



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

**Estudo Farmacológico de Extratos secos
padronizados das cascas do caule de *Aspidosperma
marcgravianum* Woodson coletadas na Amazônia
Ocidental**

MÁRCIA CAROLINE PIRES VILHENA

MANAUS

2012



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

MÁRCIA CAROLINE PIRES VILHENA

Estudo Farmacológico de Extratos secos
padronizados das cascas do caule de *Aspidosperma*
***marcgravianum* Woodson coletadas na Amazônia**
Ocidental

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

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

MANAUS

2012

MÁRCIA CAROLINE PIRES VILHENA

**Estudo Farmacológico de Extratos secos padronizados das cascas do caule
de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson coletadas na Amazônia**

Ocidental

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

Aprovado em 26 de junho de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profª. Dra. Maria de Meneses Pereira
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Vilhena, Márcia Caroline Pires

V711e Estudo Farmacológico de Extratos secos padronizados das cascas do caule de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson coletadas na Amazônia Ocidental / Márcia Caroline Pires Vilhena. - Manaus: UFAM, 2012.

83 f.; il. color.

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-orientadora: Prof^a Dra Mirtes Midori Tanae

1. Carapanaúba 2. Plantas medicinais 3. Farmacologia I. Lapa, Antonio José (Orient.) II. Tanae, Mirtes Midori (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 633.88(811.3)(043.3)

**Este trabalho dedico:
À minha mãe (*In Memoriam*) que em vida sonhou com este momento e sempre
me orientou que o melhor caminho para o sucesso
é a dedicação aos estudos.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas por ter me proporcionado a obtenção de conhecimentos desde o início da minha vida acadêmica e a aquisição de competência necessária para a realização e concretização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antônio José Lapa pela orientação, pela transmissão de conhecimentos que levarei por toda a vida e por contribuir para o meu crescimento profissional.

À Professora Mirtes Tanae pela dedicação, transmissão de conhecimentos, carinho e por sempre facilitar o andamento da minha dissertação da melhor maneira.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia pelo apoio e infra-estrutura para o desenvolvimento e conclusão desta dissertação.

À Fundação Djalma Batista e à Fundação de Apoio Institucional Rio Solimões pelo auxílio e concessão de bolsa.

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

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

À todos os técnicos do Laboratório de Farmacologia do CBA, pela amizade, paciência e momentos de descontração na laboratório, em especial à Vania, por ter me acompanhada durante o início do meu trabalho com muita dedicação.

Aos verdadeiros amigos do Laboratório de Farmacologia do CBA e em especial à Anny, Jeff, Marny e Andrezza que foram sempre companheiros durante à realização deste trabalho; pelo incentivo e amizade que tornou o convívio dentro e fora do laboratório mais harmonioso.

Ao meu querido Silvio Bernardo pelo apoio incondicional, compreensão, companheirismo e paciência ao longo desta trajetória que me levou à concretização deste trabalho.

A todos na minha família que mesmo à distância sempre me apoiaram, em especial ao meu pai e aos meus avós Artur e Iolanda.

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

Só posso terminar agradecendo a Deus por me amparar nos momentos difíceis, e me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Meus sinceros agradecimentos.

**"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."
(Anatole France)**

RESUMO

Aspidosperma marcgravianum Woodson (Apocynaceae) é conhecida como carapanaúba. Além da qualidade da madeira, a casca da espécie é utilizada como infuso na medicina popular da Região Amazônica para tratar malária, diabetes, males do estômago, inflamações do útero e do ovário, contra câncer, e como contraceptivo. Poucos trabalhos científicos confirmam essas ações, mas já são conhecidos cerca de 50 alcalóides indólicos, que parecem ser os responsáveis pela atividade tóxica às larvas de *Artemia franciscana* e pela atividade antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos e o(s) mecanismo(s) de ação dos alcalóides de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson em roedores. O pó das cascas do caule foi extraído em Soxhlet obtendo-se o extrato etanólico (EETOH, rendimento 3%). O EETOH foi particionado com clorofórmio em diferentes pH, dando origem à fração clorofórmica (FCHCl₃) e, esta, à fração mais purificada contendo os alcalóides totais (FAT). A purificação da FCHCl₃ por cromatografia em coluna (CC), separou seis frações de diferentes alcalóides (F₁₃₋₂₃, F₂₄₋₃₂, F₅₅₋₇₃, F₃₃₋₄₃, F₄₄₋₅₄ e F₇₄₋₇₆). A padronização da FAT em CLAE mostrou 11 picos principais com tempos de retenção que variaram de 3,5 a 26,9 min, coincidentes com os das frações purificadas. Para identificar os principais efeitos farmacológicos de *A. marcgravianum*, o extrato etanólico (EETOH) e a fração alcaloídica (FAT) foram administrados por via oral (1 g/kg, v.o.), em camundongos. O EETOH produziu diminuição da motilidade e relaxamento muscular evidentes, além de sinais de dispnéia, sem cianose; não houve morte em 24 horas de observação. A FAT produziu os mesmos efeitos, porém rápidos e intensos, com 100% de letalidade. Em átrios isolados de rato, a FAT (10 a 100 µg/mL) produziu efeito cronotrópico negativo proporcionalmente às concentrações e efeito inotrópico positivo na menor concentração e inotrópico negativo na maior concentração. As contrações do músculo diafragma de rato foram potenciadas na presença da FAT; esta ação não foi relacionada a uma atividade anticolinesterásica da FAT ou à inibição da atividade da Ca²⁺-ATPase de músculo esquelético. Na presença da FAT (10 a 100 µg/mL) o tétano do músculo diafragma de rato não foi sustentado, mas a contração inicial à estimulação tetânica (30 e 50 Hz) não foi inibida na mesma proporção; efeitos semelhantes foram observados com as frações purificadas (1 µg/mL). Estes efeitos indicam que o período refratário da fibra muscular foi aumentado na presença dos alcalóides. O prolongamento do potencial de ação, talvez por bloqueio de canais de potássio na repolarização celular, potencializaria a contração e inibiria a resposta à estimulação tetânica. As experiências, no entanto, não indicam diretamente a ação dos alcalóides nas correntes iônicas do potencial de ação.

PALAVRAS-CHAVE: carapanaúba, *Aspidosperma marcgravianum*, Apocynaceae

ABSTRACT

Aspidosperma marcgravianum Woodson (Apocynaceae) is popularly known as carapanaúba a high quality wood. The bark is used in the Amazonian folk medicine as infusion to treat malaria, diabetes, gastrointestinal disturbances, in uterus and ovarian inflammation, against cancer and as contraceptive. The few papers available do not confirm the folk use, but the about 50 known indolic alkaloids isolated from *A. marcgravianum* are often used to explain the toxic effect on *Artemia franciscana* and the described anti-bacterial activity. The present work aimed to study the *in vivo* and *in vitro* effects and mechanisms of action of the alkaloids extracted from *Aspidosperma marcgravianum*. The bark was extracted with ethanol in Soxhlet apparatus generating the ethanol extract (EETHO, 3% yield). The EETHO 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 six fractions of different alkaloids (F₁₃₋₂₃, F₂₄₋₃₂, F₅₅₋₇₃, F₃₃₋₄₃, F₄₄₋₅₄ and F₇₄₋₇₆). FAT standardization in HPLC showed 11 major peaks with retention times from 3.5 to 27.0 min similar to those obtained for the purified fractions. To know the main pharmacological effects induced of *A. marcgravianum*, mice were orally treated with EETHO and TAF (1 g/kg). EETHO produced evident muscular relaxation and reduced mice motility, as well as dyspnea; death was not observed within 24 h. Comparatively, TAF produced faster and more intense effects that killed all the animals. In rat isolated atrium, FAT (10 to 100 µg/mL) produced negative chronotropic effect related to the drug concentration, positive inotropic effect at low concentration but contraction inhibition at high one. The diaphragm muscle contractions were potentiated by TAF; this action was neither related to an anticholinesterase activity nor to Ca²⁺-ATPase inhibition. The diaphragm tetanus after repetitive electrical stimulation (30-50 Hz) was not sustained in presence of FAT (10 to 100 µg/mL) but the initial muscle responses were not proportionally blocked; similar effects were observed for the purified fractions at 1 µg/mL. Since the alkaloids did not induce muscle contracture, neither inhibited SERCA 1 activity, nor reduced the initial responses upon repetitive muscle stimulation, the effect on contraction might putatively be explained by increased action potential duration. This effect would increase the muscle membrane refractoriness and would block the tetanus responses, but at the same time it would increase the myofibrils active state resulting in increased contraction of diaphragm and heart muscles. Usually increased action potential duration is due to potassium channel blockade. The present experiments, however, do not provide any direct evidence for this latter effect.

Key words: carapanaúba, *Aspidosperma marcgravianum*, Apocynaceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Estruturas de alcaloides indólicos identificados nas espécies de <i>Aspidosperma</i> : aspidospermina, olivacina, ioimbina.....	32
Figura 2:	Acoplamento excitação-contração do músculo esquelético. A fibra muscular é excitada via nervo motor pela placa terminal e gera o potencial de ação que se propaga ao longo da superfície da membrana (sarcolema), penetrando pelo sistema tubular transverso. A proteína dihidropiridina (DHP), um receptor sensível à despolarização da membrana, altera sua conformação e ativa o receptor rianodínico (RyR), que libera Ca^{+2} do RS. O Ca^{+2} liga-se à troponina e ativa o processo de contração.....	36
Figura 3:	Acoplamento excitação-contração cardíaco. O potencial de ação proveniente de células adjacentes chega, os canais de Ca^{+2} voltagem-dependentes abrem-se e o influxo de cálcio induz à liberação de mais Ca^{+2} pelos receptores de rianodina (RyR) do RS; a liberação local de Ca^{+2} induz a liberação de mais Ca^{+2} que liga-se à troponina para iniciar a contração; relaxamento ocorre quando o Ca^{+2} desliga-se da troponina. Ao final, o Ca^{+2} é recaptado para o retículo sarcoplasmático pela Ca^{+2} -ATPase.....	39
Figura 4:	Área da coleta de <i>Aspidosperma marcgravianum</i> Woodson na Reserva Adolpho Ducke, km 26 da rodovia AM-010 Manaus-Itacoatiara, AM, nas coordenadas: S 02° 55' 53.0'' e W 059° 58' 24.3''	42
Figura 5:	<i>Aspidosperma marcgravianum</i> Woodson (Carapanaúba).....	43
Figura 6:	<i>Aspidosperma marcgravianum</i> Woodson (Carapanaúba). (A) Tronco acanalado e fenestrado, ausência de látex no tronco; ritidoma escamoso, desprendendo em pequenas placas. (B) Detalhe da árvore etiquetada com número 3064 (C) Folhas coriáceas com a face inferior densamente papilosa (esbranquiçada a olho nu).....	44
Figura 7:	Fluxograma de obtenção da Fração Alcaloides Totais.....	50
Figura 8:	Purificação da FCHCl ₃ de <i>A. marcgravianum</i> por cromatografia em coluna (CC) em sílica gel e eluição com gradiente crescente de metanol em clorofórmio, coletando-se frações de 20 mL cada.....	52
Figura 9:	Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações semi-purificadas de <i>Aspidosperma marcgravianum</i> Woodson.....	53
Figura 10:	Cromatografia em camada delgada do ETOH e da fração de alcaloides totais de <i>A. marcgravianum</i> utilizando cromatofolhas de sílica gel, fase móvel BAW (4 : 2 : 1) e revelação com reagente de Dragendorff.....	65
Figura 11:	Perfil cromatográfico da FAT de <i>Aspidospermum marcgravianum</i> em CLAE utilizando coluna C18, eluída com gradiente de água/acetonitrila de 8 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 260 nm.....	66
Figura 12:	Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de <i>A. marcgravianum</i> (10, 30 e 100 μ g/mL) na contração do diafragma de rato sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Dados expressos como médias \pm erro padrão (n= 4 animais) comparados a contração antes da incubação da FAT. *p < 0,05. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.....	68
Figura 13:	Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo sob estímulo indireto. Registro miográfico representativo do efeito da FAT de <i>A. marcgravianum</i> na concentração de 100 μ g/mL durante 30 min de incubação, a contração foi bloqueada pela ação da d-tubocurarina 2 μ M.....	68

- Figura 14:** Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (10, 30 e 100 µg/mL) na contração do diafragma de rato sob estímulo indireto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4 animais) comparados ao controle (ausência da FAT). **p < 0,01 e *** p < 0,001. ANOVA ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni..... 69
- Figura 15:** (A) Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (1 a 100 µg/mL) na atividade da enzima Ca⁺²-ATPase isolada de músculo esquelético de coelho. (B) Efeito da tapsigargina (controle positivo) na atividade da Ca⁺²-ATPase. Os símbolos e barras representam as médias ± erro padrão (n = 3, triplicata)..... 70
- Figura 16:** Registro de contração em diafragma de rato sob estímulo direto (frequência 5, 10, 20 e 50 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima), a 30° C na primeira contração e na fusão de tétano. (A) controle antes da incubação da fração alcaloides totais (FAT) e (B) na presença da FAT de *A. marcgravianum* (30 µg/mL)..... 72
- Figura 17:** Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) na tensão máxima da contração do diafragma de rato sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz [log da frequência], 2 ms e voltagem supra máxima). Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle (ausência da FAT). *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni..... 73
- Figura 18:** Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) na manutenção do tônus após 10s da contração do diafragma de rato sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz, 2 ms e voltagem supra máxima). Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4), comparados ao controle (ausência da FAT). *** p < 0,001. ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni..... 73
- Figura 19:** Efeitos das frações purificadas F₁₃₋₂₃, F₂₄₋₃₂ e F₃₃₋₄₃ de *A. marcgravianum* (1 µg/mL) na manutenção do tônus da contração do diafragma de rato sob estímulo direto após 10 s (A, C e E, respectivamente) e na tensão máxima da resposta do diafragma sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz [log da frequência], 2 ms e voltagem supra máxima) (B, D e F, respectivamente). Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle antes da incubação das frações. *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni..... 75
- Figura 20:** Efeito das frações purificadas F₄₄₋₅₄, F₅₅₋₇₃ e F₇₄₋₇₆ de *A. marcgravianum* (1 µg/mL) na manutenção do tônus da contração do diafragma de rato sob estímulo direto após 10 s (G, I, K, respectivamente) e na tensão máxima da resposta do diafragma sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz [log da frequência], 2 ms e voltagem supra máxima) (J, H, L, respectivamente). Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle antes da incubação das frações purificadas. *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni..... 76
- Figura 21:** Efeito da FAT (10 a 100 µg/mL) de *A. marcgravianum* na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. bpm = batimentos por minuto. Dados expressos como médias ± erro padrão (n = 5) comparados ao controle (ausência da FAT) (ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni). **P<0.01 e *** p < 0,001..... 77
- Figura 22:** Efeito da FAT (10 a 100 µg/mL) de *A. marcgravianum* na contração do átrio esquerdo isolado de rato estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima), a 35 °C. Dados expressos como médias ± erro padrão (n = 6) comparados ao controle (ausência da FAT) (ANOVA duas- vias e pós-teste de Bonferroni). *p < 0,051 e *** p < 0,001..... 78

Figura 23: Efeito da FAT de *A. marcgravianum* na concentração de cálcio citosólico livre em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (A). Dados expressos como médias \pm erro padrão (n= 3, em triplicata). O Kcl 70 mM foi utilizado para promover a abertura dos canais e o verapamil (100 μ M) como controle positivo (ANOVA)..... 79

ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

BAW – buthanol : Acetic acid : WaterBPM – batimentos por minuto

CBA - Centro de Biotecnologia da Amazônia

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CC - Cromatografia em coluna

EETOH - Extrato etanólico

EC₅₀ – Concentração efetiva 50%

FAT – Fração alcaloides totais

F – Fração

FCHCl₃ - Fração clorofórmica

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

i.p. – intraperitonal

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

LNV – Líquido nutritivo de vesícula

LC – limite de confiança

MS - Ministério da Saúde

Meta - Metacolina

NOR – Noradrenalina

OMS - Organização Mundial de Saúde

Pi - fosfato inorgânico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SUS - Sistema Único de Saúde

RFAD - Reserva Florestal Adolfo Ducke

Rf – fator de retenção

SERCA - “Sarcoplasmic and endoplasmic reticulum calcium”

SNC - Sistema nervoso central

TCA - Ácido tricloroacético

TYRODE – Líquido nutritivo

UV – ultra-violeta

v.o. – via oral

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

SÍMBOLOS

\geq – maior igual
 \pm – mais ou menos
< - menor que
 Δ – variação
 α – Alfa
g – giros por segundo
 μg – Micrograma
 μL – Microlitros
 μmol – Micromolar
 μM – Micromolar
cm – Centímetro
g – Grama
Hz – Hertz
kg – Quilograma
 λ_{ex} – Comprimento de onda de excitação
 λ_{em} - Comprimento de onda de emissão
L – Litro
M – Molar
mEq – Miliequivalente
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mm – Milímetros
ms – Milissegundos
mV - Milivolt
N – Normal
n – Número de animais
nm – Nanômetro
min – minuto
% - percentagem
°C – Grau celsius
h – hora
S – Sul
W – oeste
pH – potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo Geral.....	24
2.2	Objetivos Específicos.....	24
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1	A planta.....	26
3.1.1	Apocynaceae.....	26
3.1.2	Aspidosperma.....	28
3.2	Junção neuromuscular	33
3.2.1	Acoplamento Excitação-Contração no músculo esquelético.....	35
3.3	Acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco.....	37
4	MATERIAL.....	40
4.1	Material vegetal.....	41
4.2	Animais.....	41
4.3	Material Químico.....	45
4.3.1	Solventes, Reagentes e Sais.....	45
4.3.2	Drogas.....	45
4.3.3	Soluções e Reagentes.....	46
5	MÉTODOS.....	48
5.1	Obtenção do extrato etanólico (EETOH)	49
5.1.1	Obtenção da Fração Alcaloides Totais (FAT)	49
5.1.2	Obtenção da Fração Clorofórmica (FCHCl ₃)	50
5.1.3	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa	51
5.1.4	Semi-purificação da FCHCl ₃ de <i>Aspidosperma marcgravianum</i> por cromatografia em coluna (CC) de sílica.....	51
5.1.5	Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)	54
5.2	Métodos farmacológicos para avaliação da atividade do extrato etanólico (EETOH) e Fração alcalóides totais (FAT) de <i>Aspidosperma marcgravianum</i>	54
5.2.1	Teste geral de Atividade farmacológica.....	55
5.3	Avaliação da ação da FAT de <i>Aspidospema marcgravianum</i> na junção neuromuscular esquelética.....	55
5.3.1	Avaliação da atividade da FAT na capacidade contrátil do músculo diafragma de rat estimulado direta e indiretamente.....	55
5.4	Avaliação do efeito da FAT de <i>A. marcgravianum</i> na atividade da enzima Ca ⁺² ATPase de mamífero.....	56
5.4.1	Isolamento da Ca ⁺² -ATPase.....	56
5.4.2	Determinação do teor de proteína.....	57
5.4.3	Determinação da atividade enzimática da Ca ⁺² -ATPase de mamífero.....	58
5.5	Avaliação da atividade da FAT e das frações (F ₁₃₋₂₃ , F ₂₄₋₃₂ , F ₃₃₋₄₃ , F ₄₄₋₅₄ , F ₅₅₋₇₃ , F ₇₄₋₇₆) de <i>A. marcgravianum</i> na fusão tetânica da contração do músculo diafragma de rato estimulado com pulsos elétricos aplicados diretamente na musculatura.....	58
5.5.1	Análise Estatística	59
5.6	Avaliação da ação cardiovascular da FAT de <i>Aspidosperma marcgraviaum</i>	59
5.6.1	Avaliação da ação da FAT no átrio de rato.....	59

5.6.2	Cultura de músculo cardíaco de rato.....	60
5.6.3	Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria em células de útero e cardiomiócitos mantidos em cultura.....	61
6	RESULTADOS.....	63
6.1	Obtenção do extrato etanólico (EETOH) e Fração Alcaloides Totais (FAT) de <i>Aspidosperma marcgravianum</i>	64
6.1.1	Cromatografia em Camada Delgada.....	64
6.1.2	Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)	66
6.2	Efeito do extrato etanólico (EETOH) de <i>A. marcgravianum</i> (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin)	67
6.3	Efeito da fração alcaloides totais de <i>A. marcgravianum</i> (FAT) na junção neuromuscular.....	67
6.3.1	Efeito da FAT de <i>A. marcgravianum</i> em músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente.....	67
6.4	Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de <i>Aspidosperma marcgravianum</i> na atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase	70
6.5	Efeito da FAT e das frações purificadas na fusão tetânica da contração do músculo diafragma de rato estimulado com pulsos elétricos aplicados diretamente na musculatura.....	71
6.6	Efeito da fração alcaloides totais de <i>A. marcgravianum</i> (FAT) na atividade cardiovascular.....	77
6.6.1	Efeito da FAT de <i>A. marcgravianum</i> (10, 30 e 100 μ g/mL) na frequência de batimentos do átrio direito de rato	77
6.6.2	Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de <i>A. marcgravianum</i> (10, 30 e 100 μ g/mL) na força de contração do átrio esquerdo de rato	78
6.6.3	Efeito da FAT de <i>A. marcgravianum</i> na medida da concentração de cálcio citosólico livre em células de cardiomiócitos de rato mantidos em cultura.....	79
7	DISCUSSÃO.....	80
8	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais para uso medicinal têm recebido atenção especial, pelos diferentes significados que as plantas medicinais assumem na sociedade: como um recurso biológico e cultural, destacando-se seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas; como possível fonte de recursos financeiros, através de sua comercialização; como acesso primário à saúde para muitas comunidades e para o resgate e fortalecimento da identidade cultural (SILVA, 2003). Acredita-se que a flora mundial esteja entre 250 e 500 mil espécies. O Brasil contribui com 120 mil espécies, a grande maioria na região amazônica; o saber popular selecionou cerca de duas mil delas como medicinais. Dessas, apenas 10% foram cientificamente investigadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A necessidade exige e a ciência busca a unificação do progresso com aquilo que a natureza oferece, respeitando a cultura do povo em torno do uso de produtos ou ervas medicinais para curar os males. Assim, as plantas medicinais, que no passado representavam o principal meio terapêutico, continuam sendo empregadas tanto de forma direta no tratamento de doenças, quanto como matéria-prima de medicamentos utilizados na medicina moderna (ARNOUS; BEINNER; SANTOS, 2005).

