



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

ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA FRAÇÃO
ALCALOÍDICA OBTIDA DA ESPÉCIE NATIVA
AMAZÔNICA *Geissospermum argenteum* WOODSON

JEFFESON ARAUJO DE MORAIS

MANAUS
2012



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

JEFFESON ARAUJO DE MORAIS

**ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA FRAÇÃO
ALCALOÍDICA OBTIDA DA ESPÉCIE NATIVA
AMAZÔNICA *Geissospermum argenteum* WOODSON**

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

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

**MANAUS
2012**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Morais, Jeffeson Araujo de

M827e Estudo das ações cardiovasculares da fração alcaloídica obtida da espécie nativa amazônica *Geissospermum argenteum* Woodson / Jeffeson Araujo de Moraes. - Manaus: UFAM, 2012.
95 f.; il. color.

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-orientadora: Dra. Mirtes Midori Tanae

1. *Geissospermum argenteum* Woodson – Ação cardiovascular 2. Fitoquímica 3. *Geissospermum argenteum* Woodson – Atividade farmacológica 4. Plantas medicinais I. Lapa, Antonio José (Orient.) II. Tanae, Mirtes Midori (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 582.923.5 (043.3)

JEFFESON ARAUJO DE MORAIS

**ESTUDO DAS AÇÕES CARDIOVASCULARES DA FRAÇÃO
ALCALOÍDICA OBTIDA DA ESPÉCIE NATIVA
AMAZÔNICA *Geissospermum argenteum* WOODSON**

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

Aprovado em 27 de Junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio José Lapa, Presidente
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Márcio Luiz Lombardi Martinez, Membro
Universidade Estadual do Amazonas

Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira, Membro
Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

A Deus por todos os momentos vividos durante a realização desse trabalho, por sempre estar ao meu lado com a sua eterna bondade, abrindo as portas para o conhecimento e para a sabedoria;

Aos meus pais que mesmo à distância nunca deixaram faltar amor e apoio e aos meus irmãos que sempre torceram pelas minhas conquistas. Dedico esse trabalho a vocês;

Ao Prof. Antonio José Lapa pela oportunidade, orientação, amizade e pelo conhecimento compartilhado comigo mesmo antes do início desse trabalho;

A minha co-orientadora Dra. Mirtes Midori Tanae, antes de tudo pela amizade, dedicação e pelo carinho colocado em cada ensinamento;

Aos professores e técnicos da UFAM, UNIFESP e INPA por todo o apoio e conhecimento que fizeram desse trabalho mais completo;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) pela disponibilização da estrutura física e técnica, a FDB e a UNISOL pela concessão da bolsa de estudo;

Aos meus queridos amigos e colegas de laboratório Andrezza, Alzemir, Fabíola, Francyanne, Kaori, Karla, Maciel, Márcia Caroline, Marnyce, Siglia, Suzana, Thaís, Thiago, Juliana e Tânia;

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CBA Danilo, Geane e Vânia e ao estagiário Tony. Agradeço pela amizade e pelo apoio que vocês dedicaram com grande profissionalismo. O mesmo sentimento vai a toda a equipe do biotério do CBA;

Ao Sr. Everaldo Costa que realizou a coleta do material vegetal utilizado;

A todas as pessoas que não foram citadas aqui, mas que sabem a importância que tiveram nesse período e sempre terão em minha vida. Em especial a Maria Texeira, Sr. Jorge, George e Geysel Sadim.

RESUMO

Geissospermum argenteum Woodson (Apocynaceae), conhecida como acariquara-branca, é utilizada popularmente para tratar malária, distúrbios gastrointestinais e como curare. Considerando o reduzido número de publicações científicas relatando a atividade farmacológica da espécie, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos cardiovasculares de *G. argenteum* da Amazônia em roedores. O pó das cascas do caule foi extraído em Soxhlet obtendo-se o extrato hidroalcoólico (EHA). O EHA foi particionado com clorofórmio em diferentes pH, dando origem à fração clorofórmica (FCHCl₃), e esta, à fração contendo os alcaloides totais (FAT). A purificação da FCHCl₃ por cromatografia em coluna (CC), gerou 13 frações semipurificadas. A padronização da FAT em CLAE a 260 nm mostrou 9 picos principais com tempos de retenção que variaram de 3,5 a 23,5 min. A administração oral da FAT (10 a 100 mg/kg) não indicou ação central, no entanto, foram observados efeitos indicativos de ação curarizante quando administrados por via i.p. e e.v. Essa ação foi confirmada *in vitro*. A FAT (10 a 100 µg/mL) bloqueou as contrações do diafragma de rato induzidas por estímulo elétrico do nervo frênico. O bloqueio neuromuscular foi proporcional às concentrações e revertido após lavagem, mas não pela neostigmina (10⁻⁵ M). Nas mesmas concentrações, as contrações induzidas por estimulação direta das fibras do diafragma foram potenciadas. Em ratos anestesiados e sob respiração artificial, a injeção endovenosa da FAT (0,3 a 3,0 mg/kg) produziu hipotensão rápida e reversível, não bloqueada pela atropina (1,0 mg/kg). Em animais anestesiados e tratados com hexametônio, a hipertensão produzida pela FAT (2,0 mg/kg) não foi alterada pelo prazosin (1,0 mg/kg), indicando que o efeito hipertensor da FAT não é pelo aumento na liberação de noradrenalina (Nor) por estimulação ganglionar. A FAT (1,0 mg/kg) também não alterou os efeitos pressóricos produzidos pela Nor ou acetilcolina (ACh), indicando que não houve interação aparente dos alcaloides com receptores α₁ dos vasos e, muscarínicos do coração (M₂) e vasos (M₃). Em outro protocolo, a FAT inibiu a hipertensão produzida pela maior dose do DMPP, que pode ter sido por redução na liberação da Nor por um bloqueio nicotínico ganglionar da FAT. Esse efeito também poderia explicar a bradicardia produzida simultaneamente ao efeito hipotensor da FAT. Em átrios isolados de rato, a FAT (10 a 100 µg/mL) produziu cronotropismo negativo e inotropismo positivo. Em músculo papilar de rato, o período refratário efetivo não foi alterado, indicando que a FAT não interfere com o potencial de ação cardíaco. Na aorta isolada de rato, a FAT (1,0 a 10 µg/mL) produziu vasodilatação independente do endotélio vascular e deslocamento da curva-cumulativa de Nor para a direita, sem diminuição do efeito máximo, indicando bloqueio competitivo dos receptores α₁-adrenérgicos ou bloqueio do influxo de cálcio por canais do tipo L. No entanto, a FAT não inibiu o influxo de cálcio em culturas celulares com o método do Fura-4. Em ducto deferente de rato (DDR), a FAT (10 a 100 µg/mL) deslocou a curva-cumulativa de Nor para a direita e potencializou o efeito contrátil máximo produzido pela Nor e ACh. Os resultados obtidos mostraram muitos efeitos diferentes produzidos pela FAT da *G. argenteum*: bloqueio competitivo de receptores α₁-adrenérgicos não-competitivo de receptores nicotínicos musculares; aumento do inotropismo e potenciação da contração do diafragma, não explicados por um bloqueio de canais de potássio durante a repolarização celular, nem por inibição da atividade da Ca⁺²-ATPase muscular. A potenciação do efeito máximo dos agonistas no DDR parece ser por ativação de segundos mensageiros intracelulares (talvez IP₃, DAG ou PKC), mas não existem dados comprobatórios dessa ação.

PALAVRAS-CHAVE: *Geissospermum argenteum* Woodson, alcaloides, cardiovascular

ABSTRACT

Geissospermum argenteum Woodson (Apocynaceae), known as “acariquara-branca” is popularly used to treat malaria, gastrointestinal disorders and as curare. Considering that there are no published data reporting the pharmacological activities of this species, the aim of this work was to study the cardiovascular effects of Amazonian *G. argenteum* in rodents. The bark was extracted with ethanol in Soxhlet apparatus generating the hydroalcoholic extract (EHA). The EHA was partitioned with chloroform in different pH, yielding the chloroform fraction (FCHCl₃); further partition yielded the total alkaloids fraction (TAF). FCHCl₃ purification in silica gel column chromatography (CC) yielded thirteen fractions. FAT standardization in HPLC showed nine major peaks with retention times from 3.5 to 23.5 min. FAT oral administration did not indicate a central nervous system action, however, curare-like effect was observed after i.p. and i.v. injections. This action was confirmed *in vitro*. FAT (10, 30 and 100 µg/mL) blocked rat diaphragm contractions induced by phrenic nerve electrical stimulation. The neuromuscular blockade was proportional to the concentrations and was reverted by washing, but not by neostigmine (10⁻⁵M). On the same concentrations, contractions induced by direct electrical stimulation were potentiated in rat diaphragm. In anesthetized rats under mechanical respiration, FAT intravenous injection (0.3; 1.0 and 3.0 mg/kg) produced fast and reversible hypotension, not blocked by atropine (1.0 mg/kg). In anesthetized animals treated with the nicotinic ganglion blocker hexamethonium, hypertension induced by FAT was not changed by previous prazosin (1.0 mg/kg) injection, indicating that FAT hypertensive effect is not caused by an increase in noradrenaline (Nor) release by ganglion stimulation. FAT did not alter Nor or acetylcholine (ACh) effects on the blood pressure, indicating that there was not an apparent interaction among the alkaloids and α₁, M₂ or M₃ receptors. On another protocol, FAT inhibited the hypertension induced by the ganglion stimulant DMPP; this effect could be due to ganglion blockade and decreased Nor release at sympathetic nerve terminals which could also explain bradycardia and hypotension induced by FAT. In rat isolated atria, FAT (10, 30 and 100 µg/mL), caused negative chronotropism and positive inotropism. In rat papillary muscle, the effective refractory period was not altered, indicating that FAT did not interfere with the cardiac action potential. In rat isolated aorta, FAT (1.0; 3.0 and 10 µg/mL) produced endothelium-independent vasodilatation and shifted Nor cumulative concentration-response curve to the right, without inhibiting the agonist maximal response. This effect indicated α₁-adrenergic receptors competitive blockade. Blockade of L-type calcium channel by FAT was not confirmed in cultured cardiac and uterus cells using the FURA-4 method to measure calcium influx. In rat vas deferens (DDR), FAT (10, 30 and 100 µg/mL) shifted Nor and ACh cumulative concentration-response curves to the right and potentiated the maximal effects. The results indicated many different activities of the total alkaloid fraction of *G. argenteum*: competitive α₁-adrenergic receptors blockade and a non-competitive muscular nicotinic receptor blockade; positive inotropism and diaphragm twitch potentiation unrelated to potassium channel blockade during the muscle fiber repolarization, no inhibition of the muscle Ca⁺²-ATPase activity; potentiation of the rat vas deferens maximal responses to agonists is probably caused by intracellular second-messengers (IP₃, DAG, PKC) activation, although no direct data confirm this possibility.

PALAVRAS-CHAVE: *Geissospermum argenteum* Woodson, alkaloids, cardiovascular system

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura dos alcaloides de <i>Geissospermum argenteum</i> Woodson.....	26
Figura 2	(A) Marcação da área em que foi coletado o material vegetal (S 02° 55' 27.8", W 059° 58' 28.1"). (B) Espécime localizado em área de floresta- virgem dentro da Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	32
Figura 3	<i>Geissospermum argenteum</i> Woodson. (A) Árvore de grande porte, (B) tronco fenestrado e/ou acanalado, (C) folhas discoloradas de base assimétrica, reticulação inconspícua, encoberta por pelos adpressos prateados (RIBEIRO <i>et al</i> , 1999), (D) casca fresca, (E) casca moída em moinho de facas e (F) fração alcaloides totais (FAT) liofilizada de acariquara-branca.....	33
Figura 4	Representação esquemática da extração e purificação dos alcaloides de <i>G. argenteum</i> Woodson.....	40
Figura 5	Análise cromatográfica (CCD) da <i>G. argenteum</i> Woodson. Cromatofolhas com sílica gel eluídas com BAW 4:2:1 e reveladas por reagente de Dragendorff.....	55
Figura 6	Cromatograma da CLAE com os principais picos revelados da FAT de <i>G. argenteum</i>	56
Figura 7	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de rato. (A) Contrações obtidas por estímulo elétrico indireto das fibras nervosas. (B) Contrações induzidas por estimulação elétrica direta das fibras contráteis.....	61

Figura 8	Registro das contrações obtidas por estímulo elétrico indireto das fibras nervosas do diafragma de rato. (A) Bloqueio das contrações produzido pela d-Tubocurarina (d-Tc 10^{-6} M) revertido após a incubação da neostigmina (NEO 10^{-5} M) (controle). (B) Efeito do anticolinesterásico incubado na vigência do bloqueio da FAT de <i>G. argenteum</i>	61
Figura 9	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> sobre a atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético. (A) Atividade enzimática da SERCA I na presença da FAT (1 a 100 $\mu\text{g/mL}$). (B) Efeito do inibidor enzimático específico Tapsigargina (controle).....	62
Figura 10	Registro da pressão arterial de ratos anestesiados. Hipotensão acentuada e irreversível produzida pela injeção da FAT (3,0 mg/kg, e.v.) na ausência de respiração artificial.....	64
Figura 11	Efeitos pressóricos da FAT de <i>G. argenteum</i> em ratos anestesiados com pentobarbital (65 mg/kg, i.p.). Hipotensão proporcional à dose com acentuada reversão na maior dose.....	64
Figura 12	Registros da pressão arterial (A) e da frequência cardíaca (B) de ratos anestesiados. (A) Hipotensão rápida e com acentuada reversão produzida pela injeção da FAT (3,0 mg/kg, e.v.) com respiração artificial. (B) Efeito bradicardizante registrado simultaneamente ao registro da PA.....	65
Figura 13	Efeitos pressóricos da FAT de <i>G. argenteum</i> e acetilcolina (ACh 0,1 $\mu\text{g/mL}$, e.v.) na presença de atropina (ATR 1,0 mg/kg, e.v.).....	65
Figura 14	Efeitos pressóricos dos agonistas adrenérgico noradrenalina (A, Nor, 0,1 a 1,0 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) e muscarínico acetilcolina (B, ACh, 0,1 a 1,0 $\mu\text{g/kg}$, e.v.) antes e após a injeção da FAT de <i>G. argenteum</i> (1,0 mg/kg, e.v.).....	66

Figura 15	Efeitos pressóricos da FAT de <i>G. argenteum</i> e noradrenalina (Nor 0,3 µg/mL, e.v.) na presença de prazosin (PRZ 1,0 mg/kg, e.v.) em animais anestesiados que receberam hexametônio (30 mg/kg, e.v.).....	67
Figura 16	Efeitos pressóricos do dimetilfenilpiperazino (DMPP, 100 a 300 µg/kg, e.v.) antes e após a injeção da FAT de <i>G. argenteum</i> (3,0 mg/kg, e.v.).....	68
Figura 17	Efeitos cardíacos da FAT de <i>G. argenteum</i> em preparações de átrio isolado de rato. (A) Contrações induzidas por estimulação elétrica das fibras musculares de átrio esquerdo. (B) Frequência dos batimentos espontâneos das fibras do marcapasso.....	69
Figura 18	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> sobre o período refratário em preparações de músculo papilar de rato.....	70
Figura 19	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> em preparações de músculo liso vascular isolado de rato. (A) Anéis de aorta torácica com endotélio e (B) sem endotélio íntegro. Preparações com tônus induzido pela noradrenalina (10^{-7} M).....	72
Figura 20	Curvas cumulativas de Nor (10^{-10} a 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica sem endotélio de rato, realizadas antes e após a incubação da FAT de <i>G. argenteum</i>	73
Figura 21	Curvas cumulativas (10^{-8} a 10^{-3} M) de Nor (A) e ACh (B) em ducto deferente isolado de rato, realizadas antes e após a incubação da FAT de <i>G. argenteum</i>	75
Figura 22	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> sobre o influxo de cálcio em células de útero de rata e cardiomiócitos. (A) Quantificação fluorimétrica do cálcio intracelular de (A) cardiomiócitos e (B) células de útero, na presença da FAT (10 a 100 µg/mL) ou verapamil (100 µM).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Testes do labirinto em cruz elevado e do sono induzido por pentobarbital. Os valores descrevem os efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> (10 a 100 mg/kg) em camundongos após 60 min do tratamento.....	59
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Atropina
BPM	Batimentos por minuto
Ca ⁺²	Íon cálcio
CC	Cromatografia em coluna de sílica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAG	Diacilglicerol
DDR	Ducto deferente de rato
DMPP	Dimetilfenilpiperazino
d-Tc	d-Tubocurarina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHA	Extrato hidroalcoólico
Emax	Efeito máximo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAT	Fração alcaloides totais
FCHCl ₃	Fração alcaloídica clorofórmica
FH ₂ O	Fração aquosa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico

i.p./e.v./v.o.	Via intraperitoneal/endovenosa/oral
IP ₃	Inositol trifosfato
LC	Limite de confiança
LCE	Labirinto em cruz elevado
LNV	Líquido nutritivo vesicular
MLCK	Quinase da cadeia leve de miosina
NEO	Neostigmina
NO	Óxido Nítrico
Nodo SA	Nodo sinoatrial
Nor	Noradrenalina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PRE50%	Período refratário 50%
PRZ	Prazosin
Rf	Fator de retenção
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SNC	Sistema nervoso central
TCA	Ácido tricloroacético
%EBA	Porcentagem de entrada nos braços abertos
%EBF	Porcentagem de entrada nos braços fechado
%TBA	Porcentagem de tempo nos braços abertos
%TBA	Porcentagem de tempo nos braços fechados
[Ca ⁺²] _i	Concentração intracelular de cálcio

LISTA DE SIGLAS

CBA	Centro de Biotecnologia da Amazônia
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
PPGBIOTEC	Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO.....	04
ABSTRACT.....	05
LISTA DE FIGURAS.....	06
LISTA DE TABELAS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE SIGLAS.....	12
SUMÁRIO.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 <i>Geissospermum argenteum</i> Woodson.....	23
3.2 Eventos envolvidos na contração e no relaxamento dos músculos cardíaco e liso.....	27
4. MATERIAL.....	30
4.1 Material vegetal.....	31
4.2 Material biológico.....	31
4.3 Material Químico.....	34
4.3.1 Solventes, reagentes e sais.....	34
4.3.2 Drogas.....	34
4.4 Líquidos nutritivos, soluções e reveladores.....	35
4.4.1 D-MEN.....	35
4.4.2 Líquido Nutritivo de Krebs-Bicarbonato.....	35

4.4.3	Líquido Nutritivo Tyrode.....	35
4.4.4	Líquido Nutritivo Vesicular (LNV).....	35
4.4.5	Reagente de Bradford.....	35
4.4.6	Reagente de Dragendorff.....	35
4.4.7	Reagente de molibdato de amônio.....	35
4.4.8	Solução de HBSS.....	36
4.4.9	Soluções para a extração da Ca ²⁺ -ATPase de músculo esquelético.....	36
4.4.9.1	Solução I.....	36
4.4.9.2	Solução II.....	36
4.4.9.3	Solução III.....	36
4.4.10	Tampão para dosagem de proteína.....	36
4.4.11	Tampão de reação para Ca ²⁺ -ATPase.....	36
5.	MÉTODOS.....	37
5.1	Extração e purificação.....	38
5.1.1	Extrato hidroalcoólico (EHA) de <i>G. argenteum</i> Woodson.....	38
5.1.2	Fração alcaloides totais (FAT) e Fração clorofórmica (FCHCl ₃).....	38
5.1.3	Padronização química da FAT de <i>G. argenteum</i> Woodson.....	39
5.1.4	Purificação da FCHCl ₃ de <i>G. argenteum</i> Woodson.....	39
5.2	Avaliação da atividade farmacológica da FAT de <i>G. argenteum</i> Woodson.....	41
5.2.1	Teste da atividade geral da FAT <i>in vivo</i> (Teste hipocrático).....	41
5.2.2	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> na transmissão neuromuscular esquelética.....	42
5.2.3	Efeito da FAT de <i>G. argenteum</i> na atividade enzimática da Ca ⁺² -ATPase (SERCA I) de músculo esquelético.....	43
5.2.3.1	Obtenção da enzima Ca ²⁺ -ATPase.....	43

5.2.3.2	Determinação do teor de proteínas na amostra de SERCA 1.....	44
5.2.3.3	Avaliação dos efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> na atividade enzimática da Ca ⁺² -ATPase (SERCA I).....	44
5.2.4	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> na pressão arterial.....	45
5.2.5	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> no cronotropismo e no inotropismo cardíacos.....	46
5.2.6	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> no período refratário do músculo papilar de rato.....	47
5.2.7	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> na musculatura lisa vascular com e sem endotélio.....	47
5.2.7.1	Atividade da FAT na contração produzida pela noradrenalina em anéis de aorta de rato sem endotélio.....	48
5.2.8	Atividade da FAT na contração da musculatura lisa não vascular.....	49
5.2.9	Atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> no influxo e concentração de cálcio citosólico em cardiomiócitos e útero de rato mantidos em cultura.....	49
5.2.9.1	Cultura de cardiomiócito de rato.....	49
5.2.9.2	Cultura de útero de rata.....	50
5.2.9.3	Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria em células de útero e cardiomiócitos de rato mantidos em cultura.....	51
5.3	Análises estatísticas.....	51
6	RESULTADOS.....	53
6.1	Extração, padronização e purificação do material vegetal.....	54
6.2	Avaliação dos efeitos gerais da FAT de <i>G. argenteum</i> em camundongos.....	57
6.3	Avaliação dos efeitos neuromusculares esquelético da FAT de <i>G. argenteum</i> em diafragma de rato.....	60

6.4	Avaliação da atividade da FAT de <i>G. argenteum</i> na atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético.....	62
6.5	Avaliação dos efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> na pressão arterial de ratos anestesiados.....	63
6.6	Avaliação dos efeitos cardíacos da FAT de <i>G. argenteum</i> em átrios esquerdo e direito de rato.....	68
6.7	Avaliação dos efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> no período refratário em músculo papilar de rato.....	70
6.8	Avaliação dos efeitos vasculares da FAT de <i>G. argenteum</i> em anéis de aorta torácica de rato.....	71
6.9	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> nas curvas cumulativas de noradrenalina em anéis de aorta torácica de rato.....	73
6.10	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> nas curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato.....	74
6.11	Efeitos da FAT de <i>G. argenteum</i> no influxo de cálcio em células de útero de rata e cardiomiócitos mantidos em cultura primária.....	76
7	DISCUSSÃO.....	78
8	CONCLUSÃO.....	88
9	REFERÊNCIAS.....	90

O valor dos produtos de origem natural, em especial das plantas, sobre a saúde humana pode ser observado, historicamente, nos dados publicados referentes ao uso delas por diversos grupos étnicos para o tratamento das suas enfermidades. Esses registros datam da utilização desde as civilizações mais antigas até os dias de hoje (HALBERSTEIN, 2005). No mundo moderno, inúmeras substâncias foram isoladas de plantas tradicionalmente utilizadas como medicinais e estão inseridas em fases avançadas de estudos clínicos. Constituem candidatos promissores com atividades anti-infecciosas, anticancerígenas, analgésicas, anti-inflamatórias e com ação sobre doenças cardiovasculares (SAKLANI; KUTTY, 2008).

