 mL/kg, v.o) e o grupo controle positivo foi tratado com imipramina (15 mg/kg, i.p.).

O experimento consistiu em colocar os animais individualmente em cilindros com 35 cm de altura por 24 cm de diâmetro, contendo 13,5 cm de água, formando uma coluna de água alta o suficiente para impedir que o camundongo se apoie no fundo do recipiente. Durante 5 min é registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação da imobilidade. Considera-se como “imobilidade” quando o animal faz apenas movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água.

5.1.5.4. Teste do sono induzido por barbitúrico

Drogas depressoras do SNC reduzem a latência e aumentam a duração do sono induzido por pentobarbital, 50 mg/kg i.p., administrado uma hora após os tratamentos com o extrato em estudo. Após registrar o tempo de latência para indução do “sono”, os camundongos foram colocados em decúbito dorsal e a duração total da perda do reflexo postural dos animais foi registrada.

5.1.5.5. Teste do sono induzido por éter etílico

A avaliação do sono etéreo segue os mesmos princípios do sono barbitúrico. Os mecanismos farmacodinâmicos de ambos os agentes são mediados via complexo receptor GABA_A. Camundongos pré-tratados com o EA v.o. ou veículo foram colocados em câmara transparente e hermeticamente fechada saturada com éter etílico. A saturação foi obtida com um chumaço de algodão de tamanho padrão (6 g) com 5 mL de éter etílico colocado na câmara a 20 cm do chão, 10 minutos antes da realização dos testes farmacológicos. O sono é caracterizado quando o animal perde o reflexo postural. Uma vez o reflexo perdido, espera-se 60 s para retirar o animal da câmara de saturação, colocando-o em decúbito dorsal para registro da duração da hipnose, cujo término é caracterizado pela recuperação da postura normal.

5.1.6. Avaliação da atividade antinociceptiva da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* Mart. em ratos e camundongos

5.1.6.1. Teste da placa quente

Neste teste será medido tempo de latência para resposta ao estímulo térmico nociceptivo em camundongos. Os animais foram colocados sobre uma placa aquecida a 55°C, o que determina uma resposta característica, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés, lambe as patas ou salta. Foi considerado um tempo de corte de 20 segundos para evitar lesões nas patas.

Foram utilizados camundongos (5 animais/grupo), que foram tratados com FBut de *C. sciadophylla* 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o e o grupo controle tratado com água (10 mL/kg, v.o.), O fentanil (50 µg/kg, i.p.), injetado 30 minutos antes dos testes foi utilizado como controle positivo. Após obtenção de valores basais, os camundongos foram tratados e a resposta foi novamente avaliada decorridos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos dos tratamentos.

5.1.6.2. Teste da retirada da cauda

Este teste consiste em estímulo térmico de $50 \pm 1,0$ °C aplicado à cauda de ratos e camundongos, que desencadeia uma resposta nocifensiva reflexa, caracterizado por um movimento de flexão da cauda predominantemente na direção rostral.

Foram utilizados camundongos (6 animais/grupo), que foram tratados com FBut de *C. sciadophylla* 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o e o grupo controle tratado com água (10 mL/kg, v.o.). Os animais foram colocados em contêntores com a cauda permanentemente exposta, durante 5 minutos antes do estímulo para adaptação à nova situação. Em seguida, o terço inferior da

cauda do animal é mergulhado em água aquecida à 55°C, por duas vezes consecutivas, sem enxugar a cauda, anotando o segundo tempo de reação. O procedimento foi repetido em intervalos de 30, 60, 120 e 180 minutos, considerando um tempo de corte de 15 segundos e 7 leituras por cauda.

5.1.6.3. Teste da formalina

A injeção subcutânea de formalina desencadeia o aparecimento de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite a avaliação da intensidade da resposta nociceptiva. Na variação do método descrito por DUBISSON; DENNIS (1977), o tempo (s) em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada (“licking time”) foi usado como índice de nocicepção. O teste consiste em duas fases da resposta ao estímulo aversivo, que tem mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sensibilidade às drogas analgésicas.

Foram injetados 30 µL de formalina 1,5%, via subplantar (s.pl.), na pata posterior direita de cada animal, 60 minutos após a administração da FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. Em seguida, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico transparente e observados durante 30 minutos em dois intervalos de tempo. O tempo I foi de 0 a 5 minutos e o II de 15 a 30 minutos (Fase I: neurogênica e Fase II: inflamatória) (Lapa *et al.*, 2005).

5.1.6.4. Teste de contorções abdominais

As contorções abdominais, em camundongos, caracterizam-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras. Esta resposta motora decorre da aplicação de estímulo nociceptivo por via intraperitoneal. A contagem do número

de contorções ocorridas em um intervalo de tempo pré-determinado é tomado como índice da resposta nociceptiva tempo.

Para a avaliação da atividade nociceptiva foram utilizados camundongos (6 animais/grupo), que serão tratados com FBut de *C. sciadophylla* 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o e o grupo controle tratado com água (10 mL/kg, v.o.) 60 minutos antes da administração intraperitoneal do ácido acético 1 % (10 ml/kg). Os animais, já ambientados à sala de experimentação, serão colocados em caixas de visualização de acrílico, 10 minutos antes da injeção i.p. de ácido acético. As contorções serão contadas em intervalos de 5 minutos durante período de 30 minutos subseqüentes à injeção do ácido acético, sendo o número total neste período tomado como índice da resposta nociceptiva.

5.1.7. Avaliação da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* Mart. na atividade anti-inflamatória

5.1.7.1. Edema induzido por injeção intra-plantar de carragenina

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória. O edema inflamatório induzido pela injeção de carragenina é resultante da ação seqüencial e integrada de vários mediadores inflamatórios. Inicialmente, nos primeiros 60 - 90 minutos, ocorre a liberação de histamina, serotonina, bradicinina, PAF, substância P e prostaglandinas, dentre outras substâncias. A partir deste momento, o edema é mantido principalmente pela produção de prostaglandinas, atingindo um pico entre 4 - 6 horas.

Neste ensaio, utilizando-se um pletismômetro digital modelo LE 7500 da marca Leica, mediu-se o volume das patas traseiras dos animais (em triplicata), imergindo cada pata até o maléolo lateral na cuba. Os animais (ratos, 6 animais/grupo) foram tratados com FBut v.o. de *C. sciadophylla* 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o e o grupo controle tratado com água (10 mL/kg, v.o.). Após 60 minutos, a carragenina 2% foi injetada na pata direita posterior de cada animal (300 µL/pata, s.pl.). Na pata esquerda posterior, foi injetado o veículo (salina 0,9%; 300 µL/pata, s.pl.). Foram feitas leituras: basal (imediatamente após a injeção de carragenina) e nos tempos de 60, 120, 180 e 240 minutos, após a injeção da carragenina 2%.

5.1.7.2. Peritonite induzida pela carragenina

A peritonite é induzida em camundongos pela injeção i.p. de carragenina 2%, após 60 minutos do tratamento v.o. com o extrato em estudo, utilizando-se água v.o (volume máximo de 5 mL/kg) para os grupos controle. O grupo controle positivo foi tratado com dexametasona (8 mg/kg, s.c.) e o grupo controle negativo com salina (0,9%, s.c.). Após 6 horas da administração da carragenina os animais foram mortos e receberam injeção de 5 mL de tampão PBS pH 7,4 heparinizado (5 UI/mL) e foram massageados no abdômen para soltar células aderidas. Uma amostra do exsudato peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Turk e as células contadas em câmara de Neubauer.

A migração de leucócitos promovida pela injeção de carragenina foi quantificada, permitindo avaliar a influência do extrato em estudo no desenvolvimento desta resposta inflamatória, particularmente sensível a anti-inflamatórios esteróides.

5.1.8. Avaliação da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* Mart. no Sistema Cardiovascular

5.1.8.1. Registro da pressão arterial de ratos anestesiados

Os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal com associação de uretana (800 mg/kg) e pentobarbital (50 mg/kg). Em seguida, foram fixados em decúbito dorsal, canulando-se a artéria carótida para registro da pressão arterial e a veia íliaca externa para injeção de drogas e da FBut de *C. sciadophylla*. As variações pressóricas foram registradas com um transdutor de pressão conectado a um aparelho (Power Lab – AD Instruments) que transmite os dados para o computador, utilizando software Chart Pro5.

5.1.8.2. Preparação de anéis de aorta torácica de rato

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

Anéis de aorta torácica de aproximadamente 3 mm de comprimento foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba para órgão isolado com capacidade para 2 mL, contendo solução nutritiva de Krebs, pH 7,4 a 35 °C, aerada com carbogênio (O₂ 95 % CO₂ 5 %). A destruição do endotélio vascular, quando necessária, foi realizada mecanicamente pela introdução e giro de uma haste metálica lesando intraluminalmente o endotélio. Após 30 minutos de estabilização, a presença de endotélio foi testada observando-se o relaxamento induzido pela incubação de acetilcolina (1,0 μM) em anéis previamente contraídos por

noradrenalina (10 μ M). O efeito de concentrações individuais da FBut foi testado em preparações com e sem endotélio, previamente contraídas por noradrenalina (10 μ M).

Os efeitos foram medidos em g de tensão e expressos em porcentagem da contração máxima produzida por noradrenalina (10 μ M).

5.1.9. Avaliação do extrato de *Cecropia sciadophylla* Mart. na atividade anti-úlcero-gênica

5.1.9.1. Indução de lesões gástricas por estresse

Neste modelo, o estresse induzido por imobilização de ratos ou camundongos a frio produz lesões hemorrágicas agudas na mucosa gástrica.

Os animais foram separados em grupos controle e experimental. O grupo controle foi tratado com água e o grupo experimental com FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.. Após 1 hora do tratamento, os animais foram imobilizados em contêntores individuais e colocados em câmara fria a 4° C. Após 2 h, os animais foram mortos sob anestesia etérea e os estômagos retirados.

Os estômagos foram lavados externamente e abertos ao longo da pequena curvatura. O conteúdo estomacal foi desprezado e a parte interna do estômago lavada cuidadosamente com solução salina a 0,9%. Os estômagos foram fixados em placa de Petri coberta com parafina contendo salina gelada para a determinação do índice de lesões e número de úlceras segundo a tabela de pontuação das lesões gástricas.

5.1.9.2. Indução de lesões gástricas por etanol 75%

Foram estudadas as ações anti-úlceras e anti-secretora ácida da FBut em camundongos Swiss machos (30 - 40 g) e ratos Wistar (250 – 300 g). O grupo controle foi tratado com água (volume máximo de 5 mL/kg, v.o.) e o grupo experimental com FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. Úlceras foram induzidas com a administração de etanol 75% (10 mL/kg, v.o.) após 1 h dos tratamentos. Decorrida 1 hora da administração do etanol 75%, os animais foram mortos sob anestesia etérea e os estômagos retirados, limpos com salina 0,9% e fixados em placa de petri

coberta com parafina contendo salina gelada para a determinação do índice de lesões e número de úlceras segundo tabela de pontuação das lesões gástricas.

5.1.9.3. Avaliação da atividade anti-secretora ácida – Método da ligadura pilórica

Camundongos foram mantidos em jejum por 15 h com acesso livre à água. Os animais foram anestesiados com éter etílico recém destilado, a cavidade abdominal foi exposta e o piloro foi amarrado. Após a ligadura, o veículo (salina 0,9%, volume máximo de 5 mL/kg) e a FBut foram injetados na luz duodenal. Transcorridas 4 h da cirurgia, os animais foram sacrificados por anestesia etérea profunda, seus estômagos foram removidos e as secreções coletadas para medidas do volume, do pH e da acidez total dos conteúdos gástricos. O volume de secreção gástrica e o pH foram determinados por medida direta. A acidez total foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base. O número de equivalentes de NaOH necessários para titular o ácido foi considerado indicativo da acidez total , expresso em $\text{mEq}[\text{H}^+]/\text{L}/4\text{h}$.

5.1.10. Avaliação da atividade da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla*

Mart. na junção neuromuscular

5.1.10.1. Preparação nervo frênico - músculo diafragma de rato

Ratos foram mortos por deslocamento cervical sob anestesia com éter. Após incisão no gradeado costal e remoção do diafragma, o nervo frênico esquerdo foi dissecado em toda sua extensão e o conjunto músculo/nervo transferido para o líquido nutritivo (Tyrode). O nervo foi colocado entre eletrodos de platina ligados a um estimulador (0,2 Hz, 0,5 ms, voltagem supra máxima), o diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante ligado a transdutor Power Lab 4/25 (ADInstruments.com, LSI Letica Scientific Instruments). Após estabilização do órgão por 30 minutos, a FBut 0,1, 0,3 e 1,0 mg/mL de *C. sciadophylla* foi incubada e as contrações registradas por software Power Lab Chart 5.

5.1.11. Avaliação do efeito do extrato butanólico de *Cecropia sciadophylla* Mart. na atividade das enzimas Acetilcolinesterase, Ca⁺²-ATPase e H⁺, K⁺-ATPase de mamífero

5.1.11.1. Isolamento da Ca⁺²-ATPase

A Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (SERCA 1) foi extraída dos músculos da coxa de coelho (1,5-2 kg) pelo método descrito por KOSK-KOSICKA (1999). Todas as etapas foram realizadas a 4°C. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital sódico de acordo com as normas do comitê de ética em pesquisa institucional. Os músculos das duas coxas foram removidos, transferidos para béquer contendo EDTA 0,1 mM, dissecados e lavados com água destilada gelada. Para 170 g de músculo foram adicionados 510 mL da solução I. Os músculos foram cortados e homogeneizados em tampão MOPS (solução I), pH 7,0 por 5 min e o homogenato foi centrifugado a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em gaze e o filtrado foi centrifugado a 40.000 g por 90 min. O precipitado foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e mantido em câmara fria por 40 min. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 15.000 g por 20 minutos, o precipitado foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 40.000 g por 90 min. O precipitado resultante foi ressuspenso e homogeneizado em homogeneizador de vidro. O material foi conservado em freezer a -80°C até a realização dos ensaios de atividade enzimática. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford.

5.1.11.2. Determinação da atividade enzimática da Ca^{+2} -ATPase de mamífero

Para os ensaios de medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase foram utilizadas microplacas transparentes de fundo chato de 96 poços. A velocidade de hidrólise enzimática do ATP foi determinada colorimetricamente por quantificação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP em função do tempo (MURAKAMI *et al.*, 1992). As amostras membranares contendo 0,6 μg de proteína preparadas em tampão Tris-maleato 50 mM foram incubadas na ausência e na presença de FBut (3 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em volume final de 75 μL por poço. Iniciou-se a reação com a adição de 7,5 μL de ATP 30 mM e o tempo de reação foi de 10 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com 25 μL de TCA 50 % gelado. Adicionou-se 200 μL de solução ácida de molibdato (15 mL para 0,36 g de ácido ascórbico, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37°C por 10 minutos. A taspigargina (0,01 a 1 μM) foi usada como controle positivo. A leitura foi feita a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices). A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol Pi}/\text{mg}$ proteína/min.