Aproximadamente 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados, advêm direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. As grandes empresas farmacêuticas têm demonstrado um interesse renovado na investigação de plantas superiores como matéria-prima na síntese de novas moléculas e também no desenvolvimento de agentes fitoterápicos padronizados com eficácia, segurança e qualidade comprovada (CALIXTO, 2000). Calixto (2003) reforça esta afirmação concluindo que a terapêutica moderna, composta por medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem a contribuição dos

produtos naturais, notadamente das plantas superiores, das toxinas animais e dos microorganismos.

Dentre as etapas importantes na obtenção de um fitoterápico, a seleção da planta medicinal é de extrema importância e deve-se levar em conta vários passos, dentre eles o emprego do conhecimento etnofarmacológico. Utilizando informações corretas da etnofarmacologia é possível aumentar, significativamente, a probabilidade de encontrar plantas com boa atividade farmacológica (CALIXTO, 2001) e conseqüentemente, descobrir novos medicamentos originados de plantas, e para isso são envolvidos diversos conhecimentos como: aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (BRANDÃO *et al*, 2010).

Medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar inúmeras enfermidades humanas, incluindo os indicados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e anticancerígenos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Muitas classes de substâncias orgânicas, como os alcaloides, têm demonstrado efeitos biológicos promissores e diversos fitoconstituintes apresentam potência similar ou superior à de um fármaco sintético (CECHINEL-FILHO *et al*, 2003).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta que administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exerce algum tipo de ação farmacológica. As plantas medicinais podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semissíntese (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os fitoterápicos, diferentes dos fitofármacos, constituem-se em medicamentos preparados com extratos padronizados de uma ou mais plantas medicinais com constituintes

ativos, caracterizam-se pela necessidade de respaldos científicos quanto ao uso seguro e eficaz, hoje amplamente comercializados em países pobres e ricos. Os constituintes responsáveis pela atividade farmacológica são, em geral, pouco conhecidos e acredita-se que a ação farmacológica desses produtos envolva a interação de inúmeras substâncias presentes no extrato. O fitofármaco é a substância ativa isolada de matérias-primas vegetais, ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal (CALIXTO, 2000).

O registro de fitoterápicos é regulamentado pela RDC nº 14, de 31 de março de 2010 da ANVISA. De acordo com esta RDC, medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas por estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A segurança também é determinada pelos ensaios que comprovam a identidade da planta e a ausência de contaminantes. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (ANVISA, 2010).

Observando o pequeno número de novos constituintes químicos que superam as etapas pré-clínicas e clínicas no desenvolvimento de medicamentos, a síntese química de novas substâncias passou a exigir investimentos elevados demais. Desta forma é possível entender a corrida das indústrias farmacêuticas multinacionais pela procura de novas substâncias bioativas de origem vegetal (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apocynaceae tem grande importância econômica. O principal e mais importante uso da mesma está relacionado aos alcaloides do metabolismo secundário de muitas espécies, que são utilizados na elaboração de medicamentos (RIBEIRO *et al*, 1999).

Alcaloides são substâncias de caráter alcalino, nitrogenados e farmacologicamente ativos, encontrados predominantemente nas angiospermas (HENRIQUES *et al*, 2010). O uso de alcaloides se perde na história do tempo e atinge o apogeu na Idade Média na forma de venenos e poções “mágicas”, usadas nas práticas de feitiçaria ou para matar os inimigos. Não se pode, entretanto, deixar de mencionar a importância dos alcaloides na medicina popular (MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009).

Dentre os inúmeros gêneros de plantas da Amazônia utilizadas por suas propriedades medicinais pelas populações locais, indígenas e caboclas, está *Aspidosperma*, uma Apocynaceae.

As espécies brasileiras de *Aspidosperma* têm grande importância tanto do ponto de vista econômico como científico, pois além de serem fornecedoras de madeira nobre, com larga aplicação na carpintaria (JOLY, 1991), a maioria das espécies tem sido objeto de extensas investigações na busca de novas substâncias com atividades biológicas (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

Na medicina popular, as espécies de *Aspidosperma* são usadas para tratamento de febres e bronquites, de afecções dos rins, fígado e estômago e ainda, para o tratamento da leishmaniose, de inflamação do útero e ovário, como contraceptiva, em diabetes, contra o câncer, febre e reumatismo (DUKE; VASQUEZ, 1994; RIBEIRO *et al*, 1999) e para o tratamento de malária (HIDALGO, 2003).

Do ponto de vista químico, a grande maioria das espécies constituintes do gênero já foi submetida a algum estudo de isolamento e identificação dos alcaloides indólicos presentes nas mais diversas partes das plantas. Já do ponto de vista farmacológico, poucos testes foram

realizados até agora para justificar a grande aplicação das mesmas por populares e a importância dos alcaloides indólicos presentes nas representantes do gênero. A maioria dos alcaloides indólicos atua como agonistas parciais em receptores adrenérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Neste contexto de plantas bioprodutoras de alcaloides de Apocynaceae, insere-se *Aspidosperma marcgravianum* Woodson uma das diversas espécies conhecidas como carapanaúba, utilizada comumente na forma de infuso das cascas pela medicina popular da Região Amazônica no tratamento da malária, além do diabetes e câncer (RIBEIRO *et al*, 1999). A importância dessa informação popular do uso em malária orientou a escolha da espécie vegetal para o presente trabalho.

Levantamentos etnobotânicos das espécies de plantas amazônicas de uso popular utilizadas diretamente no tratamento da malária e dos males associados a esta, ou utilizadas como coadjuvantes de outros tratamentos, mostram que as espécies nativas da região são em sua maioria, de porte arbóreo, como a carapanaúba (*Aspidosperma* sp.) (HIDALGO; MING, 2003).

De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcaloides indólicos (PEREIRA *et al*, 2007; ROBERT *et al*, 1983), os quais poderiam justificar sua atividade antimicrobiana (VERPOORTE; PUIGROK; BERARHEIM, 1982).

Estudos *in vivo* com os extratos indicados na medicina popular e a atividade farmacológica geral dessa planta são pouco conhecidos. *A. marcgravianum* da Amazônia, particularmente, conta apenas com alguns estudos botânicos, acreditando-se que sejam mais motivados pelo uso da madeira, do que por seu uso na medicina popular ou em estudos químicos.

Considerando o amplo uso de *Aspidosperma* na medicina popular, e principalmente o uso de *A. marcgravianum* no tratamento da malária e baseando-se na literatura que descreve a

presença dos alcaloides indólicos nesta espécie e suas atividades farmacológicas em alvos moleculares de mamíferos, este trabalho objetivou obter, analisar quimicamente e estudar o extrato alcaloídico dessa espécie vegetal, visando à elaboração futura de um fitoterápico padronizado quanto à constituição e atividade farmacológica. Para isso, os extratos foram padronizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que permite a realização de análises qualitativas e quantitativas de modo eficaz. Tendo definidas as condições de análise, o cromatograma forma uma espécie de desenho característico (perfil cromatográfico ou “*fingerprint*”) devido aos diferentes tempos de retenção e intensidades de absorção de seus constituintes, em que a proporção entre seus componentes deve ser constante, podendo ser comparado e utilizado como padrão para outros estudos, ou ainda, pode-se utilizar a constância da atividade farmacológica com o mesmo perfil químico (SHARAPIN, 2000).

Os estudos com o extrato padronizado de alcaloides totais de *A. marcgravianum* foram planejados para a detecção experimental de um amplo espectro de ação farmacológica, desde testes gerais *in vivo* por administração oral dos extratos, até o estudo das frações semi-purificadas em preparações isoladas e em enzimas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

✓ Avaliar os efeitos farmacológicos dos alcaloides de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Carapanaúba) em roedores da colônia Wistar tipo SPF do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e estudar seu mecanismo de ação.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Extrair os alcaloides totais do extrato etanólico de *A. marcgravianum*;
- ✓ Fracionar a FCHCL₃ em cromatografia em coluna (CC) de sílica e padronizar a FAT em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- ✓ Avaliar em roedores os efeitos do extrato etanólico (EETOH), da fração alcaloides totais (FAT) e das frações semi-purificadas;
- ✓ Estudar as ações farmacológicas dos alcalóides em testes farmacológicos *in vivo* e *in vitro*;
- ✓ Estudar os mecanismos de ação dos alcaloides no músculo esquelético e na musculatura cardíaca de ratos.
- ✓ Avaliar as ações dos alcaloides na atividade da Ca⁺²-ATPase do retículo sarcoplasmático isolado de músculo esquelético de coelho.
- ✓ Estudar as ações dos alcaloides na duração do potencial de ação pela técnica de fusão tetânica em diafragma de rato.
- ✓ Estudar os efeitos dos alcaloides no influxo de Ca⁺² estimulado por KCl em cardiomiócitos de rato mantidos em cultura.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A planta

3.1.1 Apocynaceae

Espécies de Apocynaceae estão incluídas filogeneticamente na ordem Gentianales e subclasse Asteridae sendo consideradas como espécies dicotiledôneas bem evoluídas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Elas são representadas por árvores de grande a médio porte, arvoretas, lianas e menos frequentemente arbustos.

Dentre as angiospermas, a família está entre as dez mais ricas em número de espécies. Inclui aproximadamente 400 gêneros e 3700 espécies (CASTRO; LORENZI, 2008), sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos frequentes em regiões temperadas (RIBEIRO *et al*, 1999). No Brasil, ocorrem cerca de 95 gêneros e 850 espécies de Apocynaceae (CASTRO; LORENZI, 2008). Na Amazônia, são encontrados aproximadamente 32 destes gêneros (PEREIRA *et al*, 2007). Os mais importantes desta família são *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Vinca*, *Tabernaemontana*, *Mandevilla*, *Hancomia*, *Nerium*, *Strophantus*, *Catharanthus*, *Allamanda*, *Thevetia*, *Wrightia*, *Plumeria*, *Himatanthus* e *Rauvolfia* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Na Reserva Florestal Adolfo Ducke, foram reconhecidos 16 gêneros e 40 espécies de Apocynaceae (RIBEIRO *et al*, 1999).

Espécies vegetais pertencentes à Apocynaceae possuem grande importância medicinal, uma vez que, são ricas fontes vegetais de constituintes químicos como glicosídeos e alcaloides, presentes nas sementes e látex, com utilidade na medicina moderna (CASTRO; LORENZI, 2008).

Segundo Budman *et al* (1997), várias substâncias têm sido isoladas dos diversos gêneros de Apocynaceae e muitas delas representam protótipos de classes farmacológicas distintas. O principal e mais importante uso está relacionado aos alcaloides do metabolismo

secundário, como por exemplo, os alcaloides de *Rauwolfia* (reserpina, ajmalicina, ajmalina, ajmalinina, serpentina e serpentinina), utilizados para tratar hipertensão e arritmias cardíacas, e os glicosídeos cardiotônicos de *Strophantus* (ouabaína, estrofantinidina e cimarina). Dentre os alcaloides, os mais conhecidos são a vincristina e a vimblastina, utilizados como quimioterápicos no tratamento de câncer e extraídos de *Vinca rosea*, uma espécie nativa de Madagascar.

Biologicamente, muitos alcaloides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Por isso, são largamente empregados como hipotensores, simpatolíticos, diuréticos, vasoconstrictores periféricos, estimulantes respiratórios, anestésicos, agentes bloqueadores adrenérgicos, espasmogênicos intestinais, sedativos e relaxantes do músculo esquelético. Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas do maracujá (BIEL; DRUKKER; MITCHELL, 1959; ROBERTS; WINK, 1998).

Além dos representantes com inúmeras propriedades medicinais, as espécies de Apocynaceae mostram-se como importante fonte de recursos econômicos (RIBEIRO *et al*, 1999). A borracha é obtida do látex de várias espécies, marcadamente com qualidade inferior àquela extraída de *Hevea brasiliensis* (Willd. Ex A. Juss.) Mull. Arg., a seringueira. Em países africanos e populações indígenas da América do Sul, espécies tóxicas são utilizadas para envenenar flechas para a caça de animais e pesca. Outras espécies fornecem madeiras de excelente qualidade para a confecção de móveis, como é o caso de algumas espécies de *Aspidosperma*, cujo representante mais comum é *A. peroba* Allemão ex Saldanha, conhecida como “peroba-rosa” (BARATTO, 2010).

Alguns gêneros apresentam frutos comestíveis (*Couma*, *Ambelania* e *Rhigospira*). O látex da sorva (*Couma utilis*) é comestível e muito apreciado pelos povos da Floresta Amazônica. Esta espécie foi muito explorada na região do médio e alto Rio Negro, pois o látex era utilizado no passado para a produção de goma de mascar. Muitas espécies apresentam potencial paisagístico pela beleza de suas flores (*Mandevilla* spp., *Tabernaemontana* spp., *Himatanthus* spp.) ou pela forma do tronco e da copa (*Aspidosperma* spp., *Geissospermum* spp. e *Himatanthus* spp.) (RIBEIRO *et al*, 1999). Considerando a importância da Apocynaceae como fonte de substâncias com atividade farmacológica, verifica-se a potencialidade destas espécies e a consequente necessidade de estudos voltados para uma melhor descrição química e biológica de seus constituintes.

3.1.2 *Aspidosperma*

Aspidosperma Mart., Apocynaceae, possui cerca de 43 espécies distribuídas em regiões neotropicais, encontradas apenas nas Américas, principalmente na Argentina, Brasil, Bolívia, México, Paraguai e Peru (MARCONDES-FERREIRA; KINOSHITA, 1996).

Espécies desse gênero são conhecidas popularmente como peroba na maioria das regiões brasileiras e carapanaúba na Região Amazônica (HENRIQUE; NUNOMURA; POHLIT, 2010). Curiosamente, o nome popular carapanaúba refere-se ao fato de a árvore possuir caule profundamente sulcado no sentido vertical e repleto de septos capazes de abrigar o carapanã, um mosquito muito comum na região amazônica (BARBOSA; TAVARES; SOARES, 2003).

As seguintes espécies foram encontradas com a mesma denominação popular de carapanaúba: *Aspidospema nitidum*, *A. marcgravianum*, *A. carapanauba*, *A. oblongum* e *A. auriculatum* (BARBOSA; TAVARES; SOARES, 2003).

Aspidosperma compreende tipicamente espécies arbóreas tropicais de grande porte (2 a 60 m de altura), com flores e sementes abundantes, copas amplas, folhas alternas espiraladas não agrupadas no ápice dos ramos, que podem apresentar látex abundante, sendo que, as mesmas não apresentam látex no tronco circular como a maioria das espécies de Apocynaceae (RIBEIRO *et al*, 1999).

Alguns dos usos populares atribuídos às espécies de carapanaúba já foram confirmados por testes farmacológicos e químicos, muitos deles possivelmente devido à presença de alcaloides.

Añez (2009), em estudo etnofarmacológico em uma comunidade no interior do Amazonas e em entrevista com vendedores no mercado municipal Adolpho Lisboa (em Manaus) relatou que a casca do caule da carapanaúba é a parte utilizada nas comunidades, na forma de chá ou por maceração. No caso, *A. nitidum* e *A. marcgravianum* são usadas para o tratamento de doenças do estômago e do fígado, sendo comum a indicação para a profilaxia e o tratamento da malária (HIDALGO, 2003). Vários autores descrevem que a planta é reconhecida ainda como contraceptiva se tomada regularmente e abortiva no uso abusivo; além disso, é citado o uso para inflamações do útero e ovário e em afecções que, na concepção popular, são localizadas no fígado, tais como anemia e malária (OLIVEIRA *et al*, 2009; PEREIRA *et al*, 2007; RIBEIRO *et al*, 1999). Um estudo realizado por Pereira *et al* (2006), avaliou a atividade antinociceptiva do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum* no teste da formalina, no reflexo de retirada da cauda (“tail-flick”), na performance motora (“rota-rod”) e no edema induzido por carragenina, sugerindo ação anti-inflamatória e antinociceptiva, sem a participação do sistema opioidérgico.

In vitro, os extratos de folhas e cascas do caule de *A. ramiflorum* (guatambu) mostraram atividade antibacteriana contra *E. coli* (AGRIPINO *et al*, 2004). O extrato metanólico e ramiflorinas isoladas de *A. ramiflorum* inibiram o crescimento de *Bacillus*

subtilis e *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA, 1999; TANAKA *et al*, 2006), e apresentaram atividade antifúngica frente ao *Cryptococcus neoformans* (SOUZA *et al*, 2006). Segundo Ferreira *et al* (2004), o extrato alcaloídico de *A. ramiflorum* é empregado no tratamento de leishmaniose cutânea e foi eficaz contra a forma extracelular (promastigotas) de *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (DL₅₀ <47 mg/mL).

Cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* são utilizadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária (PEREIRA *et al*, 2007). Essa indicação etnofarmacológica está relacionada provavelmente à presença de alcaloides; por exemplo, *A. excelsum* possui 18 alcaloides indólicos entre os quais, a ioimbina, a *N*-acetilaspidospermidina, a excelsinina e a aspexcina (OLIVEIRA *et al*, 2009).

Mesquita e colaboradores (2007), demonstraram em estudo *in vitro* que o extrato etanólico das cascas das raízes de *A. macrocarpon* têm atividade contra uma cepa de *Plasmodium. falciparum* resistente à cloroquina (FcB1). Nesse mesmo estudo, não foram observados efeitos citotóxicos do extrato em células pulmonares embrionárias de humanos (MRC-5) e células de linhagem L-6 de ratos.

Camundongos tratados com injeção intraperitoneal de fração rica em alcaloides da casca da raiz de *A. ulei* (piquiá) apresentaram ereção peniana, o que embasaria o seu uso popular para tratar a disfunção erétil (CAMPOS *et al*, 2006).