O conhecimento técnico-científico em conjunto com as experiências baseadas na tradição tem transformado o uso empírico dessas plantas em produtos tecnicamente elaborados e dotados de validação científica. Nesse contexto, é importante enfatizar que no estudo da planta medicinal, a multidisciplinaridade é essencial para a validação do uso terapêutico. Em geral, as etapas devem envolver estudos etnobotânicos/etnofarmacológicos, fitoquímicos e farmacológicos, dentre as quais estão inseridas a seleção, a coleta, a identificação taxonômica da espécie, a extração, o isolamento e a identificação dos constituintes químicos, além dos ensaios farmacológicos e toxicológicos (MACIEL; PINTO; VEIGA Jr., 2002). Os ensaios pré-clínicos realizados em animais, envolvem estudos em laboratório da farmacodinâmica, da farmacocinética e da toxicologia, e tem o objetivo de validar a ação proposta e identificar a toxicidade do novo composto (LAPA *et al*, 2004).

O registro e a comercialização desses produtos são passíveis a normas e diretrizes, internacionais e singulares a cada país, para a comprovação da eficácia e da segurança toxicológica (CALIXTO, 2000). No Brasil, de forma semelhante às drogas sintéticas, essa comprovação é pré-requisito legal para o registro dos fitoterápicos, que entre outras formas, pode ser demonstrada por meio de testes pré-clínicos e clínicos (CARVALHO *et al*, 2011).

Em resumo, uma planta medicinal somente poderá ser utilizada como medicamento, quando a sua eficácia e sua segurança toxicológica forem comprovadas na espécie humana e, portanto, validadas cientificamente (LAPA *et al*, 2004).

Nos últimos anos, trabalhos científicos têm sido publicados descrevendo os constituintes químicos, as atividades farmacológicas e a potencial toxicidade das espécies do gênero em estudo (*Geissospermum*). Atividades do tipo bloqueadora neuromuscular (TANAE *et al*, 2006), antimicrobiana (CORREIA *et al*, 2008), anticolinesterásica (LIMA *et al*, 2009; TANAE *et al*, 2006), antinocepsiva (WERNER *et al*, 2009), entre outras, foram anteriormente descritas e algumas relacionadas aos compostos isolados.

Utilizadas por diferentes povos amazônicos para tratar e/ou prevenir o impaludismo, algumas espécies do gênero (*G. laeve*, *G. urceolatum* e *G. argenteum*) tiveram a sua eficácia contra o *Plasmodium* descrita em laboratório (MARTINS, 2010; MUÑOZ *et al*, 2000; VIGNERON *et al*, 2005). Apesar do amplo espectro de atividade já descrito para o gênero, pouco se tem publicado sobre a farmacologia da *Geissospermum argenteum* Woodson.

O presente trabalho tem como proposta descrever a farmacologia secundária dessa planta nativa amazônica utilizada popularmente como antimalárica. Em vista da escassa literatura científica referente à farmacologia da espécie, o estudo foi iniciado com uma triagem geral das atividades farmacológicas, produzidas em animais de laboratório, que nos permitiu relacionar os efeitos às doses estabelecidas e definir os estudos sobre as ações cardiovasculares dos alcaloides da acariquara-branca.

2.1 Objetivo Geral

Estudar o espectro de ação dos alcaloides da espécie amazônica utilizada popularmente como antimalárica *Geissospermum argenteum* Woodson (APOCYNACEAE) no sistema cardiovascular e caracterizar o(s) mecanismo(s) de ação de seus alcaloides.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e estabilizar o material vegetal;
- Extrair, padronizar e purificar quimicamente os alcaloides da casca de *G. argenteum*;
- Analisar quantitativamente os efeitos farmacológicos do extrato alcaloídico semipurificado com técnicas *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar os efeitos da fração alcaloides totais na musculatura vascular e identificar os mecanismos moleculares específicos.

3.1 *Geissospermum argenteum* Woodson

A acariquara-branca como é conhecida a *Geissospermum argenteum* Woodson na Amazônia central e oriental é uma Apocynaceae representada por árvores de dossel de grande porte, frequentemente encontradas em florestas de platô e vertente (RIBEIRO *et al*, 1999). Também conhecida como maria-congo nas Guianas (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987) e quinarana da fruta pequena no Brasil (CORREIA *et al*, 2008) a espécie, assim como outras plantas do gênero, tem sido destacada pelo seu valor na medicina tradicional dessas regiões, onde a casca de *G. argenteum* é empregada desde veneno para caça (curare), a remédios para o tratamento de diversas enfermidades (DeFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004).

Conhecida pelo sabor amargo, a casca de *G. argenteum* macerada em álcool é utilizada na Guiana Francesa no tratamento empírico da malária (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987) e a sua decocção é utilizada para diabetes, diarreia, febres, infecções e como vermífugo (DeFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004).

Outras espécies do gênero *Geissospermum*, como *G. sericeum* e *G. laeve* (sinonímia *G. vellosii*), também são descritas como antimaláricas por diferentes grupos étnicos no Brasil (BRANDÃO *et al*, 1992; MILLIKEN, 1997), na Guiana francesa (VIGNERON *et al*, 2005) e na Bolívia (MUÑOZ *et al*, 2000).

Nos últimos anos, têm sido crescentes os estudos em laboratório descrevendo a atividade antiparasitária das espécies do gênero. Alguns trabalhos demonstraram *in vivo* e *in vitro* a ação dos compostos sobre diferentes cepas de *Plasmodium*. Em um desses trabalhos, foi demonstrado que *G. laeve* (EtOH) foi ativo contra cepas de *P. falciparum* resistentes e sensíveis a cloroquina (*in vitro*) e inativo contra *P. berghei* (*in vivo*), além de apresentar elevada toxicidade em doses de 100 mg/kg, i.p, em camundongos (MUÑOZ *et al*, 2000). O mesmo não foi observado por Bertani *et al* (2005), *G. laevis* (EA) não apresentou efeito sobre

o *P. falciparum* resistentes a cloroquina. Contudo, no mesmo trabalho, os autores demonstraram que a casca de *G. argenteum* macerada em álcool, tradicionalmente utilizada como preventiva (VIGNERON *et al*, 2005), inibiu de forma significativa o estágio intra-hepático do *Plasmodium yoelli*.

Em estudos mais recentes, Martins (2010) mostrou que uma fração alcaloídica de *G. urceolatum* foi ativa contra o *P. chabaudi* (*in vitro*), mas, em camundongos BalbC tratados por via oral (100 mg/kg/4 dias), a FAT não reduziu o número de hemácias infectadas pelo parasita. A atividade antiparasitária sobre o *Leishmania infantum* e o *Trypanosoma cruzi* também foi relacionada recentemente aos alcaloides da espécie *G. reticulatum* (REINA *et al*, 2012).

Além das atividades antiparasitárias descritas, outros trabalhos têm relatado distintas ações farmacológicas, anteriormente citadas nas farmacopeias tradicionais, e a toxicidade de compostos químicos isolados das espécies do gênero *Geissospermum*.

Em 2008, Correia *et al* demonstraram a ação antimicrobiana do extrato etanólico de *G. argenteum* em cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

Lima *et al* (2009) e Werner *et al* (2009) demonstraram, respectivamente, os efeitos anticolinesterásicos *in vitro* e antinoceptivo em camundongos da *Geissospermum vellosii*. Nesses estudos, os autores também isolaram e identificaram, respectivamente, os alcaloides geissospermine e 12-metoxi-1-methyl-aspidospermidine.

A atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* de um extrato rico em alcaloides β -carbolina de *G. vellosii* sobre células de câncer de próstata, foi descrito por Bemis *et al* (2009). Anteriormente, Steele *et al* (2002) observaram a citotoxicidade da flavopereirina (alcaloide do tipo β -carbolina) extraído da casca de *G. sericeum* em linhagem de células humanas.

Utilizando larvas de *Aedes aegypti*, não foi observada toxicidade nos extratos etanólicos e metanólicos obtidos da casca de *Geissospermum argenteum* Woodson e *G. urceolatum* A.H. Gentry (POHLIT *et al*, 2004). No entanto, em outro estudo, foi mostrado que o extrato metanólico da madeira de *G. argenteum* foi ativo/letal para *Artemia franciscana* na mesma concentração (500 µg/mL) (QUIGNARD *et al*, 2003).

Lima-Landman *et al* (2006) descreveram a ação inibitória dos alcaloides geissospermina, flavopereirina e geissoschizolina isolados de *G. laeve* sobre a recaptção de serotonina em sinaptossomas isolados de rato.

Ribeiro (1986) observou sinais de curarização em animais tratados por via intraperitoneal, com o extrato etanólico de *G. laeve*. Resultado semelhante foi observado por Martins (2010) utilizando uma fração alcaloídica de *G. urceolatum*. No trabalho descrito por Ribeiro, após purificação e obtenção de uma fração contendo provavelmente a geissoschizolina, o efeito observado foi confirmado *in vitro*, sendo descrita uma inibição não competitiva da transmissão neuromuscular, não relacionada a uma inibição da liberação de acetilcolina ou da excitabilidade da membrana, e nem a uma estimulação persistente da membrana.

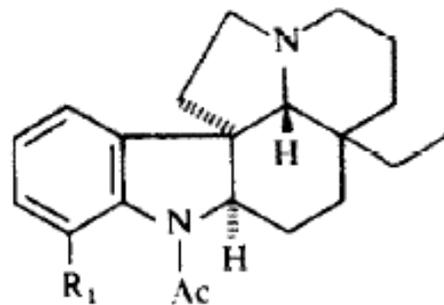
Utilizando uma fração rica em alcaloides obtida da mesma espécie, Tanae (1999) reproduziu o bloqueio neuromuscular não competitivo. No trabalho foram isolados a geissospermina e outro alcaloide, provavelmente a geissoschizolina, que *in vitro* produziu o efeito, com indicação de bloqueio do complexo canal iônico/receptor nicotínico. Mais tarde, o mesmo tipo de bloqueio foi descrito para os alcaloides geissospermina, geissoschizolina e flavopereirina, este último também apresentou expressiva atividade anticolinesterásica (TANAE *et al*, 2006).

Em meados do século XIX, já havia relatos descrevendo o isolamento de alcaloides da *G. vellosii* Allemão (Pau-pereira), na época chamado de pereirina (ALMEIDA *et al*, 2009).

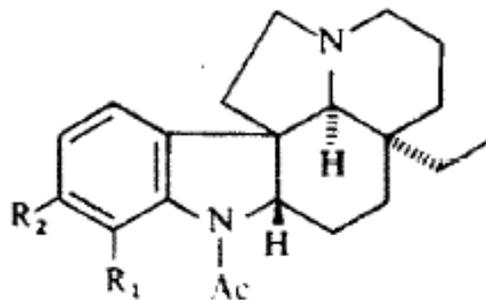
Mais tarde, da mesma espécie foram isolados e identificados os alcaloides flavopereirina (HUGHES; RAPOPORT, 1958), apogeissoschizina, geissoschizina, geissoschizolina, geissospermina (RAPOPORT *et al*, 1958), geissolosimina, geissoschizona e vellosimol (MBEUNKUI; GRACE; LILA, 2012). A flavopereirina e a geissoschizolina foram também isolados da casca de *G. sericeum* (STEELE *et al*, 2002).

Pouco se tem descrito sobre a constituição química da planta em estudo. Em um trabalho realizado por Paccioni e Husson (1978) foram identificados os alcaloides (-) dimetoxiaspidospermina, (-) aspidospermina, (+) aspidocarpina e (+) dimetilaspidospermina, a partir da folha e da casca de *G. argenteum* (figura 1).

Em estudo mais recente, Reina *et al* (2012) isolou e identificou alcaloides da *G. reticulatum*, entre eles o composto O-dimetilaspidospermina.



- 1 (-) Desméthoxyaspidospermine** $R_1 = H$
2 (-) Aspido-spermine $R_1 = OMe$



- 3 (+) Aspidocarpine** $R_1 = OH, R_2 = OMe$
4 (+) Desméthylaspidospermine $R_1 = OH, R_2 = H$

Figura 1 - Estrutura dos alcaloides de *Geissospermum argenteum* Woodson
 FONTE: PACCIONE; HUSSON, 1978.

Da mesma forma, poucos trabalhos têm descrito os efeitos cardiovasculares dos alcaloides do gênero *Geissospermum*. Em trabalho de tese recente, os alcaloides de *G. urceolatum* apresentaram ações hipotensora e vasodilatadora, com provável participação da via do óxido nítrico e inibição do influxo de cálcio em células musculares lisas (MARTINS, 2010).

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar os efeitos cardiovasculares da fração alcaloídica extraída da casca de *G. argenteum* Woodson, uma espécie nativa da Amazônia, comumente utilizada na medicina tradicional das populações locais dessa região.

3.2 Eventos envolvidos na contração e no relaxamento dos músculos cardíaco e liso

Os eventos celulares que resultam na contração ou no relaxamento das musculaturas cardíaca e lisa envolvem distintas vias de sinalização direcionadas por segundos mensageiros e a participação de estruturas proteicas que têm em comum o controle sobre os níveis intracelulares do cálcio. No coração, esse processo é regulado por mecanismos elétricos e autonômicos (BERS, 2002).

No primeiro caso, células excitáveis do marcapasso (nodo SA) geram potenciais de ação que são deflagrados sobre a membrana das células do miocárdio. Essa onda de despolarização resulta na abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo L) que estão presentes nas invaginações da membrana dos cardiomiócitos (túbulos T), permitindo o influxo do cálcio extracelular para o citosol. Os receptores de rianodina (RyR) presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) e próximos aos canais de cálcio do tipo L (SCRIVEN; DAN; MORE, 2000) são estimulados por esse cálcio e o estoque do íon na organela é liberado (FABIATO, 1985; BEUCKELMANN; WIER, 1988) aumentando a sua

concentração dentro da célula. Em seguida, o cálcio se liga a proteínas chamadas troponina C e ativa quinases da cadeia leve de miosina (MCLK), promovendo o deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina e a contração do músculo.

Os mediadores autonômicos liberados neuronalmente sobre as células do marcapasso e sobre o miócitos ventriculares interferem, respectivamente, com a frequência dos batimentos cardíacos (cronotropismo) e com a força de contração (inotropismo). A transmissão simpática produz efeitos positivos, enquanto que a colinérgica liberada vagalmente produz bradicardia.

Na membrana das células cardíacas, os receptores β_1 -adrenérgicos são ativados pela noradrenalina desencadeando a cascata de sinalização da adenosina monofosfato cíclico (AMPC), que resulta, em um primeiro momento, no aumento da $[Ca^{+2}]_i$. O segundo mensageiro formado ativa proteínas quinases (PKA) responsáveis pela fosforilação dos canais de cálcio (RyR e tipo L) e de estruturas responsáveis pelo relaxamento muscular. Como já mencionado, a abertura desses canais resultam na entrada de mais cálcio para o citosol (LINDENGER; NIGGLI, 2005; SHEN, J.X, 2006; XIAO, *et al*, 2007) e, por conseguinte, no aumento da força de contração. Em seguida, o cálcio é recaptado para o RS pela Ca^{+2} -ATPase e o músculo relaxado após fosforilação da troponina I pela PKA (ZHANG, *et al*, 1995), enquanto que, o trocador Na^+/Ca^{+2} remove o cálcio para o meio extracelular.

A membrana das células do marcapasso também possuem receptores muscarínicos que quando ativados produzem bradicardia. A acetilcolina é liberada vagalmente sobre os cardiomiócitos e atua sobre receptores muscarínicos do tipo M_2 . Ao contrário dos receptores adrenérgicos, esses diminuem a frequência cardíaca e inibem a enzima adenilato ciclase (AC), bloqueando a via do AMPC (LAI, *et al*, 1991).

No músculo liso (vascular e não vascular) a contração e o relaxamento também são dependentes da $[Ca^{+2}]_i$, no entanto, o aumento deste envolve outras vias de sinalização.

O tônus simpático dos vasos sanguíneos é promovido pela noradrenalina. Liberada sobre os vasos produz contração da musculatura via receptores α_1 -adrenérgicos. Esses receptores são acoplados a proteína G que ativam enzimas membranares (fosfolipase C) causando a clivagem dos fosfolipídios (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PIP₂) em inositol (1,4,5)-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). Os receptores para IP₃ presentes na membrana do RS quando ativados pelo segundo mensageiro liberam o cálcio estocado e aumentam a concentração do íon no citoplasma da célula. O DAG ativa proteínas quinases (PKC) que assim como o cálcio liberado do RS fosforilam a MCLK promovendo a contração do músculo liso (para revisão ver WEBB, 2003).

Os receptores β_2 -adrenérgicos, também presentes na membrana das células do vaso, produzem aumento no AMPc, que no músculo liso vascular inibe a ativação da miosina quinase e produz relaxamento (QUEEN; FERRO, 2006).

O lúmen dos vasos sanguíneos é revestido por células endoteliais, onde é sintetizado o fator de relaxamento muscular óxido nítrico (NO). Esse gás é obtido da clivagem enzimática do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (eNOS), em uma via desencadeada pela ativação de receptores muscarínicos (M₃) presentes na membrana dessas células (FURCHGOTT, 1999; VANHOUTTE, 2009). O cálcio liberado do RS pelo IP₃ se liga a calmodulina e ativa a enzima eNOS levando a produção do NO. O gás produzido no endotélio se difunde para as células musculares lisas e promove a formação de GMPc e o relaxamento muscular (VANHOUTTE, 2001).

Outros mediadores vasculares atuam sobre a musculatura lisa e sobre o endotélio promovendo a contração ou o relaxamento do músculo. A angiotensina II e a endotelina I produzem contração via receptores AT₁ e ET_A, respectivamente (WYNNE; CHIAO, WEBB, 2009), enquanto que a prostaciclina produz relaxamento (DUSTING; MONCADA; VANE, 1977).

4.1 Material vegetal

Cascas do tronco da árvore nativa amazônica *Geissospermum argenteum* Woodson foram obtidas e utilizadas no presente trabalho. A coleta foi realizada em agosto de 2009, na Reserva Florestal Adolpho Ducke – Manaus - Amazonas (S 02° 55' 27.8", W 059° 58' 28.1"), de um exemplar registrado (placa nº 3062) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA (Projeto Flora da Reserva Ducke) (figura 2).

Sob condições ambientais de temperatura e iluminação, o material coletado foi seco e, em seguida, pulverizado (moinho de facas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UFAM). Durante o armazenamento, evitou-se o contato do material com a umidade, a luz e temperaturas extremas (figura 3).

4.2 Material biológico

Os animais utilizados nos testes farmacológicos foram criados no biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA. Antes de cada experimento, os animais foram previamente mantidos em biotério experimental, sob condições controladas de temperatura (21 ± 2 °C) e iluminação (ciclo claro/escuro 12 horas) e sem restrições a água e ração.

Nos testes *in vivo* foram utilizados camundongos machos Swiss albinos da espécie *Mus musculus*, pesando entre 40 e 60 g e ratas Wistar da espécie *Rattus norvegicus* pesando entre 200 e 400 g. Nos testes *in vitro*, foram utilizados ratos (as) e coelhos. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFESP (CEP/EPM 0760/07) e todos os protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de Animais (GILES, 1987).