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

As membranas contendo H^+ , K^+ -ATPase foram obtidas da fração microsomal extraída da mucosa gástrica de suíno pelo método descrito por RABON *et al.* (1988). O animal foi adquirido de fornecedor ocasional e sacrificado de acordo com as normas. O estômago foi removido, seccionado ao longo da curvatura menor, lavado com PBS gelado e transferido para um béquer contendo tampão de homogeneização. O fundo do estômago foi dissecado e estendido em placa de vidro sobre gelo, o muco foi removido e as glândulas

gástricas foram isoladas. O material foi homogeneizado em homogeneizador de vidro contendo tampão de homogeneização (20 – 30 mL) a 3000 rpm. O homogenato foi centrifugado a 13000 g por 15 minutos, o precipitado foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 g por 60 minutos. O precipitado resultante (fração microsomal) foi ressuspenso em tampão de homogeneização (18 mL), aplicado em gradiente de Ficol e sacarose (4 % e 12 %) e centrifugado a 24.000 rpm por 60 minutos. A fração contendo a H^+ , K^+ -ATPase foi coletada na interface do Ficol 12 %, ressuspenso em tampão de homogeneização (6 mL) contendo sacarose 30 % e homogeneizada em homogeneizador de vidro. Os microsomas gástricos foram conservados em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos ensaios. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

5.1.11.4. Determinação da atividade enzimática da H^+ , K^+ -ATPase de mamífero

Para as medidas da atividade da H^+ - K^+ -ATPase gástrica, amostras microsomais (0,9-1 μg) foram incubadas em tampão Tris-HCl 50 mM, contendo ouabaína 1 mM (para eliminar a Na^+ -ATPase presente no homogenato) em volume final de 100 μL . Foram usadas microplacas transparentes de 96 poços. A FBut foi testada em triplicata nas concentrações de 3 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A reação foi iniciada adicionando-se 20 μL de ATP 5 mM e incubando-se a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μL de TCA 50% a 4°C . Adicionou-se às amostras 200 μL de solução ácida de molibdato (0,36 g de ácido ascórbico para 15 mL de solução, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37°C por 10 minutos. Para controle positivo foi utilizado o antagonista específico da bomba H^+ - K^+ -ATPase, SCH 28080 (3 a 1000 μM). A leitura das absorbâncias foi feita a 820 nm em leitor de placa (Spectramax M2 - Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol Pi}/\text{mg proteína} / \text{min}$.

5.1.11.5. Isolamento da acetilcolinesterase

Em todas as etapas o material utilizado foi mantido sempre em temperatura baixa, através de banhos com gelo. O animal foi morto de acordo com as normas, por decapitação e sua estrutura cerebral (córtex) foi removida, pesada e transferida para um béquer contendo tampão fosfato pH 8,0 gelado e enriquecido com sacarose 0,32 M. O córtex foi homogeneizado em homogeneizador de vidro e dividido em alíquotas de 150 µL em tubos Eppendorf e conservado em freezer a -80 °C até a realização dos ensaios de atividade enzimática.

5.1.11.6. Determinação da Atividade enzimática da acetilcolinesterase de mamífero

A metodologia para a determinação da atividade colinesterásica nas amostras de homogenatos de córtex cerebral de ratos foi adaptada do método descrito por ELLMAN *et al.*, (1960), como descrito por ROCHA *et al.*, (1993). Este método baseia-se na medida da velocidade de produção da tiocolina proveniente da hidrólise enzimática da acetiltiocolina (AChE) pela colinesterase. Essa medida foi obtida pela reação contínua da tiocolina com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) liberando o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB). A taxa de produção do ânion de coloração amarela formado é diretamente proporcional à concentração de acetiltiocolina hidrolisada pela enzima presente no tecido.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços transparentes com fundo chato. Primeiramente, foi pipetado o tampão de reação para determinação da atividade da Acetilcolinesterase (tampão fosfato pH 8,0), em seguida foram pipetados a enzima (volume relativo a 63 µg/mL de proteínas do homogenato), o DTNB (0,1 mM) e por último o substrato

acetilcolina (0,25 mM), perfazendo um volume total de 300 μ L. A ação sobre a enzima acetilcolinesterase da FBut nas concentrações 3,0; 10,0; 30,0 e 100 μ g/mL foi analisada comparativamente à ação da neostigmina (anticolinesterásico de duração média) nas concentrações de 0,3 a 100 nM. Todas as reações foram realizadas em triplicata. Para as reações com FBut e neostigmina, a placa foi incubada por 10 minutos a 37 °C antes da adição do substrato.

A velocidade de produção do ânion TNB, de coloração amarela, segue a reação cinética de ordem zero e foi determinada em espectrofotômetro Spectra Max M2 Molecular Devices, a 412 nm a 37 °C, em intervalos de 1 minuto durante 10 minutos.

A atividade enzimática foi determinada através da velocidade de hidrólise da acetilcolina pela colinesterase, calculada por:

$$R = \Delta A \times (1,36 \times 10^4 \times Fd \times Co)^{-1}$$

Onde:

R = velocidade em moles de substrato hidrolisado por minuto por grama de tecido;

ΔA = variação da absorbância por minuto;

Co = concentração original do tecido (mg/mL);

$1,36 \times 10^4$ = coeficiente de extinção do ânion TNB;

Fd = fator de diluição.

A atividade enzimática (R) foi expressa em moles de acetilcolina hidrolisada/min/ μ g de proteína.

5.1.11.7. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o método descrito por BRADFORD (1976). O método baseia-se na mudança de coloração vermelha do corante ácido azul de coomassie brilhante G-250, presente no reagente de Bradford, para a coloração azul após a sua ligação à proteína das amostras. O complexo proteína-corante tem um alto coeficiente de extinção, resultando em uma medida precisa da quantidade de proteínas das amostras.

Alíquotas em triplicata das amostras ensaiadas foram incubadas com o reagente de Bradford e as absorbâncias das amostras contendo o complexo proteína-corante foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro UV mini-1650 PC (Shimadzu). As concentrações de proteínas das amostras foram determinadas por interpolação em curva padrão obtida com albumina de soro bovino nas concentrações (1 a 8 µg/mL).

5.1.12. Análises Estatísticas

Os resultados dos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram expressos como média \pm erro padrão da média, 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, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Foi utilizado o Programa Graphpad Prism versão 5.0.

6. Resultados

6.1. Efeitos do extrato aquoso e fração butanólica de *Cecropia sciadophylla*

Mart. no sistema nervoso central

6.1.1. Teste geral de atividade farmacológica

Nas duas primeiras horas após o tratamento com extrato aquoso (EA) de *C. sciadophylla* 100 mg/kg, v.o. (n= 6/grupo) os animais estavam notadamente mais agitados, andando e reagindo com movimentos bruscos aos estímulos sonoros. A reação à compressão da cauda foi menos intensa em alguns animais. O resumo dos principais parâmetros analisados no teste geral encontra-se na tabela 1. No labirinto em cruz elevado, o EA não aumentou as entradas nos braços abertos. Nos testes de convulsão, o EA não alterou a latência, duração ou severidade das convulsões.

Tabela 1 - Resultados da triagem farmacológica no comportamento em camundongos tratados com o extrato aquoso (EA) de *C. sciadophylla* (1,0 g/kg, v.o.).

Teste Hipocrático – (Irwin)	
Deambulação	Sem efeito observável
Equilíbrio	Sem efeito observável
Estereotípias	Sem efeito observável
Depressora	Efeito de analgesia
Estimulante	Hiperatividade
Morte	Ausente

No teste de Irwin com a fração butanólica (FBut) 1,0 g/kg, v.o., os animais reagiram menos aos estímulos potencialmente dolorosos. Foi observada hiperatividade em todos os animais tratados, efeito não observado no tratamento com EA (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados da triagem farmacológica no comportamento e testes específicos de atividade no sistema nervoso central em camundongos tratados com a fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (1,0 g/kg, v.o.).

Teste Hipocrático – (Irwin)	
Deambulação	Aumento da motilidade
Equilíbrio	Sem efeito observável
Estereotípias	Sem efeito observável
Estimulante	Agitação e aumento da motilidade
Depressora	Efeito de analgesia
Morte	Ausente
Avaliação de atividades Centrais Específicas	
Temperatura °C	Sem efeito observável
Sono Etéreo	Sem efeito observável
Labirinto em cruz	Sem efeito observável
Suspensão pela cauda	Redução na latência para imobilidade
Ação Anticonvulsivante	Sem efeito observável

6.1.2. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste do Rota rod

Camundongos tratados com FBut 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. não mostraram alterações na coordenação motora em relação ao grupo controle, cujo tempo de permanência na barra foi de $56.7 \pm 1,3$ s; $56,0 \pm 1,3$ s; $58,3 \pm 0,9$ s; após 60, 120 e 180 minutos do tratamento, respectivamente (Figura 9).

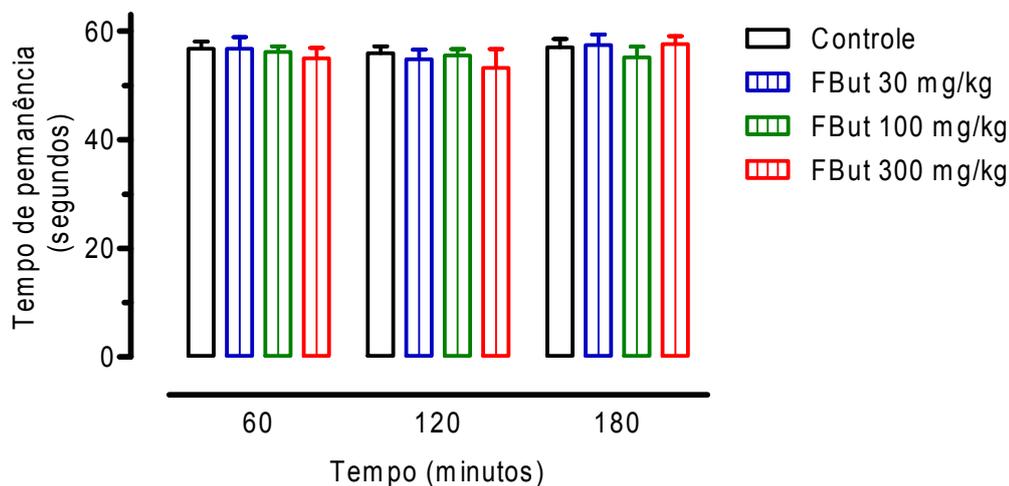


Figura 9 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) no tempo de permanência sobre a barra no teste de “rota rod” com camundongos. As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 8$ /grupo). Dados obtidos aos 60, 120 e 180 minutos após tratamento com a FBut.

6.1.3. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste do campo aberto

Camundongos tratados com FBut 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. mostraram aumento significativo (15 a 60%) no número de cruzamentos nos 60 minutos iniciais do teste ($50,0 \pm$

2,7; $57,1 \pm 6,3$; $66,7 \pm 2,8$; $79,7 \pm 2,0$ cruzamentos em 5 minutos, nos grupos controle, FBut 30, 100, e 300 mg/kg, respectivamente), sugerindo uma ação estimulante da FBut (Figura 10).

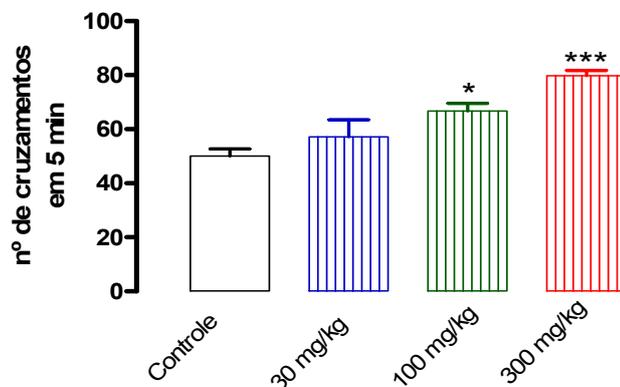


Figura 10 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos durante 5 minutos no teste do campo aberto em camundongos. As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 8$ /grupo), * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$. Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut.

Conseqüentemente, a permanência no centro do campo (figura 11) também aumentou significativamente em relação ao grupo controle ($4,2 \pm 1,2$; $8,1 \pm 1,4$; $11,5 \pm 3,1$; $13,5 \pm 1,8$ nos grupos controle, FBut 30, 100, e 300 mg/kg, respectivamente).

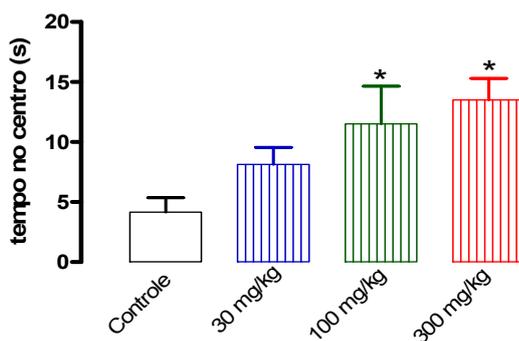


Figura 11 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300mg/kg, v.o.) no tempo de permanência de camundongos no centro do campo aberto. As colunas representam as médias \pm erro padrão da permanência total durante 5 minutos ($n = 8$ /grupo). * $p < 0,05$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o FBut.

O número de auto-limpeza (“grooming”) foi significativamente menor nos grupos tratados com FBut 100 e 300 mg/kg, em relação ao grupo controle tratado com água ($3,4 \pm$

0,3; $2,4 \pm 0,4$; $1,9 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 0,4$ auto-limpezas durante 5 minutos nos grupos controle, FBut 30, 100, e 300 mg/kg, respectivamente) (Figura 12).

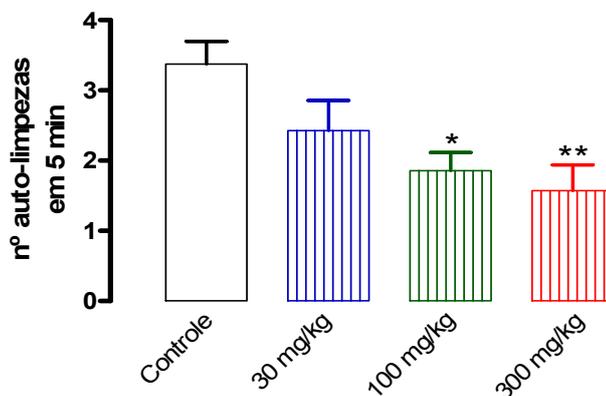


Figura 12 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) no teste do campo aberto em camundongos, mostrando o número de auto-limpezas executadas pelos camundongos durante 5 minutos. As colunas representam as médias \pm erro padrão do número de auto-limpezas ($n = 8$ /grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

O número de levantares (“rearing”) foi significativamente maior nos grupos tratados com FBut em relação ao grupo controle tratado com água ($14,9 \pm 3,0$; $25,7 \pm 1,9$; $26,3 \pm 3,4$; $24,7 \pm 1,0$ levantares durante 5 minutos nos grupos controle, FBut 30, 100, e 300 mg/kg, respectivamente) (Figura 13).

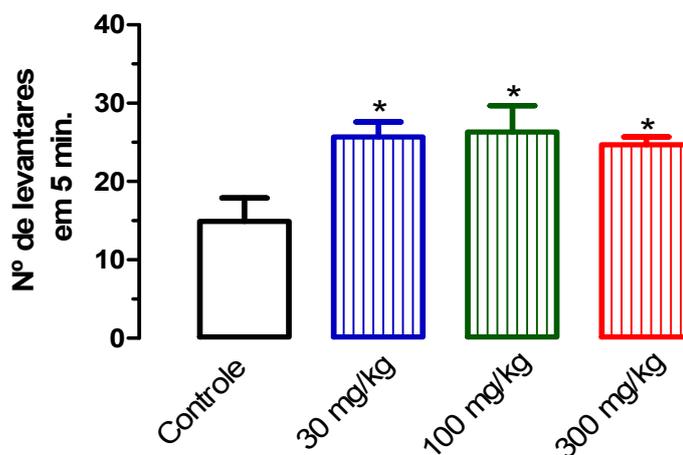


Figura 13 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) no teste do campo aberto em camundongos, mostrando o número de levantares durante 5 minutos. As colunas representam as médias \pm erro padrão do número de levantares ($n = 8$ /grupo). * $p < 0,05$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

6.1.4. Efeito do extrato aquoso de *Cecropia sciadophylla* no teste do sono induzido por barbitúrico

O tratamento com EA de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.), uma hora antes do teste, não alterou o tempo de latência relativamente ao grupo controle $3,98 \pm 0,54$ min, mas nas maiores doses aumentou significativamente (63 %) a duração total do sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.): $87,2 \pm 8,0$; $126,5 \pm 17,3$; $142,0 \pm 14,0$ e $142,2 \pm 17,4$ min, nos grupos controle e nos tratados com EA 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente (Figura 14).