A casca de *A. quebracho-blanco* na região andina é utilizada como afrodisíaco e contra febre. Na Argentina, é relatada como sendo antidispneica, antiasmática, cicatrizante, antifebril e também para curar diarreias (DEL VITTO; PETENATTI; PETENATTI, 1997). No Brasil, é utilizada para tratar enfisema, bronquite e pneumonia, bem como impotência, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispneia asmática e cardíaca (AIMI *et al*, 1991). Dessa espécie, foram isolados e identificados cerca de 34 alcaloides, dentre eles a aspidospermina, ativa contra *P. falciparum* resistente à cloroquina, e a ioimbina, bloqueador

α_2 -adrenérgico e vasodilatador, que facilitaria a ereção peniana. Diferentemente da substância pura, o extrato não se mostrou seletivo para receptores α_1 - ou α_2 - adrenérgicos (SPERLING *et al*, 2002).

Aspidosperma é um dos gêneros mais importantes da América do Sul. Neste, predominam os alcaloides indólicos de considerável diversidade estrutural, muitos deles contendo esqueleto β -carbolínico simples, com sistemas tricíclicos de anéis pirido-indólicos (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980).

Pereira e colaboradores (2007) realizaram levantamento das estruturas dos alcaloides indólicos identificados nas espécies de *Aspidosperma*, sendo possível observar a diversidade estrutural de cerca de 247 alcaloides indólicos isolados neste gênero até 2006. Dentre esses alcaloides podemos exemplificar: a aspidospermina, a olivacina, a ioimbina (Figura 1).

Segundo Bourdy *et al* (2004) uma larga aplicação terapêutica é atribuída aos alcaloides indólicos de espécies de *Aspidosperma*. Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada da relação entre as atividades terapêuticas, e a grande ocorrência de alcaloides indólicos presentes em *Aspidosperma*.

Os alcaloides indólicos, monoterpênicos, conferem um amplo espectro de atividades biológicas às espécies desse gênero, tais como antitumoral, antiplasmódica, antimicrobiana e antibacteriana, em muitos casos consistentes com suas utilizações populares. Dentre estas atividades biológicas, a mais representativa é a citotóxica, que tem sido demonstrada frente a diferentes linhagens de células tumorais (HENRIQUE *et al*, 2010).

Essas diferentes atividades devem-se, aparentemente, à existência de vários sub-tipos de receptores, com diferentes sensibilidades aos vários constituintes (ROBERTS; WINK, 1998).

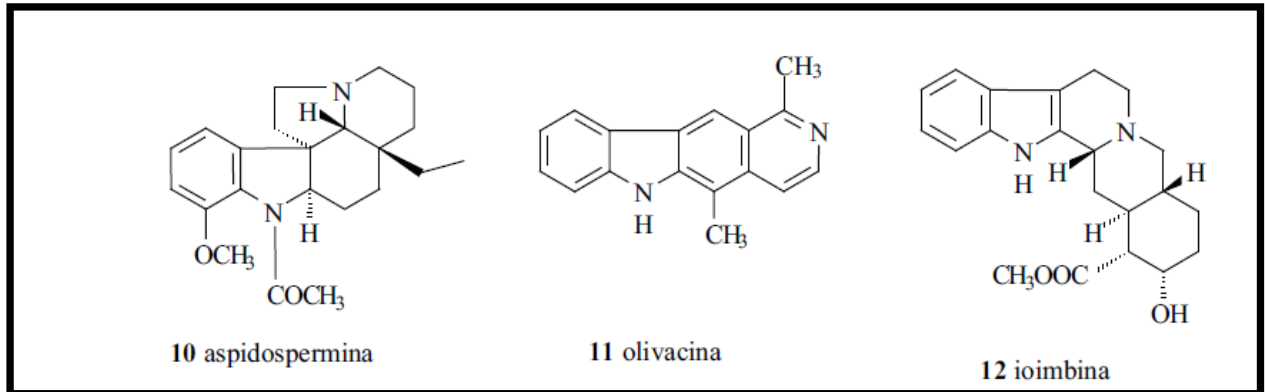


Figura 1: Alcaloides indólicos de *Aspidosperma*.

FONTE: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400022> Acesso em: 04 julho de 2011.

3.1.2.1 *Aspidosperma marcgravianum*

Aspidosperma marcgravianum Woodson é uma Apocynaceae, denominada carapanaúba do baixio (Manaus) e cipoal (Amazonas). É uma árvore de até 60 m de altura, da mata primária de terra firme de solo argiloso ou raramente argilo-silicoso e úmido. Possui tronco lamelado e casca escamosa com cerca de 3 mm de espessura. Floresce de agosto a outubro e frutifica de fevereiro a março. Tem como área de dispersão o Amazonas, Pará, Suriname e Bolívia (ALBUQUERQUE, 1971; AÑEZ, 2009).

A. marcgravianum possui indicações populares para o tratamento da malária, diabetes e câncer, da qual são utilizadas a madeira e as cascas (DUKE; VASQUEZ, 1994; RIBEIRO *et al*, 1999). De *A. marcgravianum* já são conhecidos cerca de 50 alcaloides indólicos dos tipos: aspidospermina, aspidoscarpina, limaspermina, aspidoalbina, aspidospermatidina, elipticina-olivacina, heteroioimbano, picrafilina, ioimbano, aspidodasicarpina, secodina, secamina, antirina, geissoschizol, isositsiriquina, sitsiriquina, corinanteol, deplancheína, oclorifuanina, usambarensina e razinilam (MARQUES, 1988; PEREIRA *et al*, 2007; ROBERT *et al*, 1983). Segundo alguns autores, a atividade antimicrobiana da planta contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*

(BARBOSA *et al*, 2003; VERPOORTE; PUIGROK; BERARHEIM, 1982), e a atividade letal frente às larvas de *Artemia franciscana* observadas em extratos metanólico e aquoso da casca de *A. marcgravianum* na concentração de 500 µg/mL seriam devido à presença de alcaloides indólicos (QUIQNARD *et al*, 2003).

3.2 Junção neuromuscular

Os músculos esqueléticos são os órgãos efetores do sistema locomotor e estão sob controle voluntário, embora grande parte de sua atividade seja regulada subconscientemente. Músculo esquelético e músculo cardíaco são descritos como músculos estriados. Esta aparência resulta do arranjo ordenado e regular dos elementos subcelulares contráteis. O estímulo para a contração muscular esquelética é sempre derivado de um impulso nervoso através da inervação motora (motoneurônio) (HOPKINS, 2006).

Nas membranas das células nervosas e musculares, a propagação do potencial de ação está relacionada à presença de canais de Na^+ e K^+ dependentes de voltagem. Estes canais são proteínas de membrana com seletividade iônica diferente. A despolarização de natureza elétrica ou química da membrana modifica a conformação alostérica do canal de sódio (ativação), levando à sua abertura e ao influxo de Na^+ por 1-2 ms. A despolarização continuada produzida pelo influxo crescente de Na^+ é acompanhada pela modificação alostérica do canal que ao redor de -60 mV é inativado, isto é, não é mais permeável ao Na^+ . O influxo cessa, mas a despolarização aumenta até a carga de Na^+ ser compensada com a saída de K^+ da membrana celular, isto é, os canais são modificados alostericamente permitindo o efluxo acelerado do íon. Com este mecanismo, a membrana é rapidamente repolarizada mesmo que os íons sódio não tenham sido extruídos da célula (para revisão ver ALLEN; LAMB; WESTERBLAD, 2008; CARTER; BEAN, 2009; LAUNIKONIS;

STEPHENSON; FRIEDRICH, 2009). Para cada fibra muscular há uma junção neuromuscular situada próxima ao centro desta; o potencial de ação propaga-se em direção às extremidades, e desta forma, é possível que ocorra a contração simultânea de todos os sarcômeros. A despolarização da membrana iniciada nas células musculares pelo estímulo nervoso é conduzida para o interior da fibra muscular através de túbulos T (FILL; COPPELO, 2002). Os túbulos T estão organizados de forma perpendicular ao Retículo Sarcoplasmático e às miofibrilas, formando uma rede transversal e reticulada no interior da fibra muscular. Na membrana dos túbulos T são encontrados os receptores di-hidropiridínicos (DHPR), que atuam como sensores de voltagem. Internamente, o retículo sarcoplasmático está relacionado com o armazenamento intracelular de íons cálcio, com sua liberação através de canais específicos denominados receptores de rianodina (RyR) e com sua recaptação por meio de uma Ca^{+2} -ATPase acumulado (BALOG, 2010).

A contração muscular é um processo que depende da concentração de Ca^{+2} livre no citoplasma e que, no músculo estriado, é regulada principalmente pelo retículo sarcoplasmático (RS); o RS é um sistema de membranas intracelulares que envolve cada miofibrila, com a forma de uma cisterna cheia de cálcio. O RS do músculo esquelético é composto por duas regiões morfológica e funcionalmente distintas: o RS juncional e o RS longitudinal. A membrana do RS juncional contém receptores de rianodina (RyR), que são canais de Ca^{+2} com projeções que interagem com receptores de dihidropiridina (DHPR) na região juncional dos túbulos T. O túbulo T e duas cisternas do RS formam as tríades, envolvidas na transmissão do estímulo excitatório da membrana para o RS, promovendo a liberação do Ca^{+2} neles armazenado (FILL; COPPELO, 2002). Os túbulos longitudinais do RS que envolve as miofibrilas possui o transportador Ca^{+2} -ATPase como principal componente de membrana. As cisternas contém proteínas de ligação de Ca^{+2} (calsequestrina, calreticulina,

proteínas de alta afinidade de ligação de Ca^{+2} etc.) que podem servir como locais de armazenamento para o Ca^{+2} acumulado (BERRIDGE, 2002; MARTONOSI; PIKULA, 2003).

3.2.1 Acoplamento Excitação-Contração no músculo esquelético

O acoplamento excitação-contração envolve o receptor de di-hidropiridina na membrana da fibra muscular e o receptor de rianodina na cisterna do retículo sarcoplasmático. Os mecanismos moleculares de acoplamento excitação-contração diferem entre os músculos cardíacos e esqueléticos. No músculo esquelético, o potencial de ação gerado no motoneurônio leva à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem no terminal nervoso e ao influxo de Ca^{+2} para o meio intracelular (para revisão ver BALOG, 2010; HOPKINS, 2006).

O aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} provoca a exocitose de acetilcolina (ACh) contida nas vesículas sinápticas. A ACh liberada na fenda sináptica interage com o receptor nicotínico pós-juncional, abrindo o canal do receptor ao influxo de Na^{+} e pequeno efluxo de K^{+} que leva à despolarização localizada da membrana pós-juncional. Ao atingir o limiar de excitabilidade da fibra muscular, a despolarização origina o potencial de ação no sarcolema que se propaga por toda a fibra a despolarização origina o potencial de ação no sarcolema que se propaga por toda a fibra muscular (JURKAT-ROTT; LEHMANN-HORN, 2005).

Na preparação estimulada diretamente com pulsos transmurais (estimulação direta), o potencial de ação independe da liberação de ACh do terminal nervoso. Nos dois casos, o potencial de ação propaga aos túbulos transversos da membrana (túbulos T), ativa canais de cálcio diidropiridínicos (DHPRs) da tríade, que ativam os receptores de rianodina (RyR) liberando Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS). O Ca^{+2} liberado no citosol liga-se à

troponina C ativando o complexo actina-miosina, levando à contração (para revisão ver BANNISTER; BEAM, 2009; BERRIDGE, 2002; FILL; COPELLO, 2002). Ao final do potencial de ação, o Ca^{2+} livre no citoplasma ativa a Ca^{2+} -ATPase do RS (SERCA1), que promove a recaptação do Ca^{2+} contra um gradiente de concentração e às custas da energia resultante da hidrólise do ATP. A retirada e diminuição do Ca^{2+} livre no citoplasma possibilita a dissociação dos íons cálcio da troponina C e a consequente desativação das pontes cruzadas, levando ao relaxamento e a quiescência muscular (para revisão ver DULHUNTY *et al*, 2002; ESSIN, GOLLASCH, 2009; MARTONOSI; PIKULA, 2003). A inibição da SERCA1 pode potenciar a contração muscular.

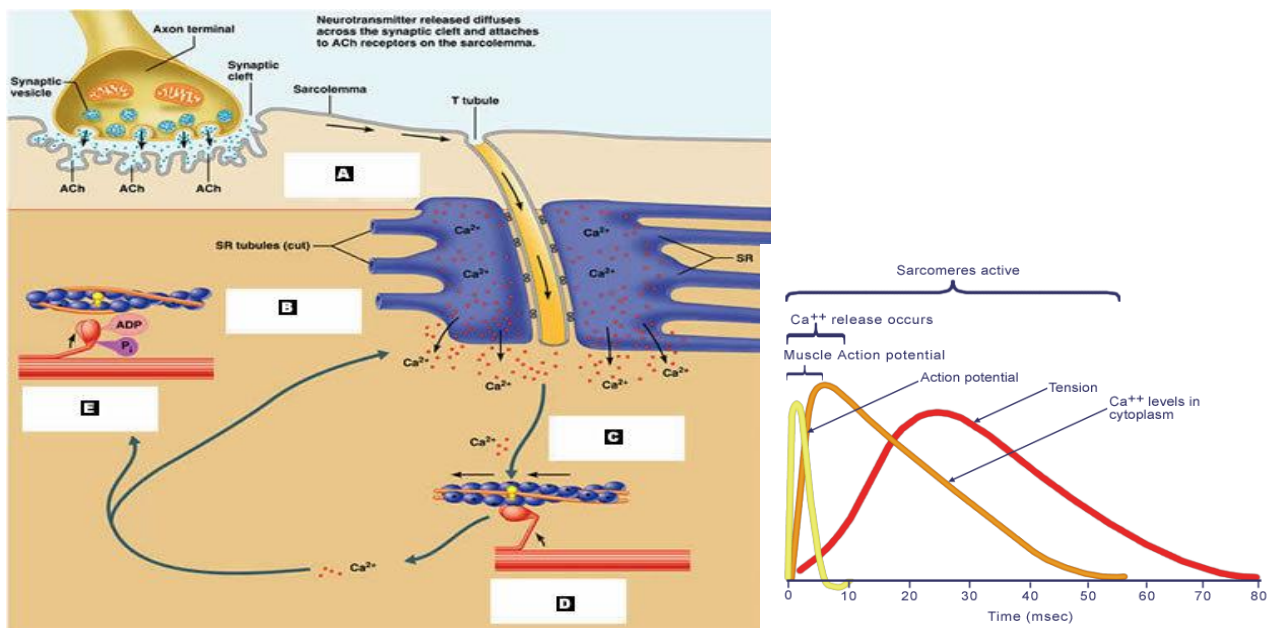


Figura 2: Acoplamento excitação-contracção do músculo esquelético. A fibra muscular é excitada via nervo motor pela placa terminal e gera o potencial de ação que se propaga ao longo da superfície da membrana (sarcolema), penetrando pelo sistema tubular transverso. A proteína di-hidropiridina (DHP), um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

Disponível em: http://wps.aw.com/bc_marieb_haplace_7_oa/42/10966/2807550.cw/index.html.

Acesso em 30 de maio de 2012.

3.3 Acoplamento excitação-contração no músculo cardíaco

No músculo cardíaco, as células do tecido nodal têm potencial diastólico de -60 mV, enquanto as células do miocárdio contrátil são polarizadas a -85 mV. Portanto, a ativação das células do marcapasso atrial não depende do influxo de Na^+ ; o potencial de ação dessas células é dependente de influxo de Ca^{2+} por canais seletivos ativados pela despolarização (tipo L). Como as células do miocárdio contrátil apresentam potencial de repouso elevado, o potencial de ação ativado pela despolarização originada nas células do marcapasso tem um componente inicial rápido (ativação dos canais de Na^+), um componente lento (ativação dos canais de cálcio) responsável pela manutenção da despolarização celular durante 200 a 250 ms que torna a célula inexcitável a novos estímulos (período refratário). O aumento da concentração de Ca^{+2} citoplasmático é responsável pela ativação de canais específicos de K^+ (canais de K^+ ativados por Ca^{+2}) que aceleram a repolarização do miocárdio finalizando o período refratário (para revisão ver BERS, 2002).

O mecanismo pelo qual o potencial de ação na membrana plasmática da fibra muscular cardíaca desencadeia a contração, é semelhante, mas não é idêntico ao do músculo esquelético. O potencial de ação cardíaco varia na sua configuração em diferentes partes do coração. Existe entretanto, um platô de centenas de milissegundos de duração após a despolarização rápida inicial. A membrana plasmática nos túbulos T contém numerosos canais de cálcio do tipo L sensíveis à voltagem, que se abrem durante o platô e permitem o influxo de Ca^{2+} extracelular para o interior da célula, porém não em quantidades suficientes para ativar diretamente a contração. É este cálcio do meio extracelular que em seguida atua sobre o RyR (de tipo molecular diferente do encontrado no músculo esquelético) para liberar Ca^{2+} do retículo sarcoplásmico, produzindo uma onda secundária e muito maior de Ca^{2+} (CICR, *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*) que por sua vez, provoca a contração (sístole). Como os

próprios RyR do músculo cardíaco são ativados pelo Ca^{2+} , a onda de Ca^{2+} intracelular é um evento regenerativo de tudo-nada. A entrada inicial de Ca^{2+} que deflagra esse evento é altamente dependente dos canais do tipo L da membrana (BERRIDGE; BOOTMAN; LLEWELYN, 2003; PROVEN *et al*, 2006).

Assim, ao contrário do músculo esquelético, no músculo cardíaco existe uma amplificação da liberação de cálcio desencadeada pela entrada inicial de cálcio extracelular por meio de canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Por conseguinte, a força de contração do músculo cardíaco é dependente da presença e da concentração de cálcio extracelular, diferente do músculo esquelético onde a contração é iniciada e mantida inteiramente pelo cálcio liberado do retículo sarcoplasmático. Em contraste com o músculo esquelético, onde a excitação da membrana produz sempre saturação da troponina, no músculo cardíaco, o cálcio liberado para o citosol não é geralmente suficiente para envolver todos os sítios de troponina. Por conseguinte, nem todas as pontes cruzadas são necessariamente ativadas, e a força de contração do músculo cardíaco é regulada, em grande parte, pela concentração de cálcio (extracelular e citosólica).

No platô do potencial de ação, com ativação dos canais de potássio ativados por cálcio, o potencial de membrana move-se em direção à hiperpolarização, o influxo de cálcio cessa e os íons livres são recaptados para o retículo sarcoplasmático ou transferidos para o espaço extracelular, levando ao relaxamento (diástole) (Figura 3) (BERS, 2002).