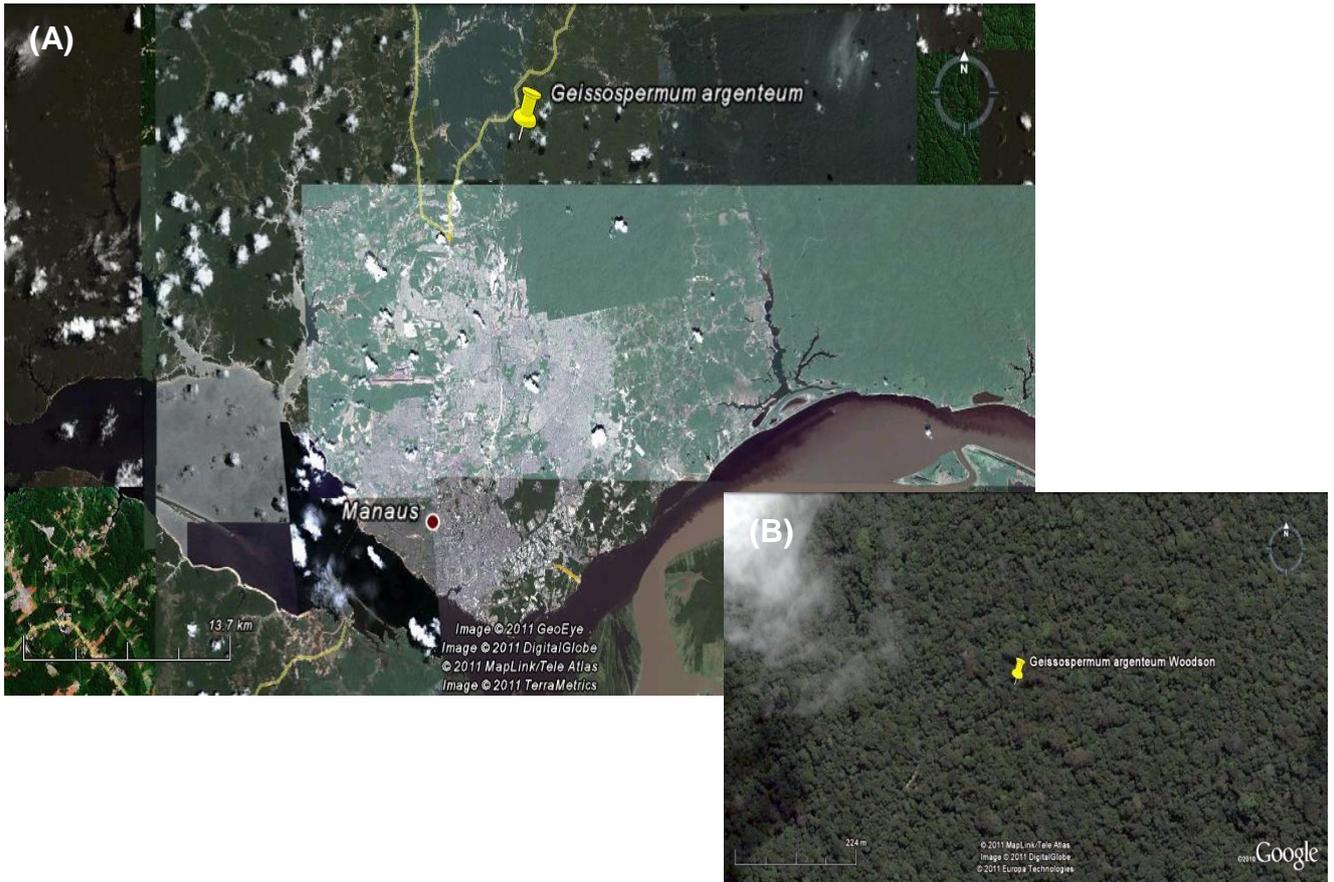


Figura 2 - (A) Marcação da área em que foi coletado o material vegetal (S 02° 55' 27.8", W 059° 58' 28.1").
(B) Espécime localizado em área de floresta-virgem dentro da Reserva Florestal Adolpho Ducke
FONTE: Google Earth 6.0.3.2197.



Figura 3 - *Geissospermum argenteum* Woodson. (A) Árvore de grande porte, (B) tronco fenestrado e/ou acanalado, (C) folhas discolores de base assimétrica, reticulação inconspícua, encoberta por pelos adpressos prateados (RIBEIRO *et al*, 1999), (D) casca fresca, (E) casca moída em moinho de facas e (F) fração alcaloides totais (FAT) liofilizada de acariquara-branca

4.3 Material químico

4.3.1 Solventes, reagentes e sais

Acetonitrila (Merck), ácido acético glacial (Nuclear-Brasil), ácido ascórbico (Vetec-Brasil), ácido clorídrico (Nuclear-Brasil), ácido etilenodiaminotetracético – EDTA (Sigma), ácido fosfórico 85% (C.P.Q), ácido tricloroacético-TCA (Nuclear), albumina de soro bovino (Sigma), adenosina trifosfato - ATP (sigma), bicarbonato de sódio (C.P.Q), butanol (Synth), cloreto de cálcio (Vetec), cloreto de magnésio (Merck-Brasil), cloreto de potássio (Vetec-Brasil), cloreto de sódio (Merck-Brasil), clorofórmio (Nuclear-Brasil), Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol (Merck-Brasil), éter etílico (Nuclear-Brasil), fosfato monossódico (Merck-Brasil), glicose (C.P.Q), hidróxido de amônio (ECIBRA-Brasil), hidróxido de sódio (Reagen-Brasil), iodeto de potássio (Sigma-Brasil), metanol P.A. (Nuclear-Brasil), sílica gel (Merck), subnitrato de bismuto (Nuclear-Brasil).

4.3.2 Drogas

Acetilcolina cloreto (Sigma-Brasil), atropina sulfato (Sigma-Brasil), dantrolene sódico (Sigma), dimetilfenilpiperazino iodeto (Aldrich), d-tubocurarina cloridrato (Sigma-Brasil), heparina (Hipolabor), hexametônio brometo (Sigma), neostigmina brometo (Sigma-Brasil), noradrenalina cloridrato (Sigma-Brasil), pentobarbital sódico (Sigma-Brasil), prazosin hidrocloreto (Sigma) e tapsigargina (Sigma).

4.4 Líquidos nutritivos, soluções e reveladores

4.4.1 D-MEM (mg/L): Gibco Life Technologies: CaCl_2 200; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,1; KCl 400; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200; NaCl 6400; NaH_2PO_4 125; NaHCO_3 3700; L-arginina HCl 84; L-cistina 62570; L-glutamina 548; glicina 30; L-histamina HCl H_2O 42; L-isoileucina 105; L-lisina HCl 146; L-metionina 30; L-fenilefrina 66; L-serina 42; L-treonina 95; L-triptofano 16; L-tirosina 104,2; L-valina 94; pantotenato de cálcio 4; ácido fólico 4; inositol 7200; nicotimamida 4; piridoxal HCl 4; riboflavina 0,4; tiamina HCl 4; glicose 1000; piruvato de sódio 110; vermelho de fenol 15. Foram adicionados gentamicina 40; cloreto de colina 4; D-glucose 3500.

4.4.2 Líquido Nutritivo de Krebs-Bicarbonato: NaCl 119,0 mM; KCl 4,6 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM; NaHCO_3 15,0 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM e glicose 11,0 mM.

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

4.4.4 Líquido Nutritivo Vesicular (LNV): NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO_3 15 mM; NaH_2PO_4 0,4 mM; glicose 5,5 mM; CaCl_2 1,8 mM.

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

4.4.6 Reagente de Dragendorff: Solução A – 0,85 g de subnitrato de bismuto em 50 mL de ácido acético 20%. Solução B – 8 g de iodeto de potássio em 20 mL de água destilada. Sol. A (5mL) + Sol. B (5mL) em 20 mL de ácido acético. Volume final de 100 mL com água destilada.

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

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

4.4.9 Soluções para a extração da Ca²⁺-ATPase de músculo esquelético

4.4.9.1 Solução I: MOPS 10 mM; sacarose 10% e EDTA 0,1 mM, pH 7,0.

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

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

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

4.4.11 Tampão de reação para Ca²⁺-ATPase: Tris-maleato 50 mM, pH 7,4; MgCl₂ 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionóforo A23187 10 μM; CaCl₂ 1 mM e ATP 5 mM.

5.1 Extração e purificação

5.1.1 Extrato hidroalcoólico (EHA) de *G. argenteum* Woodson

Após secagem e trituração, o pó das cascas do caule de *G. argenteum* foi submetido à extração e o extrato obtido foi purificado e padronizado. O extrato hidroalcoólico foi obtido a partir da extração da casca moída (100 g) com etanol a 80% (800 mL) em aparelho de Soxhlet por 18 h. Ao final da extração, o material foi filtrado e concentrado a vácuo em rotaevaporador (RE47-Yamato) a 50 °C até *secura* (figura 4).

5.1.2 Fração alcaloides totais (FAT) e Fração clorofórmica (FCHCl₃)

O EHA foi suspenso em 200 mL de clorofórmio (CHCl₃) e particionado com água acidificada (pH 3,0) com HCl 1 N, por quatro vezes consecutivas. A fração aquosa obtida foi alcalinizada com NH₄OH até pH 10,0 e particionada com CHCl₃ (250 mL, 4 vezes). Em seguida, a fração clorofórmica foi extraída por quatro vezes com água acidificada (pH 3,0). A fração aquosa resultante foi concentrada a vácuo em rotaevaporador (50 °C) e liofilizada (Modulayo-ThermoFischer), originando a fração alcaloides totais.

Para a obtenção da fração alcaloídica clorofórmica (FCHCl₃) 100 g da casca triturada de *G. argenteum*, foram submetidos às mesmas condições de extração descritas acima. Após partição com água ácida, a fração aquosa obtida foi alcalinizada com hidróxido de amônio e extraída com clorofórmio, dando origem a fração alcaloídica clorofórmica (figura 4).

5.1.3 Padronização química da FAT de *G. argenteum* Woodson

A FAT de *G. argenteum* foi padronizada em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas injetoras LC-20AT, módulo de comunicação CBM-20A e detector UV-VIS SPD-10A, operando a 260 nm. O sistema estava acoplado a um computador, sendo operado por software Shimadzu LC solution, versão 1.21, SP1.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 60% em 30 min, em coluna analítica C18 (250 x 0,46 cm) empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 0,8 mL/min. A amostra foi dissolvida em água/acetonitrila 10%, filtrada em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 20 µL.

5.1.4 Purificação da FCHCl₃ de *G. argenteum* Woodson

A FCHCl₃ foi purificada por cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica gel (Aldrich, 70 a 230 *mesh*) como fase estacionária. A eluição foi efetuada com gradiente crescente de metanol em clorofórmio, sendo coletadas 159 frações de 20 mL cada. As frações foram concentradas e submetidas à análise qualitativa por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica gel F₂₅₄ (Merck), eluídas com uma mistura de butanol : ácido acético : água (BAW 4 : 2 : 1). As placas foram reveladas com reagente de Dragendorff e as frações reunidas por similaridade.

***Geissospermum argenteum* Woodson**

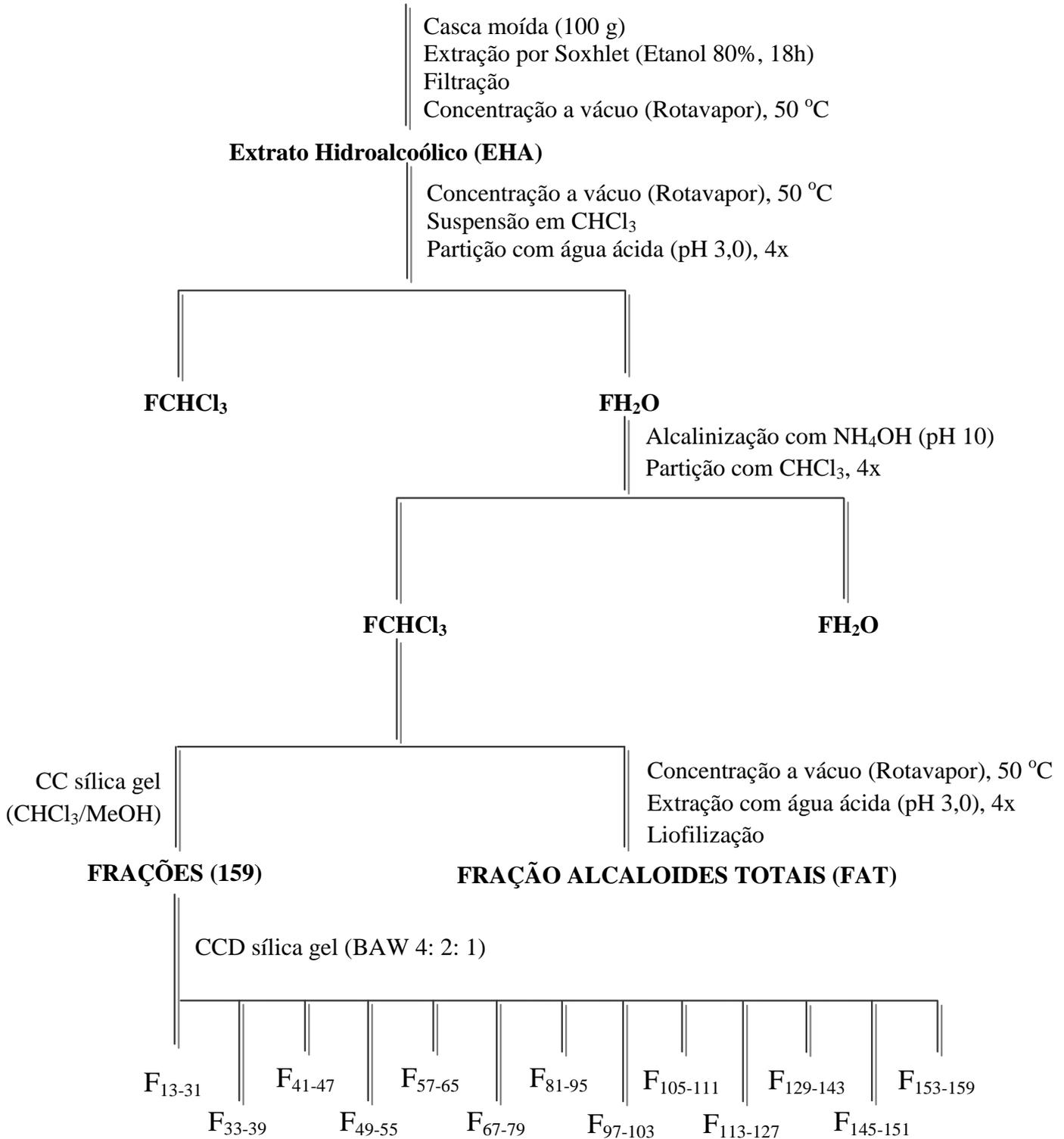


Figura 4 – Representação esquemática da extração e purificação dos alcaloides de *G. argenteum* Woodson

5.2 Avaliação da atividade farmacológica da FAT de *G. argenteum* Woodson

Os testes foram, em sua maioria, realizados seguindo os protocolos padrões descritos no livro “Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais” (LAPA *et al*, 2008), com as devidas adaptações.

Para o teste de observação geral da atividade farmacológica, a FAT de *G. argenteum* foi dissolvida em água para a administração oral e em salina 0,9% para a administração intraperitoneal. Os equipamentos utilizados foram limpos (etanol a 10%) e secos antes de cada experimento. Testes específicos no sistema nervoso central (SNC) foram realizados para investigar alterações relevantes nas mudanças no padrão normal de comportamento.

5.2.1 Teste da atividade geral da FAT *in vivo* (Teste hipocrático)

O estudo farmacológico iniciou-se com o teste geral da atividade farmacológica descrito por Irwin (1968), com devidas modificações. A finalidade do teste foi avaliar possíveis efeitos dos alcaloides de *G. argenteum* no comportamento dos animais.

Camundongos adultos, machos, divididos em grupos experimentais (n=3), foram tratados oralmente com veículo água (5 mL/kg, grupo controle) ou com FAT de *G. argenteum* nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. Após 60 minutos dos tratamentos, os animais foram colocados, individualmente, em caixas e observados quanto à mudanças no padrão normal de comportamento e outros sinais em diferentes intervalos de tempo (0,5, 1, 2, 3 e 24 horas). Animais tratados por via intraperitoneal receberam a FAT apenas na dose de 10 mg/kg e os efeitos foram avaliados logo após a sua administração.

Os animais foram observados em livre movimentação e os efeitos gerais anotados em tabela padrão de triagem farmacológica (Irwin, 1968) com as devidas adaptações.

5.2.2 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* na transmissão neuromuscular esquelética

Ratos machos, adultos, sob anestesia etérea foram mortos por deslocamento cervical. Após sangramento da aorta abdominal, o conjunto nervo frênico-músculo diafragma foi removido e dissecado em placa de Petri recoberta com parafina, contendo líquido nutritivo Tyrode, pH 7,4. Após dissecação do órgão, as amarras foram posicionadas e as preparações foram montadas em cuba de vidro contendo líquido nutritivo à 30 °C (pH 7,4) aerado com mistura carbogênica.

Para o registro das contrações obtidas por estimulação elétrica do nervo, o tronco nervoso foi introduzido em um eletrodo bipolar de platina e estimulado com pulsos de 0,5 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima. As contrações por estimulação direta do diafragma foram obtidas com pulsos de 2 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima, através de um eletrodo bipolar de platina imerso no banho. Esses registros foram obtidos utilizando-se um transdutor de força conectado a um polígrafo digital (PowerLab – ADInstruments), sob tensão inicial de 1 g.

Após um período de estabilização de 30 minutos, a FAT (10, 30 e 100 µg/mL) foi incubada durante 30 minutos e as contrações comparadas àquelas obtidas antes da incubação da FAT. Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.2.3 Efeito da FAT de *G. argenteum* na atividade enzimática da Ca⁺²-ATPase (SERCA I) de músculo esquelético

Para avaliar a ação dos alcaloides da FAT na atividade da Ca⁺²-ATPase (SERCA I) a enzima foi isolada dos músculos da coxa de coelho. Após o isolamento da enzima, a concentração proteica das amostras foi determinada e a atividade da Ca⁺²-ATPase/mg de proteína/min foi medida em condições controle e na presença dos alcaloides da *G. argenteum*.

5.2.3.1 Obtenção da enzima Ca²⁺- ATPase

A Ca²⁺- ATPase do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético (SERCA 1) foi extraída dos músculos da coxa de coelho (1,5-2 kg) pelo método descrito por Kosk-Kosicka (1999). Todas as etapas foram realizadas a 4°C. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital (> 100 mg/kg, i.p.) de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa Institucional. Os músculos das duas coxas foram removidos e transferidos para béquer contendo EDTA 0,1 mM, dissecados e lavados uma vez com água destilada gelada. Os músculos foram cortados e homogeneizados em tampão MOPS (170 g: 510 mL solução I), pH 7,0 por 5 min e o homogenato foi centrifugado a 15.000 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em gaze e o filtrado centrifugado a 40.000 x g por 90 minutos. O pellet foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e o material foi mantido em câmara fria por 40 minutos. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 15.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 40.000 x g por 90 minutos. O pellet final foi suspenso na solução III e mantido em freezer -80 °C até a realização dos ensaios de atividade enzimática.

5.2.3.2 Determinação do teor de proteínas na amostra de SERCA 1

A concentração de proteínas das amostras membranares contendo a SERCA 1 foi determinada pelo método de Bradford (1976) que se baseia na mudança de coloração vermelha do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250, presente no reagente de Bradford, para coloração azul após sua ligação à proteína das amostras. O complexo proteína–corante tem alto coeficiente de extinção, o que permite uma medida precisa da quantidade de proteína das amostras.

O ensaio foi realizado em triplicata, incubando-se as amostras com reagente de Bradford. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu) a 595 nm e a concentração de proteína (3,32 mg/mL) foi determinada por interpolação da curva padrão obtida com albumina de soro bovino (1 a 8 µg/mL).

5.2.3.3 Avaliação dos efeitos da FAT de *G. argenteum* na atividade enzimática da Ca⁺²-ATPase (SERCA I)

A atividade da Ca²⁺-ATPase foi determinada de acordo com o método de Fiske;Subbarow (1925) adaptado, utilizando microplaca transparente de 96 poços com fundo chato. A velocidade de hidrólise enzimática do ATP foi determinada colorimetricamente por quantificação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP em função do tempo (MURAKAMI *et al*, 1992). As amostras membranares contendo 0,6 µg de proteína em tampão tris-maleato 50 mM foram incubadas na ausência e na presença de FAT (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) em volume final de 75 µL/poço. A reação foi iniciada com 7,5 µL de ATP 30 mM a 37 °C. Após 10 min, a reação foi interrompida com 25 µL de TCA 50% sob banho de gelo. Adicionou-se 200 µL de reagente de molibdato de amônio (15 mL/0,36 g de ácido

ascórbico, segundo Hossein et al., 1993) e incubou-se a 37 °C por 10 minutos. A tapsigargina (0,01 a 1,0 µM) foi utilizada como controle positivo. As leituras das absorbâncias foram feitas a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

5.2.4 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* na pressão arterial

Ratas normotensas, adultas, pesando entre 200 a 240 g foram anestesiadas com pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) para o registro da pressão arterial. Os animais foram fixos em decúbito dorsal em uma placa de cortiça, a veia ilíaca foi canulada para a administração das drogas e extratos/frações e a artéria carótida foi utilizada para o registro das variações pressóricas. A FAT (0,3, 1,0 e 3,0 mg/kg) foi dissolvida em salina 0,9% e administrada por via endovenosa. O registro pressórico foi obtido através de um transdutor de pressão conectado a um polígrafo digital (PowerLab – ADInstruments). A frequência cardíaca foi obtida eletronicamente das oscilações da pressão arterial a cada sístole. Durante o experimento, os animais foram mantidos sob ventilação mecânica (Ugo Basile 7025) e heparina (100 UI/mL) foi utilizada para evitar coágulos e obstruções na cânula.