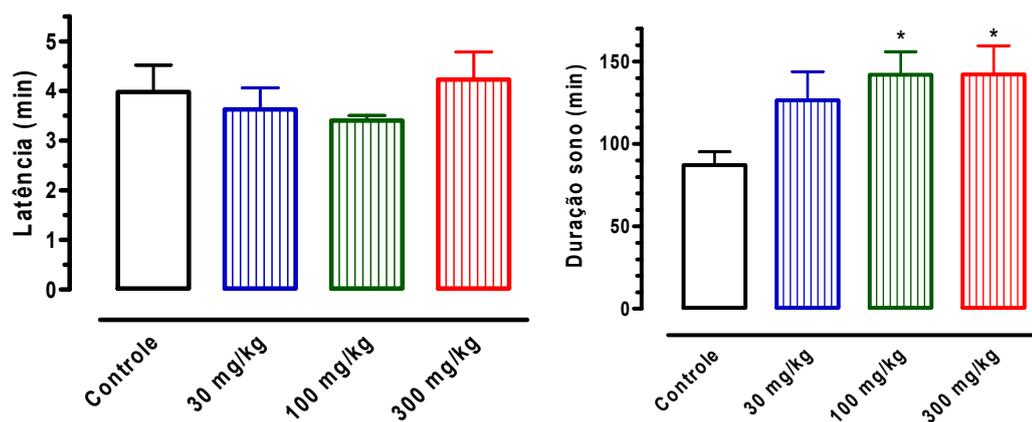


Figura 14 - Efeito do extrato aquoso (EA) de *C. sciadophylla* (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) no teste do sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle recebeu água no volume correspondente à maior dose do EA. As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 6$ /grupo), * $p < 0,05$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

6.1.5. Efeito do extrato aquoso de *Cecropia sciadophylla* no teste do sono induzido por éter etílico

O tratamento com EA de *C. sciadophylla* (100 e 300 mg/kg, v.o.), uma hora antes do teste, não alterou significativamente o tempo de latência (controle: $25,7 \pm 1,2$ s) e tampouco a duração total (controle: $78,9 \pm 6,5$ s) induzido por éter etílico (Figura 15).

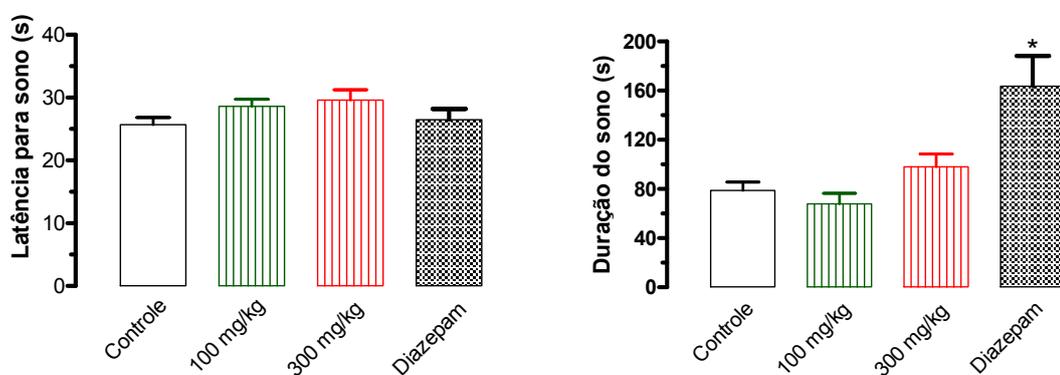


Figura 15 - Efeito do extrato aquoso (EA) de *C. sciadophylla* (100 e 300 mg/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos. O grupo controle recebeu água no volume correspondente à maior dose do EA e o controle positivo diazepam (1,5 mg/kg, i.p.). As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 6$ /grupo), * $p < 0,05$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

6.1.6. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste de suspensão pela cauda

No teste de suspensão pela cauda, o tratamento, uma hora antes, com a FBut 100, 250 e 500 mg/kg, v.o. não provocou alteração significativa no tempo de latência para imobilidade (controle: $73,0 \pm 11,2$ s). No entanto, o tratamento reduziu significativamente o tempo de imobilidade em todos os grupos comparativamente ao grupo controle tratado com água ($88,0 \pm 6,8$; $61,0 \pm 8,9$; $\pm 3,3$; $51,0 \pm 5,7$ s, para os grupos controle, FBut 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente). A imipramina (15 mg/kg, i.p.) utilizada como controle positivo do teste aumentou a latência para $115,8 \pm 3,4$ s e diminuiu o tempo de imobilidade para $24,2 \pm 6,7$ s ($n = 6$ /grupo) (Figura 16).

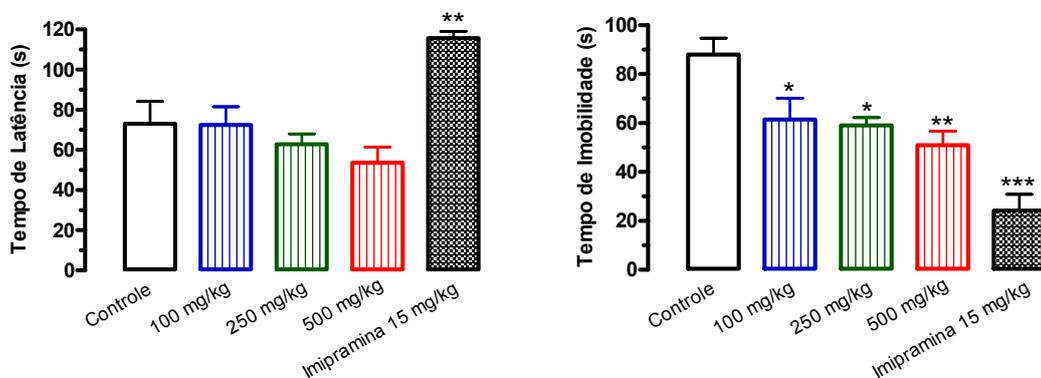


Figura 16 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (100, 250 e 500 mg/kg, v.o.) no tempo de latência para imobilidade e no tempo total de imobilidade no teste de suspensão pela cauda em camundongos. As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 6$ /grupo), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

6.1.7. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste de natação forçada

No teste de natação forçada o tratamento com a FBut 100, 250 e 500 mg/kg, v.o. não produziu alteração significativa no tempo de latência para imobilidade (controle $55,5 \pm 5,4$ s). No entanto, o tempo total de imobilidade foi significativamente diminuído em todos os grupos ($164,3 \pm 7,6$; $112 \pm 6,0$; $99,2 \pm 14,5$; $87,2 \pm 4,4$ s para os grupos controle, FBut 100, 250 e 500 mg/kg, respectivamente). A imipramina (15 mg/kg, i.p.) utilizada como controle positivo do teste, aumentou a latência para $95,5 \pm 9,5$ s e diminuiu a imobilidade total para $24,2 \pm 6,7$ s ($n = 6/\text{grupo}$) (Figura 17).

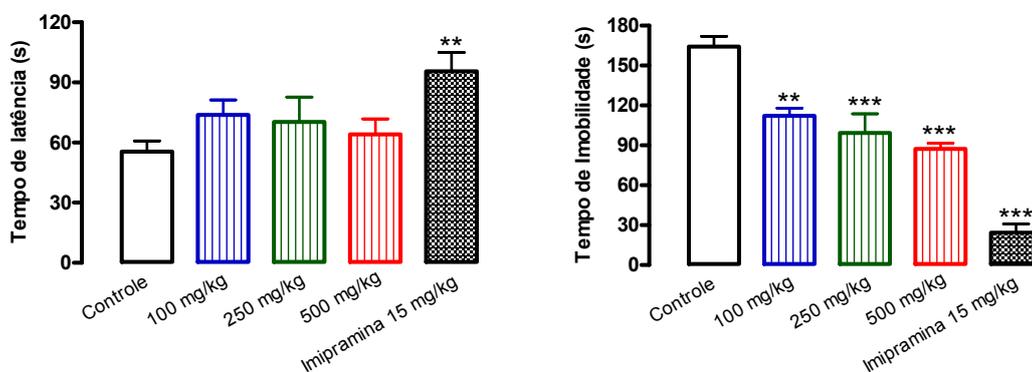


Figura 17 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (100, 250 e 500 mg/kg, v.o.) no tempo de latência para imobilidade e no tempo total de imobilidade no teste de natação forçada em camundongos. As colunas representam as médias \pm erro padrão ($n = 6/\text{grupo}$), ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. Dados obtidos uma hora após tratamento com o extrato.

6.2. Avaliação da atividade antinociceptiva

6.2.1. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste da formalina

O tempo total em que os animais permaneceram lambendo a pata (“licking-time”) injetada com formalina 1,5 % foi significativamente menor nos animais tratados com as maiores doses (0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de FBut de *C. sciadophylla* comparativamente ao observado no grupo controle tratado com água. Na fase neurogênica, de 0 a 5 minutos após a injeção de formalina, a resposta à nocicepção foi reduzida de $97,4 \pm 9,6$ s nos animais controle para $66,4 \pm 6,1$ s e $47,6 \pm 4,7$ s nos grupos tratados com FBut 0,3 e 1,0 g/kg respectivamente. Na fase inflamatória (15 a 30 minutos) a resposta foi reduzida de $117,7 \pm 22,8$ s para $67,5 \pm 5,8$ s e $51,1 \pm 4,8$ s naqueles mesmos grupos (n= 5/grupo) (Figura 18).

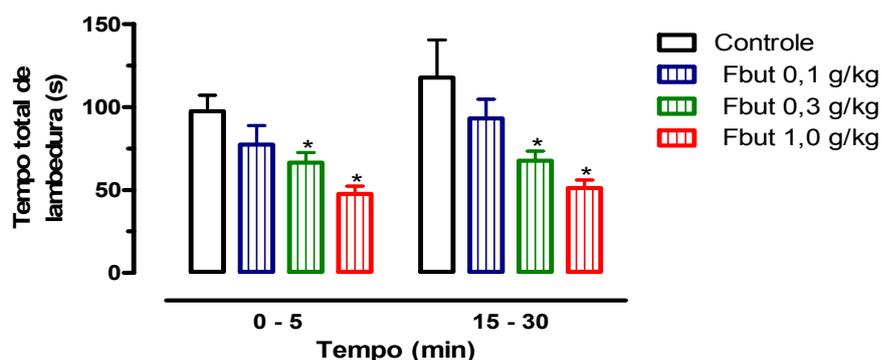


Figura 18 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* no teste da formalina em camundongos. As colunas representam a média \pm erro padrão dos tempos acumulados de lambidas (em segundos) nos intervalos de 0 a 5 min e de 15 a 30 min indicados. (n=5/grupo). * $p < 0,05$.

6.2.2. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1% em camundongos

No grupo controle, a administração de ácido acético 1% i.p. produziu contorções em número crescente até os 10 min. O número de contorções abdominais foi significativamente menor nos animais tratados com FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., após 10, 15 e 20 min da administração do ácido acético 1% comparativamente aos animais do grupo controle tratado com água (Figuras 19 e 20).

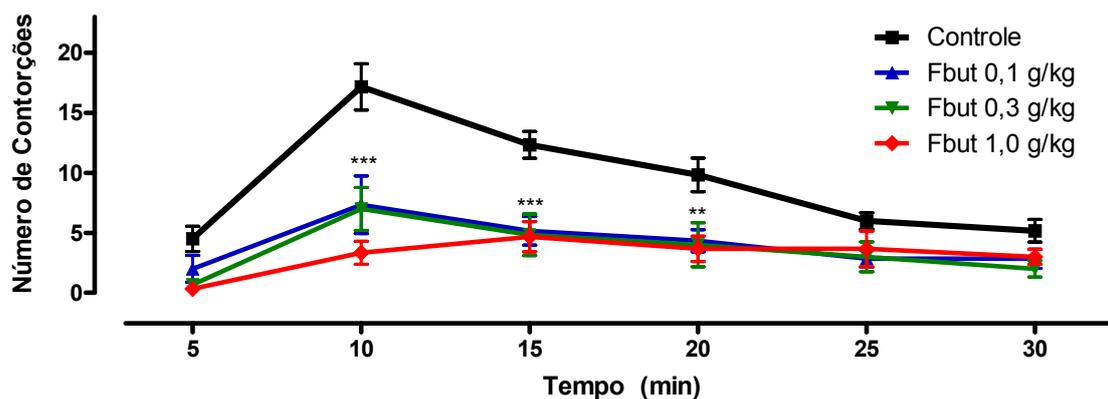


Figura 19 - Efeito da FBut de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1% i.p. em camundongos. Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut. Durante 30 min em intervalos de 5 min. Os pontos representam as médias \pm erro padrão do número de contorções acumuladas no tempo (n = 6/grupo). ** p<0,01 *** p<0,001.

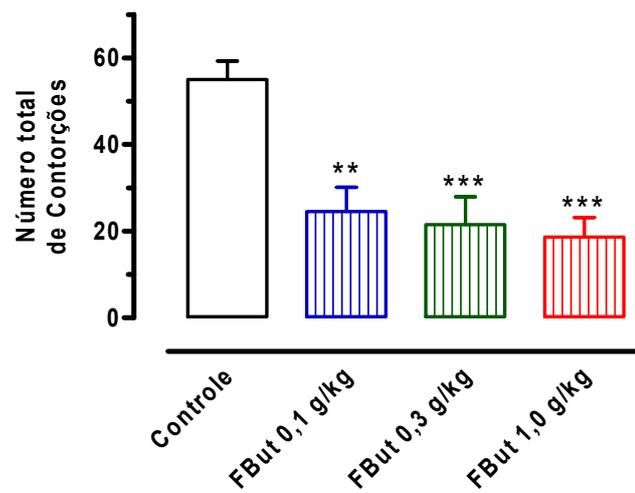


Figura 20 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) no número total de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1% i.p. em camundongos em 30 min. Os pontos representam as médias \pm erro padrão do número de contorções acumuladas no tempo (n = 6/grupo). ** p<0,01 *** p<0,001. Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut.

6.2.3. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste da retirada da cauda

Nas três horas de duração do teste da retirada da cauda (“tail flick”) não houve diferenças entre o tempo de resposta do grupo controle tratado com água ($2,4 \pm 0,2$ s) e a resposta dos grupos tratados com FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. (Figura 21).

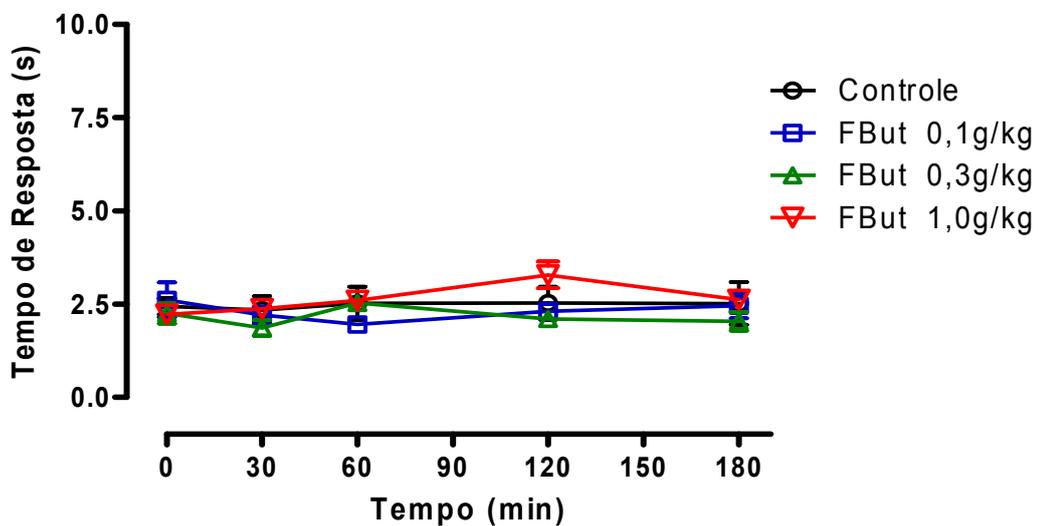


Figura 21 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) no teste da retirada da cauda (“tail flick”) em camundongos. Os pontos representam as médias \pm erro padrão do tempo de resposta ao calor ($n = 6$ /grupo). Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut.

