



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

**EFEITOS DOS ALCALÓIDES DE *Geissospermum urceolatum* A. H. GENTRY (ACARIQUARA-BRANCA) NA PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE RATOS.**

SUZANA DA SILVA DE OLIVEIRA MARTINS

MANAUS  
2010



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

SUZANA DA SILVA DE OLIVEIRA MARTINS

**EFEITOS DOS ALCALÓIDES DE *Geissospermum urceolatum* A. H. GENTRY (ACARIQUARA-BRANCA) NA PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE RATOS.**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Antônio José Lapa  
**Co-Orientação:** Mirtes Midori Tanae

MANAUS  
2010

Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Martins, Suzana da Silva de Oliveira

M386e Efeitos dos alcalóides de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (Acariquara-Branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos / Suzana da Silva de Oliveira Martins. - Manaus: UFAM, 2010.

94 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Lapa

Co-Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirtes Midori Tanae

1. Acariquara-branca; 2. *Geissospermum urceolatum* 3. Plantas medicinais I. Lapa, Antônio José II. Tanae, Mirtes Midori III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 633.88(043.3)

SUZANA DA SILVA DE OLIVEIRA MARTINS

**EFEITOS DOS ALCALÓIDES DE *Geissospermum urceolatum* A. H. GENTRY (ACARIQUARA-BRANCA) NA PRESSÃO ARTERIAL E NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao 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 03 de Dezembro de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr Antônio José Lapa - UFAM  
Presidente da Banca

---

Dr Almir Gonçalves Wanderley - UFPE  
Professor Titular

---

Dr Fábio Tonissi Moroni - UFAM  
Professor Titular

### **DEDICATÓRIA**

A Deus, por permitir que pudesse chegar até aqui com saúde, aos meus pais *Venina Rosas da Silva* e *Uelcio Rodrigues de Oliveira* que mesmo do plano onde estão, sempre torceram e acreditaram no meu sucesso, aos meus irmãos e todos da minha família. Em especial ao meu esposo e filho pela dedicação.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, pelo amor e pelo sonho que nos brinda a cada dia, dando-nos força, esperança e motivação para prosseguirmos em nossa caminhada.

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio José Lapa, pela amizade e por demonstrar que na pesquisa são necessários pilares essenciais como: ética, paciência, dedicação, perseverança e principalmente humildade. A minha amada co-orientadora Dra Mirtes Midori Tanae, principalmente pela atenção fraternal e dedicação. A Dra Caden Souccar, pelo ombro amigo, a Dra Maria Teresa R. Lima-Landman, pelo apoio durante a realização deste trabalho, a Dra Tereza Christina Monteiro Lima, pela motivação as pesquisas, a Dra Valderez, por demonstrar a importância e o respeito aos animais de laboratório.

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

A toda equipe do Biotério do Laboratório de Farmacologia, na pessoa do Dr. D'Ângelo, Antonio Batista, Claudia Rodrigues, Celina Moraes, Leandro Maquiné, Rosângela Santana, Sterner Diniz que muito me auxiliaram na obtenção e manutenção dos animais, utilizados nos estudos farmacológicos.

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

Aos amigos da convivência de todos os dias, que permaneceram desde o início do treinamento até a conclusão de mais uma etapa de minha vida (UNIFESP/UFAM/INPA), pelo auxílio e pelas valiosas discussões e críticas que muito contribuíram para enriquecer esse Trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, Toxicologia de Medicamentos e Biotério: Andrezza Miná, Alzemir Junior, Alcineide Magalhães, Cleonice Neta, Charles

Cipriano, Claudia Vieira, Daniel Castro, Eliene Canto, Fabíola Gomes, Franciane Retroz, Herbenya Peixoto, Jeffeson Moraes, Juliana Barros, Karla Feitosa, Kaori Isla, Lucinei Maciel, Pedro Barbalho, Ricardo Santos, Sandra Alves, Sandra Sales, Sinome Santos, Siglia Neves, Suelen Cristina, Thiago Lima, Thais Biondo, Tânia Regina, Tony José pela amizade e companheirismo cultivados e amadurecidos ao longo de nossa longa jornada.

Aos amigos do Laboratório da Central Analítica, de Produção de Extratos, Fitoquímica e Cultura de Tecidos Vegetais, Esterilização, Farmacotécnica, Agronomia e Herbário: Dr. Massayoshi Yoshida, Dr. Tetsuo Yamane, MSc. Raimundo Junior, Dra Claudia Carioca, Dra Arlena Gato, Dr. Ari Hidalgo, Dr. Franciscon, Augusto Batista e Dorotéia muito obrigada.

A direção e coordenação da Universidade Federal do Amazonas, nas pessoas, dos professores Dr. José Odair Pereira, Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. Edmar Vaz de Andrade que facilitaram os horários das aulas, para que eu pudesse frequentar, com assiduidade, as disciplinas ofertadas por este Programa de Pós-Graduação.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) o apoio financeiro obtido através do Programa de Pós-Graduação pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