Em alguns animais o efeito da FAT foi medido nas respostas a agonista conhecidos como acetilcolina (0,1, 0,3 e 1,0 µg/kg), noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 µg/kg) e DMPP (100, 150 e 300 µg/kg), Antagonistas muscarínicos (atropina, 1 mg/kg e.v.), bloqueadores α_1 -adrenérgicos (prazosin, 1 mg/kg e.v.) e bloqueadores ganglionares (hexametônio, 30 mg/kg e.v.) foram administrados antes da repetição de uma nova dose da FAT e os efeitos comparados.

5.2.5 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* no cronotropismo e no inotropismo cardíacos

Ratos machos e fêmeas, adultos, foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Após sangramento da aorta abdominal e remoção do pericárdio, as amarras foram posicionadas nas extremidades dos músculos e os átrios foram rapidamente retirados e montados em uma cuba de vidro com capacidade para 5 mL, contendo líquido nutritivo Tyrode à 35 °C (pH 7,4) aerado com mistura carbogênica (O₂ 95% e CO₂ 5%).

O átrio esquerdo, desprovido de atividade espontânea, foi estimulado eletricamente através de um eletrodo bipolar de platina imerso no banho, com pulsos transmuralis de 2 ms de duração, frequência de 1,0 Hz e voltagem supramáxima. O átrio direito apresentou batimentos espontâneos, os quais foram registrados para verificar a ação da FAT sobre a frequência do marcapasso. O registro das contrações e da frequência de batimentos, foram obtidos utilizando-se um transdutor de força conectado a um polígrafo digital (PowerLab – ADInstruments), sob tensão inicial de 1 g para a contração.

Após estabilização de 30 minutos, a FAT (10, 30 e 100 µg/mL) foi incubada durante 30 minutos e os resultados comparados àqueles obtidos antes da incubação da droga. Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.2.6 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* no período refratário do músculo papilar de rato

Ratos foram mortos por deslocamento cervical sob anestesia etérea. Após retirada do coração, o músculo papilar foi dissecado e preso entre uma haste de vidro e um transdutor de força para registro das contrações isométricas em Tyrode carbogenado a 37 °C. Durante 30 min, as preparações foram estimuladas com pulsos de 1 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima através de eletrodos de platina imersos na cuba. As respostas contráteis foram registradas através do sistema PowerLab conectado a um computador operado por software LabChart5 (ADInstruments). O período refratário efetivo 50% (PRE50%) foi determinado com a técnica de pulsos duplos (twin pulses) variando-se o intervalo entre o primeiro e o segundo estímulo em: 50, 100, 130, 160, 190, 220, 250, 280, 310, 340, 370, 400, 430, 460, 490, 520, 550, 580 e 610 ms. Os registros das contrações foram efetuados antes da incubação (controle) e após 10 min na presença da FAT (3,0; 10 e 30 µg/mL). O PRE50% foi determinado matematicamente, interpolando-se a porcentagem de contração obtida com o segundo estímulo em relação à contração obtida com o primeiro estímulo *versus* o logaritmo do intervalo de tempo entre os estímulos em milissegundos.

5.2.7 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* na musculatura lisa vascular com e sem endotélio

Ratos machos, adultos, sob anestesia etérea foram mortos por deslocamento cervical. Após sangramento da aorta abdominal e remoção da aorta torácica, o vaso foi dissecado em Krebs-bicarbonato, pH 7,4 e cortado em anéis (~2 mm) que foram montados em cubas de

vidro contendo solução nutritiva à 35 °C, aerada com mistura carbogênica. Quando necessário, o endotélio vascular foi removido mecanicamente pela introdução e rolagem intraluminal de uma linha cordonê. Após estabilização de 30 minutos sob tensão de 2 g, a presença de endotélio foi testada observando-se o relaxamento induzido pela incubação de acetilcolina (10^{-6} M) na preparação previamente contraída pela noradrenalina (10^{-7} M). A contração da artéria foi registrada com um transdutor de força conectado a um polígrafo digital (PowerLab – ADInstruments), e o relaxamento expresso em porcentagem da contração máxima produzida pela noradrenalina (10^{-7} M). A FAT (1,0; 3,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$) foi testada em anéis de aorta com e sem endotélio, previamente contraídas pela noradrenalina (10^{-7} M). Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.2.7.1 Atividade da FAT na contração produzida pela noradrenalina em anéis de aorta de rato sem endotélio

Anéis de aorta (2 mm) foram isolados, o endotélio destruído mecanicamente e a ausência de endotélio comprovada pela ausência do relaxamento muscular à incubação de acetilcolina (10^{-6} M) em tônus induzido pela noradrenalina (10^{-7} M), como descrito anteriormente.

Depois de lavagem e 30 minutos de estabilização, curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-10} a 10^{-4} M) foram obtidas antes e 10 minutos após a incubação da FAT (0,3 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$). Somente uma concentração foi testada por preparação. O efeito produzido pela Nor na ausência e na presença da FAT foi expresso em porcentagem da contração máxima produzido pela noradrenalina controle e relacionado ao logaritmo negativo das concentrações molares do agonista. A partir dos resultados obtidos, a concentração efetiva 50% (CE_{50}) e o efeito máximo (E_{max}) foram calculados.

5.2.8 Atividade da FAT na contração da musculatura lisa não vascular

Ratos machos, adultos, sob anestesia etérea foram mortos por deslocamento cervical. Em seguida, os ductos deferentes foram removidos, dissecados em líquido nutritivo vesicular (LNV), pH 7, e montados em cuba de 5 mL, contendo o líquido nutritivo à 30 °C (pH 7,4) aerado com mistura carbogênica. O registro da contração foi obtido utilizando-se um transdutor de força conectado a um polígrafo digital (PowerLab – ADInstruments), sob tensão inicial de 1 g. Após 30 minutos de estabilização, foram obtidas curvas concentração-efeito à adição cumulativa de noradrenalina ou acetilcolina (10^{-8} a 10^{-3} M), antes e 10 minutos após a incubação da FAT (10, 30 e 100 µg/mL). Somente uma concentração da FAT foi testada por preparação. Os resultados foram apresentados em porcentagem da contração máxima obtida nas curvas controles e relacionados aos logaritmos negativos das concentrações molares dos agonistas. Em seguida, foram calculadas a CE_{50} (concentração efetiva 50%) e o valor do efeito máximo (E_{max}) produzido pelos agonistas na presença da FAT.

5.2.9 Atividade da FAT de *G. argenteum* no influxo e concentração de cálcio citosólico em cardiomiócitos e útero de rata mantidos em cultura

5.2.9.1 Cultura de cardiomiócito de rato

Ratos com um dia de vida, machos ou fêmeas foram mortos por inalação de gás carbônico; a cavidade torácica foi aberta e o coração retirado. Após dissecção em solução de HBSS, o músculo cardíaco ventricular foi picado com tesoura fina durante 20 minutos e incubado por uma hora em solução com colagenase, $CaCl_2$ e albumina bovina a 37 °C e 5%

CO₂. Após o período de incubação, as células foram homogeneizadas com pipeta Pasteur de ponta fina, centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos, 23 °C) e o sobrenadante desprezado. A colagenase foi lavada das células por ressuspensão e centrifugação sucessivas em HBSS, nas mesmas condições anteriores. Foram adicionados às células 10 mL de meio de cultivo D-MEM, acrescido de 10% de soro de cavalo, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de 10 µM. As células do filtrado foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 0,4 x 10⁶ células em placas de 35 mm cobertas com colágeno. No terceiro dia pós-plaqueamento, o meio de cultivo foi trocado para D-MEM acrescido de 10% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados até a confluência das células (quinto dia de cultura) e utilizadas após 6 a 7 dias de cultivo.

5.2.9.2 Cultura de útero de rata

Ratas adultas foram superficialmente anestesiadas com éter e exsanguinadas por incisão da carótida; a cavidade abdominal foi aberta, o útero retirado e transferido para placa contendo HBSS para dissecação fina. Os órgãos foram cortados em pedaços menores, o tecido adiposo foi desprezado e as camadas serosa e circular foram descamadas com bisturi. Os úteros foram lavados com HBSS (4x) e adicionada tripsina (15 minutos, 37 °C, com agitação a cada 5 minutos). Após novas lavagens com HBSS (4x), os órgãos foram delicadamente picados durante 30 minutos, foi adicionada colagenase seguida por incubação a 37 °C por 1,5 h com agitação a cada 5 minutos. O homogenato foi centrifugado (2500 rpm, 10 minutos), o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de D-MEM; o processo de lavagem foi repetido por 4 vezes. O pellet obtido foi suspenso em D-MEM acrescido de 10%

de soro fetal de cavalo e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Após contagem em placa de Neubauer, as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 a 10^6 células/placa. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados e utilizadas após 15 dias de cultivo.

5.2.9.3 Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria em células de útero e cardiomiócitos de rato mantidos em cultura

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

5.3 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como médias \pm erros/desvios padrão das médias, com exceção dos valores de IC₅₀ que foram expressos como médias geométricas e limites de confiança (LC) superior e inferior.

Nos testes para comparação dos efeitos dos compostos isolados foi utilizada a análise de variância ANOVA (uma via) seguido do pós teste de Dunnett, Bonferroni, Newman-Kells ou teste *t* de Student. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ utilizando-se o Programa GraphPad Prism® versão 5.0.

6.1 Extração, padronização e purificação do material vegetal

O extrato hidroalcoólico EHA em Soxhlet foi utilizado para a obtenção da fração clorofórmica $FCHCl_3$, que teve rendimento de 0,32%.

As partições sucessivas do extrato hidroalcoólico, com clorofórmio em meio ácido (pH 3,0) e em meio alcalino (pH 10,0), deram origem à fração alcaloides totais (FAT), de coloração amarela e rendimento de 0,05%. A cromatografia da FAT em camada delgada em sílica gel, eluída com BAW e revelada com reagente de Dragendorff mostrou sete manchas bem definidas.

A $FCHCl_3$ anterior a FAT teve rendimento 5 vezes maior e em cromatografia de coluna de sílica gel separou 13 frações. O perfil cromatográfico das frações analisadas por CCD teve semelhança com a FAT: delimitou uma mancha para a F_{33-39} (Rf 0,59), duas manchas para a F_{67-79} (Rf 0,54 e 0,59), três manchas para a $F_{105-111}$ (Rf 0,49; 0,54 e 0,59) e uma mancha para a $F_{153-159}$ (Rf 0,49) (figura 5).

O perfil cromatográfico da FAT liofilizada foi determinado por CLAE pela Dra. Mirtes Midori Tanae e por CCD em sílica gel. As análises revelaram, respectivamente, um total de sete manchas com fatores de retenção (Rfs) de 0,34; 0,37; 0,41; 0,45; 0,50; 0,55 e 0,60 (figura 5) e no cromatograma da CLAE nove picos principais com tempos de retenção (min) / área total (%) de: 3,5 min / 4,3%; 8,9 min / 2,3%; 12,2 min / 3,9%; 12,8 min / 8,4%; 15,3 min / 4,2%; 15,8 min / 8,4%; 19,2 min / 6,4%; 20,3 min / 4,3 % e 23,5 min / 1,8% (figura 6).



Figura 5- Análise cromatográfica (CCD) da *G. argenteum* Woodson. Cromatofolhas com sílica gel eluídas com BAW 4:2:1 e reveladas por reagente de Dragendorff. As machas correspondem ao perfil cromatográfico da FAT e frações purificadas

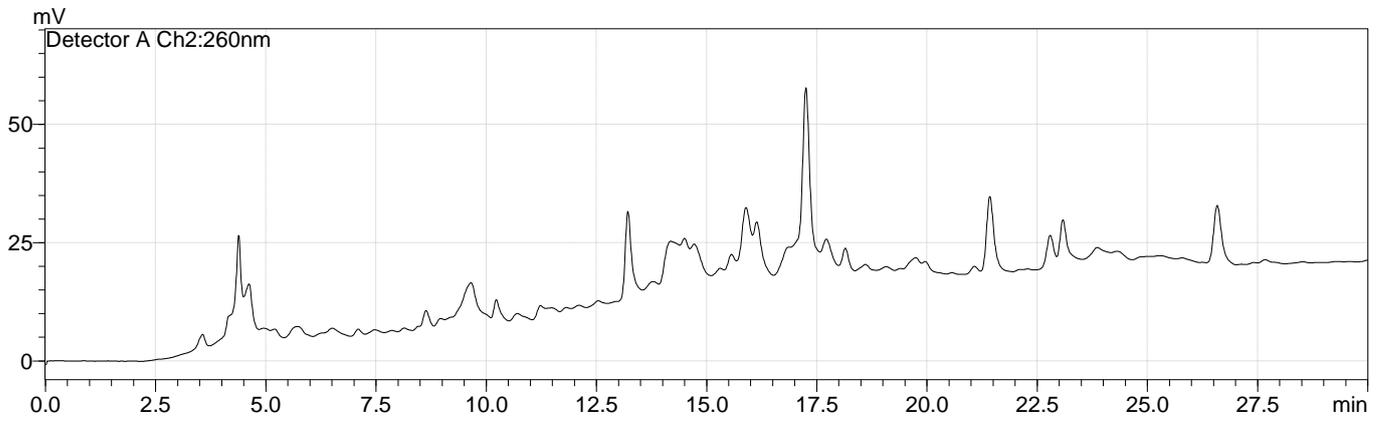


Figura 6 - Cromatograma da CLAE com os principais picos da FAT de *G. argenteum*. A figura descreve o perfil cromatográfico da amostra com os respectivos tempos de retenção dos picos detectados em λ 260 nm durante 30 min de eluição com água/acetonitrila (10 a 60%).

6.2 Avaliação dos efeitos gerais da FAT de *G. argenteum* em camundongos

Após administração oral única de 10, 30 ou 100 mg/kg da FAT de *G. argenteum*, camundongos (n=3) foram observados aos 30 min, 1, 2, 3 e 24 horas quanto a mudanças no padrão normal de comportamento e outros sinais.

Comportamentos de levantar as patas dianteiras (“rearing”) e de corrida ao elevar as patas posteriores, estiveram presentes em alguns animais tratados em todas as doses e tempos descritos, assim como no grupo controle.

Alguns animais tratados com 10 e 30 mg/kg, apresentaram comportamentos de subida nas paredes da caixa de observação, e apenas em animais tratados com 30 mg/kg foi observado algum nível de hiperatividade.

Após administração de 10 mg/kg por via intraperitoneal, os animais apresentaram dificuldade de locomoção, diminuição da motricidade, ptose e cianose, ocorrendo morte nos 30 minutos iniciais.

Para avaliar os efeitos observados na triagem farmacológica, foram realizados testes específicos no SNC. Em todos os testes, a FAT de *G. argenteum* foi administrada por via oral nas mesmas doses determinadas no teste hipocrático e os animais (n=6) foram avaliados uma hora após os tratamentos. Os grupos controle receberam somente o veículo água (5 mL/kg, v.o.). Em todos os testes, os aparelhos foram limpos com etanol a 10% e secos antes de cada avaliação.

Os animais foram submetidos à avaliação da atividade exploratória e do desempenho motor, onde foram utilizados os testes do campo aberto (“Open-Field”) e do “Rota-Rod”, respectivamente. A atividade hipno-sedativa foi observada no teste do sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), a atividade tipo antidepressiva com o teste da suspensão pela cauda (“Tail Suspension Test”), a atividade tipo ansiolítica no labirinto em cruz elevado

(“Elevated Plus-Maze”, LCE) e, por último, foi aferida a temperatura corporal dos camundongos.

A FAT de *Geissospermum argenteum* na maior dose (100 mg/kg, v.o.) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a frequência de entrada nos braços abertos do LCE (%EBA $5,5 \pm 2,5$) e aumentou a frequência de entrada nos braços fechados (%EBF $94,5 \pm 2,5$), quando comparados ao grupo controle (%EBA $23,8 \pm 4,6$ e %EBF $76,2 \pm 4,6$), sem alterar significativamente ($p > 0,05$) o tempo de permanência em ambos os braços (%TBA $1,4 \pm 0,9$ e %TBF $98,7 \pm 0,9$), em comparação ao grupo controle (%TBA $10,4 \pm 2,7$ e %TBF $89,6 \pm 2,7$). A mesma dose também produziu aumento significativo ($p < 0,01$) na postura de estiramento ($43,3 \pm 3,0$; controle - $29,2 \pm 1,3$) (Tabela 1).

No teste do sono induzido por barbitúrico, a latência para o sono diminuiu na dose de 10 mg/kg ($211,0 \pm 11,8$), porém sem significância estatística ($p > 0,05$) ao ser comparado ao grupo controle ($246,7 \pm 18,5$). Nas doses de 30 e 100 mg/kg, houve redução significativa da latência, $p < 0,05$ ($189,8 \pm 8,3$ e $190,7 \pm 13,2$, respectivamente). Não foram observadas diferenças estatísticas significantes nas doses estudadas, sobre o tempo de duração do efeito hipnosedativo induzido pelo barbitúrico (Tabela 1).

Nos outros testes e na temperatura retal dos animais, todos os efeitos observados não parecem estar relacionados ao tratamento, não atingiram significância estatística ($p > 0,05$) ao serem comparados ao grupo controle e, portanto, não apresentaram relevância farmacológica (dados não mostrados).

Testes experimentais (parâmetros analisados)		Controle	FAT 10 mg/kg	FAT 30 mg/kg	FAT 100 mg/kg
Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	Freq. entrada braços aberto (%)	23,8 ± 4,6	17,6 ± 5,2	8,3 ± 5,7	5,5 ± 2,5*
	Tempo braços aberto (%)	10,4 ± 2,7	11,5 ± 4,4	7,5 ± 5,3	1,4 ± 0,9
	Freq. entrada braços fechados (%)	76,2 ± 4,6	82,4 ± 5,2	91,7 ± 5,7	94,5 ± 2,5*
	Tempo braços fechados (%)	89,6 ± 2,7	88,5 ± 4,4	92,5 ± 5,3	98,7 ± 0,9
	Nº de estiramentos (%)	29,2 ± 1,3	36,5 ± 2,9	42,5 ± 2,6**	43,3 ± 3,0**
Sono Induzido por pentobarbital	Latência (s)	246,7 ± 18,5	211,0 ± 11,8	189,8 ± 8,3*	190,7 ± 13,2*
	Duração (min)	105,8 ± 25,1	67,0 ± 6,5	96,5 ± 19,7	115,5 ± 16,3

Tabela 1 – Testes do labirinto em cruz elevado e do sono induzido por pentobarbital. Os valores descrevem os efeitos da FAT de *G. argenteum* (10 a 100 mg/kg) em camundongos após 60 min do tratamento (n=6). Os resultados são mostrados como a média ± erro padrão e analisados por ANOVA, seguida do teste Dunnett. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

6.3 Avaliação dos efeitos neuromusculares esquelético da FAT de *G. argenteum* em diafragma de rato

Em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de rato a FAT produziu respostas proporcionais à concentração durante o período de incubação (30 min). Quando estimuladas indiretamente (nervo), as contrações foram inibidas em $13,4 \pm 1,7\%$, $94,5 \pm 1,8\%$ e 100% , respectivamente as concentrações individuais de 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (figura 7A). O efeito máximo produzido pela maior concentração da FAT foi alcançado nos 10 primeiros minutos após a incubação. Em outra preparação, a neostigmina foi incubada na vigência do bloqueio neuromuscular produzido pela FAT (20 $\mu\text{g/mL}$). Na concentração de 10^{-5} M, o anticolinesterásico não reverteu o efeito da FAT, ao contrário, potencializou o bloqueio (figura 8B). Em condições controle, a inibição (50%) produzida pela d-Tubocurarina (10^{-6} M) foi parcialmente revertida pela adição da neostigmina na mesma concentração (figura 8A).

Em preparações comprovadamente sem influência do nervo frênico, as mesmas concentrações da FAT potencializaram as contrações induzidas por estimulação elétrica direta das fibras musculares esqueléticas. Quando comparado às amplitudes de contração obtidas antes da incubação, o efeito máximo produzido por cada concentração foi de $3,0 \pm 0,6\%$, $12,5 \pm 2,0\%$ e $23,2 \pm 1,2\%$ (figura 7B). Os efeitos descritos em ambas as preparações foram reversíveis após a lavagem.