6.2.4. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste da placa quente

Nas quatro horas de duração do teste da placa quente, não houve diferenças entre o tempo de resposta (segundos) do grupo controle tratado com água e as respostas obtidas nos grupos tratados com FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg). O fentanil (50 µg/kg, i.p.) utilizado como controle positivo do teste aumentou o tempo para reação ao calor até o limite de corte (20 s) após 30 min da injeção (Figura 22).

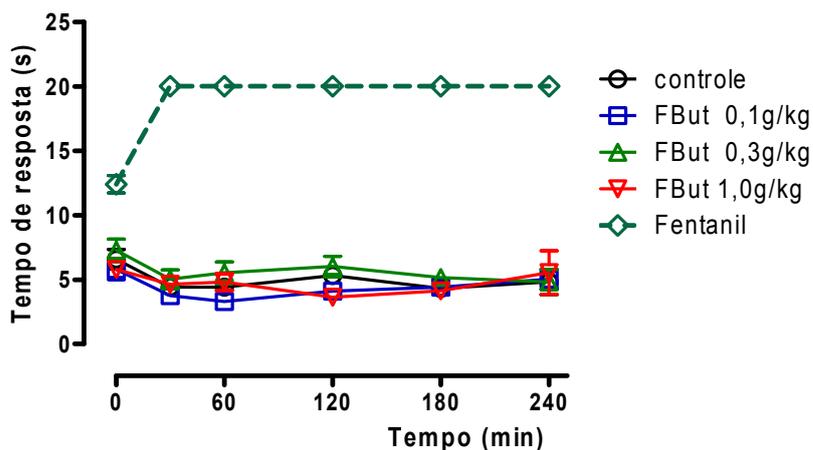


Figura 22 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg) em camundongos no teste da placa quente. Os pontos representam as médias \pm erro padrão do tempo de resposta ao estímulo térmico (n = 6/grupo). Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut.

6.3. Avaliação da atividade antiinflamatória

6.3.1. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste do edema de pata induzido por carragenina

Nas quatro horas de duração do teste do edema de pata a resposta inflamatória decorrente da injeção de carragenina 2% na pata de ratos tratados com a FBut de *C. sciadophylla* 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o. não apresentou diferenças em relação ao grupo controle tratado com água (Figura 23).

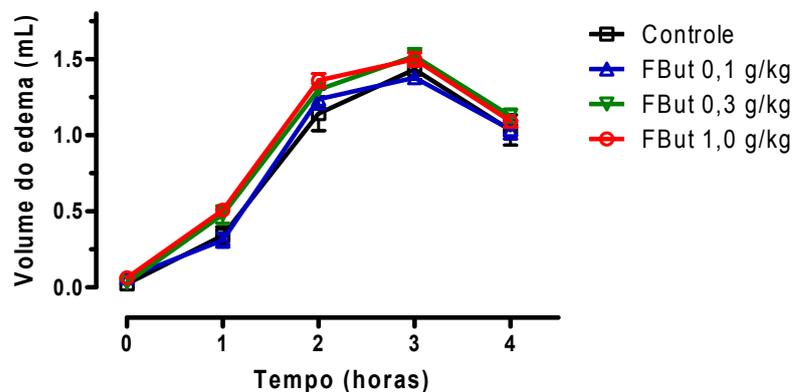


Figura 23 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) no teste do edema de pata induzido por carragenina 2% em ratos. O grupo controle foi tratado com água. Os pontos representam as médias \pm erro padrão do tempo de resposta ao estímulo térmico ($n = 6$ /grupo). Dados obtidos uma hora após tratamento com a FBut.

6.3.2. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no teste de migração celular induzida por carragenina

Após 6 horas da administração intraperitoneal de carragenina 2% o número total de leucócitos no lavado peritoneal de ratos tratados previamente com a FBut de *C. sciadophylla* 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. não apresentou diferenças em relação ao grupo controle tratado com salina 0,9% s.c. ($9,5 \pm 0,3$ leucócitos $10^3/\text{mL}$). A dexametasona (8 mg/kg, s.c.), utilizada como controle positivo, reduziu o número total de leucócitos relativamente ao grupo controle ($4,6 \pm 0,3$ leucócitos $10^3/\text{mL}$). (Figura 24).

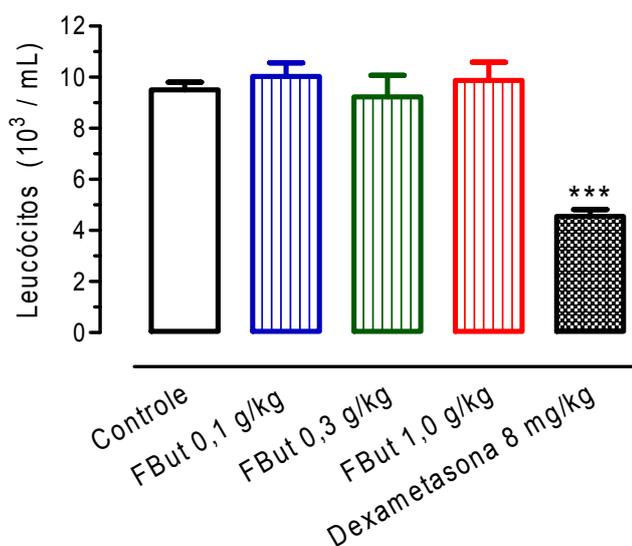


Figura 24 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) no número total de leucócitos no lavado peritoneal, após 6 horas da administração de carragenina 2% i.p. em ratos, no teste de migração celular. As colunas representam as médias \pm erro padrão na contagem total de leucócitos (n = 6 animais/grupo). *** $p < 0,001$.

6.4. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* no sistema cardiovascular de ratos

6.4.1. Registro da pressão arterial de ratos anestesiados

Os ratos anestesiados com associação entre uretana (800 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) apresentaram pressão arterial média de 120 ± 5 mmHg (n=5). A injeção endovenosa da FBut (0,1; 0,3; 1,0; 10 e 30 mg/kg) produziu hipotensão que não foi bloqueada pela administração prévia de atropina (1 mg/kg, e.v.). A frequência cardíaca não foi alterada com a injeção da FBut (Figura 25).

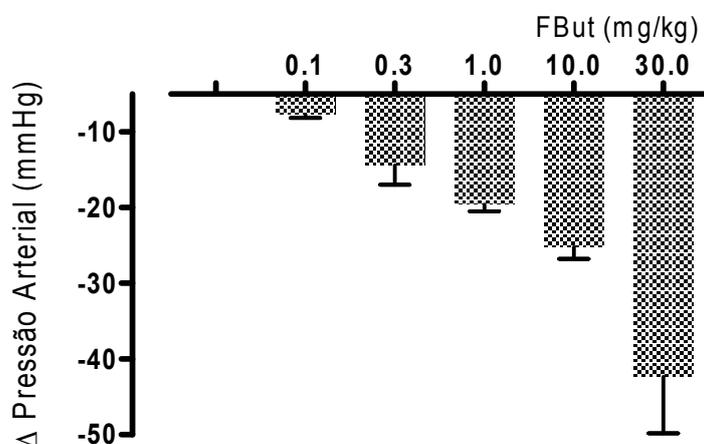


Figura 25 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3; 1,0; 10,0 e 30,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratos anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg i.p.). As colunas indicam a variação da pressão arterial produzida pela FBut (média \pm erro padrão) (n = 5).

Após administração de FBut (0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg, e.v.), as respostas pressóricas à noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 μ g/kg) não foram significativamente diferentes em relação às respostas controle no mesmo animal (n=5 animais) (Figura 26).

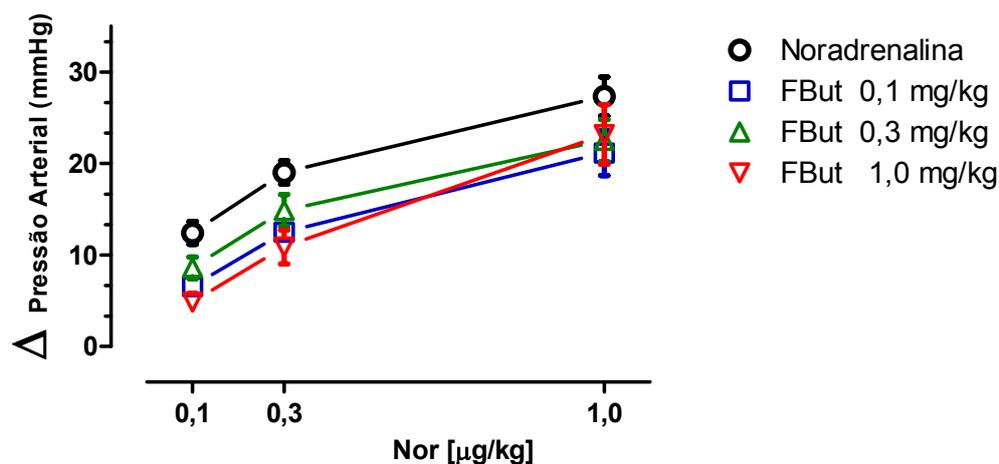


Figura 26 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 mg/kg, e.v.) nas respostas pressóricas à noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g/kg}$ e.v.). Os resultados representam as médias \pm erro padrão (n=5).

6.4.2. Preparação de anéis de aorta torácica de rato

Anéis de aorta sem endotélio, inicialmente contraídos por noradrenalina (10 μM) após incubação com FBut de *C. sciadophylla*, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram relaxamento significativo em relação ao tônus inicial por noradrenalina (n= 5 animais).

Anéis de aorta com endotélio, inicialmente contraídos por noradrenalina (10 μM) após incubação com FBut de *C. sciadophylla*, 1, 3, 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram relaxamento de $22,0 \pm 4,4$; $69,8 \pm 5,9$; $99,3 \pm 6,5$ e $117,8 \pm 2,0$ %, respectivamente, em relação ao tônus inicial por noradrenalina (n= 5 animais) (Figura 27).

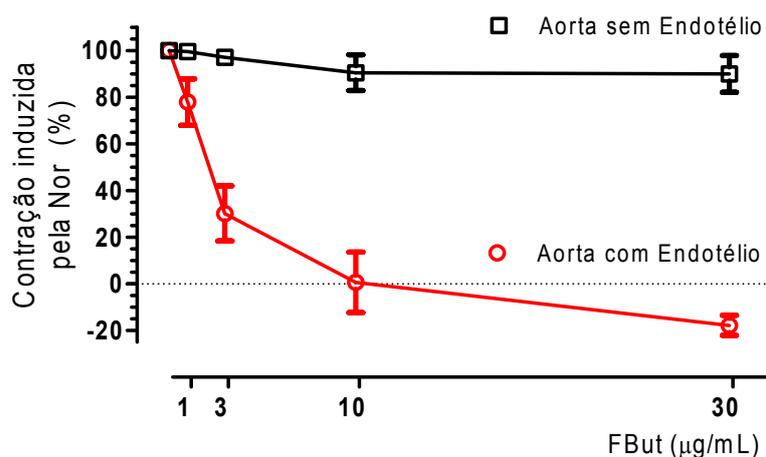


Figura 27 – Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (1, 3, 10 e 30 µg/mL) no relaxamento de anéis de aorta de rato sem e com endotélio. As preparações foram previamente contraídas por noradrenalina (10 µM). Os resultados representam as médias ± erro padrão (n= 5 animais).

6.5. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* em modelos de úlcera gástrica

6.5.1. Indução de lesões gástricas por estresse

No modelo de lesão gástrica induzida por estresse o número de úlceras na mucosa após duas horas de contensão no frio foi $13,5 \pm 0,9$ no grupo controle. Após tratamento prévio com FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o. o número de úlceras foi reduzido para $10,0 \pm 3,5$, $4,5 \pm 2,3$ e $1,8 \pm 0,9$, respectivamente (Figura 28).

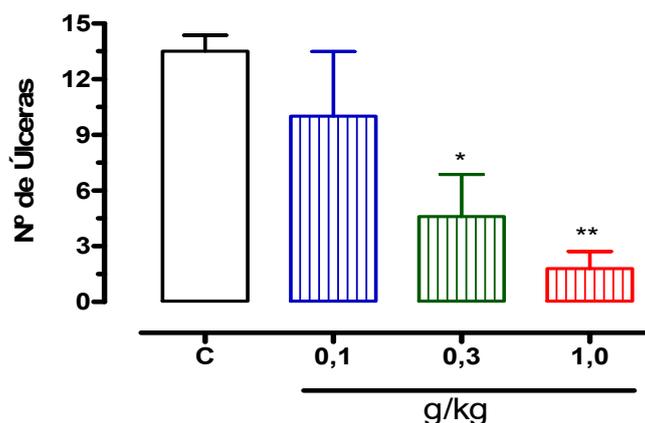


Figura 28 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse a 4 °C. As colunas representam as médias ± erro padrão dos índices de lesão. (n = 6/grupo) (*p<0,05, **p<0,01).

No grupo controle o índice de lesões gástricas induzidas por contensão no frio foi $25,8 \pm 1,7$. Com o tratamento prévio com a FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg v.o. uma horas antes do estresse, os índices de lesão gástrica foram $21,8 \pm 4,0$; $13,0 \pm 3,0$ e $9,0 \pm 1,3$, respectivamente. Nas maiores doses (0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) a FBut reduziu o índice de lesões em 49,6 % e 65,1 %, respectivamente, relativamente ao controle (*p<0,05, **p<0,01) (Figura 29).

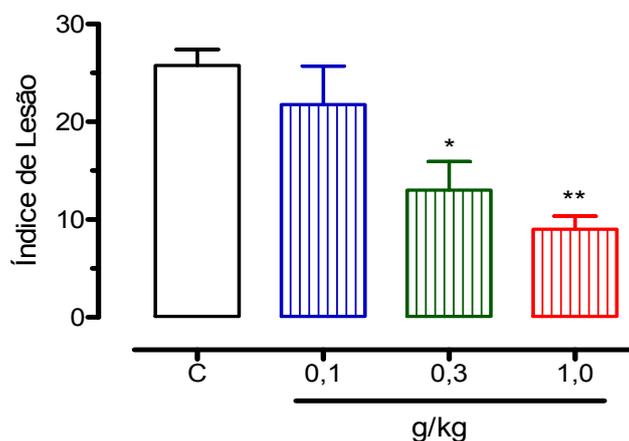


Figura 29 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse a 4 °C. As colunas representam as médias ± erro padrão dos índices de lesão. (n = 6/grupo) (*p<0,05, **p<0,01).

6.5.2. Indução de lesões gástricas por etanol 75%

No modelo de lesão gástrica induzida por etanol a 75% (10 mL/kg, v.o.), o número de úlceras após uma hora da administração do etanol foi $19 \pm 3,0$ no grupo controle. Após tratamento prévio com FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. uma hora antes da administração do etanol o número de úlceras foi reduzido para $12 \pm 2,3$; $7,3 \pm 0,9$ e $2,3 \pm 1,7$, respectivamente (** $p < 0,01$) (Figura 30).