AGRADEÇO

**EPÍGRAFE**

*“Só o tempo e o esforço trazem a competência”*

*Goethe*



## VIII

### RESUMO

*Geissospermum urceolatum* é uma Apocynaceae conhecida popularmente como acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira e pau-forquilha. Além da qualidade de suas madeiras, a casca da espécie possui um gosto amargo sendo utilizada comumente na forma de infusões pela medicina popular da Região Amazônica para tratamento de dores no estômago, tontura, febre e malária. Esta espécie não conta com trabalhos científicos confirmando essas ações. Este trabalho mostra os efeitos dos alcalóides de *Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry (acariquara-branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos. Cascas secas à sombra em temperatura ambiente e depois moídas foram extraídas; o extrato aquoso (EA) foi obtido por infusão a 2,5 %; o extrato etanólico (EETOH) foi obtido por agitação do pó a 2,5 % com etanol 50 % à temperatura ambiente; o extrato hidroalcoólico (EHA) à quente foi obtido em Soxhlet com etanol 80%. Os extratos foram filtrados e concentrados em rota evaporador. O EHA foi retomado em clorofórmio e extraído com água ácida, originando a fração alcalóides totais (FAT). A importância da informação popular do uso em malária orientou o teste preliminar da FAT em roedores infectados com *Plasmodium chabaudi*. A purificação da FAT em CLAE mostrou 14 frações referentes aos picos majoritários (>1% da área total do cromatograma), possíveis marcadores químicos do extrato depois de identificados e avaliados farmacologicamente. Na padronização química imediata realizada para o estudo farmacológico, foram considerados os 6 componentes químicos com os maiores picos, que encontram-se em processo de identificação. Os estudos com extratos padronizados foram planejados para a detecção experimental de um grande espectro de ação farmacológica, desde testes gerais *in vivo* por administração oral dos extratos, até o estudo das frações purificadas em preparações isoladas *in vitro*. A triagem geral da atividade farmacológica foi iniciada com o método de observação, ou Teste hipocrático. A administração oral, do EETOH (1,0 g/kg), não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica nos animais. Com a administração sistêmica por via intraperitoneal, no entanto, o extrato diminuiu a motilidade, a frequência respiratória e produziu cianose nos animais, sendo todos os efeitos de aparecimento e intensidades proporcionais à dose. Com a FAT os efeitos foram mais rápidos e intensos confirmando a maior concentração dos compostos na fração. Na pressão arterial em ratos anestesiados, a FAT produziu uma hipotensão rápida e passageira, sem alterar o efeito hipertensor da noradrenalina, ou a hipotensão produzida pela acetilcolina. Doses maiores produziram respostas irregulares com reversão demorada. Em átrio e músculo papilar de rato, a FAT inibiu a excitabilidade do marca-passo, mas facilitou o acoplamento excitação-contração, potenciando a contração do músculo papilar; na aorta de rato com endotélio, a FAT relaxou o tônus muscular produzido pela noradrenalina, mas após o bloqueio da NOS com L-NAME, o relaxamento foi reduzido de apenas 40%, indicando um outro mecanismo independente de NO na ação relaxante da FAT. Esta possibilidade foi confirmada quando a FAT também relaxou a aorta desprovida de endotélio. Na veia porta despolarizada, a FAT reduziu a contração máxima produzida pela adição de CaCl<sub>2</sub>, indicando bloqueio dos canais de cálcio pelos alcalóides. Nos estudos em ducto deferente de rato, a FAT potencializou a contração máxima produzida pela incubação de noradrenalina, e diminuiu a afinidade da droga pelos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. A ação da acetilcolina não foi potenciada. Estes resultados mostraram que a FAT potencializou a ação de segundos-mensageiros da via adrenérgica, mas não potencializou a contração quando os segundos-mensageiros foram ativados pela estimulação dos receptores muscarínicos. O estudo dos alcalóides purificados será essencial para o entendimento dos mecanismos das ações até agora evidenciadas. O presente trabalho apresentou resultados que mostram ação vasodilatadora que pode ser explicada por dois mecanismos: indireto, via ativação de NOS endotelial e direto na musculatura lisa, aparentemente por bloquear o influxo de íons cálcio. Esta ação, no entanto, não é tão clara, pois na musculatura do ducto deferente, ao mesmo tempo em que a CE<sub>50</sub> da noradrenalina é aumentada na presença da FAT, o efeito contrátil máximo do agonista foi potenciado, aparentando uma sensibilização das miofibrilas contráteis. A purificação e o isolamento dos constituintes deverá permitir a dissociação dos efeitos observados e a determinação dos mecanismos de ação, principalmente do efeito pouco conhecido que potencializou a contração máxima do agonista total noradrenalina.

PALAVRAS-CHAVE: acariquara-branca; *Geissospermum urceolatum*; alcalóides

## IX

### ABSTRACT

*Geissospermum urceolatum* is an Apocynaceae popularly known as acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira and pau-forquilha. Besides the quality of its wood, the bitter bark infusion is commonly used in the folk medicine of the Amazonian region to treat stomachache, fever and malaria. There are no scientific reports of this species confirming these actions. This work shows the effects of *Geissospermum urceolatum* alkaloids in the arterial blood pressure and in rats smooth muscle contraction. The dried and powdered bark was extracted obtaining the aqueous extract (AE) by infusion (2,5%), the ethanolic extract (EETOH) by maceration with ethanol 50% at room temperature, the hydro-alcoholic extract (HAE) by extraction in the Soxhlet apparatus with ethanol 80%; the extracts were filtrated and concentrated. The HAE was re-suspended in chloroform and partitioned with acidic water generating the total alkaloids fraction (TAF). The importance of the popular indication as anti-malarial guided the TAF preliminary test in rodents infected with *Plasmodium chabaudi*. The TAF purification by HPLC yielded 14 fractions referent to the main peaks (>1% of chromatogram total area), possible chemical markers of the extract after identification and pharmacological evaluation. In the immediate chemical standardization performed to the pharmacological studies, 6 major components were chosen, they are still in identification process. The studies with the standardized extracts were planned for the experimental detection of a wide spectrum of the pharmacological actions, from general tests *in vivo* with oral administration of the extracts until the study of the purified fractions in isolated preparations *in vitro*. The pharmacological screening was initiated with the observation test, or Hippocratic test. The oral administration of EETOH (1,0 g/kg) did not produce evident signs of pharmacological activity in the animals. However, the systemic administration by intra-peritoneal pathway reduced the motility, the respiratory rate and produced cyanosis with occurrence and intensity proportional to the doses. These effects were faster and more intense with TAF, confirming the higher concentration of the compounds in this fraction. In anesthetized rats blood pressure, TAF induced fast and temporary hypotension without affecting the hypertensive effect of noradrenalin or the hypotension induced by acetylcholine. Higher doses produced irregular responses with late reversion to the basal level. In rats atrium and papillary muscle, TAF inhibited the pacemaker excitability, but facilitated the excitation-contraction coupling, potentiating the papillary muscle contraction. In rat aortic rings with intact endothelium, TAF relaxed the muscular tonus induced by noradrenalin, but with NOS blockade by the previous incubation of L-NAME, the effect was only 40%, indicating a NO independent mechanism in the TAF relaxant activity. This possibility was confirmed when TAF also relaxed the endothelium deprived aortic rings preparations. In depolarized rat portal vein, TAF reduced the maximum contraction produced by  $\text{CaCl}_2$  addition, indicating the calcium channel blockade by the alkaloids. In rat vas deferens, TAF potentiated the maximum contraction induced by noradrenalin and reduced the drug affinity to the  $\alpha_1$ -adrenergic receptors; the acetylcholine action was not changed. These results showed that TAF potentiated the second-messengers of the adrenergic pathway, but did not potentiate the contraction when the second-messengers were activated by the muscarinic receptors stimulation. The study of the purified alkaloids will be essential to understand the mechanisms of action of the effects until now observed. The present work show results with vasorelaxation that may be explained by two mechanisms: indirect, via endothelial NOS activation and direct in the smooth muscle, apparently by blocking the calcium ion influx. This action, however, is not so clear because in the vas deferens, at the same time that the noradrenalin  $\text{EC}_{50}$  was increased in the presence of TAF, the maximum contractile effect of the agonist was potentiated, as if sensitization of the contractile myofibrils had been produced. The purification and isolation of the TAF constituents may permit the dissociation of the effects observed and the determination of the mechanisms of action, mainly of the poorly known effect that potentiated the maximum contraction of the total agonist noradrenalin.