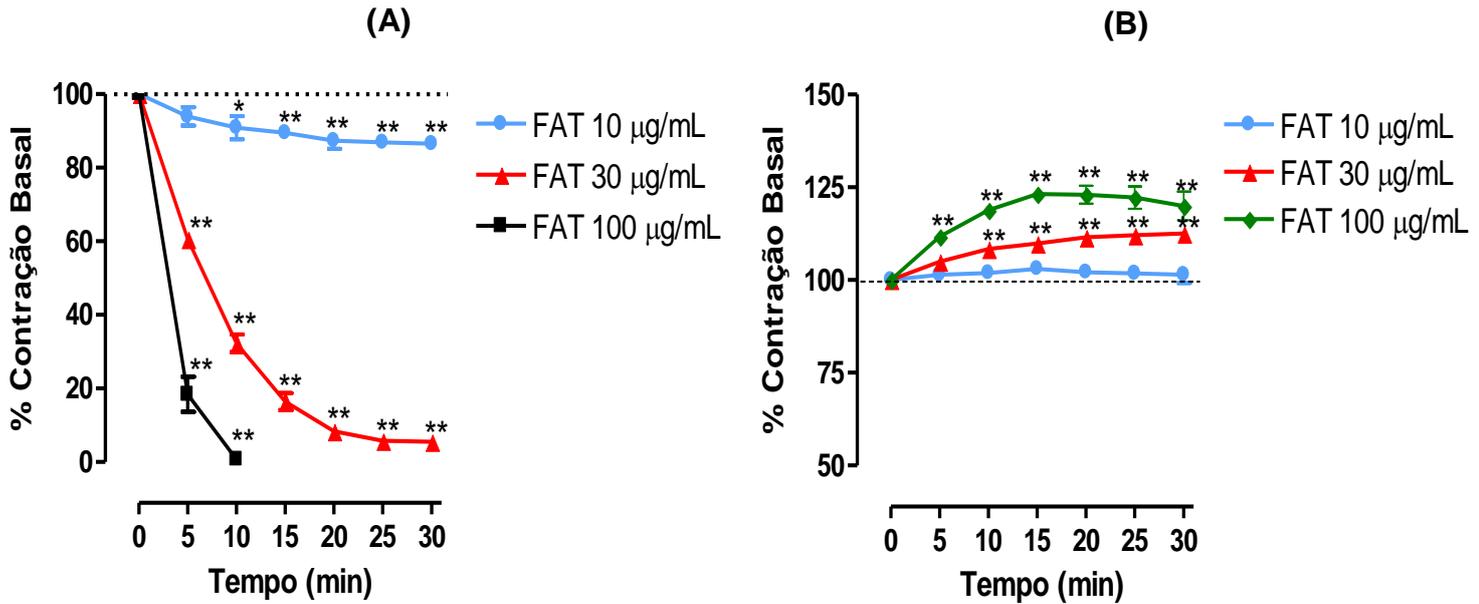


Figura 7 – Efeitos da FAT de *G. argenteum* em preparações de nervo frênico-músculo diafragma de rato. (A) Contrações obtidas por estímulo elétrico indireto das fibras nervosas (0,5 ms; 0,2 Hz e voltagem supramáxima). (B) Contrações induzidas por estimulação elétrica direta das fibras contráteis. Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão (n=4) e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

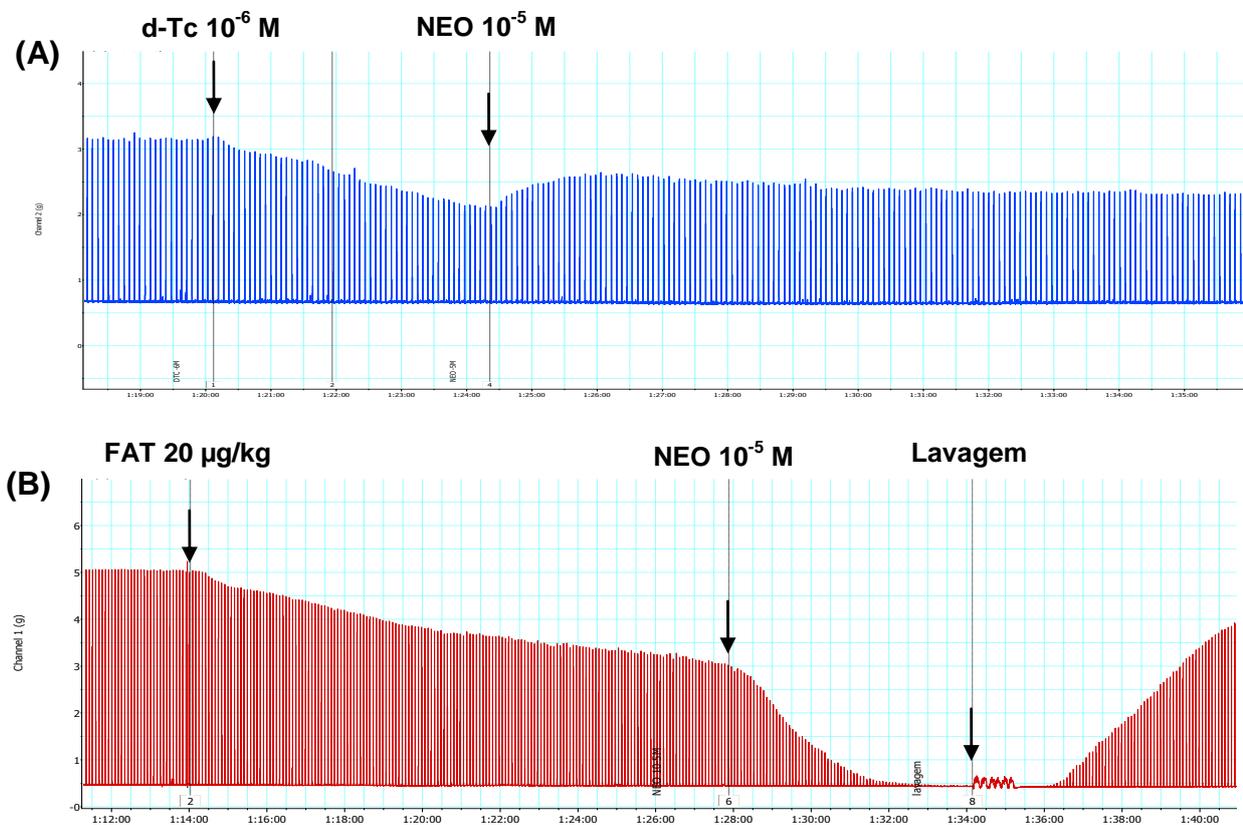


Figura 8 - Registro das contrações obtidas por estímulo elétrico indireto das fibras nervosas do diafragma de rato (0,5 ms; 0,2 Hz e voltagem supramáxima). (A) Bloqueio das contrações produzido pela d-Tubocurarina (d-TC 10^{-6} M) revertido após a incubação da neostigmina (NEO 10^{-5} M) (controle). (B) Efeito do anticolinesterásico incubado na vigência do bloqueio da FAT de *G. argenteum*

6.4 Avaliação da atividade da FAT de *G. argenteum* na atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético

Os ensaios realizados na presença de diferentes concentrações de enzima, de substrato e tempos de reação, mostraram que a atividade ótima da enzima foi obtida com 0,581 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína, 3 mM de ATP e 10 minutos de reação à 37 °C.

A atividade da Ca^{2+} -ATPase isolada de coxa de coelhos foi determinada incubando-se a FAT (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 10 minutos à 37 °C e medindo-se o Pi liberado em espectrofotômetro a 820 nm. A fração alcaloides totais de *G. argenteum* nas concentrações utilizadas não alterou a atividade da enzima (figura 9A). A tapsigargina (controle positivo) inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase com $\text{IC}_{50} = 0,18 \mu\text{M}$ (figura 9B).

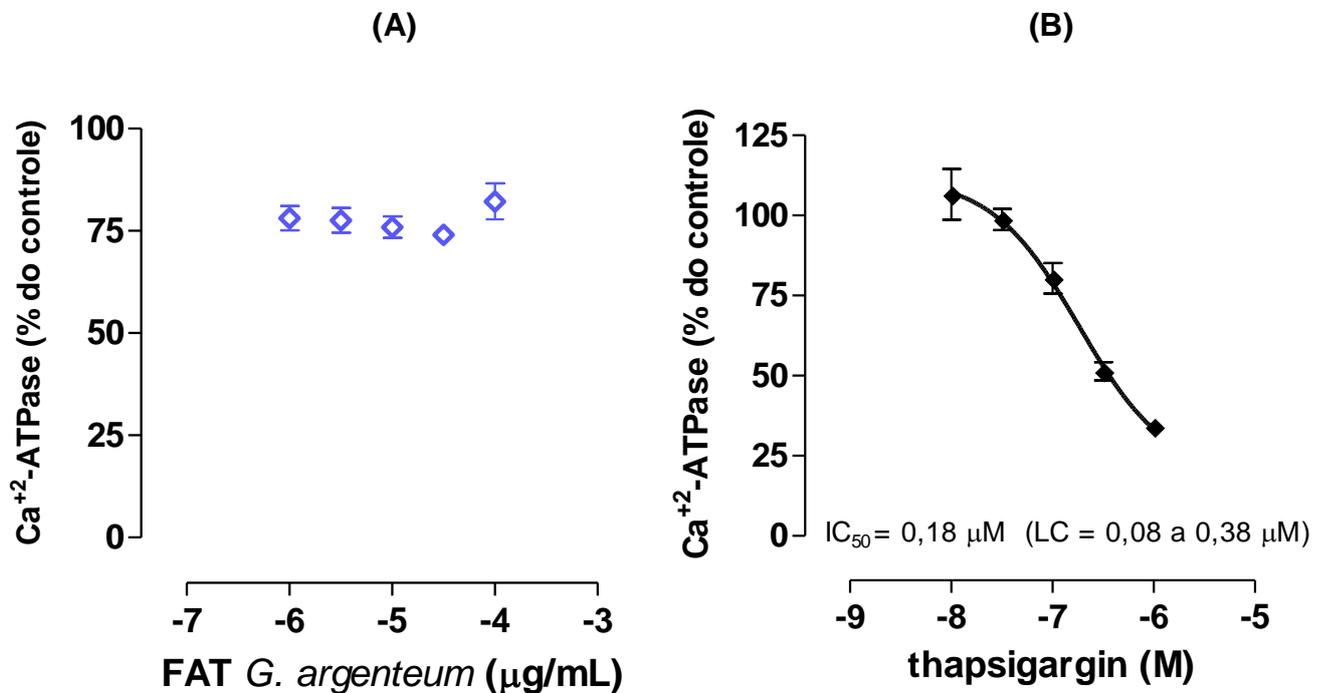


Figura 9 – Efeitos da FAT de *G. argenteum* sobre a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético. (A) Atividade enzimática da SERCA I na presença da FAT (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Efeito do inibidor enzimático específico Tapsigargina (controle). Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão dos ensaios em triplicata

6.5 Avaliação dos efeitos da FAT de *G. argenteum* na pressão arterial de ratos anestesiados

A pressão arterial média inicial dos ratos anestesiados com pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) foi de $126 \pm 1,8$ mmHg. Na ausência da respiração artificial, a dose de 3,0 mg/kg produziu queda acentuada e prolongada da pressão arterial, que levou os animais a morte (figura 10). Portanto, durante o experimento a ventilação artificial para roedores foi utilizada (figura 12).

A injeção endovenosa da FAT de *G. argenteum* nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, produziu hipotensão máxima de $15,6 \pm 3,1$ mmHg, $25,2 \pm 3,3$ mmHg e $28,4 \pm 6,3$ mmHg, respectivamente, em relação a pressão basal, com pico em 15 segundos, seguida de reversão à pressão basal em 6 minutos à maior dose (figura 11). Doses maiores foram letais mesmo na presença da ventilação artificial.

A injeção de acetilcolina 0,1; 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v. produziu hipotensão de $10,0 \pm 4,6$ mmHg, $21,0 \pm 7,1$ mmHg e $38,3 \pm 7,8$ mmHg, respectivamente. As mesmas doses dez minutos após a injeção da FAT 1,0 mg/kg produziram hipotensão de $12,7 \pm 5,8$ mmHg, $22,0 \pm 7,0$ mmHg e $39,0 \pm 6,8$ mmHg (figura 14B). A hipotensão produzida pela menor dose da fração não foi bloqueada pela injeção prévia de atropina (1,0 mg/kg) (figura 13).

A injeção de noradrenalina 0,1; 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v. produziu hipertensão de $11,0 \pm 0,6$ mmHg, $17,5 \pm 1,7$ mmHg e $21,3 \pm 3,5$ mmHg, proporcional à dose, respectivamente. As mesmas doses dez minutos após a injeção da FAT 1,0 mg/kg produziram hipertensão de $8,0 \pm 0,6$ mmHg, $16,2 \pm 0,4$ mmHg e $26,0 \pm 2,5$ mmHg (figura 14A).

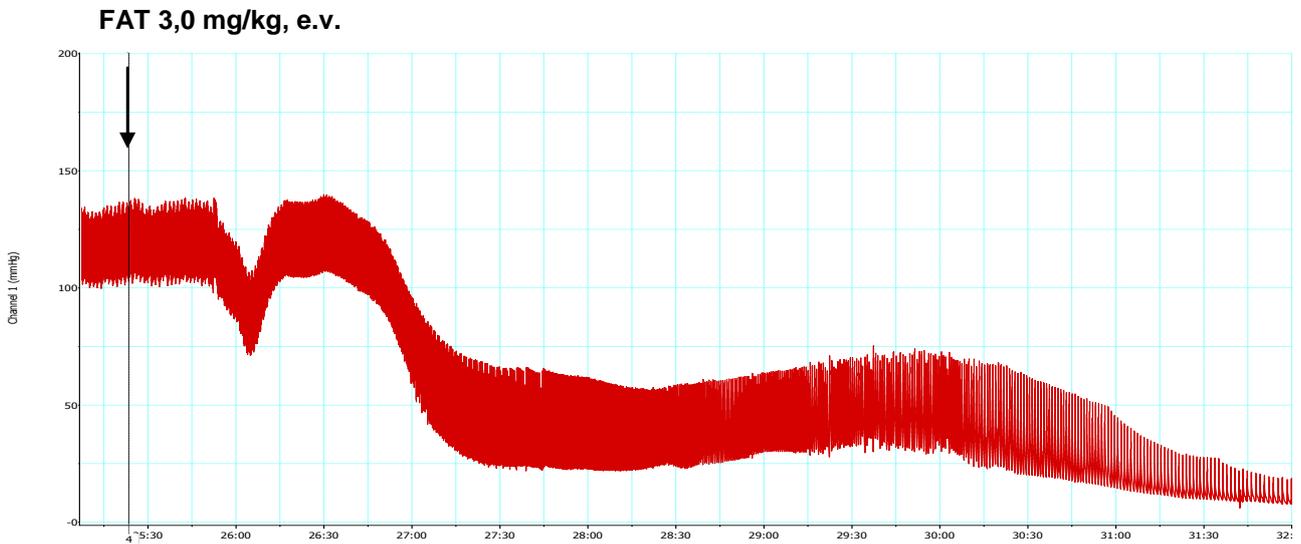


Figura 10 – Registro da pressão arterial de ratos anestesiados. Hipotensão acentuada e irreversível produzida pela injeção da FAT (3,0 mg/kg, e.v.) na ausência de respiração artificial. O efeito foi revertido com o uso do respirador

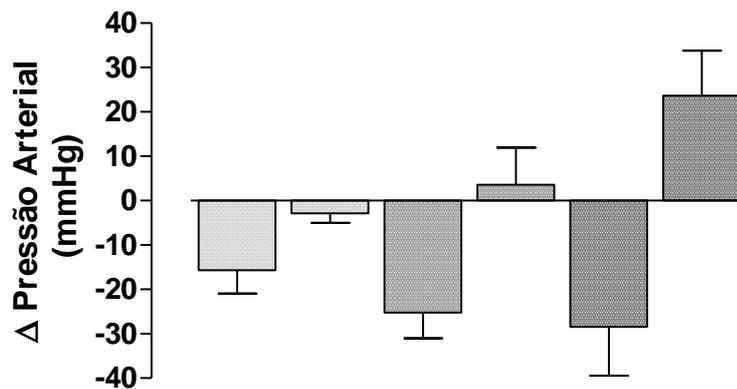


Figura 11 – Efeitos pressóricos da FAT de *G. argenteum* em ratos anestesiados com pentobarbital (65 mg/kg, i.p.). Hipotensão proporcional à dose com acentuada reversão na maior dose. As colunas e as barras representam as médias \pm desvios padrão (n=3)

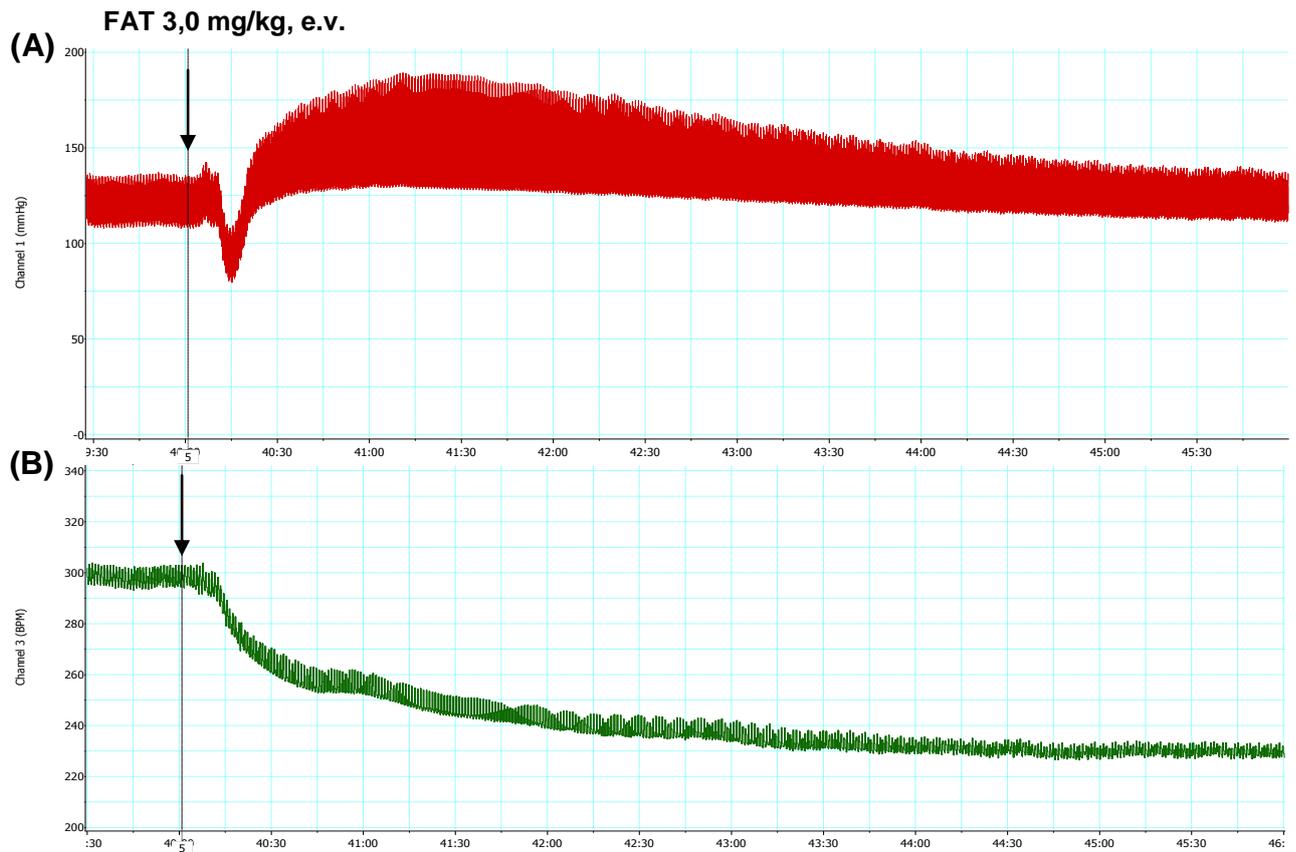


Figura 12 – Registros da pressão arterial (A) e da frequência cardíaca (B) de ratos anestesiados. (A) Hipotensão rápida e com acentuada reversão produzida pela injeção da FAT (3,0 mg/kg, e.v.) com respiração artificial. (B) Efeito bradicardizante registrado simultaneamente ao registro da PA

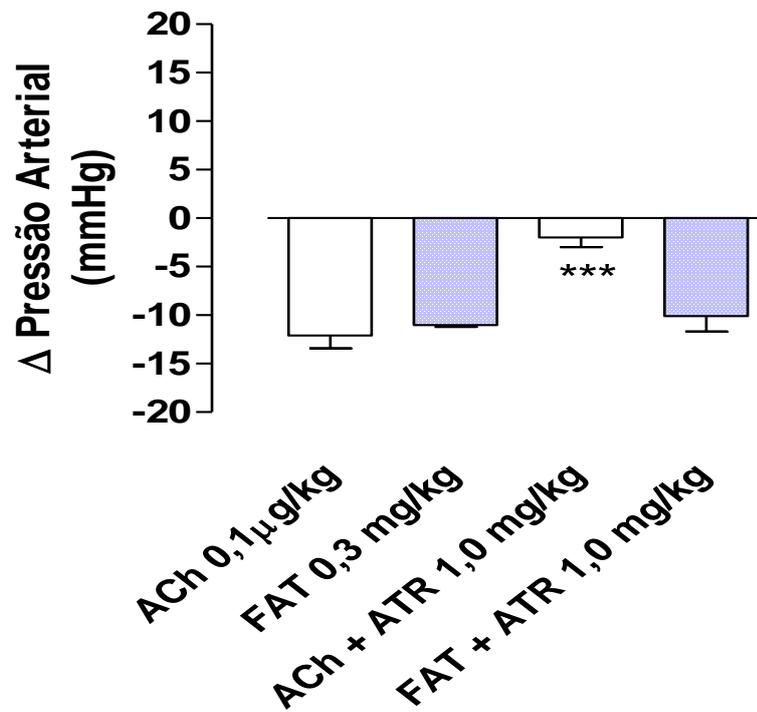


Figura 13 – Efeitos pressóricos da FAT de *G. argenteum* e acetilcolina (ACh 0,1 μ g/mL, e.v.) na presença de atropina (ATR 1,0 mg/kg, e.v.). As colunas e as barras representam as médias \pm desvios padrão (n=3) e os resultados analisados por ANOVA, seguida do teste Bonferroni. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como ***p<0,001