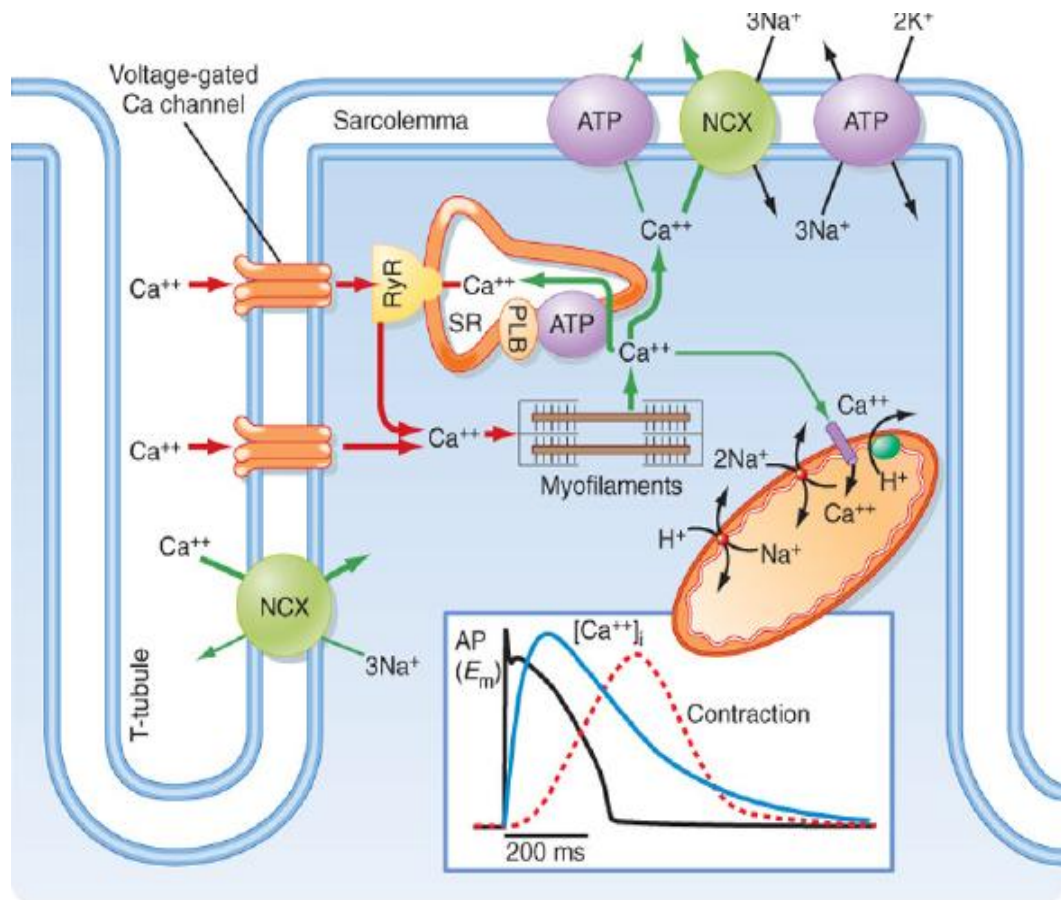


Figura 3: Acoplamento excitação-contracção cardíaco. O potencial de acção proveniente de células adjacentes chega aos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes abrem-se e o influxo de cálcio induz à liberação de mais Ca^{2+} pelos receptores de rianodina (RyR) do RS; a liberação local de Ca^{2+} induz a liberação de mais Ca^{2+} que liga-se à troponina para iniciar a contracção; relaxamento ocorre quando o Ca^{2+} desliga-se da troponina. Ao final, o Ca^{2+} é recaptado para o retículo sarcoplasmático pela Ca^{2+} -ATPase (adaptada de BERS, 2002).

4 MATERIAL

4.1 Material vegetal

Cascas de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke, km 26 da rodovia AM-010 Manaus-Itacoatiara, nas coordenadas: S 02° 55'53.0'' e W 059° 58'24.3'', em 29 de agosto de 2010 (Figura 4). O indivíduo escolhido para coleta faz parte do Projeto Flora da Reserva Ducke, encontra-se marcado no local com o número 3064 (Figura 5 e 6) e foi identificado como *Aspidosperma marcgravianum* Woodson por comparação com a exsicata de número 180516 que encontra-se depositada ao acervo do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Para os ensaios farmacológicos, cascas do caule foram secas à temperatura ambiente, pulverizadas (moinho DPM – 500/1/2/4) e o pó obtido foi armazenado em saco plástico, ao abrigo da luz e da umidade.

4.2 Animais

Nos ensaios farmacológicos foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) com peso entre 200 – 250 g e camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, entre 30 – 40 g, machos ou fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, mantidos sob condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), iluminação (ciclo de 12 horas) e com livre acesso à ração e água.

Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo os Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de Animais (GILES, 1987) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFAM (protocolo nº 058/2011 – CEEA).

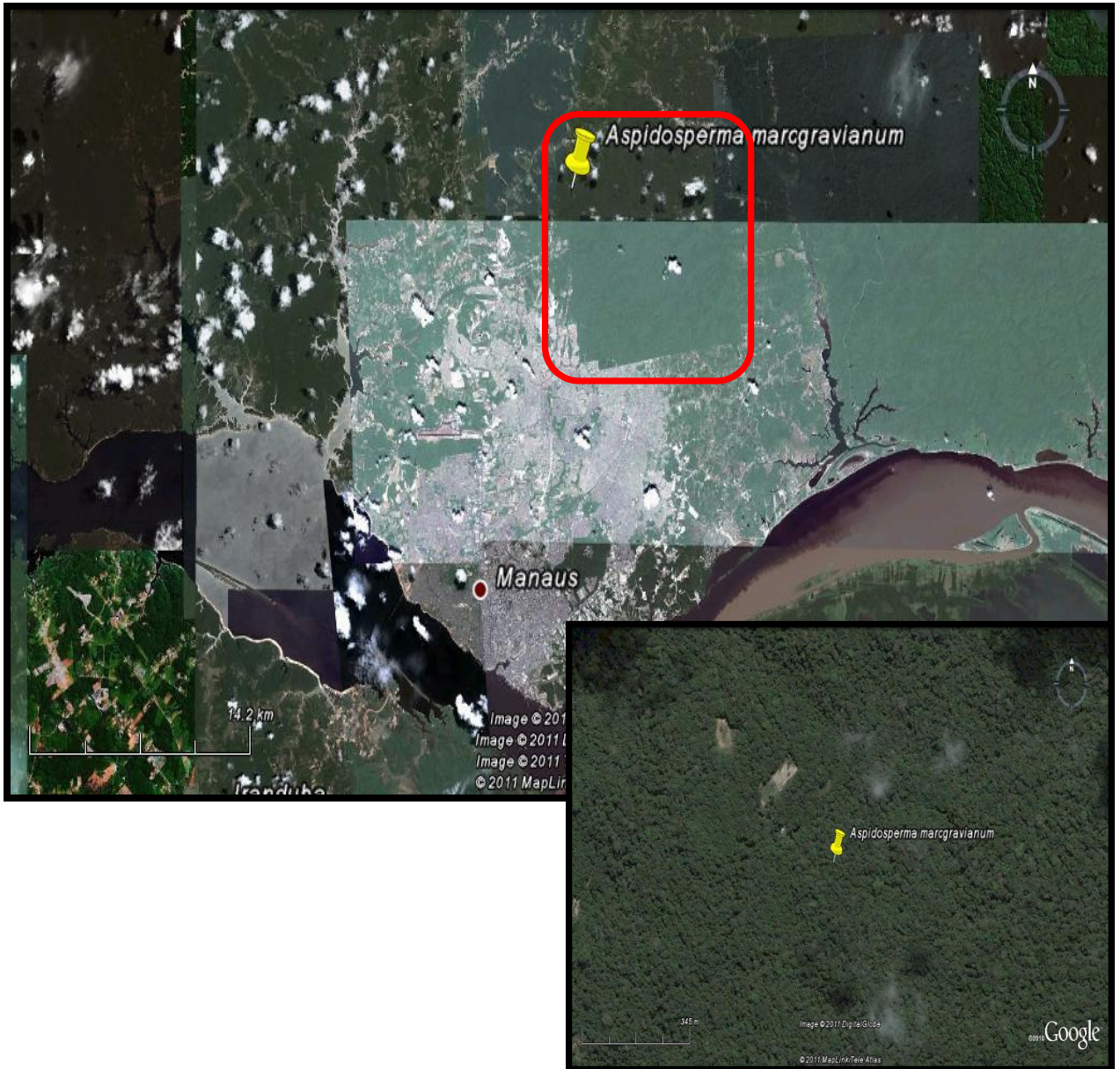


Figura 4: Área da coleta de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson na Reserva Adolpho Ducke, km 26 da rodovia AM-010 Manaus-Itacoatiara, AM, nas coordenadas: S 02° 55'53.0'' e W 059° 58'24.3''.

FONTE: Google earth 6.0.3. 2197



Figura 5: *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Carapanaúba).

Foto: VILHENA, M. C. P. 2009



Figura 6: *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Carapanaúba). **(A)** Tronco acanalado e fenestrado, ausência de látex no tronco; ritidoma escamoso, desprendendo em pequenas placas. **(B)** Detalhe da árvore etiquetada com número 3064 **(C)** Folhas coriáceas com a face inferior densamente papilosa (esbranquiçada a olho nu).

Foto: VILHENA, M. C. P. 2009

4.3 Material Químico

4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais

✓ Acetona P.A (Nuclear-Brasil), acetonitrila grau HPLC (Merck-Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear-Brasil), ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), água para CLAE, ácido ascórbico P.A (Vetec-Brasil), ácido bórico P.A (Synth-Brasil), ácido tricloroacético P.A (Synth-Brasil), ácido sulfúrico P.A (Nuclear-Brasil), albumina de soro bovino, bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), colagenase tipo IA, coluna CLAE, clorofórmio P.A (Nuclear-Brasil), cloreto de sódio P.A (Merck-Brasil), cloreto de potássio P.A (Vetec-Brasil), cloreto de magnésio P.A (Merck-Brasil), etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), EDTA (Fluka-Brasil), EGTA (Chemical-USA), ficol (Sigma-Brasil), glicose P.A (C.P.Q), hidróxido de sódio P.A (Reagen-Brasil), hidróxido de amônio P.A (ECIBRA-Brasil), iodeto de potássio P.A (Sigma-Brasil), metanol P.A (Nuclear-Brasil), molibdato de amônio (Reagen-Brasil), placas cromatográficas, pré-coluna CLAE, sacarose P.A (Queel-Brasil), soro de cavalo, soro fetal bovino; subnitrito de bismuto (Nuclear-Brasil), tris-maleato (Sigma-Brasil), trietilamina

4.3.2 Drogas

Acetilcolina (Sigma-Brasil), ATP (Sigma-Brasil), d-tubocurarina (Sigma-Brasil), estreptomicina, ionóforo A23187 (Sigma-Brasil), tapsigargina (Sigma-EUA), metacolina (Sigma-Brasil), noradrenalina (Sigma), probenecida (Sigma), penicilina, verapamil.

4.3.3 Soluções e Reagentes

As soluções nutritivas e reagentes foram preparados imediatamente antes dos experimentos e o pH foi controlado.

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

✓ **Líquido Nutritivo LNV:** NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO₃ 15 mM; NaH₂PO₄ 0,4 mM; glicose 5,5 mM; CaCl₂ 1,8 mM.

✓ **Reagente de Dragendorff:** Solução A (composta de 0,85 g de subnitrato de bismuto dissolvido em 50 mL de uma solução de ácido acético 20 %) e Solução B (composta por 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água destilada). A solução para pulverização foi composta pela mistura de 5 mL da solução A e 5 mL da solução B diluída em 20 mL de ácido acético, sendo o volume completo para 100 mL com água destilada.

✓ **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.

✓ **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, ATP 5 mM.

✓ **Soluções para a extração de Ca²⁺-ATPase de músculo esquelético**

Solução I: MOPS 10 mM, sacarose 10 %, EDTA 0,1 mM, pH 7,0 (1 L).

Solução II: MOPS 10 mM, KCl 0,6 mM, pH 7,0 (0,5 L).

Solução III: MOPS 10 mM, sacarose 30 %, pH 7,0 (0,5 L).

✓ **Tampão para dosagem de proteína:** Tris/HCl 100 mM; pH 7,4; trizma base 12,1 g; HCl 6 N; EDTA 200 mM (PM = 327,2) pH 8,0.

- ✓ **Reagente de Bradford:** Coomassie Brilliant Blue 0,01 %; etanol 4,7 % e ácido fosfórico 8,5 %.
- ✓ **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
- ✓ **D-MEM (mg/L):** Gibco Life Technologies: CaCl₂ 200; Fe (NO₃)₃ 0,1; KCl 400; MgSO₄ 7H₂O 200; NaCl 6400; NaH₂PO₄ 125; NaHCO₃ 3700; L-arginina HCl 84; L-cistina 62570; L-glutamina 548; glicina 30; L-histamina HCl H₂O 42; L-isoleucina 105; L-lisina HCl 146; L-metionina 30; L-fenilefrina 66; L-serina 42; L-treonina 95; L-triptofano 16; L-tirosina 104,2; L-valina 94; pantotenato de cálcio 4; ácido fólico 4; inositol 7200; nicotinamida 4; piridoxal HCl 4; riboflavina 0,4; tiamina HCl 4; glicose 1000; piruvato de sódio 110; vermelho de fenol 15. Foram adicionados gentamicina 40; cloreto de colina 4; D-glucose 3500.

5 MÉTODOS

5.1 Obtenção do extrato etanólico (EETOH)

Cascas de *A. marcgravianum* fresco (4 kg) foram secas à sombra em temperatura ambiente e moídas em moinho DPM – 500/1/2/4 no Núcleo de Produção de Extratos do Centro de Biotecnologia da Amazônia, obtendo-se 2,2 kg de pó da casca, que foi armazenado em saco plástico fechado, ao abrigo da luz e da umidade.

Foram realizadas duas extrações para obtenção do extrato etanólico (EETOH) de *A. marcgravianum* a partir do pó das cascas (280 g) e etanol absoluto (1,4L) em Soxhlet até exaustão, filtrado, concentrado em rota evaporador (RE47 –Yamato) a 50 °C até a secura, ressuspenso em água destilada e qsp de etanol e liofilizado (Modelo Modulayo – ThermoFischer). O EETOH teve rendimento de 3% (10,21 g).

5.1.1 Obtenção da Fração Alcaloides Totais (FAT)

Para obtenção da FAT foram realizadas mais seis extrações etanólicas (total de 840 g) em Soxhlet do pó das cascas de *A. marcgravianum*. O EETOH de *A. marcgravianum* foi concentrado até a secura, posteriormente suspenso em 200 mL de clorofórmio e fracionamento por partição com porções de 200 mL de água acidificada com HCl (pH 3,0), por três vezes. Em seguida, a fração aquosa foi alcalinizada (pH 10) com hidróxido de amônio e fracionada por partição com porções de 200 mL de clorofórmio, por cinco vezes. A fração clorofórmica foi extraída com água acidificada (pH 3,0) por 5 vezes. A fração aquosa obtida foi concentrada e liofilizada, dando origem à fração rica em alcaloides (FAT), a qual foi submetida aos ensaios laboratoriais visando determinar os possíveis efeitos farmacológicos e os mecanismos de ação desses efeitos. As frações intermediárias foram descartadas após

análise por CCD e revelação com reagente de Dragendorff por não apresentarem alcalóides (Figura 7).

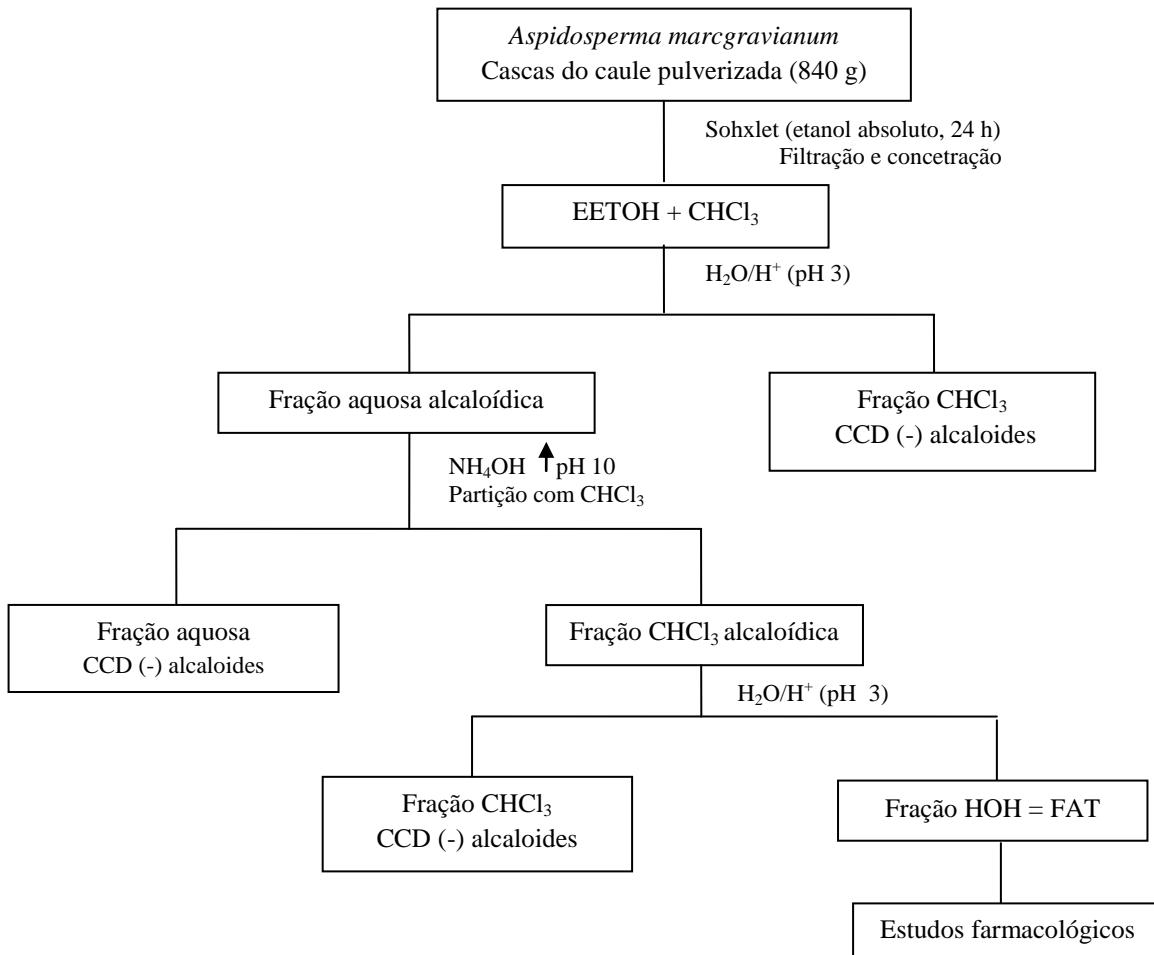


Figura 7: Fluxograma de obtenção da Fração Alcaloides Totais

5.1.2 Obtenção da Fração Clorofórmica (FCHCl_3)

Foram realizadas três extrações etanólicas (420 g de pó das cascas e 2,1 L de etanol absoluto) em Soxhlet até a exaustão; os extratos assim obtidos foram reunidos. O extrato total foi filtrado, concentrado em rota evaporador (RE47 –Yamato) a 50 °C até securo, suspenso em clorofórmio e particionado com água acidificada (pH 3,0). A fração aquosa foi

alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 10 e extraída com clorofórmio, dando origem à fração clorofômica alcaloídica (FCHCl₃) que teve rendimento de 1,07% em relação ao material inicial.

5.1.3 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) Merck. A FAT e frações semi-purificadas foram eluídas em butanol : ácido acético : água (4 : 2 : 1). As placas foram reveladas com lâmpada de UV 254 nm e 330 nm e reagente de Dragendorff.

5.1.4 Semi-purificação da FCHCl₃ de *Aspidosperma marcgravianum* por cromatografia em coluna (CC) de sílica

A FCHCl₃ foi semi-purificada por cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica gel (Sigma, 70 a 230 *mesh*) como fase estacionária. A coluna foi eluída com gradiente crescente de metanol em clorofórmio, sendo coletadas 76 frações de aproximadamente 20 mL cada (Figura 8).

As frações foram concentradas e submetidas à análise qualitativa por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reunidas por similaridade com rendimento relativo ao material original: F₁₃₋₂₃ 0,1%, F₂₄₋₃₂ 0,014%, F₃₃₋₄₃ 0,03 %, F₄₄₋₅₄ 0,01 %, F₅₅₋₇₃ 0,013% e F₇₄₋₇₆ 0,004% (Figura 9).

As F₁ a F₁₂ foram reunidas, reservadas e não foram testadas devido ao baixo rendimento e ausência de alcaloides quando analisadas por CCD e reveladas com reagente Dragendorff.



Figura 8: Purificação da FCHCl_3 de *A. marcgravianum* por cromatografia em coluna (CC) em sílica gel e eluição com gradiente crescente de metanol em clorofórmio, coletando-se 76 frações de 20 mL cada.