KEYWORDS: acariquara-branca; *Geissospermum urceolatum*; alkaloids

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da co-transmissão no ducto deferente .....	31
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da regulação da contração do músculo liso .....	34
<b>Figura 3</b> - Áreas de coletas (cascas, folhas e frutos), da espécie <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry. Município de Manacapuru, Km 60 – Comunidade Nova Esperança, Manaus/AM .....	37
<b>Figura 4</b> - Acariquara-branca ( <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry) .....	38
<b>Figura 5</b> - Frutos de acariquara-branca ( <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry) .....	39
<b>Figura 6</b> - Fluxograma da extração e fracionamento da fração alcalóides totais (FAT) de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry .....	43
<b>Figura 7</b> - Cromatografia em camada delgada do EA, ETOH e FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry .....	44
<b>Figura 8</b> - Perfil cromatográfico da fração alcalóides totais (FAT) de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry em CLAE analítica .....	47
<b>Figura 9</b> - Perfis cromatográficos das frações isoladas da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry em CLAE analítica .....	48
<b>Figura 10</b> - Teste da atividade anti-malárica da fração alcalóides totais (FAT) de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry em cultura de sangue parasitado com <i>Plasmodium chabaudi</i> .....	49
<b>Figura 11</b> - Efeitos da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódio (40 mg/kg i.p.) .....	60
<b>Figura 12</b> - Efeitos pressóricos da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.) antes e após a injeção de FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (3 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódio .....	61
<b>Figura 13</b> - Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.) antes e após a injeção de FAT (3 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódio.....	61
<b>Figura 14</b> - Efeito da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (10 a 300 µg/mL) na força de contração do músculo papilar de rato estimulado, a 35 °C .....	62
<b>Figura 15</b> - Efeito da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (10 a 300 µg/mL) na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C .....	63

<b>Figura 16</b> - Efeitos da noradrenalina (Nor $10^{-8}$ a $10^{-5}$ M) e da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ), nas contrações do músculo papilar de rato, a 35 °C .....	64
<b>Figura 17</b> - Relaxamento produzido pela FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ) na contração induzida por noradrenalina ( $10^{-7}$ M) em anéis de aorta de rato em condições controle com endotélio, na presença de L-NAME ( $10^{-5}$ M) .	65
<b>Figura 18</b> - Relaxamento produzido pela FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ) no tônus induzido por noradrenalina ( $10^{-7}$ M) em anéis de aorta de rato sem endotélio .....	66
<b>Figura 19</b> - Efeito da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ) na contração de anéis de aorta de rato sem endotélio produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor, $10^{-9}$ a $10^{-6}$ M), a 30 °C .....	67
<b>Figura 20</b> - Curvas concentração-efeito de $\text{CaCl}_2$ ( $10^{-5}$ a $10^{-1}$ M) obtidas na ausência e na presença da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ), em preparações de veia porta de ratos despolarizadas, a 35 °C .....	68
<b>Figura 21</b> - Efeito da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ ) na contração da porção prostática do ducto deferente de rato, produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor, $10^{-8}$ a $10^{-4}$ M), a 30 °C .....	69
<b>Figura 22</b> - Efeito da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ ) na contração da porção prostática do ducto deferente de rato produzida pela adição cumulativa de acetilcolina ACh ( $10^{-7}$ a $10^{-2}$ M), a 30° C .....	70
<b>Figura 23</b> - Curvas concentração-efeito de acetilcolina ( $10^{-9}$ a $10^{-4}$ M) obtidas antes controle e após incubação de FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry (10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ ) em preparações de jejuno isolado de rato a 30 °C .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeito máximo e concentração efetiva media (CE <sub>50</sub> ) obtidos de curvas concentração-efeito de noradrenalina (10 <sup>-8</sup> a 10 <sup>-4</sup> M) e de acetilcolina (10 <sup>-7</sup> a 10 <sup>-2</sup> M), na ausência e após a incubação da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry.....	70
<b>Tabela 2</b> - Valores da concentração efetiva media (CE <sub>50</sub> ) obtidos de curvas concentração-efeito da acetilcolina (10 <sup>-9</sup> a 10 <sup>-4</sup> M) registrados antes e após a incubação da FAT de <i>Geissospermum urceolatum</i> A. H. Gentry .....	72

### XIII

#### LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	- Acetilcolina
ATR	- Atropina
ATP	- Adenosina trifosfato
CBA	- Centro de Biotecnologia da Amazônia
Ca <sup>2+</sup>	- Íon cálcio
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-Prep	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa
DAG	- Diacilglicerol
DZP	- Diazepam
EA	- Extrato Aquoso
EETOH	- Extrato Etanólico
EHA	- Extrato Hidroalcoólico
EC <sub>50</sub>	- concentração efetiva 50%
FAT	- Fração Alcalóides Totais
GCS	- Guanilato ciclase solúvel
GMPC	- Monofosfato cíclico de 3', 5'guanósina
i.p./e.d./v.o.	- intraperitoneal/endovenosa/oral
IP <sub>3</sub>	- Trifosfato de inositol
LNV	- Líquido Nutritivo de Vesícula
L-NAME	- N <sup>o</sup> – nitro-arginina metil éster
MCL/MCLK	- Miosina de cadeia leve; Enzima quinase da miosina de cadeia leve
Nor	- Noradrenalina
NO/NOS	- Óxido nítrico; Óxido nítrico sintase
PSB	- Pentobarbital sódico
PKC	- Proteína quinase do tipo C
TYRODE	- Líquido Nutritivo
Uretana	- Uretana