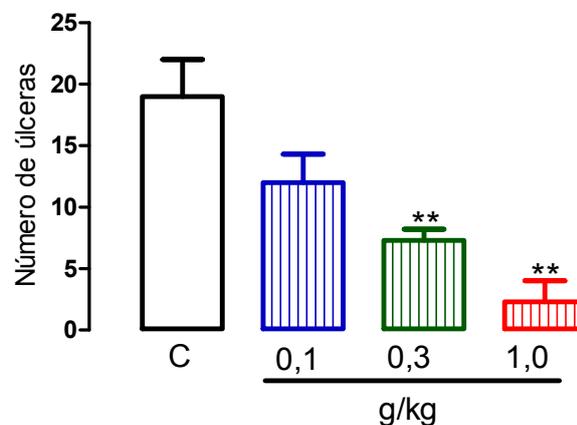


Figura 30 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos a administração de etanol 75% (10 mL/kg, v.o.). As colunas representam as médias \pm erro padrão dos índices de lesão. (n = 6/grupo) (** $p < 0,01$).

No grupo controle, o índice de lesões gástricas induzidas por administração de etanol 75% (10 mL/kg, v.o.) foi $43,4 \pm 9,0$. Com o tratamento prévio com a FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. uma hora antes da administração do etanol, os índices de lesão gástrica foram $27,7 \pm 6,0$; $24,3 \pm 2,0$ e $9,7 \pm 0,5$, respectivamente. Nas maiores doses (0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), a FBut reduziu o índice de lesões em 44,0 % e 77,6 %, respectivamente, relativamente ao grupo controle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) (Figura 31).

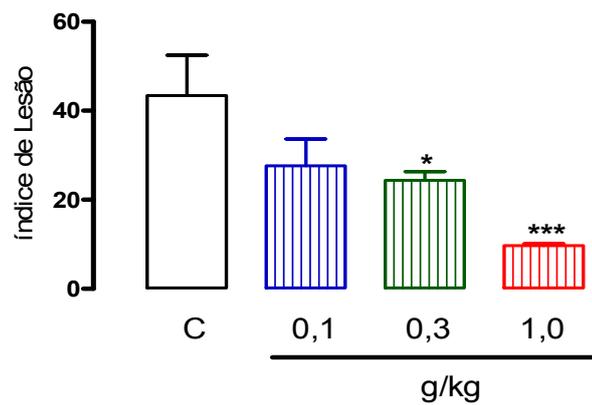


Figura 31 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na proteção da mucosa gástrica de camundongos submetidos à administração de etanol 75% (10 mL/kg, v.o.). As colunas representam as médias \pm erro padrão dos índices de lesão. (n = 6/grupo) (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

6.5.3. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* na secreção gástrica em camundongos

A avaliação da atividade da FBut na secreção gástrica foi realizada com o método da ligadura pilórica, medindo o volume do conteúdo gástrico acumulado durante 4 horas, o pH (acidez livre) e a acidez total (mEq[H⁺]/L).

Nos animais controle, tratados com água injetada na luz duodenal, o volume de secreção gástrica foi $5,0 \pm 0,6$ mL; com pH $2,2 \pm 0,2$ e acidez total de $4,6 \pm 1,0$ mEq[H⁺]/L.

Nos animais tratados com FBut 0,1, 0,3 e 1,0 g/kg os volumes da secreção gástrica foram $3,3 \pm 0,8$, $2,1 \pm 0,7$, $0,9 \pm 0,1$ mL, respectivamente (Figura 32); com pH de $3,0 \pm 0,3$ e $3,8 \pm 0,5$ e $5,0 \pm 0,4$, respectivamente (Figura 33); acidez total de $2,4 \pm 0,8$; $1,8 \pm 0,9$ e $0,4 \pm 0,1$ mEq[H⁺]/L, respectivamente (Figura 34).

Apesar do aparente efeito proporcional à dose de FBut, apenas as administrações de FBut 0,3 e 1,0 mg/kg reduziram significativamente o volume secretado em 58 % e 82% (Figura 32), aumentou o pH em 1,6 e 2,8 unidades (Figura 33) e reduziu 60,9 % e 80,4 % da acidez total da secreção gástrica, em relação ao grupo controle, respectivamente (Figura 34).

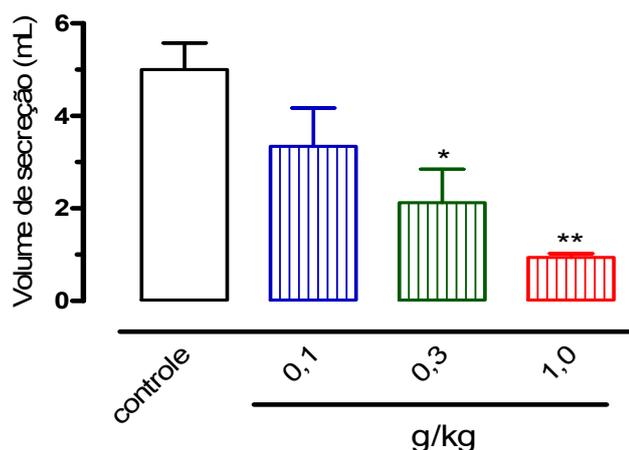


Figura 32 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no volume de secreção gástrica produzida pela mucosa de camundongos 4 horas após ligadura pilórica. As colunas representam as médias \pm erro padrão do volume da secreção. (n = 6/grupo) (*P<0,05, **p<0,01).

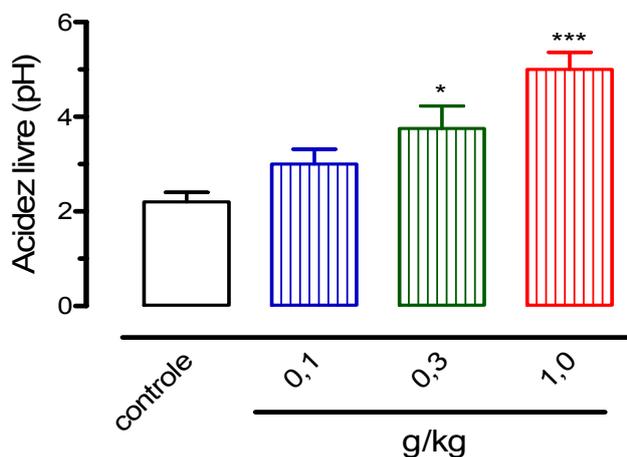


Figura 33 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) sobre a acidez livre (pH) da secreção ácida gástrica produzida pela mucosa de camundongos 4 horas após ligadura pilórica. As colunas representam as médias \pm erro padrão da acidez livre. (n = 6/grupo) (*p<0,05, ***p<0,001).

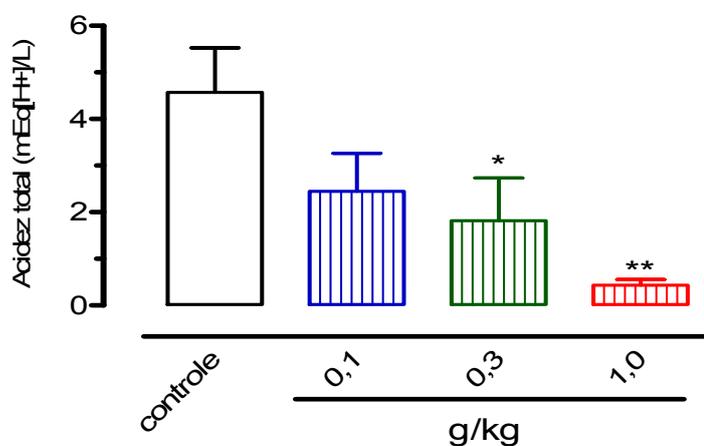


Figura 34 - Efeito da fração butanólica (FBut) *C. sciadophylla* (0,1, 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) sobre a acidez total (mEq[H+]/L/4h) da secreção gástrica produzida pela mucosa de camundongos 4 horas após ligadura pilórica. As colunas representam as médias \pm erro padrão da acidez total (n = 6/grupo) (*p<0,05, **0,01).

6.6. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* na atividade da H^+ , K^+ -ATPase de mamífero

Na determinação da atividade da enzima ATPase em homogenato de mucosa gástrica de porco foi obtida atividade de $104,9 \pm 1,9 \mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$. No estudo da inibição da H^+ , K^+ -ATPase o SCH 28080 (1 a 277 $\mu\text{g/mL}$), utilizado como droga padrão, apresentou CI_{50} 90,0 $\mu\text{g/mL}$ (LC de 55,1 a 146,9 $\mu\text{g/mL}$). Comparativamente, os resultados obtidos com a FBut de *C. sciadophylla* (1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) apresentou CI_{50} 40,2 $\mu\text{g/mL}$ (LC de 30,9 a 52,3 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 35).

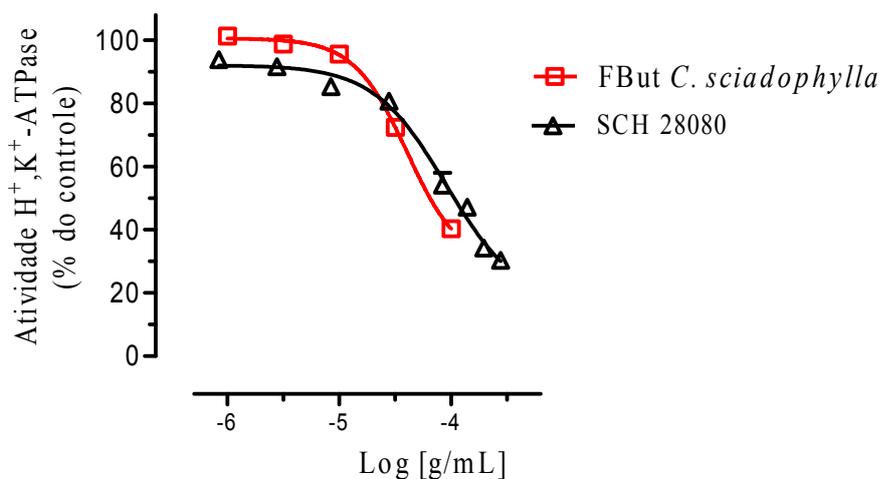


Figura 35 - Efeito da fração butanólica (FBut) *C. sciadophylla* (1 a 100 $\mu\text{g/mL}$), sobre a atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase em relação à droga controle SCH 28080 (1 a 277 $\mu\text{g/mL}$), (curva 2). Os pontos representam as médias \pm erro padrão da concentração ($n = 6$ animais).

6.7. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* na contração do músculo diafragma de rato

6.7.1. Preparação nervo frênico - músculo diafragma

A incubação da fração butanólica de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) potenciou a contração do diafragma obtida por estímulo direto das fibras musculares (0,2 Hz, 0,5 ms, voltagem supra máxima). A incubação de FBut 0,3 mg/mL potenciou a contração muscular em $26,3 \pm 1,6 \%$ e $46,5 \pm 5,4 \%$ em relação à contração basal, respectivamente (Figura 36).

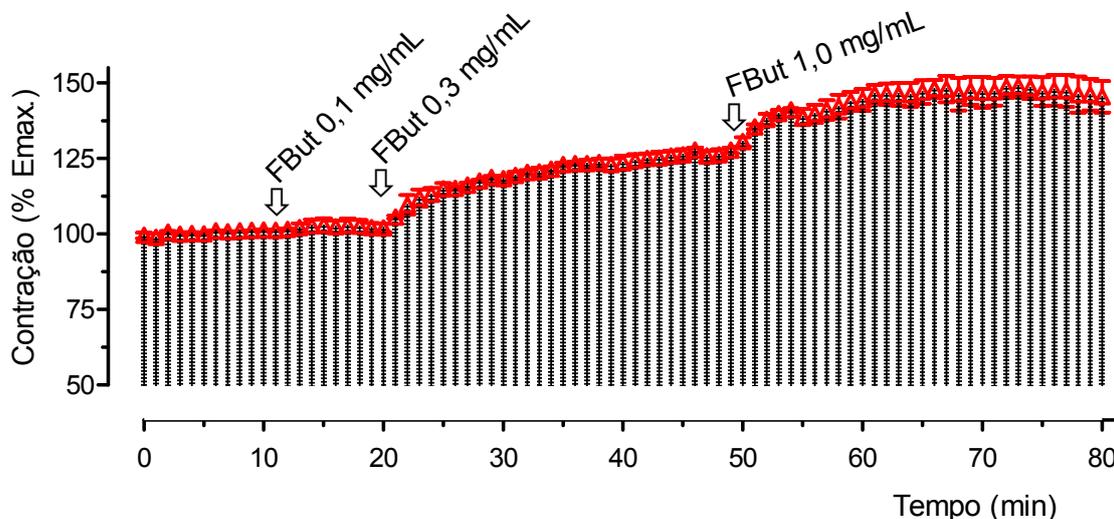


Figura 36 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) na contração do diafragma de rato sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supra máxima). Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4 animais).

A incubação da FBut de *C. sciadophylla* (1 mg/mL) potenciou a contração do diafragma obtida por estímulo do nervo frênico parcialmente bloqueado pela ação de D-tubocurarina (1 μ M). Após 15 minutos de incubação a contração do músculo diafragma retornou ao nível da contração basal (Figura 37).

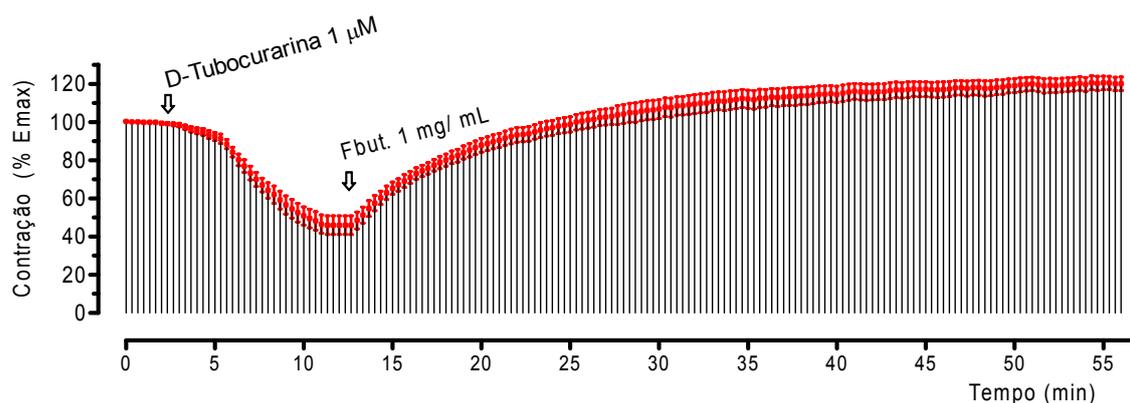


Figura 37 - Efeito da fração butanólica (FBut) 1 mg/mL de *C. sciadophylla* na contração de diafragma de ratos sob estímulo indireto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supra máxima), na presença de D-tubocurarina 1 μ M. Os valores são médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4 animais).

A incubação da fração butanólica de *C. sciadophylla* (1 mg/mL) potenciou a contração do diafragma obtida por estímulo direto das fibras musculares na presença de D-tubocurarina (10 μ M) que bloqueia totalmente as contrações devidas ao estímulo nervoso (Figura 38). A incubação de FBut 1 mg/mL potenciou a contração muscular que retornou ao nível basal após 25 minutos de incubação.