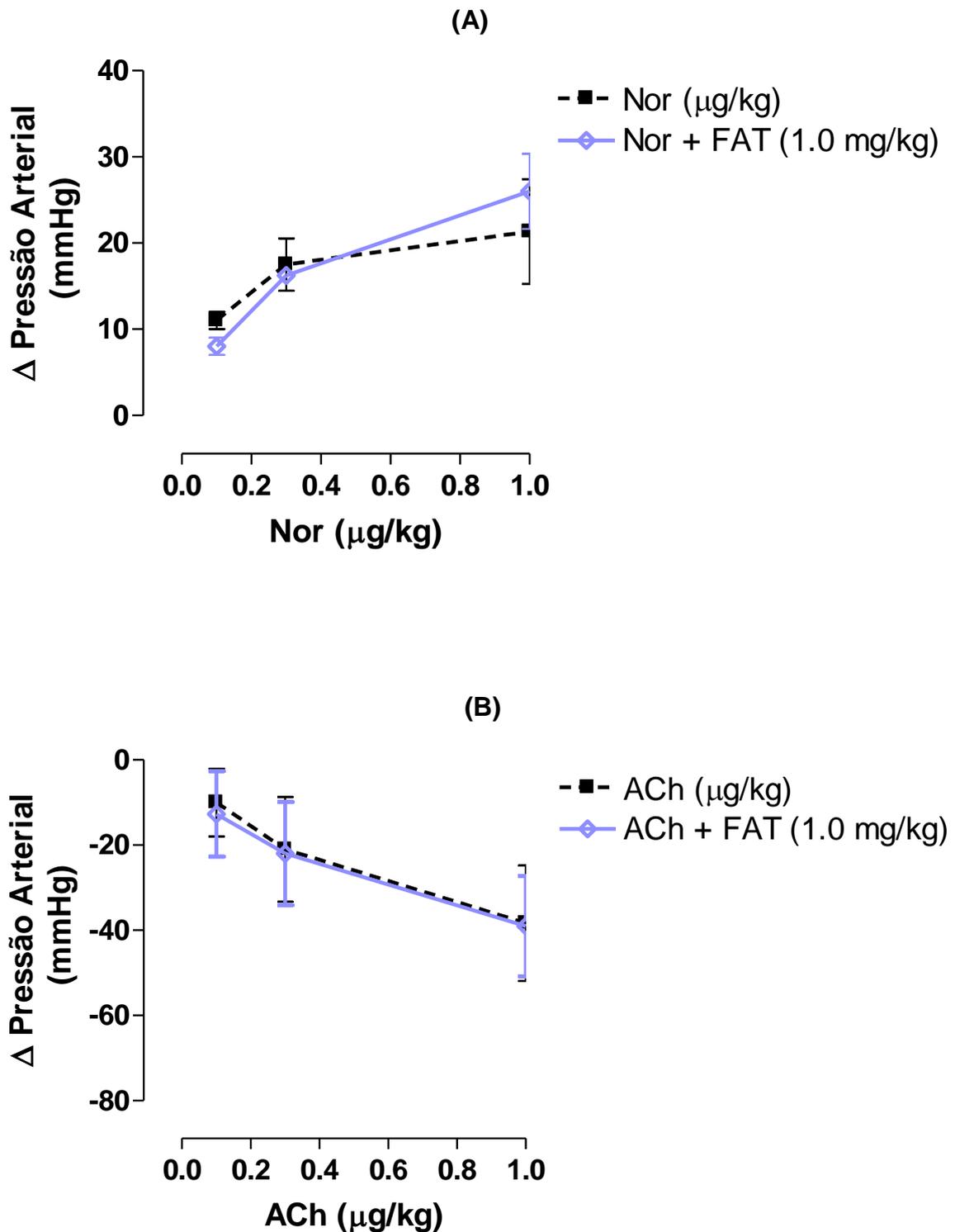


Figura 14 – Efeitos pressóricos dos agonistas adrenérgico noradrenalina (A, Nor, 0,1 a 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) e muscarínico acetilcolina (B, ACh, 0,1 a 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) antes e após a injeção da FAT de *G. argenteum* (1,0 mg/kg, e.v.). As colunas e as barras representam as médias \pm desvios padrão ($n=3$) e os resultados analisados por ANOVA de 2 vias seguida pelo teste Bonferroni.

Em animais anestesiados e sob respiração artificial, a injeção de hexametônio (30 mg/kg, e.v.) reduziu a PA em $35,7 \pm 13,7$ mmHg após 15 minutos. A injeção da FAT (2,0 mg/kg e.v.) produziu hipertensão de $31,2 \pm 6,9$ mmHg não diferente do efeito controle antes do hexametônio. A injeção de prazosin (1,0 mg/kg) inibiu a hipertensão produzida pela injeção de Nor $0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ de $30,0 \pm 1,8$ mmHg para $15,1 \pm 1,7$ mmHg (n=3). A FAT (2,0 mg/kg e.v.) depois do prazosin produziu hipertensão de $27,8 \pm 6,9$ mmHg, não diferente do efeito controle obtido antes do antagonista adrenérgico (figura 15).

Os efeitos pressóricos produzidos pela injeção de dimetilfenilpiperazino (DMPP 100, 150 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e.v.) foram comparados antes e 10 minutos após a injeção da FAT (3,0 mg/kg, e.v.). O DMPP produziu hipotensão de $8,1 \pm 1,3$ mmHg, $17,9 \pm 1,9$ mmHg e hipertensão de $44,7 \pm 4,4$ mmHg, respectivamente. O efeito hipotensor das menores doses não foi alterado, ($9,7 \pm 1,9$, $15,6 \pm 1,7$ mmHg), mas a hipertensão produzida pelo DMPP (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foi reduzida para $27,5 \pm 3,7$ mmHg. (figura 16).

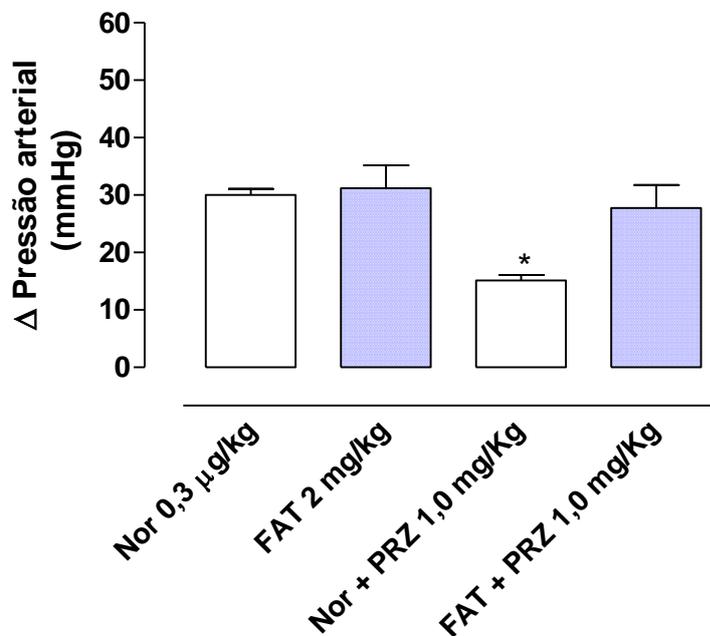


Figura 15 – Efeitos pressóricos da FAT de *G. argenteum* e noradrenalina (Nor $0,3 \mu\text{g}/\text{mL}$, e.v.) na presença de prazosin (PRZ $1,0 \text{ mg}/\text{kg}$, e.v.) em animais anestesiados que receberam hexametônio (30 mg/kg, e.v.). As colunas e as barras representam as médias \pm desvios padrão (n=3) e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como $*p < 0,05$

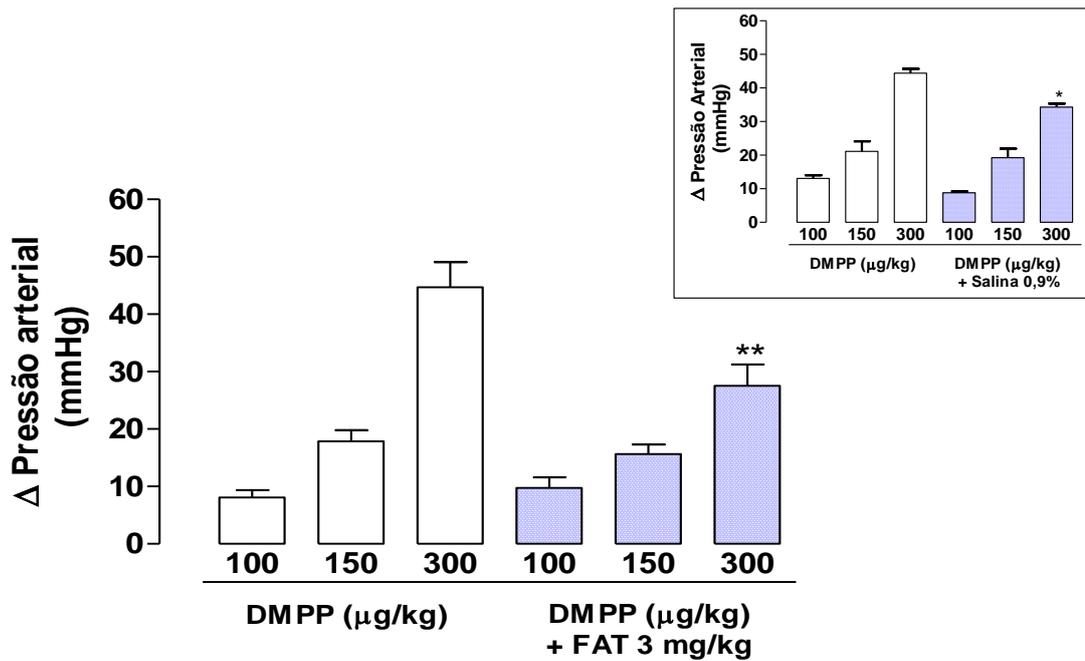


Figura 16 – Efeitos pressóricos do dimetilpiperazino (DMPP, 100 a 300 µg/kg, e.v.) antes e após a injeção da FAT de *G. argenteum* (3,0 mg/kg, e.v.). As colunas e as barras representam as médias ± erros padrão (n=5) e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

6.6 Avaliação dos efeitos cardíacos da FAT de *G. argenteum* em átrios esquerdo e direito de rato

A incubação da FAT 10, 30 e 100 µg/mL, durante 30 minutos, reduziu a frequência da atividade espontânea do átrio direito em $24,8 \pm 8,3\%$, $22,2 \pm 18,0\%$ e $29,0 \pm 12,6\%$, respectivamente, quando comparados ao controle (214 a 245 bpm) antes da incubação (figura 17A). Na ausência da FAT, a frequência teve redução de $2,1 \pm 6,4\%$ após 30 minutos. Nas mesmas concentrações, a FAT produziu aumento da amplitude de contração basal do átrio esquerdo estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima) de $10,2 \pm 3,5\%$, $16,8 \pm 6,4\%$ e $32,3 \pm 4,1\%$, respectivamente, nos cinco minutos iniciais, retornando aos valores basais ao final de 30 minutos (figura 17B).

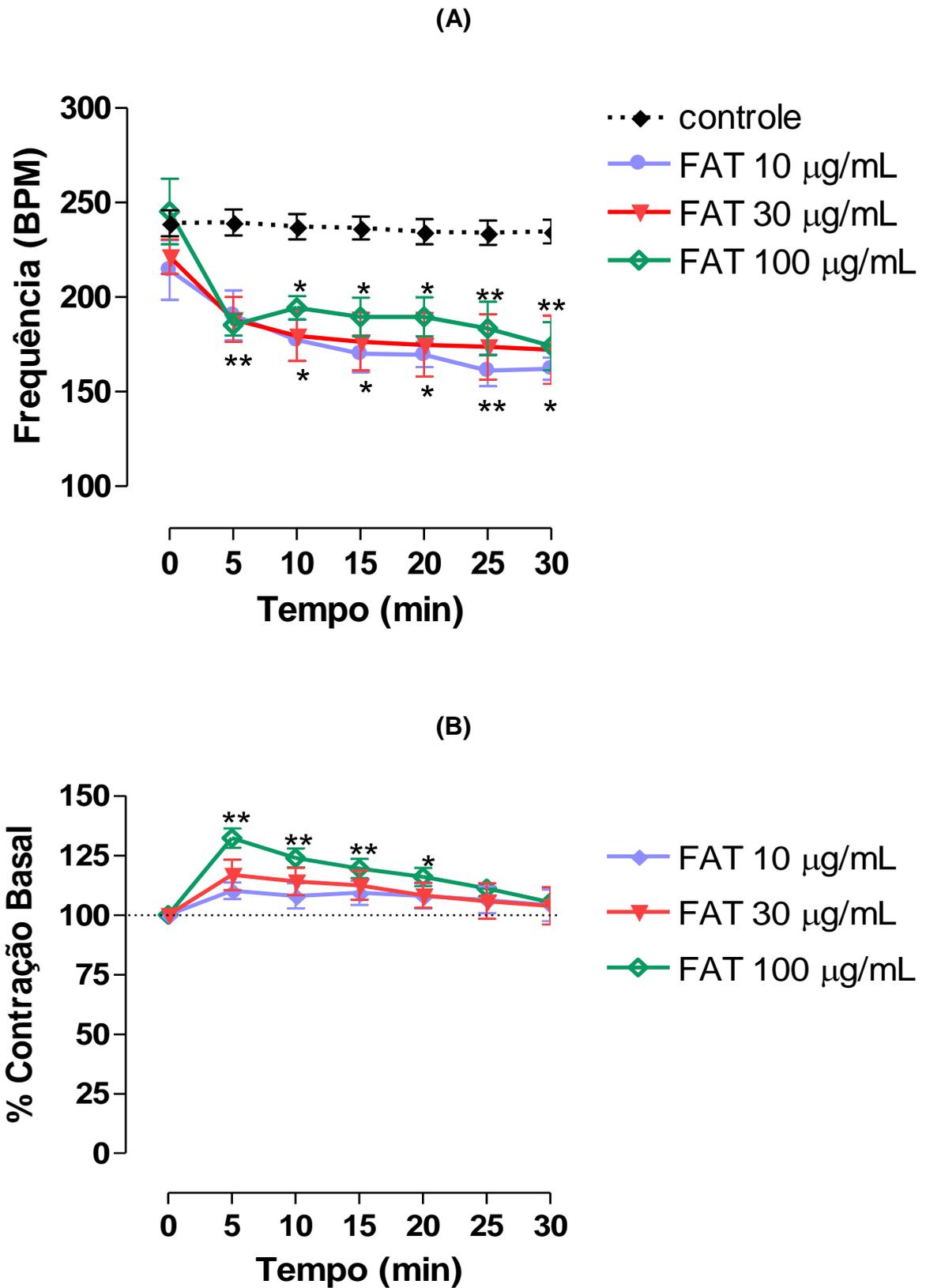


Figura 17 – Efeitos cardíacos da FAT de *G. argenteum* em preparações de átrio isolado de rato. (A) Frequência dos batimentos espontâneos das fibras do marcapasso. (B) Contrações induzidas por estimulação elétrica das fibras musculares de átrio esquerdo (2 ms; 1,0 Hz e voltagem supramáxima). Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão ($n=4$) e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como $*p<0,05$ e $**p<0,01$. BPM = batimentos por minuto

6.7 Avaliação dos efeitos da FAT de *G. argenteum* no período refratário em músculo papilar de rato

O PRE50% antes da incubação do extrato em condição controle (100%) foi 192,8 ms. Na presença da FAT 3,0 e 30 $\mu\text{g/mL}$, o PRE50% aumentou em 3,5 e 17%, respectivamente. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ o PRE50% foi 7% menor que o controle (figura 18).

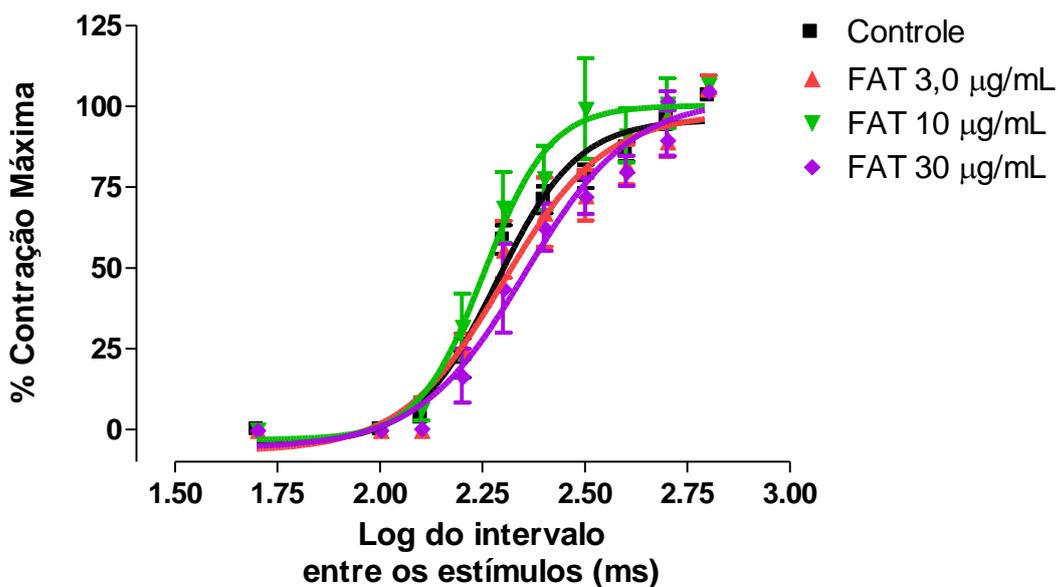


Figura 18 – Efeitos da FAT de *G. argenteum* sobre o período refratário em preparações de músculo papilar de rato. Os símbolos e as barras representam as médias \pm desvios padrão ($n=3$) e os resultados analisados por ANOVA de 2 vias seguida pelo teste de Bonferroni.

6.8 Avaliação dos efeitos vasculares da FAT de *G. argenteum* em anéis de aorta torácica de rato

Sem adição de vasodilatadores o tônus induzido pela noradrenalina relaxou espontaneamente $1,1 \pm 7,9\%$ e $11,8 \pm 6,1\%$, da contração máxima induzida pela noradrenalina nas preparações com e sem endotélio, respectivamente, após 30 minutos.

Em preparações de anéis de aorta torácica de rato com e sem endotélio íntegro a FAT produziu respostas proporcionais à concentração durante o período de incubação (30 min). Nos vasos isolados com endotélio a FAT 1,0; 3,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ relaxou o tônus induzido pela Nor (10^{-7} M) em $28,4 \pm 3,6\%$, $63,1 \pm 5,6\%$ e $96,3 \pm 1,7$, respectivamente (figura 19A). Nas artérias desprovidas de endotélio a FAT relaxou o tônus em $30,2 \pm 8,0\%$, $35,0 \pm 7,1\%$ e $85,5 \pm 9,9\%$ (figura 19B). Os relaxamentos máximos depois de 30 min não foram diferentes nos vasos com ou sem endotélio.