XIV  
**SUMÁRIO**

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS .....	X
LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XIII
SUMÁRIO .....	XIV
1. INTRODUÇÃO .....	17
2. OBJETIVOS .....	23
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1 A Planta.....	26
3.1.1 A Família Apocynaceae.....	26
3.1.2 Gênero <i>Geissospermum</i> .....	28
3.2 Neurotransmissão simpática e contração muscular no modelo do ducto deferente de rato (DDR) .....	30
3.2.1 Contração do Músculo Liso do DDR .....	33
4. MATERIAL .....	35
4.1 Material Botânico .....	36
4.2 Material Biológico .....	36
4.3 Material Químico .....	40
4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais .....	40
4.3.2 Drogas .....	40
4.3.3 Soluções e Reagentes .....	41

4.4 Obtenção dos extratos (EA, EETOH e EHA) .....	42
4.4.1 Obtenção da Fração Alcalóides Totais (FAT) .....	42
4.4.2 Cromatografia em Camada Delgada .....	44
4.4.3 Purificação da FAT por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep) e padronização da FAT .....	45
4.4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica e padronização da FAT .	46
4.4.5 Teste preliminar da atividade anti-plasmodium da FAT de <i>G. urceolatum</i> .....	48
5. MÉTODOS .....	50
5.1 Métodos Farmacológicos para avaliação da atividade do extrato etanólico (EETOH) de <i>Geissospermum urceolatum</i> .....	51
5.1.1 Teste geral da atividade farmacológica (Teste de Irwin ou Hipocrático) .....	51
5.1.2 Avaliação da ação cardiovascular da fração alcalóides totais (FAT) de <i>Geissospermum urceolatum</i> .....	51
5.1.2.1 Avaliação da atividade na pressão arterial de ratos anestesiados .....	51
5.1.2.2 Avaliação da ação da FAT no músculo papilar e no átrio de rato .....	52
5.1.2.3 Avaliação da ação da FAT no inotropismo produzido pela noradrenalina no músculo papilar de rato .....	53
5.1.2.4 Avaliação da ação da FAT em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M). Ação do L-NAME ( $10^{-5}$ M)	53
5.1.2.5 Avaliação da ação da FAT nas curvas cumulativas de noradrenalina ( $10^{-9}$ a $10^{-6}$ M) obtidas em anéis de aorta de rato sem endotélio .....	54
5.1.2.6 Avaliação da ação da FAT em veia porta de rato despolarizada com KCl 80 mM em meio sem cálcio .....	55
5.1.3 Avaliação da ação no músculo liso da fração alcalóides totais (FAT) de <i>Geissospermum urceolatum</i> .....	56
5.1.3.1 Avaliação da atividade em curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato .....	56
5.1.3.2 Avaliação da atividade em jejuno de rato .....	56
5.2 Análises Estatísticas .....	57
6. RESULTADOS .....	58



6.1 Efeito do extrato etanólico (EETOH) de <i>G. urceolatum</i> (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin) .....	59
6.2 Ação cardiovascular .....	60
6.2.1 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (3 mg/kg) na pressão arterial de ratos anestesiados .....	60
6.2.2 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (10 a 300 µg/mL) no músculo papilar de rato .....	62
6.2.3 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (10 a 300 µg/mL) na frequência de contração do átrio direito de rato .....	63
6.2.4 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (10 a 100 µg/mL) no inotropismo produzido pela noradrenalina ( $10^{-8}$ a $10^{-5}$ M) no músculo papilar de rato .....	64
6.2.5 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (1, 3 e 10 µg/mL) em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M). Ação do L-NAME ( $10^{-5}$ M) .....	65
6.2.6 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (1, 3 e 10 µg/mL) em anéis de aorta de rato sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M) .....	66
6.2.7 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (30 e 100 µg/mL) em anéis de aorta de rato sem endotélio. Curvas cumulativas de noradrenalina ( $10^{-9}$ a $10^{-6}$ M) .....	67
6.2.8 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (10, 30 e 100 µg/mL) em veia porta de rato despolarizada com KCl 80 mM em meio sem cálcio ..	68
6.3 Ação no músculo deferente e jejuno de rato .....	69
6.3.1 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (100 e 300 µg/mL) em curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato ..	69
6.3.2 Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) de <i>G. urceolatum</i> (10 a 300 µg/mL) em jejuno de rato .....	71
7. DISCUSSÃO .....	73
8. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....	82
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84



O ser humano sempre procurou na natureza o remédio para acalmar suas dores e curar seus males. O uso dos vegetais como remédio é, provavelmente, tão antigo quanto a existência do ser humano.

Ao longo da história da civilização, as plantas foram utilizadas não só como fonte de alimentos, mas também para obtenção de remédios, cosméticos, perfumes e venenos. No contexto do desenvolvimento humano, podemos citar diferentes civilizações, como as dos gregos, romanos e egípcios que muito antes de Cristo já utilizavam plantas como fins medicinais (AGRA, 1994).

Os remédios populares não são os mesmos em todas as regiões. Ao longo do tempo, os povos separaram as plantas de maior utilidade, passaram a cultivá-las e a disseminar o seu uso. O uso continuado e a crença popular valorizaram produtos que passaram a ser utilizados e recomendados oficialmente como lenitivos e remédios. A 1ª. Farmacopéia Brasileira (1929) listava 256 plantas utilizadas no Brasil naquela época, muitas exóticas oriundas de outros continentes (BRANDÃO *et al.*, 2008). Muitas delas se mantêm na Farmacopéia atual (BRASIL, 2008), mas poucas tiveram sua utilidade comprovada com testes modernos de eficácia e segurança. Poucas tiveram o uso autorizado com os critérios oficiais criados pela recente Resolução ANVISA RDC 14/2010 para registro de fitoterápicos. Popularmente, no entanto, toda planta administrada ao homem ou a um animal, sob qualquer forma ou por qualquer via, exercendo sobre eles uma ação, é denominada planta medicinal (ALMEIDA, 1993; BARROSO, 1981).