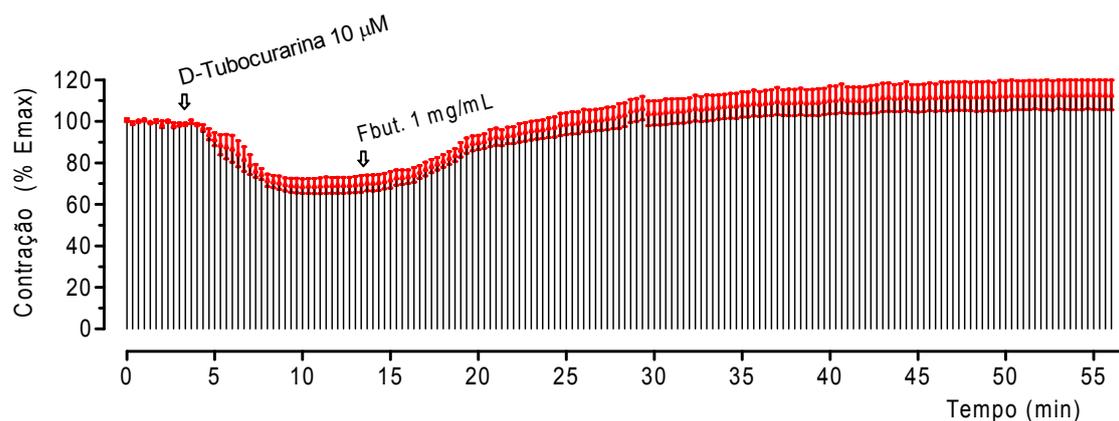


Figura 38 - Efeito da fração butanólica (FBut) 1 mg/mL de *C. sciadophylla* na contração de diafragma de rato sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supra máxima), na presença de D-tubocurarina 10 μ M. Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4 animais).

6.8. Efeito da fração butanólica de *Cecropia sciadophylla* nas atividades das enzimas Ca^{+2} -ATPase e Acetilcolinesterase de mamífero

Na determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase em homogenato de córtex de rato foi obtida uma atividade de 37.1 ± 2.7 nmoles/ μg proteína/min. No estudo da inibição da AChE a neostigmina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 30 ng/mL), utilizada como padrão, apresentou CI_{50} 1,5 ng/mL (LC de 1,3 a 1,8 ng/mL). Comparativamente, os resultados obtidos com a FBut de *C. sciadophylla* (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não apresentaram inibição significativa da atividade da enzima AChE (Figura 39).

Na determinação da atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase em homogenato de músculo esquelético de coxa de coelho foi obtida uma atividade de 205,6 $\mu\text{moles Pi}/\text{mg}$ proteína/min. No estudo da inibição da Ca^{+2} -ATPase, a tapsigargina (0,7 ng/mL a 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizada como padrão, apresentou CI_{50} 74,3 ng/mL (LC de 44,9 a 123,0 ng/mL). Comparativamente, os resultados obtidos com a FBut de *C. sciadophylla* (0,1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentou CI_{50} 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LC de 1,7 a 5,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 39).

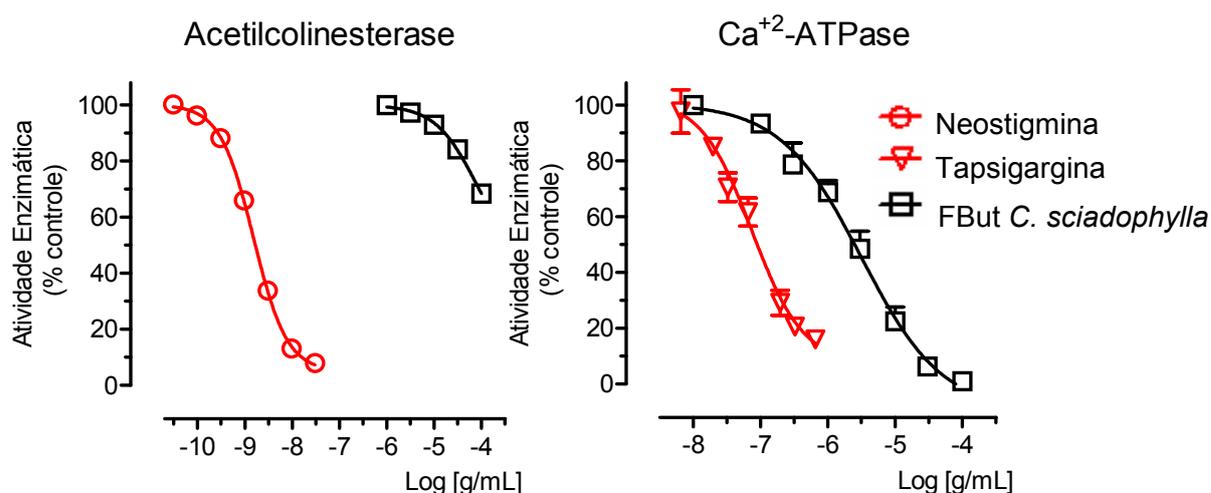


Figura 39 - Efeito da fração butanólica (FBut) *C. sciadophylla* (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase em relação ao padrão neostigmina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 30 ng/mL). Efeito da fração butanólica (FBut) de *C. sciadophylla* (0,1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre a atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase em relação ao padrão tapsigargina (0,7 ng/mL a 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os pontos representam as médias \pm erro padrão da concentração (n = 6 animais).

7. Discussão

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade do extrato aquoso de *Cecropia sciadophylla* Mart, planta amazônica até então desconhecida dos farmacologistas. Apesar da difícil padronização do extrato aquoso bruto em CLAE, o sucesso dos estudos pré-clínicos mostrou o enorme potencial fitoterapêutico de mais essa Cecropiaceae brasileira. Os estudos descritos neste trabalho utilizaram a FBut, uma fração semi-purificada obtida com uma simples partição com eficiência 10 vezes que a do extrato aquoso, que também possibilitou a separação dos principais constituintes químicos. No entanto, contando com a informação disponível de outras espécies já estudadas, foi preferível avaliar a atividade do conjunto delas antes de ser processada a purificação bio-orientada.

Portanto, o objetivo foi determinar a eficácia e a segurança da FBut com a triagem da atividade farmacológica nos principais sistemas fisiológicos. O controle de qualidade do extrato foi procurado com a padronização do extrato aquoso (EA) e purificação da fração butanólica (FBut). Os ensaios farmacológicos posteriores confirmaram que a atividade encontra-se na fração butanólica do extrato de *C. sciadophylla*.

As Cecropias são conhecidas popularmente como embaúba, umbaúba e também árvore da preguiça por terem seus frutos e brotos apreciados por esse animal. São árvores pouco exigentes quanto ao solo, muito comuns em áreas desmatadas, em recuperação (RIBEIRO *et al.*, 1999). São normalmente associadas com as fases iniciais da regeneração da floresta tropical em sucessão (WHITMORE, 1996; ALVAREZ-BUYLLA; MARTINEZ-RAMOS, 1992).

A infusão das folhas é utilizada na medicina popular com diversas finalidades, algumas comprovadas experimentalmente: anti-hipertensivas, broncodilatadoras, anti-secretoras ácidas gástricas (LIMA-LANDMAN *et al.*, 2007; DELARCINA *et al.*, 2007; SOUCCAR *et al.*, 2008, TANAE *et al.*, 2007b), hipoglicemiantes (ANDRADE-CETTO;

WIEDENFELD, 2001), diuréticas, analgésicas, antiinflamatórias (PÉREZ-GUERRERO *et al.*, 2001), anti-depressivas (ROCHA *et al.*, 2002) e antioxidantes (SILVA *et al.*, 2007). No entanto, raros foram os trabalhos que se preocuparam em padronizar quimicamente o extrato, de tal forma que a comparação de resultados é difícil naqueles onde apenas o extrato bruto foi testado. Nesse sentido a cautela científica fez com que, na mesma ocasião da coleta, amostras do material fresco fossem preservadas sob refrigeração para comparação molecular futura com exemplares de outras regiões.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep) mostrou que a FBut padronizada é formada por 26 frações se considerados apenas os picos majoritários do cromatograma com área superior a 1% da total. Os picos com tempos de retenção: 3,4; 13,9; 16,5; 18,9; 24,0; 27,3 e 28,3 min com áreas 5,7; 3,5; 7,5; 6,6; 12,4; 5,4 e 9,5% foram majoritários, merecendo a atenção inicial na padronização química. Estas frações foram encaminhadas para análises de ^{13}C e ^1H -RMN na Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e da Universidade de São Paulo (USP). Até o momento desta escrita (12/2010) foram identificadas as frações (F5) catequina de PM 289 g; (F22) quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo de PM 464 g e (F18) 2"-O-ramnosilvitexina de PM 578 g.

Na triagem geral do EA e da Fbut os resultados mostraram sinais de analgesia e estimulação central indicada pela hiperatividade dos animais tratados com FBut. Este efeito não foi observado no tratamento com EA, possivelmente em função da maior concentração relativa da FBut. O EA e a FBut não foram tóxicos aos animais, em concordância com os relatos nos trabalhos publicados com as diferentes espécies de cecropia.

No teste do sono induzido por barbitúrico foi observado aumento na duração do sono com a dose de 300 mg/kg, o que poderia sugerir uma atividade hipno-sedativa da FBut. Este efeito não foi observado no sono induzido com o éter etílico. Como a eliminação do éter

etílico pelo organismo se dá pelas vias aéreas, não ocorrendo a metabolização hepática comum aos barbitúricos, os resultados combinados do teste de sono indicam que a FBut não deprime o SNC. Aparentemente há interação farmacocinética entre os constituintes da planta e o metabolismo hepático do pentobarbital, aumentando a vida média deste e conseqüente o efeito depressor do SNC. Outras ações no SNC foram detectadas. À semelhança de outros relatos (ROCHA *et al.*, 2002), surgiram evidências de um efeito do tipo anti-depressivo do extrato de *C. sciadophylla*. Os modelos animais de depressão baseados no desespero comportamental têm valor na identificação de compostos com ação do tipo antidepressivo, que bloqueiam o sistema monoaminérgico, a captação da serotonina e/ou da noradrenalina, e os receptores (HOLSBOER, 2004; DEUSSING, 2006). Resultados semelhantes descritos por ROCHA *et al.* (2007) não foram encontrados por JARAMILLO *et al.* (2008) em extrato metanólico não padronizado de *Cecropia membranacea*.

A atividade antinociceptiva da FBut foi estudada nos testes da formalina, de contorções abdominais induzidas por ácido acético, da retirada da cauda (“tail flick”) e da placa quente.

O modelo das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético avalia possíveis efeitos antinociceptivos periféricos de natureza antiinflamatória, apresenta uma boa sensibilidade, embora pouca especificidade, uma vez que a nocicepção induzida pelo ácido acético pode ser prevenida por agentes antiinflamatórios, analgésicos, relaxantes musculares e sedativos (IKEDA *et al.*, 2001; REICHERT *et al.*, 2001). A administração intraperitoneal de ácido acético induz contorções em conseqüência de uma inflamação aguda no peritônio, induzida pela liberação de prostaglandinas, mas também por liberação de mediadores endógenos como a bradicinina, substância P, prostaciclina, bem como algumas citocinas como IL-1 beta, TNF-alfa e IL-8 (RIBEIRO *et al.*, 2000; BORSATO *et al.*, 2000; LAPA *et*

al., 2003). Portanto, o efeito antinociceptivo da FBut parece estar relacionado à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios induzida pelo ácido acético (IKEDA *et al.*, 2001).

A principal característica do teste da Formalina são as duas fases de nocicepção, que envolvem estímulos distintos. A primeira fase nos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda) está relacionada à estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P, entre outros. A segunda fase ocorre dos 20 aos 30 minutos e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987; AMARAL *et al.*, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008).

No teste da formalina o tempo total em que os animais permaneceram lambendo a pata foi significativamente menor nos grupos tratados com extrato em relação ao grupo controle. Respostas semelhantes foram obtidas tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória de resposta à nocicepção, seu efeito analgésico provavelmente envolve a indução de efeitos periféricos. A inibição do processo algésico durante a fase inflamatória do teste da formalina sugere a existência de substâncias no extrato capazes de atuar diretamente sobre as terminações nervosas periféricas, caracteristicamente pela inibição de ciclooxigenases e consequente inibição da biossíntese de prostaglandinas (BISPO *et al.*, 2001; ASONGALEM, *et al.*, 2004).

Os testes de retirada da cauda e no da placa quente permitem avaliação da nocicepção por mecanismos centrais. Os estímulos térmicos ativam os nociceptores (fibras A δ e C), que conduzem o impulso ao corno dorsal da medula espinhal, e posteriormente aos centros corticais (PIETROVSKI, 2006). Os resultados, nos testes da retirada da cauda e da placa quente, não foram diferentes entre os grupos de animais tratados com a FBut e o grupo

controle. Estes resultados excluem uma possível atividade analgésica de ação central, decorrente de estímulos de receptores opióides por algum componente da FBut.

Os resultados, portanto, são díspares: se o teste da formalina indica ação analgésica por mecanismo central e por mecanismo periférico, a ação central não foi comprovada nos testes da placa quente e do tail flick. A ação periférica é concordante nos testes da formalina e das contorções. Estes resultados sugerem que o efeito analgésico da FBut pode ser semelhante ao da dipirona, analgésico que não tem ação antiinflamatória. Analgésicos não opióides, incluindo dipirona, que têm sítios de ação centrais e periféricos, produzem efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste da formalina, mas particularmente na segunda fase, onde a dor é inibida por doses menores do que as necessárias para inibir a nocicepção na primeira fase (SHIBATA *et al.*, 1989). Efeitos analgésicos periféricos foram também descritos para o extrato aquoso de *Cecropia obtusifolia*, (PEREZ-GUERRERO *et al.*, 2001).

No entanto, a atividade antiinflamatória da FBut avaliada nos testes de edema de pata e migração celular induzidos por carragenina foram negativos. Estes resultados diferem dos de PEREZ-GUERRERO *et al.* (2001) com *Cecropia obtusifolia*.

A FBut injetada endovenosamente produziu hipotensão em ratos anestesiados. A hipotensão foi rápida e de curta duração, proporcional à dose, não acompanhada de alteração da frequência cardíaca. A hipotensão não foi bloqueada pela administração prévia de atropina, excluindo a participação de receptores M3 na gênese da vasodilatação. O tratamento prévio com a FBut não interferiu com a hipertensão produzida pela injeção de noradrenalina, excluindo interação da FBut com receptores alfa-1 adrenérgicos na gênese da hipotensão. Os efeitos cardiovasculares de *Cecropia* são controversos na literatura: extratos de *Cecropia pachystachya* produziram hipotensão relacionada à depressão da inervação simpática dos vasos e taquicardia por inibição vagal (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005). *In vitro* houve efeito

inotrópico positivo independente da inervação simpática (CONSOLINI *et al.*, 2006). A *Cecropia glaziovii* Sneth induziu hipotensão em ratos normotensos, ratos espontaneamente hipertensos, em hipertensão por L-NAME e na produzida por constrição de uma artéria renal sem inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), aumento da síntese de NO ou ao bloqueio dos receptores AT1 e α -1 adrenérgicos, sugerindo que o extrato interfere com mecanismos de controle do cálcio em células de músculo liso e neurônios. (LIMALANDMAN *et al.*, 2007). LACAILLE-DUBOIS *et al.* (2001) descreve inibição da ECA *in vitro* enquanto NINAHUAMAN *et al.* (2007) não encontrou esta ação *in vivo*.

Em anéis de aorta pré-contraídos por noradrenalina a FBut relaxou intensamente o tônus vascular. A destruição mecânica do endotélio da aorta bloqueou a ação vasodilatadora da FBut indicando que a hipotensão à injeção do extrato ocorre, possivelmente, por ativação da síntese de óxido nítrico no endotélio vascular, mas ações na regulação do cálcio intracelular não foram eliminadas.

É conhecido que células endoteliais liberam, intermitentemente, pequenas quantidades de NO em resposta a diferentes estímulos, o mais constante sendo a pressão de cisalhamento do sangue. Acetilcolina, BK e trombina, atuando em receptores específicos da membrana plasmática, desencadeiam a seqüência de eventos que culmina com a ativação da NO-sintase endotelial (constitutiva). O NO produzido difunde-se, então, para as células musculares lisas adjacentes e promove relaxamento das mesmas por meio da ativação da guanil ciclase e produção de GMP cíclico (LOWENSTEIN *et al.*, 1994).

Em conclusão, os estudos da ação dos extratos de *Cecropia* na pressão arterial indicam muitos mecanismos de ação, a maioria obtida *in vitro* ou por injeção endovenosa de extratos não purificados. Alguns estudos por administração oral, no entanto, indicam a produção de hipotensão por mecanismos que interferem com a homeostasia de cálcio no músculo liso vascular.