Foto: VILHENA, M. C. P. 2009

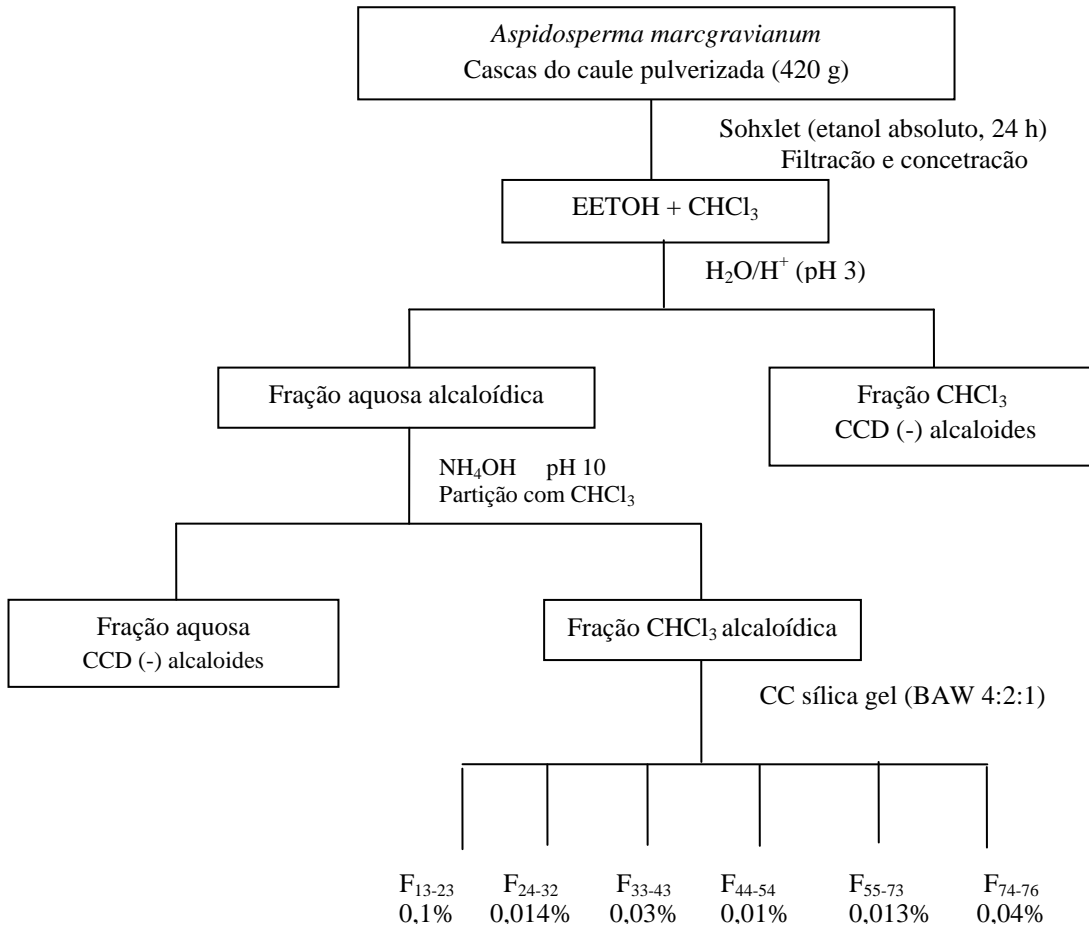


Figura 9: Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações semi-purificadas de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson.

5.1.5 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

A padronização da fração alcaloides totais (FAT) de *Aspidosperma marcgravianum* Woodson em CLAE foram realizadas pela Dra. Mirtes Midori Tanae.

O sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) era 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.

Para a padronização, a fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila de 8 a 50% em 30 min, em coluna analítica C18 (25,0 x 0,46 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 1,0 mL/min.

Para a análise comparativa, a fase móvel consistiu de gradiente crescente de água/trietilamina 2 mM em acetonitrila, em coluna analítica C18 (25,0 x 0,46 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm fluxo constante de 0,6 mL/min e λ 280 nm.

Todas as amostras foram dissolvidas em água/acetonitrila 10%, filtradas em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 20 µL.

5.2 Métodos farmacológicos para avaliação da atividade do extrato etanólico (EETOH) e Fração alcaloides totais (FAT) de *Aspidosperma marcgravianum*

Todos os testes foram realizados seguindo os métodos e padronização descritos no livro “Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais” (LAPA *et al.*, 2008), com as devidas adaptações.

5.2.1 Teste geral de Atividade farmacológica

Os testes gerais da atividade farmacológica foram realizados em camundongos machos adultos, em 2 animais para cada teste. Os animais foram tratados com o extrato etanólico (EETOH) da casca de *A. marcgravianum* (1,0 g/kg, v.o.) e o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg, v.o.). Dois animais foram tratados com a fração alcaloides totais (100, 300 e 1000 mg/kg v.o.). Os animais foram colocados em caixas-moradia e utilizando manobras padronizadas, foram observados em intervalos de tempos de 30 min, 1, 2, 3 e 24 horas após os tratamentos. O resultado das observações foi condensado em tabela de efeitos adaptada a partir da original publicada por Malone; Robichaud (1962) (ver IRWIN, 1964).

5.3 Avaliação da ação da FAT de *Aspidospema marcgravianum* na junção neuromuscular esquelética

5.3.1 Avaliação da atividade da FAT na capacidade contrátil do músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente

Ratos machos adultos anestesiados superficialmente com éter foram sacrificados por deslocamento cervical. Após exsanguinamento do animal pela aorta abdominal, o gradeado costal foi aberto e o nervo frênico esquerdo, identificado abaixo do coração, foi seccionado na altura do timo e dissecado ao longo dos vasos da base e borda cardíaca até sua inserção no diafragma. Evitando-se trações e ressecamento do nervo, o conjunto neuromuscular foi transferido para placa de Petri contendo líquido nutritivo de Tyrode para a dissecação fina e colocação das amarras nas costelas, no centro tendíneo e no nervo frênico.

O conjunto nervo frênico/músculo diafragma foi posicionado verticalmente em uma cuba de vidro com capacidade para 10 mL, contendo líquido nutritivo de Tyrode a 30 °C aerado constantemente com carbogênio (O₂ 95 % CO₂ 5 %). Para o registro das contrações isométricas da preparação, a amarra costal foi fixada a uma haste de vidro mergulhada dentro da cuba e a amarra tendínea a um transdutor de força PowerLab (ADInstruments), conectado a um computador e operado pelo software Chart Pro 5. O nervo foi introduzido em um eletrodo bipolar de platina e estimulado com pulsos de 0,5 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima liberados por um estimulador Grass S88.

As contrações por estimulação direta do diafragma foram obtidas com pulsos de 2 ms de duração, frequência de 0,2 Hz e voltagem supramáxima, na presença de d-tubocurarina 10⁻⁵ M, um antagonista competitivo não despolarizante, bloqueador de receptores nicotínicos na junção da placa neuromuscular. Após estabilização da preparação, a FAT (10, 30 e 100 µg/mL) foi incubada e as contrações obtidas comparadas àquelas obtidas antes da incubação. Somente uma concentração foi testada por preparação muscular.

5.4 Avaliação do efeito da FAT de *A. marcgravianum* na atividade da enzima Ca⁺²-ATPase de mamífero

5.4.1 Isolamento da Ca⁺²-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.

5.4.2 Determinação do teor de proteína

A concentração de proteínas das amostras membranares foi determinada pelo método de Bradford (1976). O método baseia-se na mudança da coloração vermelha do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250, presente no reagente de Bradford, para coloração azul após sua ligação à proteína das amostras. O complexo proteína–corante tem alto coeficiente de extinção, o que permite uma medida precisa da quantidade de proteína das amostras. O ensaio foi feito em triplicata, incubando-se as amostras com reagente de Bradford. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu) a 595 nm. A concentração de proteína (3,32 mg/mL) foi determinada por interpolação da curva padrão obtida com albumina de soro bovino.

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

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

5.5 Avaliação da atividade da FAT e das frações (F_{13-23} , F_{24-32} , F_{33-43} , F_{44-54} , F_{55-73} , F_{74-76}) de *A. marcgravianum* na fusão tetânica da contração do músculo diafragma de rato estimulado com pulsos elétricos aplicados diretamente na musculatura

Ratos machos adultos anestesiados superficialmente com éter foram mortos por deslocamento cervical. O diafragma foi removido como citado anteriormente e montado em cuba de vidro de 5 mL. As contrações foram obtidas com estímulos aplicados através de um eletrodo bipolar de platina imerso na cuba. Estímulos com pulsos de duração de 2 ms, diferentes frequências (1, 2, 5, 10, 20, 30 e 50 Hz, durante 8 a 12 s cada) e voltagem

supramáxima, foram aplicados na preparação a intervalos de 3 min, em sequência fixa. Estabilizada a resposta da preparação, nova sequência de estímulos foi realizada na ausência (controle) e na presença da FAT (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) ou das frações F₁₃₋₂₃, F₂₄₋₃₂, F₃₃₋₄₃, F₄₄₋₅₄, F₅₅₋₇₃, F₇₄₋₇₆ (1 µg/mL), incubadas 15 min antes. O tônus observado após 10s de estímulos e a tensão máxima obtidos na presença da FAT foram comparados às sequências de respostas antes da incubação das frações testadas (controle). Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.5.1 Análise Estatística

Para comparação entre os grupos experimentais formados foi utilizada ANOVA de 2 vias, de medidas repetidas, seguida por pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os valores foram expressos em média e erro padrão da média. O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0,05$), em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas pelo programa estatístico Graphpad Prisma® (versão 5.0).

5.6 Avaliação da ação cardiovascular da FAT de *Aspidosperma marcgraviaum*

5.6.1 Avaliação da ação da FAT no átrio de rato

Ratos foram anestesiados superficialmente com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. O coração foi retirado rapidamente após toracotomia, e os átrios direito e esquerdo foram isolados. O átrio direito, como apresenta batimentos espontâneos, foi utilizado para verificar *in vitro* a ação da FAT na frequência do marcapasso. No entanto, a preparação não

foi utilizada para investigar ação inotrópica da FAT porque como a força de contração é dependente e inversamente proporcional à frequência cardíaca, o cronotropismo desta preparação, poderia mascarar efeitos exercidos na força de contração atrial.

O átrio esquerdo, ao contrário, não mostra atividade rítmica própria que indicou seu uso para o estudo dos efeitos da FAT no inotropismo cardíaco. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode, a 35 °C, aerado com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂), e ligada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g, acoplado a um sistema de registro e análise PowerLab (ADInstruments), conectado a um computador e operado pelo software Chart Pro 5. A contração muscular foi estimulada por pulsos transmuralis supramáximos com duração de 2 ms e frequência de 1 Hz. Nessas condições, a FAT foi incubada nas concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL, registrando-se os seus efeitos até estabilização da resposta contrátil. Somente uma concentração foi testada por preparação.

5.6.1.1 Análise Estatística

Para comparação entre os grupos experimentais foi utilizada ANOVA de duas vias seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$) em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico Graphpad Prisma® (versão 5.0).

5.6.2 Cultura de músculo cardíaco de rato

Ratos recém-nascidos (1 dia de vida) machos ou fêmeas foram mortos por inalação de gás carbônico; a cavidade torácica foi aberta e o coração retirado. Após dissecação em solução

de HBSS, o músculo cardíaco ventricular foi picado com tesoura fina durante 20 min e incubado por 1 h em solução com colagenase, CaCl₂ e albumina bovina a 37 °C e 5% CO₂. Após o período de incubação, as células foram homogeneizadas com pipeta Pasteur de ponta fina, centrifugadas (2500 rpm, 5 min, 23 °C) e o sobrenadante desprezado. A colagenase foi lavada das células por ressuspensão e centrifugação sucessivas em HBSS, nas mesmas condições anteriores. Foram adicionados às células 10 mL de meio de cultivo D-MEM, acrescido de 10% de soro de cavalo, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de 10 µm. As células do filtrado foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de $0,4 \times 10^6$ células em placas de 35 mm cobertas com colágeno. No terceiro dia pós-plaqueamento, o meio de cultivo foi trocado para D-MEM acrescido de 10% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As culturas foram mantidas em incubadora a 37 °C, 5% CO₂, trocando-se o meio de cultura em dias alternados até a confluência das células (quinto dia de cultura) e utilizadas após 6 a 7 dias de cultivo.

5.6.3 Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria em células de cardiomiócitos 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 em cultura foram plaqueados nas microplacas 24 h antes do experimento na densidade de 40.000 células/poço, e incubados a 37 °C. Decorridas 24 h, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 100 µL da mistura: *loading buffer* (Fura-4) + probenecida + HBSS. Após 50 min de incubação a 37 °C, foram adicionados 10 µL da FAT (10, 30 e 100 µg/mL) ou do controle positivo verapamil (100 µM), em triplicata. As placas foram incubadas

por mais 10 min e em seguida lidas em leitor de placas FlexStation[®] (Molecular Devices) com λ_{ex} 494 nm e λ_{em} 525 nm. Os resultados foram expressos pelas diferenças entre as fluorescências máxima e mínima (Δ RFU) obtidas durante 3 min de leitura/poço, a partir da pipetagem de KCl 70 mM.

6 RESULTADOS

6.1 Obtenção do extrato etanólico (EETOH) e Fração Alcaloides Totais (FAT) de *Aspidosperma marcgravianum*

O EETOH foi obtido por exaustão em aparelho de Soxhlet. Após filtração e concentração em rota evaporador, o EETOH concentrado foi extraído com clorofórmio em diferentes pH, obtendo-se a fração alcaloides totais (FAT). Os rendimentos foram de 3% para o EETOH e 0,1% para a FAT.

6.1.1 Cromatografia em Camada Delgada

As placas cromatográficas obtidas em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) Merck, utilizando butanol : ácido acético : água (BAW) (4 : 2 : 1) como fase móvel, após revelação com reagente de Dragendorff (revelador para identificar alcaloides) o EETOH apresentou 4 manchas principais com Rf: 0,36; 0,47; 0,53 e 0,60 e a FAT apresentou 3 manchas com Rf: 0,48; 0,55; 0,62 (Figura 10).

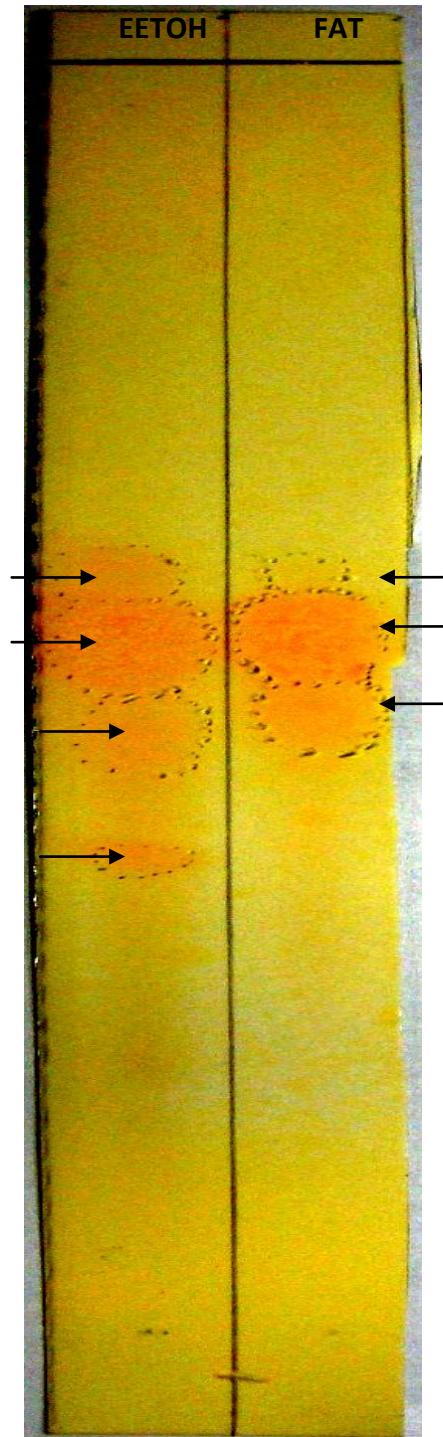


Figura 10: Cromatografia em camada delgada do EETOH e da fração de alcaloides totais de *Aspidosperma marcgravianum*, utilizando cromatofolhas de sílica gel, fase móvel BAW (4 : 2 : 1) e revelação com reagente de Dragendorff.

Foto: VILHENA, M. C. P. 2011

6.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)

A padronização cromatográfica da FAT apresentou 11 picos principais com tempos de retenção em 3,5; 4,9; 14,9; 15,2; 15,9; 16,4; 17,3; 20,9; 21,9; 23,6 e 26,9 min, representando 1,8; 1,3; 7,6; 6,7; 6,8; 4,7; 3,4; 2,7; 2,7; 13,3 e 5,3 % do total do cromatograma, respectivamente (Figura 11).

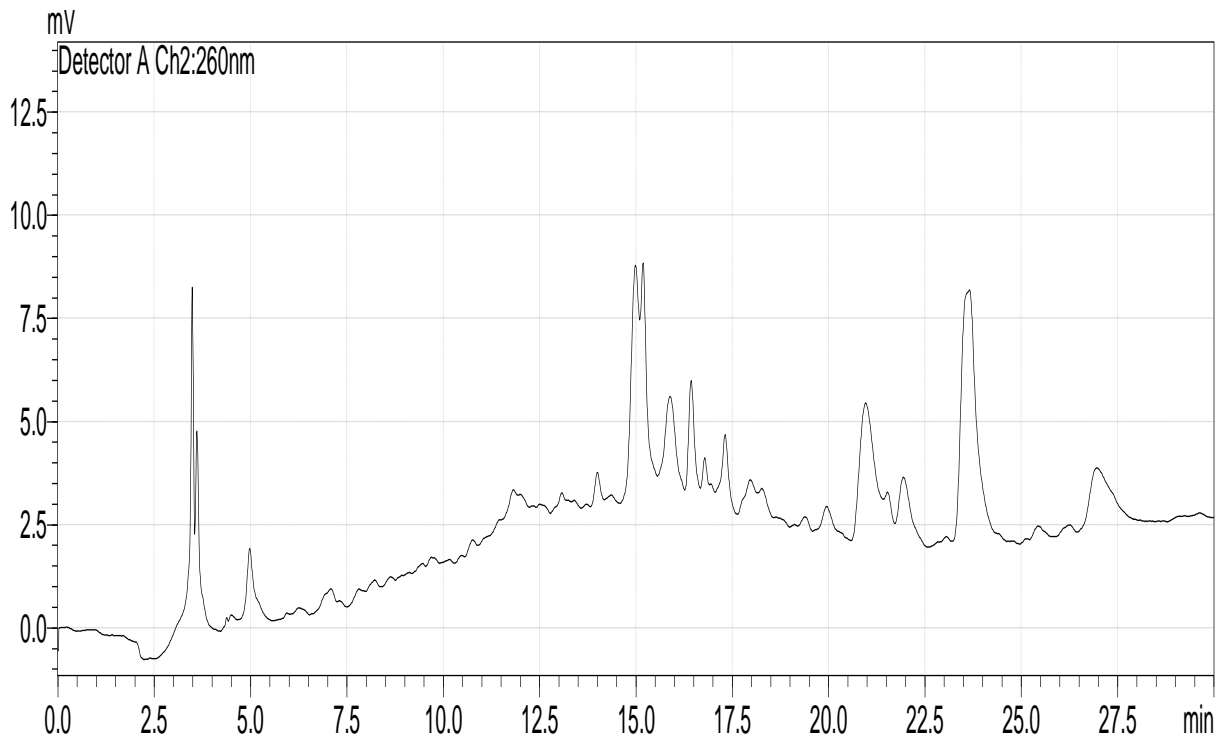


Figura 11: Perfil cromatográfico da FAT de *Aspidospermum marcgravianum* em CLAE utilizando coluna C18, eluída com gradiente de água/acetonitrila de 8 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e λ 260 nm.

FONTE: TANAE, M. M

6.2 Efeito do extrato etanólico (EETOH) de *A. marcgravianum* (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin)

Após 1 h do tratamento com o EETOH por via oral, os animais apresentaram ptose palpebral leve, diminuição discreta da força e da deambulação, respiração forçada nas primeiras 3 h e completa recuperação após 24 h. Os animais tratados com FAT (0,3 e 1,0 g/kg) por via oral apresentaram abdução e paralisia das patas posteriores e consequente diminuição da deambulação e perda de força. Apresentaram ainda, piloereção, respiração forçada e ptose palpebral após 30 min do tratamento, com completa recuperação após 3 h. Um animal tratado com a dose de 300 mg/kg da FAT morreu após 20 min e os tratados com a dose de 1 g/kg morreram após 10 min do tratamento.