A definição de planta medicinal em publicação recente da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008) não foi muito diferente da popular: “PM é todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”.

Plantas Medicinais dão origem a fitoterápicos. Há longo tempo as plantas medicinais tem sido objeto de estudo na descoberta de novas fontes de princípios ativos (ALEMÃO, 1862). No entanto, muitas delas possuem atividades tóxicas e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas. Com os avanços científicos, o empirismo milenar perdeu espaço para os medicamentos sintéticos, de controle e dosificação mais fáceis. Entretanto, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais surgidos com o mau uso, contribuíram para o ressurgimento da terapia com plantas (SCHVARTSMAN, 1990). O conhecimento das propriedades medicinais das plantas, dos minerais e de certos produtos de origem animal é uma riqueza da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração (SCHVARTSMAN, 1979). Vivendo em permanente contato com a natureza, os índios e outros povos da floresta estão habituados a estabelecer semelhança entre as substâncias naturais e a ação em seu próprio corpo, adquirindo, dessa forma, conhecimento da flora que passa a usar como fonte terapêutica (SOUZA, 1991).

A importância do estudo taxonômico de plantas usadas na medicina popular fundamenta-se em certas considerações: 1) as referidas plantas, geralmente apresentando muitos nomes vulgares, podem corresponder a espécies totalmente diferentes, causando confusão e dificultando o seu estudo (CAMINHOÁ, 1984). 2) Os aspectos morfológicos e taxonômicos em geral ficam desatualizados e quase sempre não documentados. Muitas espécies corriqueiramente usadas e bem conhecidas pela população amazônica, não são citadas na literatura etnobotânica (HIDALGO, 1999).

As plantas são fontes vantajosas de medicamentos utilizados na farmacoterapia. SOEJARTO *et al.*, (1989), citam que há pelo menos 47 fármacos importantes que foram desenvolvidos a partir de plantas encontradas nas florestas tropicais, como, por exemplo, o curare, a pilocarpina, o quinino, a ipeca e a codeína (BARRETO, 1994). Poucas foram

estudadas com os critérios internacionais que definem as etapas do estudo de um medicamento, antes da aplicação pela primeira vez na espécie humana (BRASIL, 2004 a,b).

A ANVISA, MS define o Fitoterápico (Plantas Medicinais) como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário (Portaria nº 6, 1995). Esta definição de Fitoterápico se confunde, portanto, com a definição de medicamento: “Produto farmacêutico tecnicamente obtido ou elaborado com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (Resolução RDC 84/2002).

Nos últimos 10 anos, o desenvolvimento de novos medicamentos com as técnicas usuais de triagem farmacológica de muitos produtos sintéticos, não tem dado os resultados esperados (SAMS-DODD, 2005). A diminuição do número de novos compostos promissores é preocupante em todas as áreas, mas as doenças negligenciadas seriam as mais afetadas em vista do baixo retorno econômico esperado.

A malária é uma endemia preocupante por causa do insucesso das vacinas (NTOUMI *et al.*, 2007) e da resistência do plasmódio aos medicamentos conhecidos (OMS, 2007). É preocupante pensar na falta de medicamentos eficazes (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2003). Portanto, é importante investir em novos produtos com essa atividade. O presente trabalho estudou a farmacologia da acariquara-branca (*Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry), planta amazônica utilizada na medicina popular para “prevenção da malária”. A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo (NEVES, 1998; OMS, 2007; VERONESI, 1991). É talvez a mais antiga, a de maior distribuição e a mais conhecida das doenças parasitárias que afligem o homem. Plantas conhecidas na etnofarmacologia como “antimaláricas” distribuem-se por toda a região amazônica (KRETTLI *et al.*, 2001), têm sido muito estudadas, mas trabalhos conclusivos

quanto à sua atividade antimalárica, positiva ou negativa, não foram encontrados na literatura científica. Relatos controversos de atividade “*in vitro*” são comuns (OLIVEIRA, 2009), associando-se, nesse particular, o estudo com material vegetal não padronizado e testes pouco específicos *in vitro*. Nenhum extrato de planta do folclore medicinal amazônico foi padronizado quimicamente e submetido a uma triagem farmacológica ampla para definir, por exemplo, a biodisponibilidade esperada de seus constituintes.

Atividade anti-malárica tem sido atribuída a várias espécies do gênero *Geissospermum* dentre elas *G. vellosii*, *G. sericeum*, *G. argenteum* e *G. urceolatum*. Elas são encontradas na Amazônia Central, Oriental e Guianas (VINCENTINI *et al.*, 1999). No Brasil e na Guiana são utilizadas na forma de chá; na Guiana francesa são usadas em preparações alcoólicas (MILLIKEN, 1997, MUÑOZ *et al.*, 2000; POHLIT, 2004).

O gênero *Geissospermum* é rico em alcalóides (JANOT, 1961) aos quais se atribui atividade antiplasmodial (KAYSER *et al.*, 2003). Esta atividade foi confirmada *in vitro* para a flavopereirina, alcalóide  $\beta$ -carbolina isolado da casca de *G. sericeum*, mas não para o alcalóide geissosquizolina e seus derivados geizosquizolina N<sup>4</sup>-óxido e 1,2-dehidrogeissosquizolina (STEELE *et al.*, 2002). Estes alcalóides foram também isolados de *G. vellosii* (RIBEIRO, 1986; TANAE, *et al.*, 2006;); alcalóides do tipo corinano, diferente do observado na espécie *G. argenteum* que contém alcalóides do tipo aspidospermano como desmetoxiaspipermina, aspipermina, aspidocarpina e desmetilaspidospermina (PACCIONI; HUSSON, 1978). A atividade do extrato etanólico da *G. argenteum* foi relacionada à interferência no ciclo hepático do *Plasmodium falciparum* (BERTANI *et al.*, 2005).

Estudos *in vivo* com os extratos indicados na medicina popular e a atividade farmacológica geral dessas plantas são pouco acessíveis, se existentes. A *G. urceolatum* da Amazônia, particularmente, conta apenas com estudos botânicos, mais motivados pelo uso da madeira, que por seu uso na medicina popular. A disponibilidade do material propiciou a

seleção desta espécie para estudo comparativo com outras mais conhecidas. Para isso os extratos precisaram ser padronizados.