A ação protetora gástrica das cecropias é conhecida na medicina popular e foi comprovada em alguns trabalhos que mostram atividade antissecretora ácida por inibição da bomba de prótons na célula parietal da glândula gástrica (SOUCCAR *et al.*, 2008).

As úlceras pépticas são atribuídas a um desequilíbrio entre os fatores agressivos, da mucosa gástrica (HCl, pepsina, etanol, antiinflamatórios não esteróides, fumo) e os mecanismos fisiológicos de proteção (muco, bicarbonato, prostaglandinas) na mucosa gastroduodenal (KWIECIEN *et al.*, 2002).

A FBut de *C. sciadophylla* protegeu a mucosa gástrica dos ratos contra as lesões induzidas por estresse por contensão em frio e por etanol injetado na luz gástrica. Esta ação já foi descrita para outras espécies de Cecropias (SOUCCAR *et al.*, 2008) e o mecanismo parece estar relacionado à inibição da secreção ácida pelas células oxínticas da mucosa gástrica.

A secreção ácida nas células parietais do estômago, pela bomba H^+ , K^+ -ATPase que é a responsável pela secreção de íons H^+ , cria um gradiente de íons, nos quais prótons são bombeados de fluidos intracelulares para o lúmen gástrico contra um gradiente produzindo o ambiente ácido do estômago. A H^+ , K^+ -ATPase é a etapa final da secreção ácida, o que sugere que um inibidor da bomba seria mais eficaz na supressão da secreção gástrica que um antagonista de receptores da estimulação hormonal da célula parietal (SACHS *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2008). Foi analisado se a FBut poderia estar atuando sobre a atividade da enzima H^+ , K^+ -ATPase, a bomba de prótons, diminuindo a acidez da secreção.

Testes *in vitro* da atividade da enzima demonstraram que a FBut foi capaz de inibir a atividade desta enzima proporcionalmente à concentração. Os dados apresentados demonstram que o extrato padronizado de *C. sciadophylla* foi capaz de proteger a mucosa gástrica contra lesões provavelmente por mecanismo envolvendo a inibição da bomba de prótons, H^+ , K^+ -ATPase, e conseqüentemente inibindo a secreção ácida gástrica.

A contração do músculo estriado esquelético é controlada, em condições fisiológicas, pela atividade do Sistema Nervoso Central através da inervação motora (motoneurônio). Quando o potencial de ação gerado no motoneurônio alcança a região pré-sináptica na placa motora, ocorre o aumento da concentração intracelular de cálcio (ativação de canais de cálcio voltagem dependentes), responsável pela exocitose de vesículas contendo acetilcolina. Esta se difunde para áreas adjacentes ligando-se a receptores nicotínicos, presentes na membrana pós-sináptica (MARBAN *et al.*, 1998).

Em termos fisiológicos, a interação do neurotransmissor (acetilcolina) e os receptores nicotínicos permitem o surgimento de um novo potencial de ação, mas desta vez no miócito. A propagação deste potencial de ação ao longo da membrana muscular e dos túbulos T estimula a liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS) promovendo a contração muscular. O processo pelo qual o potencial de ação induz a contração muscular é definido como o acoplamento excitação-contração e envolve a interação de um complexo macromolecular de proteínas formado pelo sensor de voltagem e receptor de dihidropiridina (DHPR) e pelo receptor de rianodina (RyR). A ativação da Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA1) promove a recaptação do Ca^{+2} pelo RS produzindo o relaxamento muscular (DULHUNTY, 2002). A Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) é uma enzima associada à membrana intracelular, responsável pelo transporte de Ca^{+2} contra um gradiente de concentração à custa da energia resultante da hidrólise do ATP. (MARTONOSI; PIKULA, 2003).

Os estudos *in vitro* da FBut da *C. sciadophylla* foram iniciados na preparação isolada de diafragma de rato comandado por estimulação elétrica do nervo motor, ou estimulado diretamente com estímulos elétricos transmurais. Na triagem preliminar foi verificado que as contrações obtidas por estímulo do nervo frênico foram potenciadas na presença da FBut. Verificou-se também que a contração do músculo diafragma obtida por estímulo do nervo

frênico, mas parcialmente bloqueada pela ação de d-tubocurarina (1 μM), podia ser revertida pela incubação da FBut. Estes efeitos são característicos de drogas inibidoras da colinesterase muscular que facilitam a transmissão neuromuscular (FANN *et al.*, 1990). As experiências posteriores mostraram, porém, que *in vitro* a FBut não inibia a acetilcolinesterase muscular. Ao mesmo tempo verificou-se que a potenciação ocorria também nas contrações do diafragma estimuladas por estímulo direto das fibras musculares na presença de d-tubocurarina (10 μM), concentração suficiente para abolir a transmissão neuromuscular.

No estudo, *in vitro*, da inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase de homogenato de córtex cerebral de rato, pela FBut de *C. sciadophylla*, não houve inibição significativa da atividade da enzima acetilcolinesterase comparativamente à neostigmina, inibidor padrão utilizado. Descartando a hipótese de uma atividade anticolinesterásica do extrato de *C. sciadophylla* responsável pelo aumento da contração do músculo diafragma, estes resultados sinalizaram um possível um efeito sobre a mobilização de Ca^{+2} intracelular.

A inibição da atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase pela FBut de *C. sciadophylla* foi significativa com CI_{50} 3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LC de 1,7 a 5,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Pela interpolação deste valor na curva de inibição da atividade colinesterásica, pode-se observar que nenhuma inibição desta enzima seria responsável pela potenciação da contração.

8. Conclusão

- ✓ O objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia e a segurança da FBut do extrato aquoso de *Cecropia sciadophylla* Mart com a triagem da atividade farmacológica nos principais sistemas fisiológicos.
- ✓ A fração butanólica (FBut), mais concentrada e ativa, obtida do EA, conservou o mesmo perfil cromatográfico em CLAE. Foram isoladas 26 frações com tempos de retenção bem definidos. Alguns compostos pouco característicos da espécie já foram identificados: catequina, quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo e 2"-O-ramnosilvitexina.
- ✓ A triagem farmacológica geral dos extratos evidenciou hiperatividade e aumento da motricidade, e efeito tipo-antidepressivo. As atividades antinociceptiva e antiinflamatória foram pouco consistentes.
- ✓ A FBut, *in vivo*, produziu hipotensão sem interferir com a ação da noradrenalina, ou com a atividade cardíaca. *In vitro*, relaxou o tonus induzido por noradrenalina apenas na aorta com endotélio íntegro, indicando ação vasodilatadora dependente da síntese de óxido nítrico.
- ✓ A FBut protegeu a mucosa gástrica contra úlceras por stress e as produzidas por etanol. Efeito que foi correlacionado com diminuição da acidez livre da secreção gástrica e com inibição, *in vitro*, da atividade da H⁺, K⁺-ATPase.
- ✓ No músculo diafragma, a FBut potenciou a contração ao estímulo direto da fibra muscular; este efeito foi correlacionado com a inibição da Ca⁺²-ATPase, mas não à inibição da acetilcolinesterase.

9. Referências Bibliográficas

- ALVAREZ-BUYLLA, E.R., MARTINES-RAMOS, M. Demography and allometry of *Cecropia obtusifolia*, a neotropical pioneer tree - an evaluation of the climax - pioneer paradigm for tropical rain forests. *J. Ecol.* 80 : 275-290, 1992.
- ALY, A.S.I., AND MATUSCHEWSKI, K. A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J. Exp. Med.* 202, 225-230, 2005.
- AMARAL, J. F. M.; SILVA, I.; G. NETO, M. R. A.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS S. M.; SOUSA F. C. F. Antinociceptive effect of monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* , v. 30, p. 1217-1220. 2007.
- ANDEL, T. V.; WESTERS P. Why Surinamese migrants in the Netherlands continue to use medicinal herbs from their home country. *Journal of Ethnopharmacology* 127 p. 694–701. 2010.
- ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. – Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 78: 145-149, 2001.
- ANDRADE-NETO, V.F., BRANDAO, M.G., OLIVEIRA, F.Q., CASALI, V.W., NJAINE, B., ZALIS, M.G., OLIVEIRA, L.A., KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) ethanol extracts from wild plants collected in various localities or plants cultivated in humus soil. *Phytother Res*, 18:634-639. 2004.
- APELL H.-J. Structure – function relationship in P-Type ATPases - a biophysical approach, *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 150: 1– 35. 2003.
- APELL H.-J. How do P-Type ATPases transport ions? *Bioelectrochemistry* 63: 149– 156, 2004.
- ASONGALEM E.A., FOYET H.S., NGOGANG J., FOLEFOC G.N., DIMO T., KAMTCHOUING P. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron fl oribundus*. *J Ethnopharmacol* 91: 301-308. 2004
- BASSEL-DUBY, R. & OLSON, E.N. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 311, 1133–1141; 2003.
- BASSEL-DUBY, R. & OLSON, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochemistry*, v. 75, 19-37. 2006.
- BEARD N.A., LAVER D.R., DULHUNTY A.F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 85: 33–69, 2004.
- BECKER K.; KIRK K. Of malaria, metabolism, and membrane transport *Trends Parasitol* 20: 590-596. (2004)
- BEGHDADI, W., PORCHERIE, A., SCHNEIDER, B. S., DUBAYLE, D., PERONET, R., HUERRE, M., WATANABE, T., OHTSU, H., LOUIS, J., MÉCHERI, S. Inhibition of histamine-mediated signaling confers significant protection against severe malaria in

- mouse models of disease. *The Journal of Experimental Medicine*; Vol. 205, No. 2, 395-408; 2008
- BERS D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198–205, 2002.
- BIEL W., STAAR U., SEWING K.F. SCH28080 is a more selective inhibitor than SCH32651 at the K⁺ site of gastric K⁺/H⁺-ATPase. *Eur J Pharmacol.* 139: 349-52, 1987.
- BISPO M. D., MOURÃO R. H. V., FRANZOTTI E. M., BOMFI M. K. B. R., ARRIGONI-BLANK M. F., MORENO M. P. N., MARCHIORO M., ANTONIOLLI A.R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 76: 81-86. 2001
- BORSATO MLC, GRAEL CFF, SOUZA GEP, LOPES NP. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* 55: 809-813. 2000.
- BOTSARIS A. S.; Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of *Flora Medicinal*, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3:18; 2007.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.33, p.179-189, 2000.
- CAPLAN, M.J.: Ion pumps in epithelial cells: Sorting, stabilization and polarity. *Am J Physiol* 272:G1304–G1313. 1997.
- CHARLES-DOMINIQUE, P. Inter-relations between frugivorous vertebrates and pioneer plants: *Cecropia*, birds and bats in French Guiana. In A. Estrada and T. H. Fleming [eds.], *Frugivores and seed dispersal*, 119– 135. Dr. W. Junk, Dordrecht, Netherlands. 1986.
- CONSOLINI, A.E.; MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 417-422, 2005.
- CONSOLINI, A.E.; RAGONE, M.I.; MIGLIORI, G.N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M.G. – Cardiostimulant and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 90-96, 2006.
- CRAMBERT G, HASLER U, BEGGAH AT, YU C, MODYANOV NN, HORISBERGER JD, LELIEVRE L., GEERING K. Transport and pharmacological properties of nine different human Na,K-ATPase isozymes. *J Biol Chem* 275, 1976–1986. 2000.
- DELARCINA Jr., S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; LAPA, A.J. – Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea-pigs treated with *Cecropia glazioui* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. *Phytomedicine*, 14(5): 328-332, 2007.
- DELLA MONACHE, F.; GIACOMOZZI, C.A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Isolamento e identificação da isovitexina obtida de frações farmacologicamente ativas da *Cecropia glazioui*. X Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, painel 5/9, 1998.

- DEUSSING J. M. Animal models of depression. *Drug Discovery Today: Disease Models* Vol. 3 (4): 375-383. 2006
- DUARTE, I. D.; SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine - nitric oxide - cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.217, p.225-227, 1992.
- DULHUNTY A.F., HAARMANN C.S., GREEN D., LAVER D.R., BOARD P.G., CASAROTTO M.G. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 79: 45–75, 2002.
- DULHUNTY A.F., CURTIS S.M., CENGIA L., SAKOWSKA M., CASAROTTO M.G. Peptide fragments of the dihydropyridine receptor can modulate cardiac ryanodine receptor channel activity and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Biochem. J.*; 379: 161–72. 2004.
- DYER, M., JACKSON, M., MCWHINNEY, C., ZHAO, G., MIKKELSEN, R. Analysis of a cation-transporting ATPase of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 78 (1-2); 1-12; 1996.
- FANN, M. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Phentonium, a quaternary derivate of (-) hyoscyamine, enhances the spontaneous release of acetylcholine at the rat motor nerve terminals. *British Journal of Pharmacology*, 100(3), 441–446. 1990.
- FILL M.; COPELLO J. A. Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiol. Rev.* 82: 893-922, 2002
- FRANCIS S.E, SULLIVAN JR. D.J., GOLDBERG D.E., Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 97–123, 1997.
- FRANZINI-ARMSTRONG C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. *FASEB J.*; 13 (Suppl): S266–70, 1999.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C.; JORGENSEN, A. O. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 56, p. 509-534, 1994.
- FRANZINI-ARMSTRONG C., PROTASI F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev* 77: 699–729, 1997.
- FREDERICH M., HAYETTE M. P., TITS M., DE MOL P., ANGENOT L. In vitro activities of Strychnos alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2328-2331. 1999.
- GARCIA C.R.: Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol.Today.* 15:488-491, 1999
- GAZARINI M. L., SIGOLO C. A. O., MARKUS R. P., THOMAS A. P., RS GARCIA C.R. S. Antimalarial drugs disrupt ion homeostasis in malarial parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 102(3): 329-334, 2007.

- GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R. B.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull.* V. 31, p. 1017-1020. 2008.
- GWATHMEY J.K., COPELAS L., MACKINNON R., SCHOEN F.J., FELDMAN M.D., GROSSMAN W., MORGAN J.P. Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res.* 61(1):70–76. 1987.
- HALL, J.; GUYTON, A. *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier 2ª Ed. Rio de Janeiro, 2002.
- HANSEN, M.B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. *Physiological research.*, v. 52, p. 1-30, 2003.
- HEINY J.A. Excitation–contraction coupling in skeletal muscle. In *Cell physiology sourcebook. A molecular approach*, 3d edn. Sperelakis N. ed, pp 911–26, 2001.
- HILLE, B. Sensory transduction, salt transport, calcium release, and intercellular coupling. In: _____ *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Massachusetts: Sinauer Associates INC., p. 202-235, 1992
- HOLSBOER, F. Therapeutics for anxiety and depression disorders. *Drug Disc. Today* 1 (1), 105–109. 2004
- HOSSEIN SADRZADEH, S.M.; VICENZI, F.F.; HINDS, T.R. Simultaneous measurement of multiple membrane ATPases in microtiter plates. *J Pharmacol Toxicol Methods* 30, 103-110, 1993.
- HUGHES B. W., KUSNER L. L., KAMINSKI H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve* Vol 33 (4), Pag: 445–461, 2006.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, L K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, p. 103-104, 1987.
- IKEDA Y, UENO A, NARABA H, OH-ISHI S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci* 69, 2911–2919, 2001.
- IKEMOTO, N. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Physiology*, v. 44, p. 297-317, 1982.
- INESI G., HUA S., XU C., MA H., SETH M., PRASAD A. M., SUMBILLA C. Studies of Ca²⁺ ATPase (SERCA) Inhibition. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 37, No. 6. 2005.
- IRWIN, S. Comparative observational assessment: I. a. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia (Berlin)* 13, 222-257, 1968.
- ITOKAWA H.; MORRIS-NATSCHKE S. L.; AKIYAMA T.; LEE K. H. Plant-derived natural product research aimed at new drug Discovery. *J Nat Medicines*, 62: 263–280, 2008.