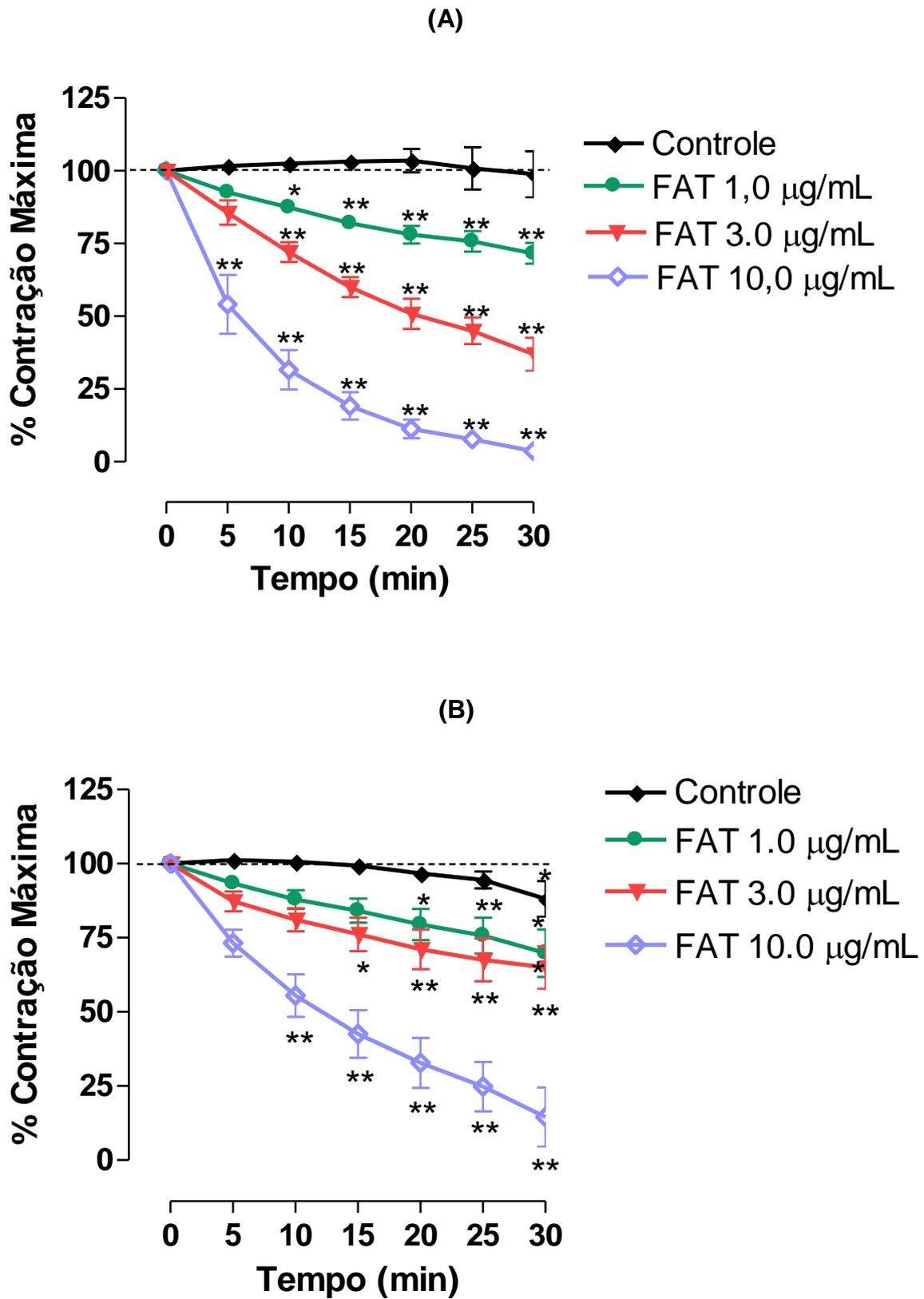


Figura 19 – Efeitos da FAT de *G. argenteum* em preparações de músculo liso vascular isolado de rato. (A) Anéis de aorta torácica com endotélio e (B) sem endotélio íntegro. Preparações com tônus induzido pela noradrenalina (10^{-7} M). Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão ($n=3-6$) e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p<0,05$ e ** $p<0,01$

6.9 Efeitos da FAT de *G. argenteum* nas curvas cumulativas de noradrenalina em anéis de aorta torácica de rato

As curvas concentração-efeito obtidas por adições cumulativas de noradrenalina em aorta torácica de rato desprovida de endotélio foram deslocadas para a direita na presença da FAT sem alterar os efeitos máximos (E_{max}). As CE_{50} obtidas na presença das concentrações individuais de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (CE_{50} 0,55 μM , LC 0,26 - 1,16 μM) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (CE_{50} 0,63, LC 0,38 - 1,04 μM) aumentaram de 6 a 8 vezes quando comparadas ao controle (CE_{50} 0,08 μM , LC 0,06 a 0,11 μM) (figura 20).

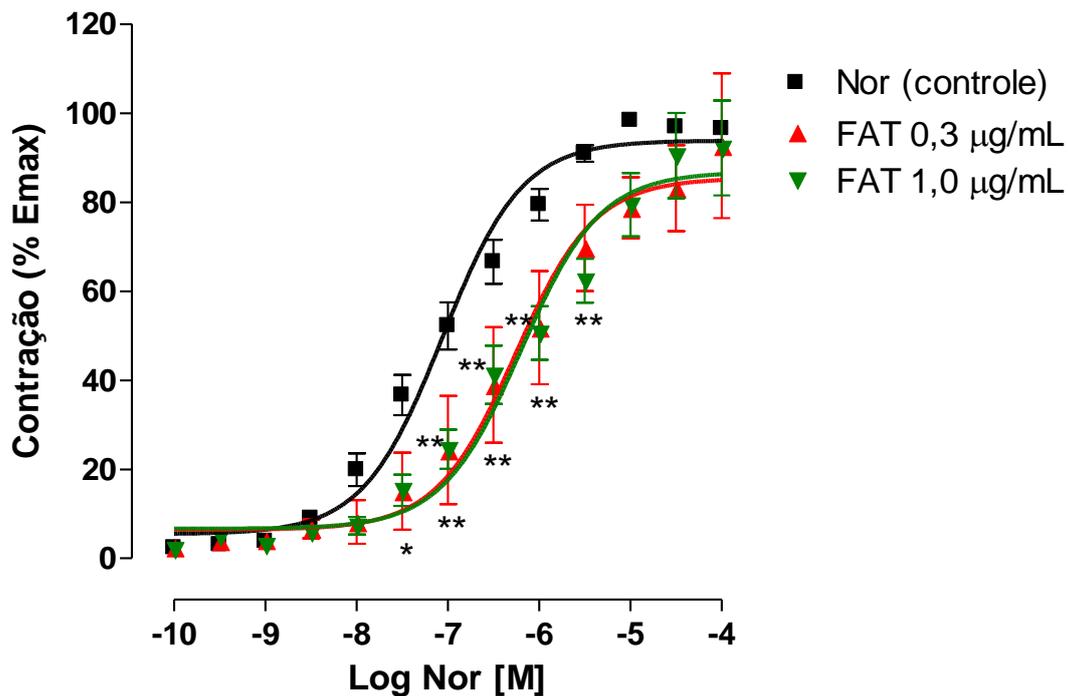


Figura 20 – Curvas cumulativas de Nor (10^{-10} a 10^{-4} M) em anéis de aorta torácica sem endotélio de rato, realizadas antes e após a incubação da FAT de *G. argenteum*. Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão ($n=4$) e os resultados analisados por ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

6.10 Efeitos da FAT de *G. argenteum* nas curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato

As curvas concentração-efeito obtidas por adições cumulativas de noradrenalina em preparações de ducto deferente de rato (DDR) foram deslocadas para a direita e o Emax potenciados na presença da FAT (10 a 100 µg/mL). As CE₅₀ obtidas após a incubação (10 min) das concentrações individuais de 10 µg/mL (CE₅₀ 13,01 µM, LC 9,44 a 17,94 µM), 30 µg/mL (CE₅₀ 17,19 µM, LC 12,28 a 24,07 µM) e 100 µg/mL (CE₅₀ 40,06 µM, LC 30,65 a 52,34 µM) aumentaram de 3 a 10 vezes quando comparadas ao controle (CE₅₀ 3,91 µM, LC 3,32 - 4,61 µM). A contração máxima induzida pela Nor (10^{-3} a 10^{-8} M) foi potenciada em $44,7 \pm 3,5\%$, $34,6 \pm 11,9\%$ e $35,1 \pm 11,6\%$, respectivamente (figura 21A).

A FAT (10 a 100 µg/mL) incubada (10 min) reduziu as CE₅₀ e potenciou o Emax produzido pela adição cumulativa de ACh (10^{-3} a 10^{-8} M). As CE₅₀ obtidas na presença de 10 µg/mL (CE₅₀ 39,74 µM, LC 28,28 a 55,84 µM), 30 µg/mL (CE₅₀ 97,7 µM, LC 73,84 a 127,6 µM) e 100 µg/mL (CE₅₀ 114,4 µM, LC 71,85 a 182,2 µM) tiveram redução de 1 a 2 vezes quando comparadas ao controle (CE₅₀ 105,8 µM, LC 83,92 a 133,4 µM). A contração máxima induzida pela ACh foi potenciada em $40,8 \pm 3,7\%$, $29,2 \pm 9,0\%$ e $34,0 \pm 13,8\%$, respectivamente às mesmas concentrações (figura 21B).

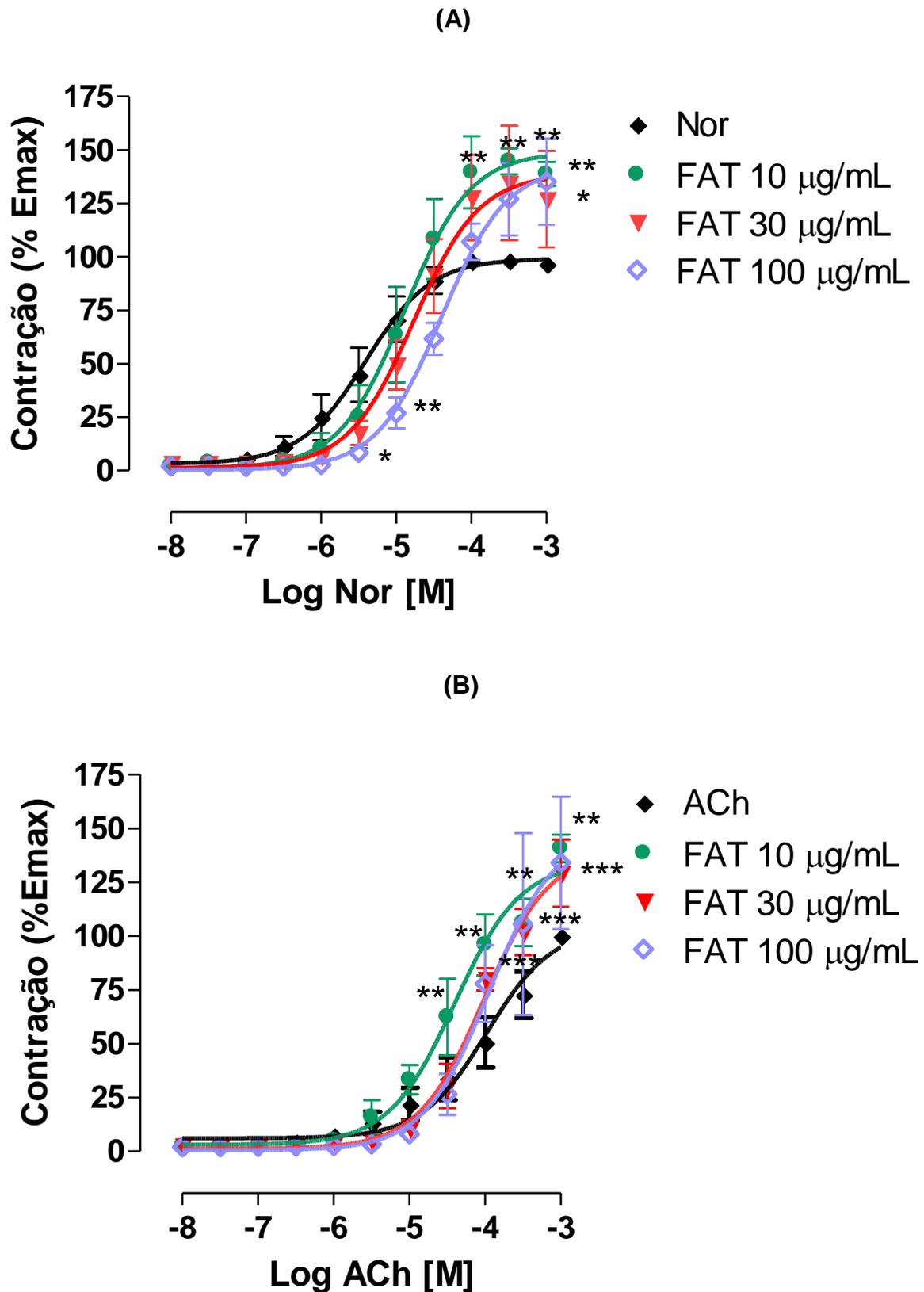


Figura 21 – Curvas cumulativas (10^{-8} a 10^{-3} M) de Nor (A) e ACh (B) em ducto deferente isolado de rato, realizadas antes e após a incubação da FAT de *G. argenteum*. Os símbolos e as barras representam as médias \pm erros padrão (n=3-5) e os resultados analisados por ANOVA de 2 vias, seguida pelo teste de Bonferroni. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

6.11 Efeitos da FAT de *G. argenteum* no influxo de cálcio em células de útero de rata e cardiomiócitos mantidos em cultura primária

Em condições controle, o Verapamil 100 μ M inibiu o influxo e mobilização de íons cálcio estimulados pela adição de KCl 70 mM nos cardiomiócitos e nas células uterinas em cultura, de 50% e 70% respectivamente. Comparativamente, a incubação de FAT (10, 30 e 100 μ g/mL) não alterou a concentração citosólica de cálcio medida após incubação de KCl 70 mM (n=3, em triplicata) (figura 22A e B).

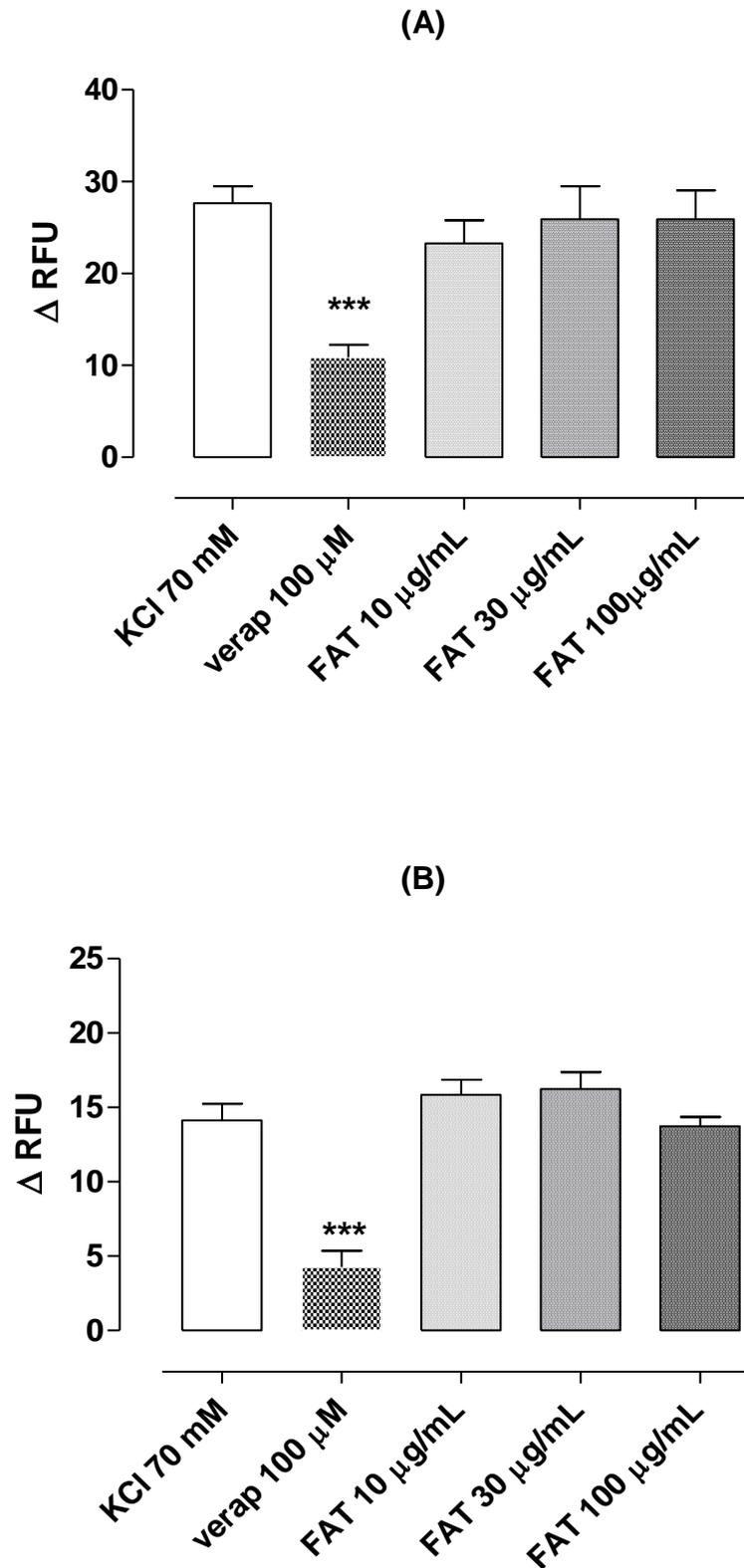


Figura 22 – Efeitos da FAT de *G. argenteum* sobre o influxo de cálcio em células de útero de rata e cardiomiócitos. (A) Quantificação fluorimétrica do cálcio intracelular de (A) cardiomiócitos e (B) células de útero, na presença da FAT (10 a 100 μg/mL) ou verapamil (100 μM). As colunas e as barras representam as médias ± erros padrão e os resultados analisados por ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett. As diferenças estatísticas em relação ao controle são descritas como *** $p < 0,01$

A medicina tradicional confere algumas propriedades terapêuticas às espécies do gênero *Geissospermum* (Apocynaceae), com destaque para o uso da casca no tratamento (BOTSARIS, 2007; MILLIKEN, 1997) e na prevenção (VIGNERON *et al.*, 2005) do paludismo. Especialmente encontrada na Amazônia central e oriental e nas Guianas (RIBEIRO *et al.*, 1999), a decocção e a maceração em água ou álcool da casca de *Geissospermum argenteum* Woodson são utilizadas como antidiabéticas, vermífugas, anti-infecciosas, antifebris, antidiarreicas e como curares (DeFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004; GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987).

Conhecida popularmente como acariquara-branca (RIBEIRO *et al.*, 1999), quinarana da fruta pequena (CORREIA *et al.*, 2008) e maria-congo (DeFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004; GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987), a *G. argenteum* está inserida na família Apocynaceae, conhecida por sua grande importância medicinal e por ser rica em glicosídeos e alcaloides utilizados no preparo de medicamentos (RIBEIRO *et al.*, 1999; SOUZA; LORENZI, 2008).

Os alcaloides flavopereirina (alcaloide β -carbolina), geissospermina e geissosquizolina têm sido descritos como os principais constituintes químicos de algumas espécies do gênero *Geissospermum* (LIMA *et al.*, 2009; STEELE *et al.*, 2002; TANAE, 1999). Em *G. argenteum*, os alcaloides (-) demetoxiaspidospermina, (-) aspidospermina, (+) aspidocarpina e (+) dimetilaspidospermina foram identificados por Paccioni & Husson (1978).

O uso popular do *Geissospermum spp.* no tratamento da malária foi explicado por ação antiparasitária *in vitro* (BERTANI *et al.*, 2005; MARTINS, 2010; MUÑOZ *et al.*, 2000; STEELE *et al.*, 2002). A elevada citotoxicidade do extrato metanólico da *G. argenteum* foi também descrita em *Artemia salina* (QUIGNARD *et al.*, 2003). Além da atividade antimalárica, outras ações farmacológicas também foram descritas para os alcaloides do

gênero, como por exemplo, ação curarizante (RIBEIRO, 1986; TANAE, 1999), inibição da captação de serotonina nos sinaptossomas de hipocampo de rato (LIMA-LANDMAN *et al*, 2006), ação antinociceptiva (WERNER *et al*, 2009), ação anticolinesterásica (TANAE *et al*, 2006; LIMA *et al*, 2009) e atividade hipotensora (MARTINS, 2010).

Os principais alcaloides de *G. argenteum* (PACCIONI; HUSSON, 1978) e as suas atividades no estágio intra-hepático do *Plasmodium* (BERTANI *et al*, 2005) e como antimicrobianos (CORREIA *et al*, 2008) foram previamente descritos. No entanto, a atividade farmacológica dos alcaloides em mamíferos não é conhecida. O presente trabalho propõe estudar o espectro de ação dos alcaloides de *Geissospermum argenteum* Woodson (acariquara-branca) em roedores, com enfoque principal na atividade cardiovascular.

Este trabalho teve como ponto de partida a extração hidroalcoólica da casca pulverizada da *Geissospermum argenteum*, nativa da Amazônia central, como indicado no uso popular. A extração foi realizada em Soxhlet e o extrato resultante passou por sucessivas partições entre água/clorofórmio em diferentes pH para obtenção da fração alcaloídica. A extração foi acompanhada de análises cromatográficas em sílica gel e a FAT padronizada em CLAE.

O cromatograma da FAT em CLAE mostrou 9 picos principais detectados a 260 nm. A FCHCl₃ purificada em coluna de sílica gel forneceu 13 frações que foram levadas a análise química instrumental. É parte do projeto biomonitorar as substâncias purificadas até identificação daquelas ativas.

À semelhança dos trabalhos recentes que demonstraram ações biológicas dos alcaloides isolados e semipurificados de outras espécies do gênero (TANAE, 1999; MARTINS, 2010) todos os testes farmacológicos foram realizados utilizando a fração rica em alcaloides (FAT).

Os estudos farmacológicos foram iniciados com a triagem da atividade geral como descrito por Irwin (1968), com as devidas modificações. A finalidade dessa triagem foi observar o comportamento dos animais, relacionando a intensidade dos efeitos com as doses administradas da FAT. Com base nos sinais observados, os estudos foram redirecionados para testes mais específicos.

Alguns animais tratados com a FAT por via oral apresentaram inquietação e hiperatividade, mas nenhum outro sinal característico de atividade central. Com a administração intraperitoneal da FAT, os animais apresentaram, progressivamente, dificuldade de locomoção, diminuição da motricidade, ptose, cianose e morte. Esses efeitos sugeriram uma ação curarizante da FAT que, posteriormente, foi confirmada na preparação isolada nervo frênico-músculo diafragma de rato. Efeito semelhante foi descrito por Martins (2010) e Ribeiro (1986) com a administração i.p. do extrato bruto etanólico da casca de *G. urceolatum* e *G. laeve*, respectivamente. No entanto, Lima *et al* (2009) administrando uma fração rica em alcaloides de *G. vellosii*, também por via i.p., não observou alterações motoras no teste do “rota-rod”.