Recentemente, TANAE *et al.*, (2007) descreveram um método rápido e eficiente para padronização de extratos polares por HPLC. A conveniência desse método, em se tratando de extratos aquosos usualmente utilizados na medicina popular, é a preservação da mistura de compostos de polaridades distintas extraídas no chá (infusão), o que facilita o estudo da atividade farmacológica e a obtenção dos compostos ativos (purificação bioorientada). Os estudos com o extrato padronizado foram planejados para a detecção experimental de um grande espectro de ação farmacológica, desde testes gerais *in vivo* por administração oral dos extratos, até o estudo das frações purificadas em preparações isoladas e em enzimas. A importância da informação popular do uso em malária orientou o teste preliminar em roedores infectados com *Plasmodium chabaudi*, mas foram os efeitos dos extratos na pressão arterial de rato e em músculos lisos que forneceram resultados inesperados e potencialmente inovadores.





## 2.1 Objetivo Geral

➤ Estudar os efeitos dos alcalóides de *Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry (acariquara-branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos.

## 2.2 Objetivos Específicos

➤ Comparar a extração aquosa da casca da *G. urceolatum* com a extração etanólica.

Determinar a influência da temperatura no processo de extração;

➤ Extrair os alcalóides do extrato hidroalcoólico;

➤ Purificar a fração alcaloídica em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);

➤ Estudar a ação dos alcalóides de *G. urceolatum* na pressão arterial de ratos;

➤ Determinar o mecanismo de ação dos alcalóides na musculatura lisa.



### 3.1 A Planta

A *Geissospermum urceolatum* é uma apocynaceae conhecida popularmente como acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira e pau-forquilha. Na Amazônia esta planta é reputada como medicinal, possui um gosto amargo, sendo utilizada no trato de dores de estômago, tontura, febre e malária. Esta espécie não conta com trabalhos científicos, confirmando essas ações.

#### 3.1.1 A Família Apocynaceae

Plantas da família Apocynaceae estão incluídas filogeneticamente na ordem Gentianales e subclasse Asteridae, sendo consideradas como espécies dicotiledôneas bem evoluídas (NICHOLAS; BAIJNATH, 1994). Em geral, representantes dessa família apresentam látex branco e abundante, em alguns casos com coloração diferenciada, vermelho ou acastanhada (RIBEIRO *et al.*, 1999). A taxonomia evolutiva dessa família esta em construção; estima-se que possa conter entre 3700 a 5100 espécies distribuídas entre 250 a 550 gêneros (NICHOLAS; BAIJNATH, 1994), encontrados predominantemente em regiões tropicais ou subtropicais e menos frequentemente em regiões temperadas. Apocynaceas apresentam síndrome de polinização associada a borboletas, e menos a abelhas, talvez por causa do gosto amargo (RIBEIRO *et al.*, 1999). Na Amazônia são catalogadas como Apocynaceas mais de 400 espécies em 41 gêneros; 32 destes são encontrados na Amazônia Ocidental e Oriental (CAMPBELL; HAMMOND, 1989).

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. O látex foi muito explorado no 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).

As Apocynaceae produzem madeira resistente e de bom uso. Uma grande variedade de alcalóides indólicos e glicosídeos foram isolados da família. Glicosídeos cardíacos presentes em algumas espécies podem provocar irritações primárias de pele (BoDD, 1984).

Muitos alcalóides indólicos podem agir nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos (BIEL *et al.*, 1959; RIVAS *et al.*, 1999). Por isso, produzem efeitos amplos como hipotensão arterial, bloqueio simpático, diurese, vasoconstrição periférica, estimulação respiratória, anestesia, espasmo intestinal, sedação e relaxamento do músculo esquelético (BENOIT *et al.*, 1973; GARRET; GRISHAM, 1995; LYON *et al.*, 1973). Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980).

Alcalóides do metabolismo secundário de Apocynaceae, como *vincristina* e *vinblastina*, são utilizados como quimioterápicos no tratamento de câncer, extraídos da *Vinca rosea*, nativa de Madagascar (BUDMAN *et al.*, 1997).

Na Amazônia, muitas espécies são utilizadas pelas populações indígenas e caboclas, por suas propriedades medicinais (FERREIRA, 2004; WENIGER, 2001). A infusão da casca de *Aspidosperma nitidum* e *A. marcgravianum*, conhecidas por carapanaúba, é utilizada no tratamento de malária, em inflamações do útero e do ovário, em problemas de diabetes e do estômago, contra câncer, e também como anticoncepcivo. O látex de *A. nitidum* é utilizado pelos índios Makuna e Taiwano na Colômbia para tratar lepra (RIBEIRO *et al.*, 1999). Na Guiana, *A. excelsum*, é usada no tratamento de dor de dente.

As sucubas (*Himatanthus spp.*) contém látex usado em emplastos e no tratamento de fraturas. Com as folhas de *Tabernaemontana macrocalyx* (*Bonafousia muelleriana*) os índios

Waimiri-atroari preparam em cerimônias, a “bebida da cura”. A casca de *T. undulata* (*B. undulata*), por sua vez, é usada contra fungos de pele ou para dor de cabeça, enquanto as folhas são usadas junto com mandioca para preparar vermífugos e o látex, para remover bernes. O látex do amapá-amargoso (*Parahancornia amapa*) é usado no tratamento de úlceras internas, dor de estômago, hepatite e também na “cura da sífilis” (OLIVEIRA *et al.*, 1999) .

Na medicina popular, as atividades antifúngica, antimicrobiana, antitumoral, antisséptica e antimalárica são reconhecidas nessa família (HENRIQUE *et al.*, 2002).

### 3.1.2 Gênero *Geissospermum*

As espécies do gênero *Geissospermum* conhecidas popularmente como acariquara-branca, acariquara, quinarana, acariubarana, acarirana, pereira, pau-pereira e pau-forquilha, são encontradas na Amazônia Central, Oriental e Guianas (VINCENTINI *et al.*, 1999).