6.3 Efeito da fração alcaloides totais de *A. marcgravianum* (FAT) na junção neuromuscular

6.3.1 Efeito da FAT de *A. marcgravianum* em músculo diafragma de rato estimulado direta e indiretamente

A incubação da FAT de *A. marcgravianum* na maior concentração testada (100 µg/mL) potenciou em 20% a contração do diafragma obtida por estímulo direto (0,2 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima, a 30 °C) das fibras musculares, na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M). O efeito foi reversível mesmo na presença da droga. As menores concentrações de FAT (10 e 30 µg/mL) não produziram qualquer alteração (Figura 12).

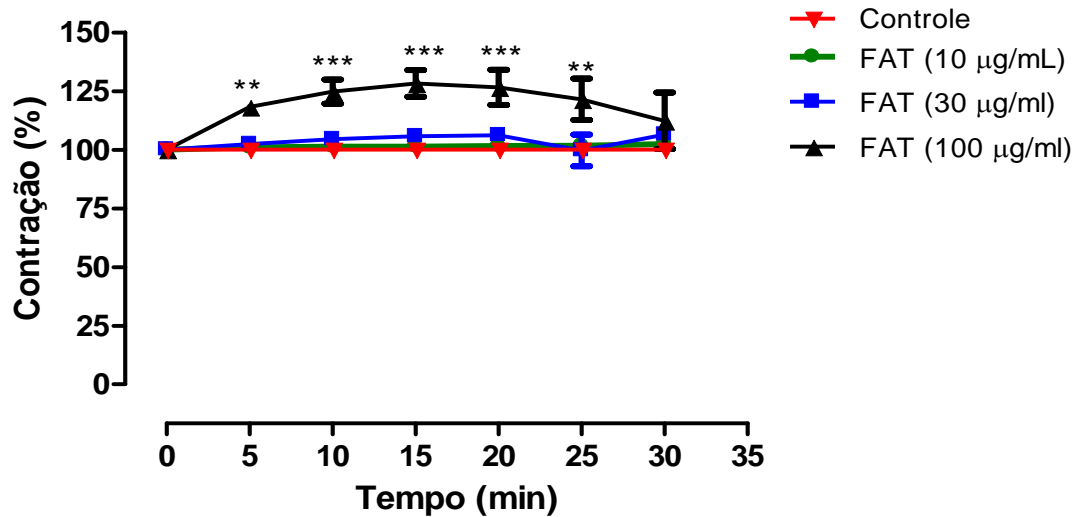


Figura 12: Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (10, 30 e 100 µg/mL) na contração do diafragma de rato sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Dados expressos como médias \pm erro padrão (n= 4 animais) comparados à contração antes da incubação da FAT. *p < 0,05. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

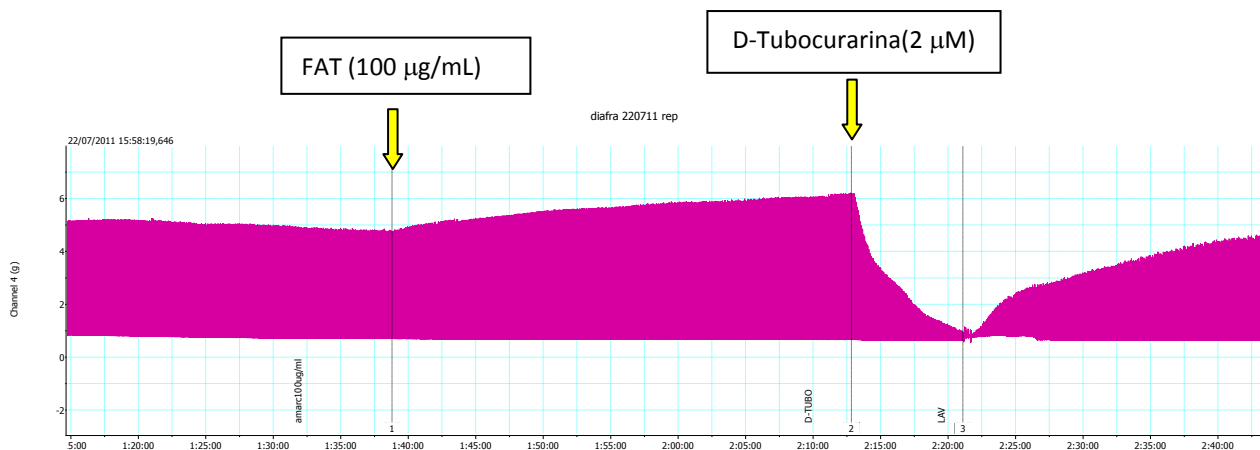


Figura 13: Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo a 30°C. Contrações obtidas com estímulo indireto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Registro miográfico representativo do efeito da FAT (100 µg/mL) de *A. marcgravianum* durante 30 min de incubação. A contração foi bloqueada com d-tubocurarina 2 µM sem lavar a preparação

A incubação da FAT de *A. marcgravianum* 100 µg/mL potenciou a contração do diafragma obtida por estímulo indireto (0,2 Hz, 0,5 ms, voltagem supra máxima, a 30 °C) em $24,7 \pm 5,1$ %; $28,2 \pm 5,7$ %; $26,6 \pm 7,5$ %; $21,5 \pm 8,8$ % após 10, 15, 20 e 25 min, respectivamente. As contrações voltaram ao nível basal após aproximadamente 30 min de incubação, indicando uma ação secundária da FAT inibitória da contração, que também foi observada com a estimulação direta da preparação (Figura 13 e 14).

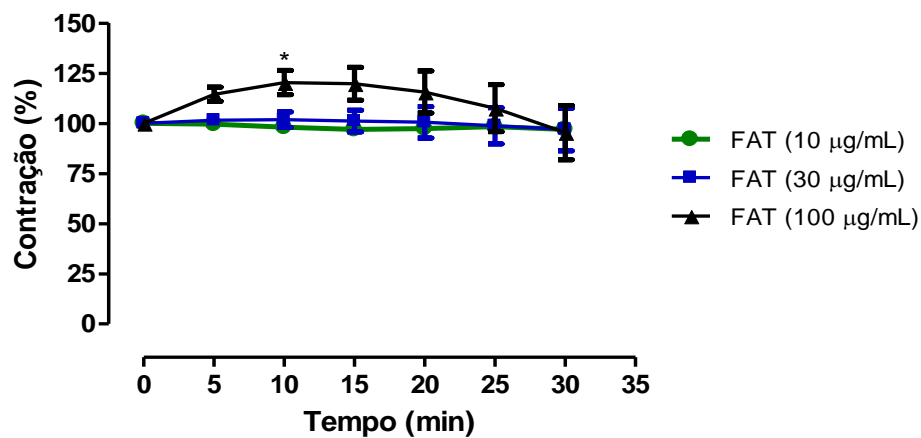


Figura14: Efeito da fração alcaloide total (FAT) de *A. marcgravianum* (10, 30 e 100 µg/mL) na contração do diafragma de rato sob estímulo indireto (0,2 Hz, 0,5 ms e voltagem supramáxima). Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4 animais) comparados ao controle (ausência da FAT). **p < 0,01 e *** p < 0,001. ANOVA ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

6.4 Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *Aspidosperma marcgravianum* na atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase

A FAT de *A. marcgravianum* (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não interferiu na atividade da Ca^{+2} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho. A thapsigargina (0,01 a 1 μM), utilizada como controle positivo, inibiu a atividade da enzima com $\text{IC}_{50} = 0,18 \mu\text{M}$ (Figura 15).

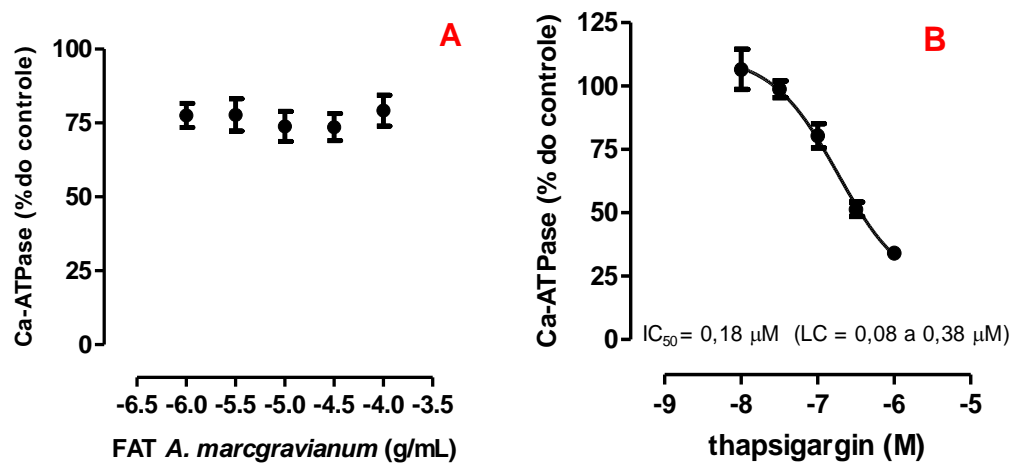


Figura 15: (A) Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na atividade da enzima Ca^{+2} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho. (B) Efeito da thapsigargina (controle positivo) na atividade da Ca^{+2} -ATPase. Os símbolos e barras representam as médias \pm erro padrão ($n = 3$, em triplicata).

6.5 Efeito da FAT e das frações semi-purificadas na fusão tetânica da contração do músculo diafragma de rato estimulado com pulsos elétricos aplicados diretamente na musculatura

A incubação da FAT de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) reduziu significativamente a resposta máxima da contração do diafragma, principalmente nas concentrações de 30 e 100 µg/mL quando aplicadas a músculos estimulados em frequência a partir de 10 Hz (Figura 16 e 17).

Na mesma preparação, a incubação da FAT de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) impediu a manutenção do tônus após 10s do diafragma estimulado diretamente de forma concentração-dependente. Quando aplicados os primeiros estímulos no músculo até a frequência de 10 Hz, a FAT (1 a 10 µg/mL) não produziu diferença significativa na manutenção do tônus após 10s, comparativamente ao controle antes da incubação, mas a partir de 10 Hz inibiu a fusão tetânica proporcionalmente à concentração (Figura 16 e 18). Na presença de FAT 30 µg/mL, 30% da contração inicial foi bloqueada e o tétano não foi mantido (Figura 16).

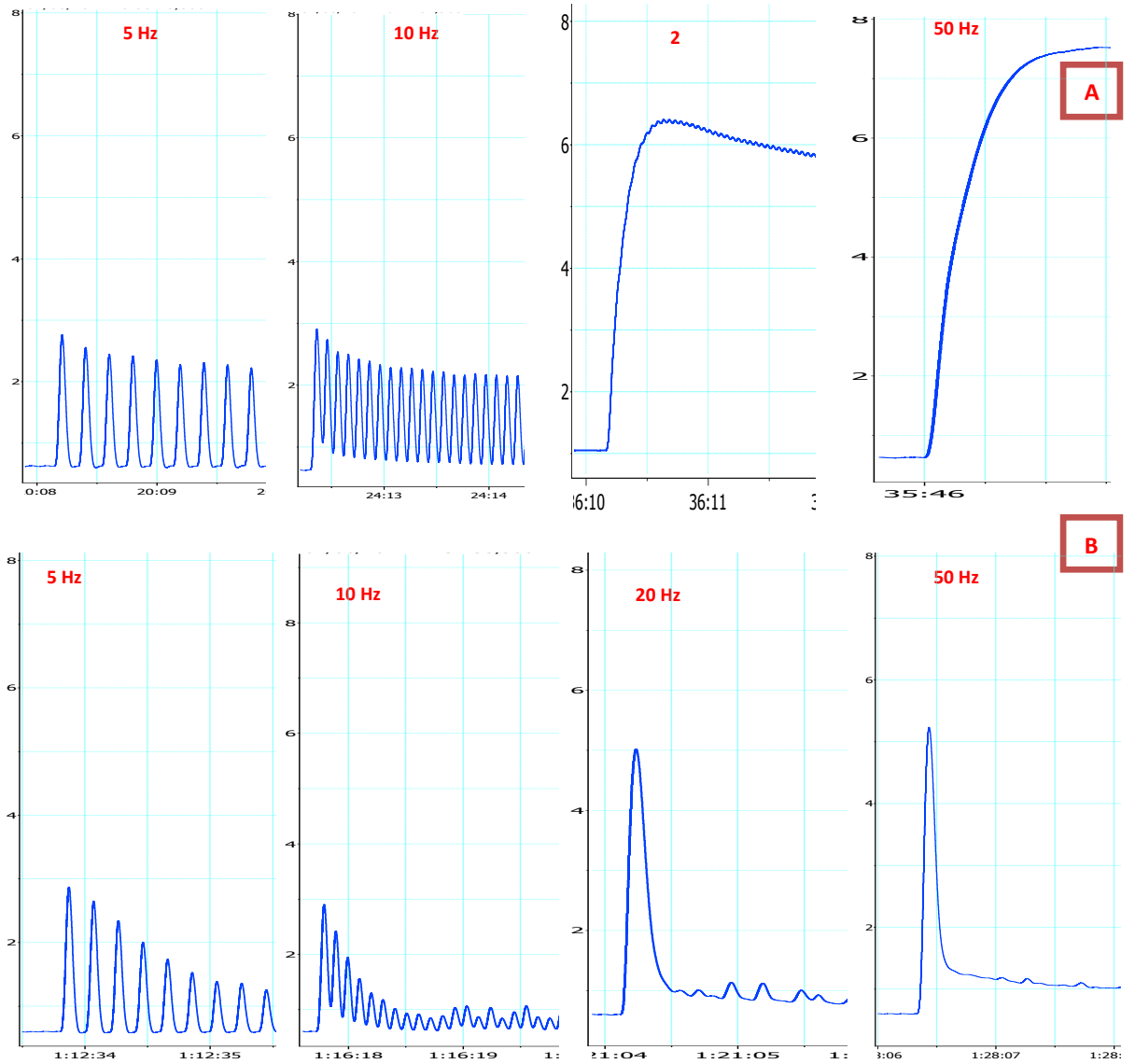


Figura 16: Registro de contração em diafragma de rato sob estímulo direto (frequência 5, 10, 20 e 50 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima), a 30 °C na primeira contração e na fusão de tétano. **(A)** controle antes da incubação da fração alcaloides totais (FAT) e **(B)** na presença da FAT de *A. marcgravianum* (30 µg/mL).

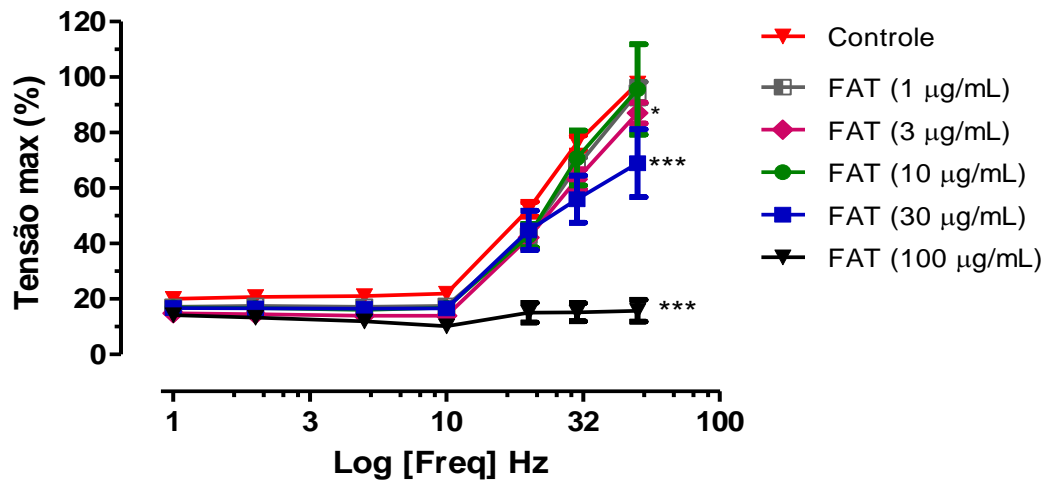


Figura 17: Efeito da fração alcaloide total (FAT) de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) na tensão máxima da contração do diafragma de rato sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz [log da frequência], 2 ms e voltagem supra máxima). Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle (ausência da FAT). *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

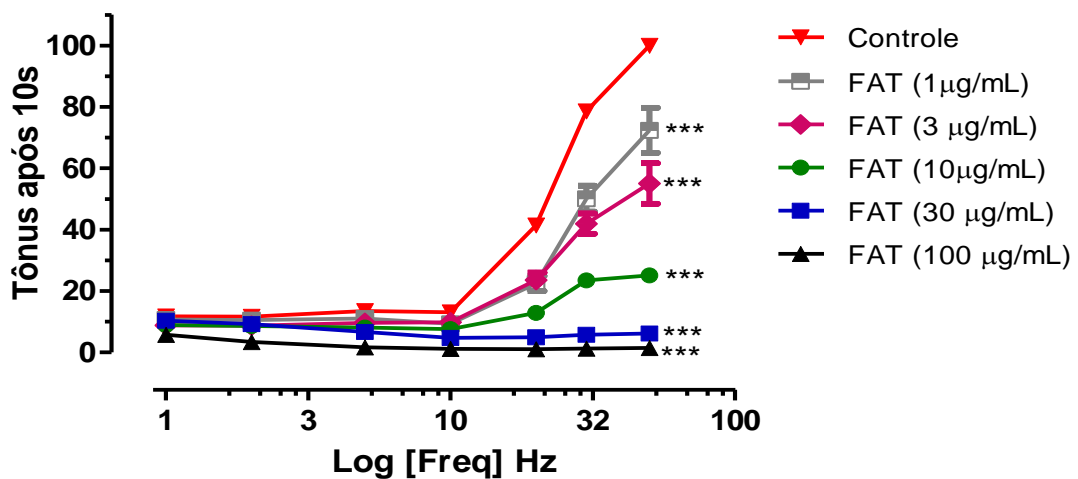


Figura 18: Efeito da fração alcaloide total (FAT) de *A. marcgravianum* (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) na manutenção do tônus após 10s da contração do diafragma de rato sob estímulo direto (diferentes frequências 1-50 Hz, 2 ms e voltagem supra máxima). Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4), comparados ao controle (ausência da FAT). *** p < 0,001. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

A incubação da fração semi-purificada F₁₃₋₂₃ (1 µg/mL) reduziu em aproximadamente 40% o tônus mantido após 10s de estimulação a 50 Hz. Na mesma preparação, a F₁₃₋₂₃ (1 µg/mL) reduziu em 17 % a tensão máxima do tétano produzido por estimulação a 20 Hz. A fração F₂₄₋₃₂ reduziu o tônus muscular em 20% e a tensão máxima do tétano não foi mantida com estímulos de 10 Hz. De maneira similar, a incubação das frações F₅₅₋₇₃ e F₇₄₋₇₆ (1 µg/mL) reduziu o tônus e a tensão máxima do tétano produzido por estímulos aplicados com frequências a partir de 10 Hz. As frações F₃₃₋₄₃ e F₄₄₋₅₄ (1 µg/mL) não reduziram significativamente o tônus muscular mantido após 10 s de estimulação a 20 Hz, mas diminuíram a tensão máxima do tétano (Figura 19 e 20).