- JARAMILLO H. D. A., RINCÓN V. J., GUERRERO P. M. F. Kind Of Activity Antiabsence In Mice Produced By The Methanolic Extract From *Cecropia Membranacea* Trécul. *Vitae* Vol. 15(2), p. 267-273 2008.
- JORGENSEN A.O., KALNINS V.I., ZUBRZYCKA E., MACLENNAN D.H. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J Cell Biol*; 74: 287-298, 1977.
- JURKAT-ROTT K.; LEHMANN-HORN F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. *The Journal of Clinical Investigation* 115-8: 2000-9. 2005.
- KAYSER, O., MASIHI, K.N., KIDERLEN, A.F. Natural products and synthetic compounds as immunomodulators. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 1:319-335, 2003
- KIMURA, M., YAMAGUCHI Y., TAKADA S., TANABE, K. Cloning of a Ca(2+)-ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca(2+)-ATPases. *Journal of Cell Science*, Vol 104 (4), 1129-1136, 1993.
- KHAN, M.A., SMEGO, R.A. JR., RAZI, S.T., BEG, M.A. Emerging drug-resistance and guidelines for treatment of malaria. *J Coll Physicians Surg Pak*, 14:319-324. 2004
- KOSK-KOSICKA D. Measurement of Ca²⁺-ATPase activity (in PMCA and SERCA1). In: *Methods in Molecular Biology* vol. 114: Calcium signaling protocols Edited by D.G. Lambert , Humana Press Inc Totowa NJ , pp. 343-354. 1999.
- KRETTLI, A.U. A Pesquisa da Malária no Brasil, *Revista Ciência Hoje*, 1998.
- KRETTLI, A.U., ANDRADE-NETO, V.F., BRANDAO, M.G., FERRARI, W.M. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem.Inst.Oswaldo.Cruz.* 96: 1033-1042, 2001.
- KWIECIEN, S.; BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, S. J. Effects of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of Physiology and Pharmacology.* v.53, p.39-50, 2002
- LACAILLE-DUBOIS, M.A., FRANCK, U., WAGNER, H., Search for potential angiotensin (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine* 8, 47–52. 2001.
- LAPA, A.J., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CYSNEIROS, R.M., BORGES, C.R., SOUCCAR, C., BARETTA, I.P., DE LIMA, T.C.M. A topic on new antihypertensive drug research. In: Hostettmann, K., Gupta, M.P., Marston, A. (Eds.), *Chemistry, Biological and Pharmacological; Properties of Medicinal Plants from the Americas*. Harwood Academic Pub., pp. 185–196, 1999.
- LAPA, A.J., SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M.T.R., CASTRO, M.S.A, DE LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais. Lagoa Editora Ltda. pp. 119, 2003.

- LEWINSOHN T.M.; PRADO P.I.; Síntese do Conhecimento Atual da Biodiversidade Brasileira, cap 1 In.: Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira – Volumes I e II. Série Biodiversidade nº15. Brasília: MMA, 520p. 2005.
- LIMA-LANDMAN M.T.R., BORGES C.R., CYSNEIROS R.M., DE LIMA T.C.M., Souccar C., Lapa A.J., Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine* 14: 314–320, 2007
- LOBOVA T.A., MORI S.A., BLANCHARD F., PECKHAM H., CHARLES-DOMINIQUE P., *Cecropia* as a Food Resource for Bats in French Guiana and the Significance of Fruit Structure in Seed Dispersal and Longevity. *American Journal of Botany* 90(3): 388–403. 2003.
- LOCHER C. P., RUBEN P.C., GUT J., ROSENTHAL P.J. 5HT1A Serotonin Receptor Agonists Inhibit *Plasmodium falciparum* by Blocking a Membrane Channel. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12): 3806–3809. 2003
- LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *Eur. J. Pharmacol.*, v.114(3), p.375-381, 1985.
- LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine - nitric oxide pathway in primary sensory neurones contributes to dipyrrone - induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm. Res.*, v.45, p.308-311, 1996.
- LOWENSTEIN C.J., DINERMEN J.L., SNYDER S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227-37.
- MAR S.O., MARKS A.R. Ryanodine receptors. In: *Calcium signalling*. Putney J.W. Jr. ed, pp 227–47, 2000.
- MARBAN, E.; YAMAGISHI, T.; TOMASELLI, G. F. Structure and function of voltage-gated sodium channels. *Journal of Physiology*, v. 508.3, p. 647-657, 1998.
- MARCHESINI N., VIEIRA M., LUO S., MORENO S.N., DOCAMPO R. A malaria parasite-encoded vacuolar H⁺-ATPase is targeted to the host erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 280:36841-36847, 2005
- MARTONOSI A., PIKULA S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Polon.*; 50: 1–29. 2003.
- MEISSNER G. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* 56: 485–508, 1994.
- MEISSNER G. Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in muscle. In *Cell physiology sourcebook. A molecular approach*, 3rd edn. Sperelakis N. ed, pp 927–40, 2001.
- MENDLEIN J., SACHS G. Interaction of a K⁺-competitive inhibitor, a substituted imidazo[1,2a]pyridine, with the phospho- and dephosphoenzyme forms of H⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 265:5030–5036. 1990.

- MILLIKEN W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Econ Bot* 51: 212-237. 1997
- MILNER R.E., FAMULSKI K.S., MICHALAK M. Calcium binding proteins in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum of muscle and nonmuscle cells. *Mol Cell Biochem* 112: 1-13, 1992.
- MOFFETT, S.; MOFFETT, D.; SCHAUF, C. *Fisiologia Humana*. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1993.
- MOLLER J.V., JUUL B., LE MAIRE M. Structural organization, ion transport and energy transduction of P type ATPases. *Biochim Biophys Acta.*; 1286: 1-51. 1996.
- MORTH J.P., PEDERSEN B.P., TOUSTRUP-JENSEN M.S., SORENSEN T.L-M., PETERSEN J., ANDERSEN J.P., VILSEN B., NISSEN P. Crystal Structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450:1043-1049. 2007.
- MUHAMMAD I., BEDIR E., KHAN S.I., TEKWNI B.L., KHAN I.A., TAKAMATSU S., PELLETIER J., WALKER L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *J Nat Prod* 67: 772-777. 2004.
- MURAKAMI, S.; ARAI, I.; MURAMATSU, M.; OTOMOS, S.; BABA, K.; KOZAWA, M. Inhibition of gastric H⁺, K⁺ - ATPase and acid secretion by cassigarol A: A polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. *Biochem. Pharmacol.*, 44: 33-37, 1992.
- NEWMAN D.J., CRAGG G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70: 461-477. 2007.
- NIGGLI E. Localized intracellular calcium signalling in muscle: calcium sparks and calcium quarks. *Annu Rev Physiol.*; 61: 311-35, 1999.
- NINAHUAMAN, M.F.M.L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. – ACE activity during hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glazoui* Sneth: A comparative study to captopril effects in rats. *Phytomedicine*, 14(5): 321-327, 2007.
- OGAWA Y., MURAYAMA T., KUREBAYASHI N. Ryanodine receptor isoforms of non-mammalian skeletal muscle. *Front Biosci.*; 7: d1184-94, 2002.
- OLIVEIRA F.Q., ANDRADE-NETO V., KRETTLI A.U., BRANDAO M.G. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *J. Ethnopharmacol.* 93 : 39-42, 2004
- PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008
- PEDERSEN P.L., CARAFOLI E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12: 146-150, 1987.

- PEDERSEN P.L. Transport ATPases: Structure, Motors, Mechanism and Medicine: A Brief Overview. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, Vol. 37, No. 6, 2005.
- PEREZ-GUERRERO C., HERRERA M.D., ORTIZ R., SOTOMAYOR M.A., FERNANDEZ M.A.A. pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract, *Journal of Ethnopharmacology* 76 279–284. 2001.
- PIETROVSKI, E. F; ROSA, K. A; FACUNDO, V. A; RIOS, K; MARQUES, M. C. A; SANTOS, A. R .S. Antinociceptive Properties of the Ethanolic Extract and of the Triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene Obtained From the Flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. vol. 83(1). Pág. 90 – 99. 2006.
- PIMENTEL, L. F.; JACOME JUNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F., SANTOS-MAGALHAES, N. S.; Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v. 43, n. 4, 2007
- PHILLIPSON J.D. New drugs from nature – It could be yew. *Phytother Res* 13: 2-8. 1999.
- PROTASI F., IKEMOTO -ARMSTRONG C., ALLEN P.D. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol* 140: 831–842, 1998.
- PROTASI F. Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci* 7: d650–658, 2002.
- RABON, E.C.; IM, W.B.; SACHS, G. Preparation of Gastric H⁺, K⁺ - ATPase. *Methods in Enzymology* 157: 649-654, 1988.
- RABON E.C., REUBEN M.A. The mechanism and structure of the gastric H,K-ATPase. *Annu Rev Physiol.*; 52:321–344. 1990.
- RASMUSSEM U., CHRISTENSEN S. B., SANDBER F. Thapsigargin and thapsigarginic acid, two new histamine liberators from *Thapsia garganica* L. *Acta Pharm Suec.*;15(2):133-40. 1978.
- REICHERT, J.A.; DAUGHTERS, R.S.; RIVARD, R.; SIMONE, D.A. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain*, v. 89, p. 221-227. 2001.
- RIBEIRO, J. E. L.S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M.S.; BRITO, J. M.; SOUZA, C. F.; MESQUITA, M. R & PROCÓPIO, L. C. Flora da reserva de Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia central. INPA. Manaus. p. 210-217. 1999.
- RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal Pharmacology*, Netherlands, v. 387, 111-118, 2000.

- RIBEIRO, L.T.C. - Envolvimento do óxido nítrico (NO) no relaxamento vascular produzido por frações da *Cecropia glazioui* Sneth com atividade hipotensora. Tese apresentada à UNIFESP – EPM para obtenção do título de Mestre em Farmacologia, 2003.
- RIEL M.A., KYLE D.E., BHATTACHARJEE A.K., MILHOUS W.K. Efficacy of proton pump inhibitor drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro and their probable pharmacophores. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2627-2632, 2002a.
- RIEL M.A., KYLE D.E., MILHOUS W.K. Efficacy of Scopadulcic Acid A against *Plasmodium falciparum* in Vitro, *Journal of Natural Products.* 65 (4), 614-615. 2002b.
- ROCHA J.B.T., EMANUELLI T. PEREIRA M.E., Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats, *Acta Neurobiol. Exp.* 53 pp. 431–437, 1993.
- ROCHA, F.F., LAPA, A.J., DE LIMA, T.C.M., Evaluation of the anxiolytic effects of *Cecropia glaziouii* Sneth in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 183–190. 2002.
- ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; TANAE, M.M.; De LIMA, T.C., LAPA, A.J. - Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents – in vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*, 14(6): 396-402, 2007.
- SACHS G.; SHIN J.M.; VAGIN O.; LAMBRECHT N.; YAKUBOV I.; MUNSON K. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol* v. 41 p.226–242. 2007
- SAGARA Y., WADE J.B., INESI G. A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with thapsigargin. *J Biol Chem.*; 267: 1286–92. 1992.
- SHIBATA, M., OHKUBO T., TAKAHASHI H., INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38: 347-352. 1989.
- SHIN J.M., MUNSON K., VAGIN O., SACHS G. The gastric H⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and inhibition *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 457(3):609-22. 2008
- SILVA E.M., SOUZA J.N.S., ROGEZ, H., REES J.F., LARONDELLE Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry* 101: 1012–1018, 2007.
- SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais; a necessaria interação da industria com a academia. *Rev. Bras. Farmacognosia*, V. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.
- SORENSEN T. L., MOLLER J. V., NISSEN P. Phosphoryl Transfer and Calcium Ion Occlusion in the Calcium Pump. *Science* 304 n 5677, 1672–1675. 2004.
- SOUCCAR, C., CYSNEIROS, R.M., TANAE, M.M., DE LIMA, T.C.M., LIMA-LANDMAN, M.T.R., LAPA, A.J., Inhibition of gastric acid secretion by a standardized

- aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine*, 2008.
- SPERELAKIS N., GONZALEZ-SERRATOS H. Skeletal muscle action potential. In *Cell physiology sourcebook. A molecular approach*, 3rd ed. Sperelakis N., pp 865–86, 2001.
- STOKES D. L., LACAPERE J-J. Conformation of Ca²⁺-ATPase in two crystal forms. Effects of Ca²⁺, thapsigargin, adenosine-5'(β,γ methylene) triphosphate and chromium (III)-ATP on crystallization. *J Biol Chem.*; 269: 11606–13. 1994.
- STOKES D. L.; WAGENKNECHT T. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum Structure and function of Ca²⁺-ATPase and the ryanodine receptor *Eur. J. Biochem.* 267, 5274 – 5279. 2000.
- STREHLER E.E., TREIMAN, M. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med.* 4, 323–335. 2004.
- TANAE M.M., LIMA-LANDMAN M.T.R., DE LIMA T.C.M., SOUCCAR C., LAPA A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities, *Phytomedicine* 14: 309–313. 2007a.
- TANAE, M.M. Isolamento, identificação e mecanismos da ação hipotensora de compostos isolados de *Cecropia glazioui* Sneth. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências, 2007b.
- TOYOSHIMA C., NAKASAKO M., NOMURA H., OGAWA H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787): 647-55. 2000.
- TOYOSHIMA C., NOMURA H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898): 605-11. 2002.
- TOYOSHIMA C., NOMURA H., TSUDA T., LUMENAL gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogues. *Nature*, 32(7015): 361-8. 2004.
- TRIPATHI A.K., KHAN S.I., WALKER L.A., TEKWANI B.L. Spectrophotometric determination of de novo hemozoin/b-hematin formation in an in vitro assay. *Analytical Biochemistry* 325: 85–91, 2004
- UCHOA, V.T.; DE PAULA, R.C.; KRETTLI, L.G.; SANTANA, A.E.G.; KRETTLI, A.U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of *Cecropia pachystachya*. *Drug Development Research* 71 : 82-91, 2010.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat., New Biol.*, v.231, p.232-235, 1971.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, Apr. 2006

- WAGNER A.C., FINBERG K.E., BRETON S., MARSHANSKY V., BROWN D., GEIBEL J.P. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol.*, Ver. 84: 1263-1314. 2004.
- WAHLER G.M. Cardiac action potentials. In *Cell physiology sourcebook. A molecular approach*, 3rd ed. Sperelakis N. ed, pp 887–98, 2001.
- WEISNAR J., ORTMANN R., JOMAA H., SCHLITZER M New Antimalarial Drugs, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 5274-93. 2003
- WHITMORE, T.C. A review of some aspects of tropical rain forest seedling ecology with suggestion for further enquiry. In *The ecology of tropical forest tree seedlings* (M.D. Swaine, ed.). Unesco, Paris, p.3-39, 1996.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; World Malaria Report 2008; WHO/HTM/GMP/2008.1 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>
Acesso em: fevereiro, 2010.
- XU C., MA, H., INESI G., AL-SHAWI M. K., TOYOSHIMA C. Specific structural requirements for the inhibitory effect of thapsigargin on the Ca²⁺ ATPase SERCA. *J. Biol. Chem.* 279(17):17973-9. 2004.
- YU X., CARROLL S., RIGAUD J.L., INESI G. H⁺ countertransport and electrogenicity of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump in reconstituted proteoliposomes. *Biophys J.* 64(4): 1232–1242. 1993.
- ZHAO, X.; YOSHIDA, M.; ROTTO, L.; TAKESHIMA, H.; WEISLEDER, N.; HIRATA, Y.; NOSEK, T.M.; MA, J.; BROTTTO, M. Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumen in knockout mice. *Physiol Genomics*, v. 23, 72-78, 2005.