O gênero *Geissospermum* é conhecido por árvores de dossel com látex branco, em alguns casos visíveis apenas nos ramos terminais e frutos. Em geral são plantas muito comercializadas no Norte do Brasil. As folhas são concolores, alterno-dísticas, com base simétrica a oblíqua, reticulação evidente em ambas as faces, apresentando características florais em folhas jovens que são cobertas por pêlos deitados e ferrugíneos e glabras em folhas adultas. O tronco é acanalado e fenestrado ocorre em *Geissospermum* e em algumas espécies de *Aspidosperma*. A casca é de sabor amargo (daí o nome de quinarana). Os frutos veludosos, pardacentos, são apreciados por alguns animais silvestres como o veado e o jabuti (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Muitas *Geissospermum* são utilizadas na malária entre elas *G. vellosii*, *G. sericeum*, *G. argenteum* e *G. urceolatum*. Essas plantas são utilizadas na forma de chá no Brasil e na Guiana; na Guiana francesa, em preparação alcoólica preventiva da malária (MILLIKEN, 1997; MUÑOZ *et al.*, 2000). Esta atividade descrita para *G. argenteum* foi relacionada à

interferência no ciclo hepático do *Plasmodium falciparum* (BERTANI *et al.*, 2005). *Geissospermum reticulatum* foi citada em estudo etnofarmacológico realizado na Amazônia Peruana entre outras 100 espécies utilizadas na malária (RENGIFO *et al.*, 2008).

Estudo clássico refere o gênero *Geissospermum* como rico em alcalóides (JANOT, 1961) aos quais se atribui atividade antiplasmodial (KAYSER *et al.*, 2003), verificada *in vitro* para a flavopereirina, alcalóide  $\beta$ -carbolina isolado da casca de *G. sericeum*, mas não para o alcalóide geissoschizolina e seus derivados geissoschizolina N<sup>4</sup>-óxido e 1,2-dehidrogeissoschizolina (STEELE *et al.*, 2002).

Alcalóides como a geissospermina, geissoschizolina, geissoschizina e flavopereirina foram isolados de *G. vellosii* (sinóníma *G. laeve*) (RAPOPORT *et al.*, 1960; TANAE *et al.*, 2006). Alcalóides do tipo aspidospermano - desmetoxiaspidospermina, aspidospermina, aspidocarpina e desmetilaspidospermina, foram isolados de *G. argenteum* (PACCIONI; HUSSON, 1978).

### 3.2 Neurotransmissão simpática e contração muscular no modelo do ducto deferente de rato (DDR)

A densidade de inervação do ducto deferente de rato é bastante alta, o que o torna um dos órgãos mais densamente inervados pelo sistema nervoso autônomo simpático. Os eventos pré e pós-sinápticos, os receptores, os neurotransmissores, os neuromoduladores e outros mecanismos envolvidos na transmissão nas sinapses simpáticas, tem sido caracterizados com grande sucesso no DDR.

Os principais neurotransmissores liberados por esses neurônios são a noradrenalina, o ATP e o neuropeptídeo Y, que atuam como neurotransmissores e neuromoduladores (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2010; WESTFALL; WESTFALL, 2001; HUIDOBRO-TORO *et al.*, 1995). No processo da neurotransmissão, mecanismos de *feed-back*, são bem conhecidos. Por esse mecanismo, o neurotransmissor, após a exocitose, regula sua própria liberação através de receptores pré-sinápticos. No DDR, o principal receptor envolvido nesse mecanismo é o receptor adrenérgico  $\alpha_2$  pré-sináptico (STARKE, 1977, 1987 e 1989). A ativação desse receptor causa inibição do processo de exocitose. A neuroliberação pode ser facilitada pela ativação de receptores nicotínicos (TODOROV *et al.*, 1991), ou por receptores pré-sinápticos  $\beta$ -adrenérgicos, embora o aumento da neuroliberação nesse caso seja pouco evidente (HOVEVEI-SION *et al.*, 1983).

A neuroliberação pode ser inibida também por outros receptores pré-sinápticos, como receptores de adenosina  $A_1$ , também conhecidos como purinérgicos  $P_1$  (DRIESSEN *et al.*, 1994), receptores serotoninérgicos  $5-HT_1$  (SMITH; BENNETT, 1990) e receptores histaminérgicos  $H_2$  (POLI *et al.*, 1994) (Figura 1).





A inervação colinérgica no DDR tem distribuição nas proximidades do epitélio, lâmina basal e camadas musculares próximas ao lúmen (AVELLAR *et al.*, 2009; DIXON; GOSLING, 1972). As terminações colinérgicas são ricas em ACh, peptídeo vasoativo (VIP), óxido nítrico (NO) e a somatostatina (SOM) que atuam como co-transmissores. A função colinérgica principal relaciona-se ao processo secretório das células epiteliais e com a modulação da neurotransmissão simpática (DIXON; GOSLING, 1972; KUJAT *et al.*, 1993; KALECZYC, 1998; KOLBECK; STEER, 1993; ROBINSON, 1982; VENTURA, 1998).

A distribuição assimétrica da inervação autonômica do ducto deferente pode ter importantes implicações na neurotransmissão, visto que a estimulação elétrica dos terminais nervosos simpáticos produz respostas contráteis com perfil distinto na porção prostática e epididimal do ducto deferente (ROHDE *et al.*, 1986; SNEDDON; MACHALY, 1992). Por exemplo, a contração neurogênica do ducto deferente de roedores é predominantemente bifásica formada por um componente inicial rápido (contração fásica) seguido de um componente tardio sustentado (tônico) (WESTFALL; WESTFALL, 2001). A contração fásica é maior na prostática, enquanto a contração tônica é maior na epididimal (ROHDE *et al.*, 1986; SNEDDON; MACHALY, 1992).

Essas características fazem do DDR uma preparação não vascular conveniente para o estudo de substâncias que interferem diretamente com a contração do músculo liso, ou indiretamente com a atividade simpatomimética (LAPA *et al.*, 2008).

### 3.2.1 Contração do Músculo liso do DDR

O estímulo para contração do músculo liso pode ser gerado pelo estiramento da célula muscular que despolariza a membrana e ativa canais de cálcio voltagem-dependentes (do tipo L), ou através da ligação de agonistas em receptores de membrana associados à proteína G ou aos canais de cálcio. No DDR a noradrenalina, a acetilcolina e o ATP são os agonistas fisiológicos. A contração induzida no DDR por noradrenalina envolve a interação com  $\alpha_1$ -adrenoceptores, a acetilcolina interage com receptores  $M_3$  e o ATP com receptores purinérgicos  $P_1$ , todos ligados à proteína G (CARNEIRO; MARKUS, 1990).