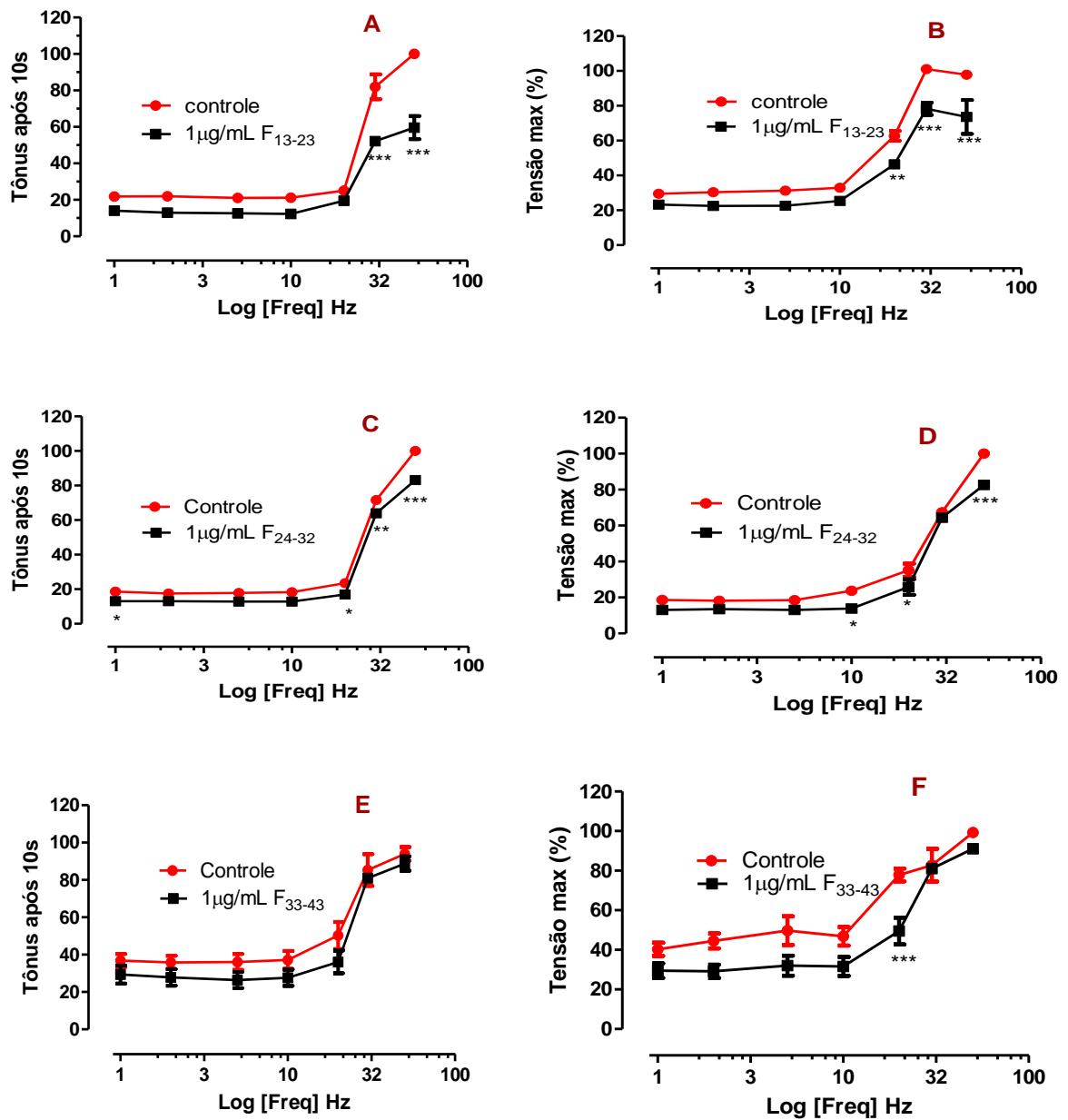


Figura 19: A, C e E - Efeitos das frações semi-purificadas F₁₃₋₂₃, F₂₄₋₃₂ e F₃₃₋₄₃ de *A. marcgravianum* (1 µg/mL), respectivamente, na manutenção do tônus tetânico do diafragma de rato após 10 s de estimulação direta supramáxima com frequências de 1 a 50 Hz. B, D e F - efeitos na tensão tetânica máxima com a mesma estimulação. Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle antes da incubação das frações. *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

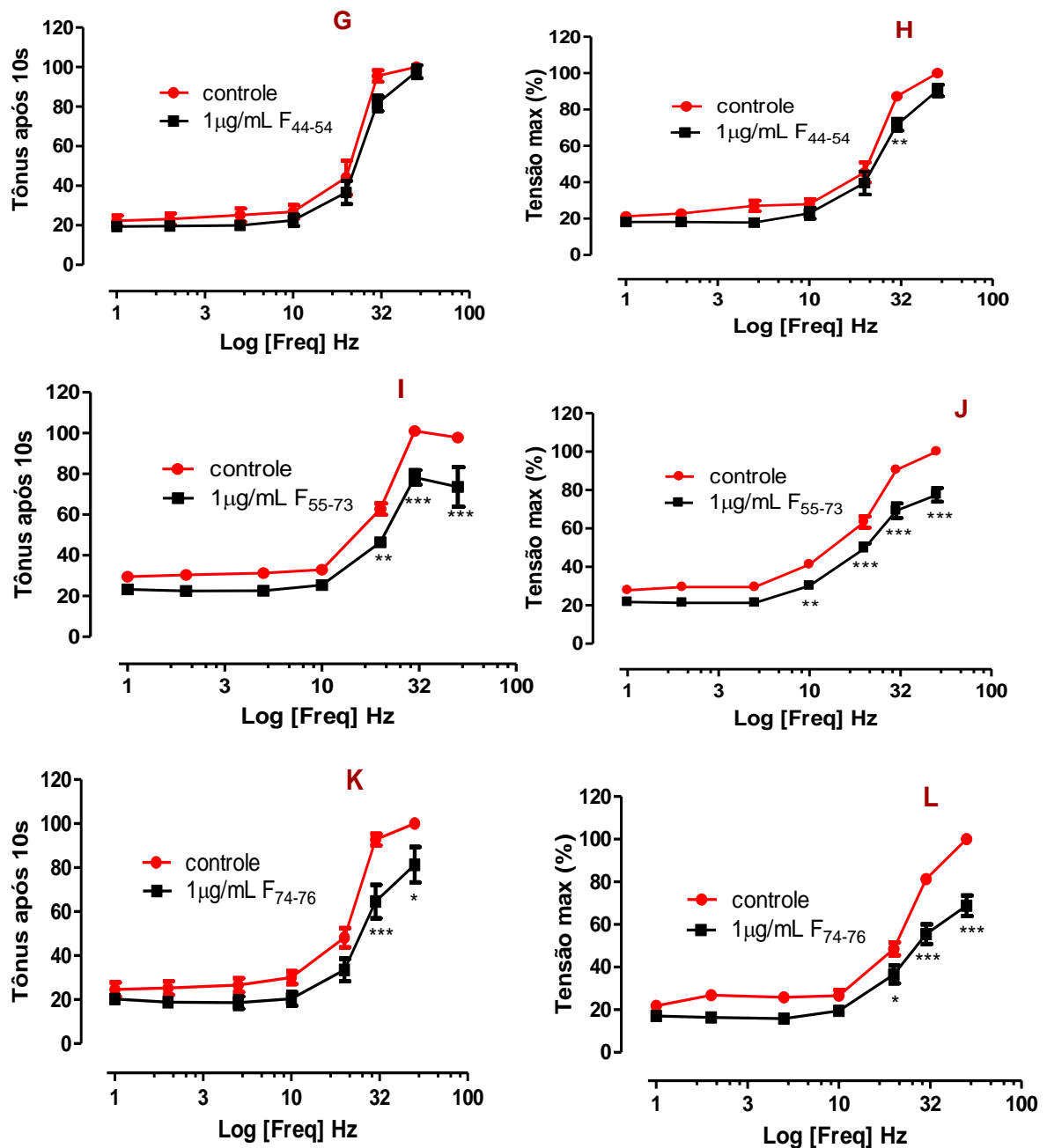


Figura 20: G, I e K - Efeitos das frações semi-purificadas F₄₄₋₅₄, F₅₅₋₇₃ e F₇₄₋₇₆ de *A. marcgravianum* (1 µg/mL), respectivamente, na manutenção do tônus tetânico do diafragma de rato após 10 s de estimulação direta supramáxima com frequências de 1 a 50 Hz. J, H e K - Efeitos na tensão tetânica máxima com a mesma estimulação. Os valores representam as médias ± erro padrão da porcentagem da contração máxima basal (n= 4) comparados ao controle antes da incubação das frações. *p < 0,05 e *** p < 0,001. ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni.

6.6 Efeito da fração alcaloides totais de *A. marcgravianum* (FAT) na atividade cardiovascular

6.6.1 Efeito da FAT de *A. marcgravianum* (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na frequência de batimentos do átrio direito de rato

Após 30 minutos de estabilização a 35 °C, o átrio direito de rato apresentou batimentos espontâneos com frequência variando de 210 a 240 bpm, no tempo zero.

A incubação da FAT 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu o cronotropismo do átrio direito nas concentrações testadas em 31,6 %; 58,2 % e 74,3 %, após 30 minutos de incubação respectivamente. Este efeito foi concentração e tempo dependente (Figura 21).

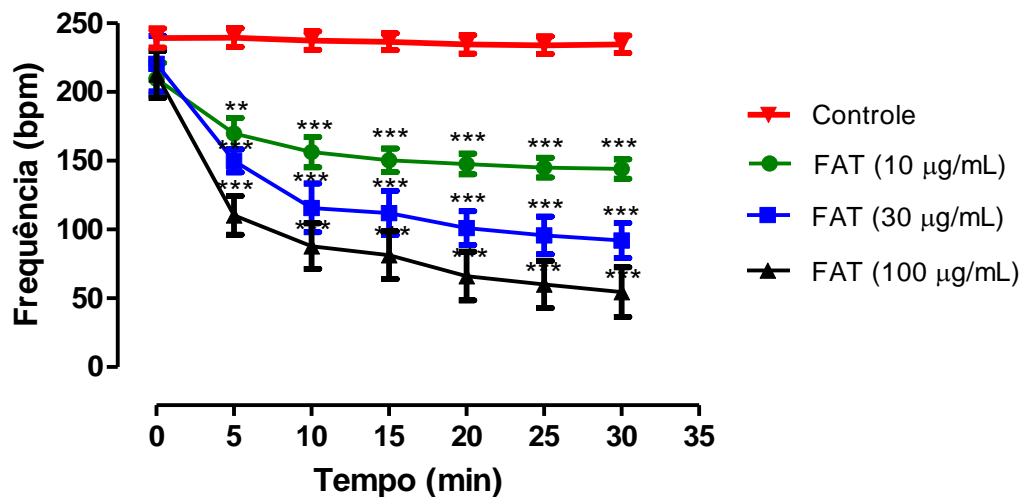


Figura 21: Efeito da FAT (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) de *A. marcgravianum* na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. bpm = batimentos por minuto. Dados expressos como médias \pm erro padrão (n = 5) comparados ao controle (ausência da FAT) (ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni). **p < 0,01 e *** p < 0,001.

6.6.2 Efeito da fração alcaloides totais (FAT) de *A. marcgravianum* (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) na força de contração do átrio esquerdo de rato

Em átrio esquerdo de rato estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima, a 35 °C), a FAT 10 $\mu\text{g/mL}$ não alterou a força de contração do músculo cardíaco; a FAT 30 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a força de contração em 11,6 % durante todo o tempo de observação. Na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), a FAT aumentou a força de contração nos primeiros 5 minutos de incubação. A partir de 5 min a força de contração atrial foi diminuída proporcionalmente ao tempo de incubação da FAT. Após 30 min, houve uma redução de 64,8 %, comparativamente aos valores basais antes da incubação. Este último efeito foi tempo e concentração dependentes (Figura 22).

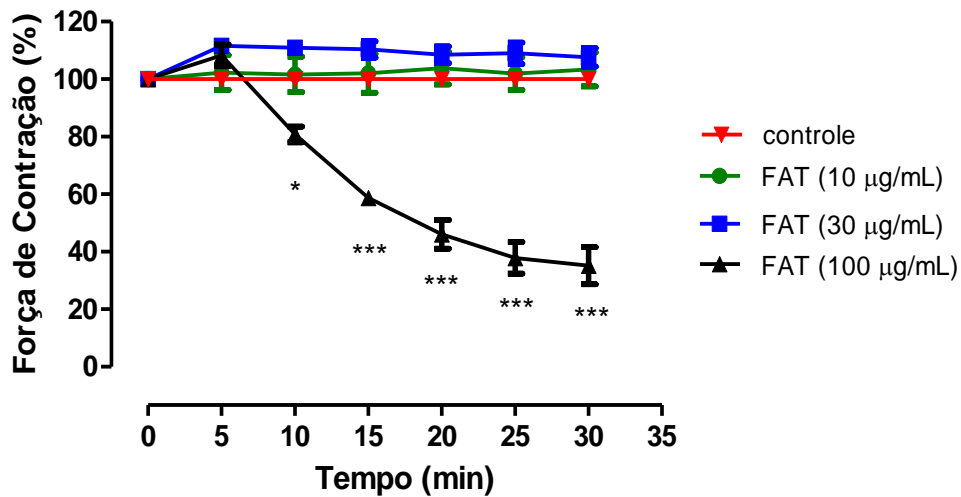


Figura 22: Efeito da FAT (10 a 100 $\mu\text{g/mL}$) de *A. marcgravianum* na contração do átrio esquerdo isolado de rato estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima), a 35 °C. Dados expressos como médias \pm erro padrão (n = 6) comparados ao controle (ausência da FAT) (ANOVA duas-vias e pós-teste de Bonferroni). * $p < 0,051$ e *** $p < 0,001$.

6.6.3 Efeito da FAT de *A. marcgravianum* na concentração de cálcio citosólico livre em células de cardiomiócitos de rato mantidos em cultura

A incubação da FAT (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) em cultura de cardiomiócitos de rato despolarizados com KCl 70 mM, durante 3 min, não produziu diminuição significativa da fluorescência emitida pelo marcador incorporado previamente às células. O verapamil (100 μM), um bloqueador de canais de cálcio, utilizado como controle positivo, reduziu a fluorescência de 75% (Figura 23).

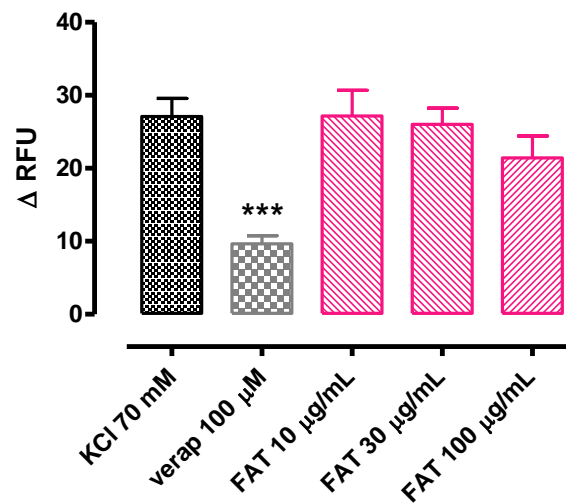


Figura 23: Efeito da FAT de *A. marcgravianum* na concentração de cálcio citosólico livre em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. A concentração de cálcio citoplasmático livre foi medida pela fluorescência emitida pelo marcador FLIPR previamente incorporado às células. Dados expressos como médias \pm erro padrão ($n = 3$, em triplicata). O KCl 70 mM foi utilizado para promover a abertura dos canais de cálcio e o verapamil (100 μM) como controle positivo (ANOVA).

7 DISCUSSÃO

Embora no Brasil existam normas e legislação para garantir a segurança e qualidade dos fitoterápicos, para muitas das plantas utilizadas com este fim, não há registros facilmente disponíveis de suas características macroscópicas, marcadores químicos ou padronização dos extratos da planta. Dessa forma, principalmente para espécies de maior uso na região Amazônica, são necessárias informações que possam fornecer subsídios para a correta identificação e garantia da qualidade, da eficácia e da segurança, princípios fundamentais que definem um medicamento.

Aspidosperma, assim como todas as espécies pertencentes à Apocynaceae, é rico em alcaloides, o que também foi detectado no extrato padrão de *A. marcgravianum* utilizado neste estudo. Assim, os alcaloides indólicos são os constituintes majoritários e quase sempre as substâncias ativas no gênero, o que nos levou à extração etanólica pela forma simples de mimetizar o uso popular. A extração aquosa não foi escolhida, pois referências anteriores mostraram a obtenção do material farmacologicamente ativo em solventes de polaridade intermediária, nesse caso miscíveis com a água, como o etanol, ainda que os extratos obtidos possam conter outros compostos não alcaloídicos (SCHRIPEMA; DAGNINO; GOSMANN, 2010). Na extração das cascas pulverizadas com etanol obteve-se um rendimento de 3%. Posteriormente, os alcaloides totais da planta foram extraídos por semi-purificação alternando o pH em partições repetidas (5 vezes) entre água (pH 3) e clorofórmio. O rendimento final da fração contendo os alcaloides (FAT) foi 0,1%. A revelação das placas de cromatografia do ETOH em camada delgada de sílica-gel com o reagente de Dragendorff confirmou a presença de alcaloides em quatro manchas com Rfs: 0,36; 0,47; 0,53 e 0,60. Nas mesmas condições, a FAT apresentou três manchas visíveis com Rfs: 0,48; 0,55; 0,62. A atividade farmacológica dessas frações foi estudada na etapa final deste trabalho. Na padronização química realizada para o estudo farmacológico em CLAE a 260 nm, a FAT apresentou 11 picos principais (TANAE, 2011 – contribuição pessoal). Nas experiências aqui descritas, em

vista da quantidade de material necessária para a avaliação das atividades relatadas popularmente, após ingestão do extrato, os estudos *in vivo* foram iniciados com o EETOH, reservando-se a FAT para as experiências *in vitro*.

A triagem geral da atividade farmacológica dos extratos obtidos da *A. marcgravianum* foi iniciada com o método descrito por Irwin (1964) e Malone e Robichaud (1962). A administração do EETOH em dose única elevada de 1,0 g/ kg, v.o. em camundongos, produziu: ptose palpebral, diminuição da força e da deambulação; dificuldade na respiração, às vezes ruidosa, nas primeiras 3 h e completa recuperação após 24 h. Com a administração da FAT 100 e 300 mg/kg por via oral, os animais apresentaram abdução e paralisia das patas posteriores, ptose palpebral, perda da força muscular e respiração forçada 30 min após o tratamento. A recuperação foi completa após 3 h, sendo que um dos animais tratado com a dose de 300 mg/kg morreu após 20 min; os animais tratados com a dose de 1 g/kg morreram após 10 min do tratamento. Como esperado, os efeitos obtidos por administração oral da FAT foram mais rápidos e intensos que os produzidos pelo EETOH, provavelmente devido a maior concentração dos alcaloides na FAT.

Os resultados obtidos *in vivo* indicaram que os alcaloides da *A. marcgravianum* são absorvidos por via oral, contrastando com os alcaloides extraídos da *Geissospermum urceolatum* (Apocynaceae) (MARTINS, 2010). Indicaram também, efeito na movimentação e na respiração do animal, que surteram ação do tipo curarizante. No entanto, com a menor dose (100 mg/kg) nenhum dos animais tratados morreu durante o período de observação. Por esta razão, os estudos *in vitro* foram orientados para detectar outras ações dos alcaloides que também pudessem produzir os efeitos discutidos.

Primeiramente, para verificar o efeito da FAT de *A. marcgravianum* no sistema cardiovascular foram realizados testes utilizando preparações de átrio direito de rato, para

detectar alterações no cronotropismo, e de átrio esquerdo, que não apresenta batimentos espontâneos, para verificar alterações no inotropismo cardíaco.

Observou-se que o automatismo do átrio direito foi inibido proporcionalmente à concentração da FAT no banho, mas que a força de contração do átrio esquerdo aumentou com a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ e foi inibida na presença da maior concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Como será discutido, no músculo diafragma de rato a FAT potenciou a contração; a maior concentração estudada (100 $\mu\text{g/mL}$) não interferiu com a transmissão neuromuscular, nem inibiu a contração ao estímulo direto da musculatura. Tendo em vista que as organelas envolvidas na contração do diafragma são muito semelhantes às do músculo cardíaco, mas que a excitação e o acoplamento excitação-contração no coração são dependentes do influxo de íons cálcio através da membrana, os resultados indicam que a inibição do automatismo e a inibição do inotropismo observadas no átrio podem ocorrer por bloqueio de canais de cálcio do tipo L. Esta possibilidade foi estudada com os alcaloides isolados utilizando técnicas espectrofluorimétricas, tendo o Fura-4 como fluoróforo, em cultura de cardiomiócitos. No entanto, nessa preparação, a FAT nas concentrações testadas (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não produziu diminuição significativa da fluorescência emitida pelo marcador incorporado previamente às células, indicando que não houve bloqueio do influxo de cálcio pelos canais do tipo L.