A hiperatividade após a administração oral da FAT foi reavaliada com maior número de animais no teste do campo-aberto, “rota-rod” e labirinto em cruz elevado. Os resultados não confirmaram o observado no teste geral. No teste do labirinto em cruz elevado, que avalia atividade tipo ansiolítica, os resultados mostraram que a administração oral da FAT na maior dose aumentou as entradas nos braços fechados e o número de estiramentos, sinais não conclusivos de hipermotilidade. No teste do sono induzido por barbitúrico, a latência para o sono foi menor, mas de mesma duração e, portanto, não indicativo de estimulação central produzida pela FAT. No teste de suspensão pela cauda, que avalia atividade tipo antidepressiva, não foram observadas alterações significativas. Portanto, os resultados *in vivo* não indicaram ação central da FAT após administração oral.

Vale ressaltar que, Werner *et al* (2009) descreveram ativação específica de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} com administração oral de uma fração diclorometânica da *G. vellosii*, embora sem alterar o desempenho motor de camundongos. Como demonstrado nos testes iniciais deste trabalho, nossas experiências não indicaram que os alcaloides sejam absorvidos por via oral.

O uso popular atribui propriedade antifebril a *G. argenteum* (DeFILIPPS; MAINA; CREPIN, 2004; GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987). Depreende-se que no uso popular, os extratos da planta sejam administrados por via oral. Porém, em nossas experiências, nenhuma alteração foi observada na temperatura retal dos animais após administração da FAT por via oral. Testes complementares da atividade anti-inflamatória não foram realizados com a FAT, principalmente porque a falta de efeitos *in vivo* (v.o.) parece estar relacionada à baixa biodisponibilidade da fração alcaloídica no trato gastrointestinal. Ao contrário, os alcaloides mostraram efeitos intensos quando administrados pela via intraperitoneal, onde a absorção é maior e as estruturas químicas dos compostos não são modificadas ou inativadas pelas enzimas digestivas.

In vitro, Lima-Landman *et al* (2006) demonstraram que os alcaloides geissospermina, flavopereirina e geissoschizolina, isolados de *G. vellosii* inibiram a captação de serotonina em sinaptossomas de hipocampo de rato, o que poderia interferir com o comportamento, caso os produtos fossem absorvidos e poderia causar como efeito final uma atividade do tipo antidepressiva, não confirmada pelos resultados observados *in vivo*.

Outros estudos que visem avaliar a farmacocinética dos compostos da FAT serão necessários para uma melhor compreensão dos resultados.

Após a administração endovenosa em ratos anestesiados, a fração alcaloídica da *G. argenteum* (3,0 mg/kg) produziu queda acentuada e prolongada da pressão arterial, que levou os animais à morte. Esse efeito hipotensor foi revertido pela ventilação artificial nos animais

injetados, reforçando a hipótese de que a FAT produz efeito curarizante, que leva a parada respiratória e anóxia, sem comprometimento direto do sistema nervoso central.

O bloqueio neuromuscular do tipo curarizante ocorre por inibição competitiva dos receptores nicotínicos pós-juncionais. Drogas que agem dessa forma impedem a interação do neurotransmissor (acetilcolina) com os sítios de ligação específicos no canal e, por consequência a ativação (BOWMAN, 2006), resultando em relaxamento da musculatura esquelética. De outra forma (não curarizante), o bloqueio ocorre por dessensibilização do receptor após despolarização persistente, em um mecanismo não competitivo. Nesse tipo de interação, o efeito não é revertido pela ação da colinesterase (MARTYN *et al*, 2009).

Para melhor avaliar esse efeito, a ação da FAT foi estudada em preparações de diafragma de rato estimuladas eletricamente. A incubação *in vitro* da FAT 10 a 100 µg/mL bloqueou as contrações induzidas por estímulo do nervo frênico. Nas mesmas concentrações, a FAT potencializou as contrações obtidas por estimulação direta do músculo diafragma. Com a lavagem da preparação os efeitos foram revertidos, porém não houve reversão do bloqueio neuromuscular com a incubação de um anticolinesterásico (neostigmina), em concentração que reverteu a ação da d-tubocurarina na mesma preparação. Ao contrário, a incubação do anticolinesterásico potenciou a ação bloqueadora neuromuscular da FAT, indicando que o mecanismo de curarização da FAT não é competitivo (ortostérico) no receptor nicotínico da placa terminal, como observado após a incubação de d-Tubocurarina.

Tanae (1999), trabalhando com os alcaloides da *G. vellosii*, descreveu efeito de relaxamento muscular esquelético semelhante aos obtidos com a FAT de *G. argenteum*. Ribeiro (1986) demonstrou *in vitro* que alcaloides da *G. vellosii* promovem bloqueio neuromuscular do tipo não competitivo, sem despolarização da membrana, sem alterar a liberação de acetilcolina do terminal nervoso e sem bloquear a excitabilidade muscular.

A contração da musculatura esquelética é determinada por mecanismos elétricos e químicos. O potencial de ação deflagrado ao longo do nervo induz a liberação de acetilcolina da terminação nervosa na fenda sináptica. A acetilcolina presente em grande quantidade na junção neuromuscular ativa os canais de sódio (nicotínicos) presentes na placa motora do músculo esquelético, desencadeando progressivamente a despolarização da membrana pós-juncional e a ativação dos canais de cálcio (diidropiridínicos) nos túbulos-T. Em seguida, o neurotransmissor é hidrolisado pela enzima acetilcolinesterase. O cálcio dentro da célula promove a liberação de mais cálcio via receptor de rianodina, presente na membrana do retículo sarcoplasmático (RS), aumentando a concentração intracelular do íon ($[Ca^{+2}]_i$), que leva à contração das fibras musculares esqueléticas. O aumento da $[Ca^{+2}]_i$ é regulado pela enzima Ca^{+2} -ATPase sarcoplasmática que diminui a quantidade do íon após recaptação para o RS (para revisão ver MARTYN *et al*, 2009; SOUCCAR, 2003).

A potenciação da contração em diafragma estimulado diretamente como mostrado em nosso trabalho está, provavelmente, relacionada a um aumento da mobilização de íons cálcio do retículo sarcoplasmático, uma vez que uma diminuição da atividade da Ca^{+2} -ATPase, que também poderia explicar um aumento na contração muscular, não foi alterada na presença da fração alcaloídica.

Em ratos anestesiados e com respiração artificial, a injeção endovenosa da FAT produziu hipotensão rápida e reversível, de intensidade dependente das doses utilizadas. Com a maior dose testada (3,0 mg/kg), a hipotensão de 28,4 mmHg foi seguida de acentuada hipertensão, que pode ser devida a uma resposta reflexa induzida por ativação de barorreceptores. Entretanto, como os efeitos da FAT no coração e na musculatura lisa vascular não foram totalmente esclarecidos, a participação de outros mecanismos reguladores da pressão arterial, não pode ser descartada neste estágio do estudo. Em animais anestesiados e tratados com o bloqueador nicotínico ganglionar hexametônio, a hipertensão produzida pela

FAT não foi alterada pela injeção prévia do prazosin (antagonista α_1 -adrenérgico) na dose que inibiu significativamente o efeito da Nor no mesmo animal, indicando que o efeito hipertensor da FAT não envolve o aumento na liberação de noradrenalina por estimulação ganglionar.

O tratamento prévio com a FAT não alterou a amplitude dos efeitos pressóricos produzidos pelos mediadores autonômicos noradrenalina e acetilcolina, nem a hipotensão foi bloqueada pela injeção prévia de atropina, indicando que não houve interação aparente dos alcaloides com receptores α_1 -adrenérgicos dos vasos e muscarínicos do coração (M_2) e vasos (M_3). Em outro protocolo, a FAT reduziu a amplitude da hipertensão produzida pela maior dose do estimulante ganglionar DMPP, que pode ser devido a uma redução na liberação da noradrenalina devido a um bloqueio nicotínico ganglionar da FAT. Esse efeito também poderia explicar a bradicardia produzida simultaneamente ao efeito hipotensor da FAT. No entanto, esse resultado é inconclusivo, uma vez que no controle (salina 0,9%) o mesmo efeito do DMPP foi reduzido significativamente. A FAT *in vitro* reduziu a frequência de batimentos espontâneos do átrio direito, enquanto no átrio esquerdo, comandado com marca-passo artificial, as mesmas concentrações aumentaram a força de contração. Esses resultados não estão diretamente relacionados, provavelmente não têm o mesmo mecanismo de ação e devem ser reanalisados posteriormente com os alcaloides isolados. Na presença da FAT, o período refratário efetivo medido em músculo papilar de rato não foi alterado, indicando que a FAT de *G. argenteum* não interfere com o potencial de ação cardíaco.

O efeito vascular da FAT foi evidente na aorta de rato com tônus induzido pela noradrenalina. O relaxamento foi proporcional à concentração da fração no banho e, muito intenso; ficou claro nestas experiências, que a FAT produz vasodilatação independente da presença do endotélio vascular, pois o efeito relaxante ocorreu com a mesma intensidade nas artérias controle com endotélio íntegro, e naquelas sem endotélio funcional. Essas observações indicaram que a vasodilatação pode ser devida ao bloqueio dos receptores α_1 -

adrenérgicos na musculatura lisa arterial, ou ao bloqueio de segundos mensageiros acoplados a esses receptores, incluindo nessa possibilidade, a inibição do influxo de íons cálcio por canais do tipo L.

A primeira possibilidade foi confirmada quando as curvas cumulativas concentração-resposta de noradrenalina na artéria aorta foram deslocadas paralelamente à direita na presença da FAT, sem diminuição do efeito máximo, indicando bloqueio competitivo dos receptores α_1 -adrenérgicos predominantes na aorta. Como descrito anteriormente, essa interação não foi observada *in vivo*, talvez pela interação entre as muitas atividades que, aparentemente, exercem os alcaloides que compõem a FAT. A segunda possibilidade, bloqueio de canais de cálcio, não foi comprovada em culturas celulares com o método do Fura-4. A FAT não bloqueou o influxo do cálcio e não reduziu a concentração citosólica do íon.

A musculatura lisa do ducto deferente de rato (DDR) também tem inervação adrenérgica predominante, mas a participação importante de co-transmissores e a existência simultânea de atividade motora estimulada pela inervação colinérgica fazem do órgão uma estrutura com reatividade farmacológica especial (WESTFALL; WESTFALL, 2001). No DDR, foi possível evidenciar que a FAT potencializou o efeito contrátil máximo que os agonistas noradrenalina e acetilcolina produziram na preparação, antes da incubação dos alcaloides. Esse efeito não pode ser relacionado a ações extracelulares que protegem os mediadores da degradação metabólica, ou que aumentam a concentração do mediador através de estimulação dos terminais nervosos, porque na realização das curvas cumulativas de um agonista, o efeito máximo indica que o órgão não mais responde ao aumento da concentração extrínseca do agonista com um incremento da resposta contrátil. Portanto, a potenciação da resposta máxima deve ser explicada pela ativação de segundos mensageiros. No entanto, a complexidade da ação da FAT foi evidenciada nessa preparação porque, ao mesmo tempo em

que potenciou a resposta contrátil, a FAT deslocou a curva dose–efeito da noradrenalina para a direita, indicando o bloqueio dos receptores α_1 - adrenérgicos, como já foi mencionado. Comparativamente, na mesma preparação de DDR, o efeito máximo da acetilcolina nas curvas concentração-efeito também foi potenciado na presença da FAT, sem alteração da EC_{50} do agonista na presença dos alcaloides.

Como já citado, a inervação simpática do DDR é realizada por dois co-transmissores: a noradrenalina e o ATP armazenados no mesmo grânulo da varicosidade simpática. Frente às outras evidências da ação bloqueadora α_1 -adrenérgica da FAT, um possível bloqueio da ação do co-transmissor ATP não foi priorizado.

Em conclusão, a partir das cascas do caule de *G. argenteum* foram obtidas frações ricas em alcaloides, revelados com reagentes de Dragendorff e com perfil cromatográfico apresentando 9 picos principais. As experiências iniciais realizadas com o extrato alcaloídico padronizado da *Geissospermum argenteum* indicaram muitas ações farmacológicas: ação hipotensora em rato, ação bradicardizante e ação inotrópica positiva no átrio *in vitro*, ação vasodilatadora na aorta, ação bloqueadora da transmissão neuromuscular no diafragma, ação potenciadora da contração muscular no diafragma, ação bloqueadora do estímulo simpático no ducto deferente, ação potenciadora da resposta contrátil máxima da noradrenalina e da acetilcolina no ducto deferente de rato.

Evidências até agora obtidas indicam os seguintes mecanismos de ação moleculares: bloqueio competitivo de receptores α_1 -adrenérgicos (responsável por hipotensão, relaxamento de tônus adrenérgico, aumento da CE_{50} da noradrenalina), bloqueio não-competitivo de receptores nicotínicos musculares (responsável pelo efeito curarizante *in vivo* e bloqueio neuromuscular).

A potenciação da contração do diafragma e o aumento do inotropismo não contam com indicação do mecanismo responsável; a possibilidade da concentração do cálcio intracelular ser aumentada por prolongamento do potencial de ação, isto é, bloqueio dos canais de potássio durante a repolarização celular não foi confirmada no período refratário do músculo papilar de rato. Da mesma forma, não houve indicação dos mecanismos moleculares envolvidos na potenciação do efeito máximo dos agonistas no ducto deferente de rato. A interpretação atual favorece o aumento de segundos mensageiros intracelulares (IP_3 , DAG, PKC), mas não existem dados comprobatórios dessa ação.

Os estudos devem ser continuados com os alcaloides isolados para confirmação dos mecanismos de ação conhecidos e para evidenciar outros mecanismos de ação apenas suspeitados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R. et al. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil?. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 942-952, out./dez. 2009.
- BEMIS, D.L. et al. β -Carboline alkaloid-enriched extract from the Amazonian rain forest tree pao pereira suppresses prostate cancer cell. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, v. 7, p. 59-65, 2009.
- BERS, D.M. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, v. 415, p. 198-205, 2002.
- BERTANI, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 45-54, 2005.
- BEUCKELMANN, D.J.; WIER, W. G. Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *Journal of Physiology*, 405, p. 233-255, 1988.
- BOTSARIS, A.S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, v. 3, n. 18, 2007.
- BOWMAN, W.C. Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology*, v.147, p. S277 – S286, 2006.
- BRANDÃO, M.G.L. et al. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 36, p. 175- 182, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Research*, v. 33, n. 2, p. 179 – 189, 2000.
- CARVALHO, A.C.B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, n. 3, p.467-473, jul./set., 2011.

CORREIA, A.F. et al. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 12, p. 369-380, 2008.

DeFILIPPS, R.A.; MAINA, S.L.; CREPIN, J. Medicinal plants of the guianas (Guiana, Surinam, French Guiana). Disponível em: <http://botany.si.edu/bdg/medicinal/Medicinal_plants_master.pdf>. Acesso em: 01 setembro 2011.

DUSTING, G.J.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins*, v. 13, n. 1, p. 3-15, jan. 1977.

FABIATO, A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac purkinje cell. *The Journal of General Physiology*, v. 85, n. 2, p. 247-289, 1985.

FISKE, C.H.; SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal Biological Chemistry*, v. 66, n. 2, p. 375-400, 1925.

FURCHGOTT, R.F. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early, studies, and identification as nitric oxide. *Bioscience Reports*, v. 19, n. 4, p. 235-251, 1999.

GILES, A. R. Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 58, p. 1078-1084, 1987.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane: Créoles, Palikur, Wayãpi*. Institut François de Recherche Scientifique Pour Le Développement en Coopération. Paris: Éditions de l'ORSTOM. 1987.

HALBERSTEIN, R.A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *AEP*, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

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

HUGHES, N.A.; RAPOPORT, H. Flavopereirine, an alkaloid from *Geissospermum vellosii*. *J. Am. Chem. Soc.*, v.80, p. 1604-1609, 1958.

IRWIN, S. Comparative observation assessment: in a systematic quantitative produced for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology*, v. 13, p. 222-257, 1968.

KOSK-KOSICKA, D. Measurement of Ca^{2+} -ATPase activity (in PMCA and SERCA1). In: *Methods in Molecular Biology. Calcium Signaling protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, v. 114, p. 343-354, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/m333x257w8523148/#section=93624&page=1&locus=84>>. Acesso em: 12 de junho de 2011.

LAI, J. et al. R. The m_2 muscarinic acetylcholine receptors are coupled to multiple signaling pathways via pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory proteins. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 258, n. 3, p. 938-944, 1991.

LAPA, A.J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. São Paulo: setor produtos naturais, departamento de farmacologia, UNIFESP/EPM, 2008.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, 2004, p.247-262.

LIMA, J.A. et al. *Geissospermum vellosii* stem bark Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 92, p. 508–513, 2009.

LIMA-LANDMAN, M.T.R. et al. Alkaloids from medicinal *Geissospermum* species inhibit serotonin (5HT) uptake by rat hippocampal synaptosomes. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, p. 347, 2006.

LINDEGGER, N.; NIGGLI, E. Paradoxical SR Ca^{2+} release in guinea-pig cardiac myocytes after β -adrenergic stimulation revealed by two-photon photolysis of caged Ca^{2+} . *The Journal of Physiology*, v. 565, p. 801-813, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTINS, S.S.O. Efeito dos alcaloides de *Geissospermum urceolatum* A.H. GENTRY (Acariquara-Branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos. 2010.94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologias para a Saúde) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

MARTYN, J.A.J.; FAGERLUND, M.J.; ERIKSSON, L.I. Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia*, v. 64, supl. 1, p. 1–9, 2009.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M.H.; LILA, M.A. Isolation and structural elucidation of indole alkaloids from *Geissospermum vellosii* by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 885-886, p. 83-89, 2012.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Economic Botanic*, v. 51, n.3, p. 212-237, 1997.

MUÑOZ, V. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 69, p. 127–137, 2000.

MURAKAMI, S., et al. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase and acid secretion by cassigarol A, a polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. *Biochem. Pharmacol.*, v. 44, p. 33-37, 1992.

PACCIONI, JP.; HUSSON, HP. Alcaloides de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). *Phytochemistry*, v. 17, p. 2146-2147, 1978.

POHLIT, A. M. et al. Screening of plants found in the state of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amazonica*, v. 34, n. 1, p. 97-105, 2004.

QUEEN, L.R.; FERRO, A. β -adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1070-1083, 2006.

QUIGNARD, E. L. J. et al. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. *Acta Amazonica*, v. 33, n. 1, p. 93-104, 2003.

RAPOPORT, H. et al. Alkaloids of *Geissospermum vellosii*. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 80, p. 1601-1604, 1958.

REINA, M. et al. Indole Alkaloids from *Geissospermum reticulatum*. *Journal of Natural Products*, 75, p. 928–934, 2012.

RIBEIRO, J.E.G. Mecanismo da ação curarizante dos extratos do pau pereira (*Geissospermum laevi* (Vellozo) Baillon). 1986. 85f. Tese (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

RIBEIRO, J. E. L. S. et al. Apocynaceae e Asclepiadaceae. In: Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: Inpa-DFID, 1999, v. 1, p. 568-581.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. v.13, n. 3/4, p. 161-171, 2008.

SHEN, J.X. Isoprenaline enhances local Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, p. 927-932, 2006.

SCRIVEN, D.R.L.; DAN, P.; MOORE, E.D.W. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, v. 79, p. 2682-2691, Nov. 2000.

SOUCCAR, C. Bloqueadores da transmissão neuromuscular esquelética. In: Medicina celular e molecular: bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia. São Paulo, 2003. p. 285-287.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fenerógramas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STEELE, J.C. et al. Indole and β -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *Journal of Natural Products*. v. 65, n.1, p.85-88, 2002.

TANAE, M.M. Mecanismos de ação dos alcalóides isolados de *Geissospermum laeve* (Vellozo), Baillon (pau-pereira) no músculo esquelético. 1999. 105f. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de São Paulo, EPM, São Paulo.

TANAE, M.M. et al. Molecular interaction of *Geissospermum*'s alkaloids with $\alpha 7$ or muscle - type nicotinic receptors (nAChR) subtypes and with acetylcholinesterase (AChE). *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, p.347-347, 2006.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial adrenoceptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 38: 796-808, 2001.

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

VIGNERON, M. et al. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. *Journal of ethnopharmacology*, v. 98, p. 351-360, 2005.

XIAO, B. et al. Functional consequence of protein kinase a-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor sensitization of store overload-induced Ca^{2+} release. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 41, p. 30256-30264, 2007.

ZHANG, R. et al. Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation. *Circulation Research*. 76, 1028-1035, 1995.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction. *Advances in Physiology Education*. 27:201-206, 2003.

WERNER, J.A.T. et al. Evidence for a role of 5-HT_{1A} receptor on antinociceptive action from *Geissospermum vellosii*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 163-169, 2009.

WESTFALL, T.D.; WESTFALL, D.P. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the vas deferens. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 45, p. 109 – 122, 2001.

WYNNE, B.M.; CHIAO, C.W.; WEBB, R.C. Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *J Am Soc Hypertens*, v. 3, p. 84–95, 2009.