A potenciação das contrações do músculo diafragma obtidas por estímulo direto da fibra muscular na presença da FAT 100 $\mu\text{g/mL}$, que, ao mesmo tempo potencia as contrações obtidas por estímulo do nervo frênico, indicou que a potenciação não ocorreu por inibição da acetilcolinesterase muscular, levantando a hipótese alternativa da FAT aumentar a disponibilidade de cálcio intracelular e potencializar a contração muscular. Como no músculo esquelético não há influxo de cálcio durante o potencial de ação, duas alternativas podem explicar o aumento de cálcio livre no sarcoplasma: a inibição da recaptção de cálcio pela

bomba de cálcio (Ca^{2+} -ATPase, ou SERCA1) do retículo sarcoplasmático, ou a maior duração do potencial de ação da fibra muscular.

A inibição da SERCA1 prolonga o período de cálcio livre no citoplasma e pode potencializar a contração muscular.

A FAT, estudada na atividade da SERCA1 extraída do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético, não inibiu a atividade da enzima, descartando a hipótese da contração estar potenciada por inibição da recaptção do Ca^{2+} livre no sarcoplasma.

A ação da FAT na duração do potencial de ação foi estudada com o método da fusão tetânica no diafragma de rato.

Com a diminuição progressiva do intervalo entre os pulsos aplicados no diafragma (de 1 s a 0,1 s), a contração muscular não foi alterada. O aumento da frequência de estimulação de 10 a 50 Hz, no entanto, produziu contrações progressivamente maiores em vista da sincronização contrátil das fibras do diafragma com diferentes velocidades de contração (recrutamento) produzindo contrações de tétano com fusão parcial das contrações, ou com fusão total a partir da estimulação com 30 Hz. A incubação prévia da FAT inibiu a fusão tetânica proporcionalmente à concentração dos alcaloides, efeito similar ocorreu com as frações semi-purificadas F_{13-23} , F_{24-32} , F_{55-73} e F_{74-76} na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$, que reduziram o tônus muscular e a tensão máxima do tétano, com exceção das frações F_{33-43} e F_{44-54} que não reduziram significativamente o tônus muscular e não mantiveram a tensão máxima do tétano.

O efeito foi maior na manutenção do tétano que na resposta contrátil inicial, evidenciando um efeito inibidor dependente da ativação muscular. Por exemplo, na presença de 30 $\mu\text{g/mL}$ de FAT não houve manutenção de tétano, mas apenas 30% da contração inicial foi bloqueada. O repouso muscular de 3 min entre duas séries de estímulos tetânicos, foi

suficiente para reverter o efeito inibidor da FAT e nova contração muscular ser obtida com a estimulação elétrica, embora, novamente, o tétano não fosse mantido. É conhecido que a estimulação elétrica de uma fibra muscular esquelética com polaridade de membrana igual a -85 mV produz um potencial de ação que atinge o máximo de despolarização em 1-2 ms e com tempo para 50% de repolarização (a -60 mV) de 7-8 ms. As experiências clássicas de Hodgkin e Huxley mostraram que apenas 10% dos canais de sódio estão na sua conformação excitável (repouso) em membranas com -60 mV de potencial de repouso (para revisão ver MARK; RINZEL, 1990). Enquanto despolarizadas, as fibras musculares são inexcitáveis, caracterizando o período refratário da fibra muscular no qual novos estímulos não originam potenciais de ação. Aparentemente foi esse o efeito produzido pela FAT e pelas frações purificadas: o período refratário foi prolongado na presença da FAT.

Duas possibilidades podem explicar a inexcitabilidade celular: a despolarização prolongada da membrana por bloqueio de canais de potássio, o que prolonga a repolarização celular; ou então, o bloqueio de canais de sódio, o que impede a despolarização celular e o potencial de ação. Como o repouso da fibra não estimulada restabeleceu a excitabilidade na presença da FAT, não é provável que haja bloqueio primário dos canais de sódio na sua conformação excitável (repouso), mas não é possível eliminar nesta etapa do trabalho, um bloqueio alostérico (pela FAT) da proteína do canal de sódio na conformação alostérica ativada.

Por outro lado, a despolarização celular pode ser prolongada se os canais de potássio envolvidos na repolarização celular forem bloqueados pela FAT. Neste caso, dois efeitos seriam evidentes: com o prolongamento da despolarização celular, seria esperada uma mobilização prolongada de íons cálcio do RS, o que explicaria a maior sincronização das fibras contraídas e a potenciação da contração do diafragma na presença da FAT, como já foi discutido.

Ao mesmo tempo, a manutenção da célula despolarizada durante um tempo maior, impediria a reestimulação celular com estímulos de alta frequência, como observado nas experiências de tétano. A hipótese a ser comprovada, portanto, é se um ou mais alcaloides da FAT bloqueiam os canais de potássio ativados por cálcio na membrana muscular.

Com base nesses efeitos, postula-se que a potenciação da contração do músculo diafragma pode estar relacionada à maior duração do estado ativo das miofibrilas; esta ação seria consequência do prolongamento do potencial de ação, isto é, a contração seria mantida enquanto perdurasse a despolarização celular e o recrutamento de miofibrilas seria maior.

Como este efeito no potencial de ação deve aumentar também o período refratário da fibra muscular, a contração (tônus) ao estímulo repetido da fibra esquelética durante o tétano não seria mantida.

Em conclusão, como os extratos não produziram contratura muscular, não inibiram a atividade da SERCA 1 e não impediram a resposta inicial do diafragma à estimulação tetânica, os efeitos no músculo parecem estar relacionados ao bloqueio dos canais de potássio ativados durante a repolarização celular. Este efeito explicaria, também, o inotropismo positivo na presença dos alcaloides. As experiências, no entanto, não indicam diretamente a ação dos alcaloides nas correntes iônicas do potencial de ação muscular.

Em resumo,

A. marcgravianum é rica em alcaloides indólicos monoterpênicos, mas poucos estudos farmacológicos são encontrados na literatura sobre esta planta. Do pó da casca do caule foi obtido o extrato etanólico do qual foi separada por partição uma mistura de alcaloides (FCHCl₃) semi-purificados em coluna de sílicagel em 06 (seis) frações. A padronização da FAT foi realizada em CLAE analítica no comprimento de onda fixo de 260 nm, identificando-se no cromatograma a proporção dos picos relativamente à área total do cromatograma.

O pequeno rendimento durante o processo de extração impediu o uso das frações nos testes de atividade biológica. Para identificar os principais efeitos farmacológicos, o extrato etanólico (EETOH) e a fração alcaloídica (FAT) de *A. marcgravianum* foram administrados por via oral para comparação.

O EETOH (1 g/kg, v.o.) produziu diminuição da motilidade e relaxamento muscular evidentes, além de sinais de dispneia, sem cianose; não houve morte em 24 horas de observação. A administração da FAT na mesma dose por via oral produziu os mesmos efeitos, porém rápidos e intensos, levando os animais tratados na dose de 1g/Kg à morte em 10 minutos.

Experiências *in vitro* no átrio isolado de rato mostraram efeito cronotrópico negativo relacionado à concentração da FAT, efeito inotrópico positivo exclusivo da menor concentração e inotrópico negativo na concentração mais elevada.

As contrações do músculo diafragma de rato foram potenciadas sem inibição da transmissão neuromuscular. Efeito curarizante não foi obtido. O tétano do músculo diafragma de rato não foi sustentado na presença da FAT ou das frações semi-purificadas na concentração de 1 µg/mL; não houve bloqueio da contração inicial. A atividade da Ca²⁺-ATPase de músculo esquelético não foi alterada na presença da FAT.

CONCLUSÕES

1. Obteve-se na semi-purificação da FCHCl₃ 06 (seis) frações que foram utilizadas nos estudos farmacológicos.
2. Na padronização da FAT foi identificado no 14 picos principais que podem servir de padrão para futuras comparações em estudos com *A. marcgravianum*.
3. O relaxamento muscular, a dificuldade respiratória e a menor deambulação observadas *in vivo* não foram explicados por ação curarizante.
4. A potenciação da contração do diafragma não foi explicada por: ação anticolinesterásica e nem por inibição da atividade da SERCA 1.
5. A resposta ao estímulo tetânico do diafragma foi inibida na presença da FAT. Este efeito pode ser explicado por aumento da duração do potencial de ação e do período refratário da fibra muscular.
6. O aumento da duração do potencial de ação pode potenciar a força de contração do abalo muscular (contração simples).
7. O bloqueio do tônus muscular foi maior que o bloqueio da resposta contrátil inicial, indicando provável ação alostérica da FAT nos canais de K⁺ (bloqueio dependente de uso).
8. O inotropismo e cronotropismo negativos na presença da FAT não foram explicados por bloqueio de canais de Ca²⁺ do tipo L.
9. Estes resultados devem ser comprovados com estudos da ação da FAT diretamente nas correntes iônicas do potencial de ação muscular.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA/MS). Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância. D.O.U. Nº 63, 5 de abril de 2010. Disponível em: <<http://www.fcfrp.usp.br/dcf/download.php?...pdf...RDC%2014%20-2010.pdf>.> Acesso em: 06 de junho de 2011.

AGRIPINO, D.G. et al. **Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities.** I. Atlantic rain forest-Ecological station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica*, v.4, n.2, set. 2004.

AIMI, N. et al. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. *Tetrahedron Lett.*, v. 37, p. 4949-52, 1991.

ALBUQUERQUE, B. W. P. **Contribuição ao conhecimento das *Aspidosperma* da Amazônia brasileira (Apocynaceae): *A. carapanauba* Pichon, *A. marcgravianum* Woodson e *A. oblongum* A. DC.** *Acta Amazonica*, Belém, Falângula, v.1, n. 3, p. 9-20, 1971.

ALLEN, J.R.F.; HOLMSTEDT, B.R. **The simple β -carboline alkaloids.** *Phytochemistry*, v.19, n.8, p.1573-82, 1980.

ALLEN, D. G.; LAMB, G. D.; WESTERBLAD, H. **Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms,** *Physiol. Rev.*, v.88, p.287–332, 2008.

AÑEZ, R. B. Análise Morfoanatômica das folhas e casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. e *Aspidosperma marcgravianum* Woodson (Apocynaceae) com abordagem farmacognóstica e etnofarmacológica. 2009. 55f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica) - Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos naturais – PPG BTRN, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

ARNOUS, A.H.; BEINNER, R.P.C.; SANTOS, A.S. **Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário.** *Revista Espaço para a Saúde*, Londrina, v. 6, n. 2, p.1-6, jun. 2005.

BALOG, E. M. **Excitation-Contraction Coupling and Minor Triadic Proteins in Low-Frequency Fatigue.** *Exerc Sport Sci Rev.*, v. 38, n. 3135–142, July 2010 .

BANNISTER, R. A.; BEAM, K. G. **Ryanodine modification of RyR1 retrogradely affects L-type Ca^{2+} channel gating in skeletal muscle.** *J Muscle Res Cell Motil.* v. 30, n. 5-6, p. 217–223, 2009.

BARATTO, L. C. Estudo químico-analítico e morfoanatômico de espécies medicinais brasileiras da família Apocynaceae: *Himatanthus lancifolius* (MÜLL. ARG.) WOODSON e *Rauvolfia sellowii* MÜLL. ARG. 2010. 155f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BARBOSA, W.L.R.; TAVARES, I.C.C.; SOARES, D.C. **Alcalóides de *Aspidosperma auriculatum* Standl.** Rev. bras. farmacogn. Maringá, v. 13, supl.1, p. 6-8, 2003.

BERRIDGE, M. **The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle.** Cell Calcium. v.32, n. 5–6, p. 235–249, 2002.

BERRIDGE, M.; BOOTMAN, H.; LLEWELYN, R. **Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling.** Nature reviews, Molecular Cell Biology. v. 4, p.517-527, July 2003.

BERS, D.M. **Cardiac excitation–contraction coupling.** Nature, v.415, n.10, p.198-205, January 2002. Disponível em: <http://www.nature.com>. Acesso em: 06 de junho de 2011.

BIEL, J.H.; DRUKKER, A.E.; MITCHELL, T.F. **Central stimulants chemistry and structure-activity relationship of alkyl hydrazines.** Journal American Chemical Society, v.81, n.11, p.2805-13, 1959.

BOURDY, G. et al. **A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach.** Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. Journal of Ethnopharmacology, v.93, p.269-77, 2004.

BRANDÃO, H. N. et al. **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas.** Química Nova, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, jun. 2010.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem., v. 72, p. 248-54, 1976.

BUDMAN, N. L. et al. **Encapsulation of vincristine in liposomes reduces its toxicity and improves its antitumor efficacy.** J. Liposome Res, Vancouver, v.5, n.3, p. 523-541. 1997.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents).** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2, p.179-189, fev. 2000.

CALIXTO, J. B. 2001. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. *Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos, 2001. 500p.

CALIXTO, J. B. **Biodiversidade como fonte de medicamentos**. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, jul/set. 2003.

CAMPOS, A.R. et al. **Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice**. *Journal of Ethnopharmacology*, v.104, n.1-2, p.240-4, march 2006.

CARTER, B. C.; BEAN, B. P. **Sodium entry during action potentials of mammalian central neurons: incomplete inactivation and reduced metabolic efficiency in fast-spiking neurons**. *Neuron*. v. 64, p.898-909, December 2009.

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

CECHINEL-FILHO, V. et al. **Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura**. *Química Nova*, São Paulo, v. 26, n.2, p.230-241, 2003.

DEL VITTO, L.A.; PETENATTI, E.M.; PETENATTI, M.E. **Recursos herbolarios de San Luis (Republica Argentina)**. Primeira parte: Plantas Nativas. *Multequina*. *Latin American Journal of Natural Resources*, v.6, p.49-66, 1997.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002. 604 p.

DUKE, J.A.; VASQUEZ, R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. 1. ed. Florida: Taylor print on Dema, 1994. 215 pp.

DULHUNTY, A. F. et al. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 79: 45–75, 2002.

ESSIN, K.; GOLLASCH, M. Review Article. **Role of Ryanodine Receptor Subtypes in Initiation and Formation of Calcium Sparks in Arterial SmoothMuscle: Comparison**

with Striated Muscle. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Article ID 135249, p.1-15, 2009.

FERREIRA, I. C. P. et al. **Antileishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p.325-327, may. 2004.

FILL, M.; COPELLO J. A. **Ryanodine Receptor Calcium Release Channels.** Physiol. Rev. v. 82, n. 4, p. 893-922, January 2002.

GILES, A. R. **Guidelines for the use of animals in biomedical research.** Thromb. Haemost., v.58, p.1078-1984, 1987.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A. MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. p. 765-791.

HENRIQUE, C. M.; NUNOMURA, S. M.; POHLIT, A. P. **Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*.** Quim. Nova, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

HIDALGO, A. de F. Plantas de uso popular para tratamento da Malária e males associados da área de influência do rio Solimões e Região de Manaus-AM. 2003. 132f. Tese (Doutorado em agronomia) - Programa de pós graduação em Agronomia (Horticultura), UNESP, Botucatu, FCA.

HIDALGO, A. F.; MING, L. C. Matérias-primas vegetais usadas na medicina popular no Estado do Amazonas para o tratamento da malária e males associados. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 43, 2003, Recife. Hortaliças: qualidade e segurança alimentar. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br/biblioteca/arquivos/.../pmeb5000c.pdf/>>. Acesso em: 12 de junho de 2011.

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

HOPKINS, P. M. **Skeletal muscle physiology.** Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. v. 6, n.1, 2006.

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

JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 10.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1991. v.4, 777 p.

JURKAT-ROTT, K.; LEHMANN-HORN, F. Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies. *The Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.8, p. 2000-9, 2005.

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

LAPA, A. J. et al. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica*. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais (SBPM). Campinas: Lagoa, 2008. 144p.

LAUNIKONIS, B. S.; STEPHENSON, D. G.; FRIEDRICH, O. Rapid Ca^{2+} flux through the transverse tubular membrane, activated by individual action potentials in mammalian skeletal muscle. *J Physiol*, v. 587, n.10, p. 2299–312, Marc 2009.

MARBAN, E.; YAMAGISHI, T.; TOMASELLI, G. F. **Structure and function of voltage-gated sodium channels**. *Journal of Physiology*, v. 508.3, p. 647-657, 1998.

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

MARCONDES-FERREIRA, W.; KINOSHITA, L. S. **Uma nova divisão infragenérica para *Aspidosperma* Mart. (Apocynaceae)**. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 203-214, dez. 1996.

MARK, N.; RINZEL, J. The Hodgkin-Huxley Model. In: HAMILTON, V. P. *The Book of Genesis*. United States of America. chapters 4, 1990. p. 1-14.

MARQUES, M.F.S. Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg. 1988. f. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. **Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2501-2507, outubro, 2009.
- MARTINS, S. O. Efeitos dos alcalóides de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (acariquara-branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.
- MARTONOSI, A; PIKULA, S. **The network of calcium regulation in muscle.** Acta Biochim Polon. v. 50, p. 1-29, 2003.
- MESQUITA, M.L. et al. **In vitro antiplasmodial activity of Brazilian cerrado plants used as traditional remedies.** Journal of Ethnopharmacology, v.110, n. 1, p.165-70, march 2007.
- 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, n. 1, p.33-37, july 1992.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002.** Journal of Natural Products, Maryland, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, mar. 2003.
- OLIVEIRA, A. J. B. Estudo de seis espécies do gênero *Aspidosperma* utilizando GC, GC/MS e HPLC: análise qualitativa e quantitativa. Teste bioautobiográfico; Cultura de tecidos e células vegetais e Rota de preparação dos compostos diméricos ramiflorina A e ramiflorina B. 1999. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- OLIVEIRA, V. B. et al. **Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.11, n.1, p.92-99, Ago. 2009.
- PEREIRA, M. M. et al. **Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae).** Química Nova, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 970-983, July-Aug. 2007.
- PEREIRA, M. M. et al. **Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 8, n. 3, p.1-8, jul. 2006.

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

PROVEN, A. *et al.* Inositol 1,4,5-trisphosphate supports the arrhythmogenic action of endothelin-1 on ventricular cardiac myocytes. Journal of Cell Science, v.119, n.16, p. 3363-3375, 2006.

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

RIBEIRO, J. E. L. 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.

ROBERT, G. M. T. et al. ***Aspidosperma* de Guyane: Alcalóides de *Aspidosperma marcgravianum*.** Journal of Natural Products, Ohio, v. 46, n. 5, p. 694-707, Sept.-Oct. 1983.

ROBERTS, M.F.; WINK, M. Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications. New York: Plenum Press, 1998.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010. p. 818-846.

SHARAPIN, N. 2000. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterápicos.** Bogotá: Ed. Roberto Pinzón S. 248 p

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Plantas Mediciniais. In: CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004, 480 p.

SILVA, M. S. da. Avaliação Farmacológica de Plantas Mediciniais de uso popular contra distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Trezes em Lagarto/SE. 2003. 118f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e meio ambiente-PRODEMA, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

SOUZA, A.C.M. et al. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. 29, 2006. Águas de Lindóia. **Resumo**...São Paulo, 2006.

SPERLING, H. et al. **An extract from the bark of *Aspidosperma quebracho blanco* binds to human penile alfa-adrenoceptors**. The Journal of Urology, v.168, p.160-3, 2002.
TANAE, M. M. Padronização química realizada para o estudo farmacológico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da FAT de *Aspidosperma marcgravianum*. [comunicação pessoal]. 2011.

TANAKA, J. C. A. et al. **Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum***. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, p.387-91, 2006.

VERPOORTE, R.; PUIGROK, C.L.M.; BERARHEIM, S A. **Medicinal plants of Surinam. II- Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum***. Planta Medica, v.46, p.149-52, 1982.

VERPOORTE, R. et al. **Medicinal plants of Surinam**. Planta Medica, v.48, p.283-9, 1983.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 2, p.326-337, Apr. 2006.

WESTERBLAD, H.; LEE, J. A.; LANNERGREN, J.; ALLEN, D. G. **Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle**. Am J Physiol Cell Physiol, v. 261, n. 2, August 1991.