A ligação do agonista a seus receptores específicos associados à proteína G determina a ativação da fosfolipase C, que gera os mensageiros trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  liga-se a seus receptores específicos no retículo sarco/endoplasmático determinando a liberação de cálcio, enquanto o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que geralmente induz efeitos promotores da contração muscular como, por exemplo, a fosforilação de canais de cálcio do tipo L e influxo desse íon (WEBB, 2003).

O cálcio livre no citoplasma liga-se à calmodulina e ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve reguladora da miosina (RLC). Esta fosforilação da RLC determina sua modificação conformacional acoplada à modificação conformacional da molécula de miosina, fazendo com que os sítios de alta afinidade para actina, presentes na cabeça da miosina, fiquem disponíveis para interação. As alterações conformacionais da miosina, decorrentes da fosforilação da cadeia leve reguladora, também permitem que a atividade da ATPase da cabeça da miosina ocorra (AKSOY *et al.*, 1982; DILLON, 1981; PFITZER, 2001) (Figura 2). A hidrólise de ATP gera energia para a contração muscular. A ligação da molécula de ATP na ATPase presente na miosina, determina o desligamento entre a cabeça da miosina e a actina, mas, enquanto houver alta concentração de cálcio citoplasmático, a actina e miosina continuam interagindo de forma cíclica. A diminuição da

concentração de cálcio intracelular faz com que ocorra menor fosforilação da RLC, que associada à desfosforilação da RLC determinada pela fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), fazem com que a miosina adquira a conformação inicial, impossibilitando a interação com a actina e determinando o relaxamento muscular (MURPHY, 2000). Para manter baixa a concentração de cálcio intracelular, a célula estoca a maior parte do cálcio dentro do retículo endo/sarcoplasmático através da SERCA (ATPase do retículo endo/sarcoplasmático) e transporta o restante para o meio extracelular através da ação da ATPase da membrana plasmática (PAMCA).

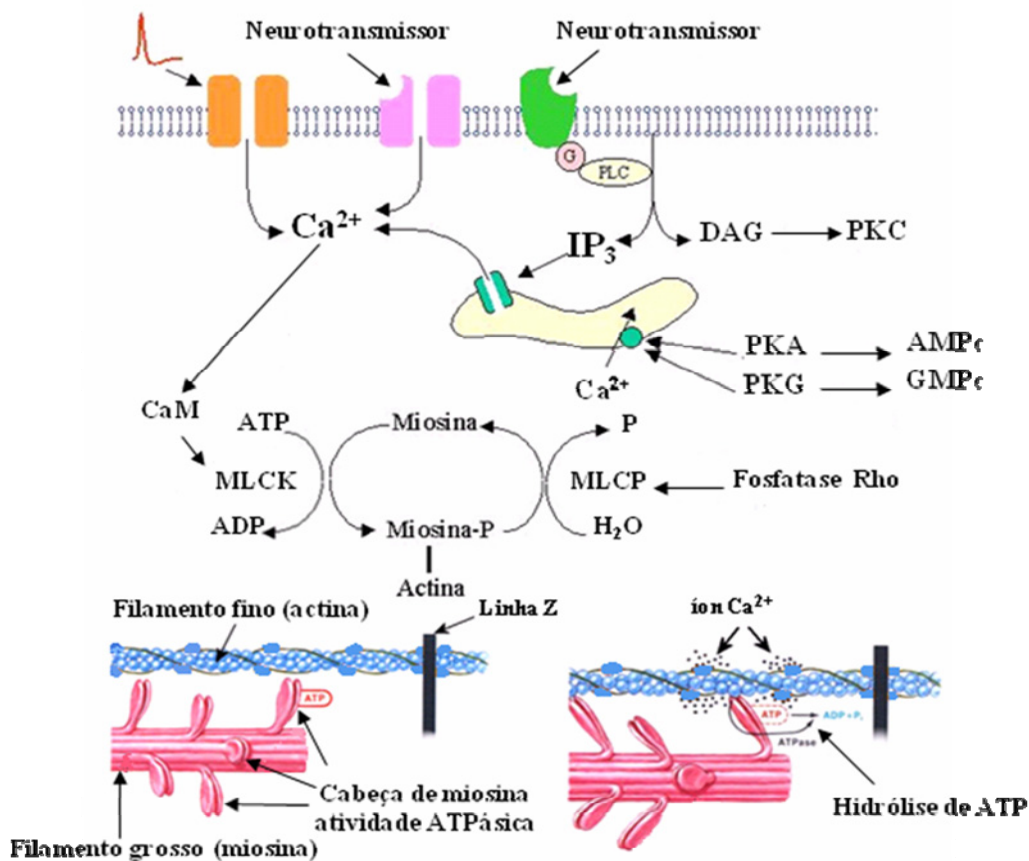


Figura 2 - Representação esquemática da regulação da contração do músculo liso. Vários agonistas (neurotransmissores, hormônios etc.) ligam-se a receptores específicos para ativar a contração do músculo liso. Após a ligação, ocorre um aumento na atividade da fosfolipase C via acoplamento com a proteína G. A fosfolipase C produz dois potentes segundos mensageiros: diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ). O  $\text{IP}_3$  liga-se a receptores específicos no retículo sarcoplasmático levando a liberação de cálcio. O DAG ativa a PKC, que fosforila proteínas-alvo específicas. O cálcio liga-se a calmodulina levando à ativação da quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). Essa quinase fosforila a cadeia leve de miosina e em conjunto com a actina, inicia o encurtamento da célula do músculo liso. Entretanto, a elevação da concentração intracelular de cálcio é transitória e a resposta contrátil é mantida por um mecanismo de sensibilização ao cálcio provocado pela inibição da atividade da fosfatase da miosina pela Rho quinase (Adaptado de WEBB, 2003)



#### 4.1 Material Botânico

Cascas, folhas e frutos de *Geissospermum urceolatum* foram coletados no Município de Manacapuru, km 60 – Comunidade Nova Esperança, Latitude: 3°16'28" e Longitude: 60°32'53", nos períodos de outubro de 2007; julho de 2008 e janeiro de 2009 (Figura 3).

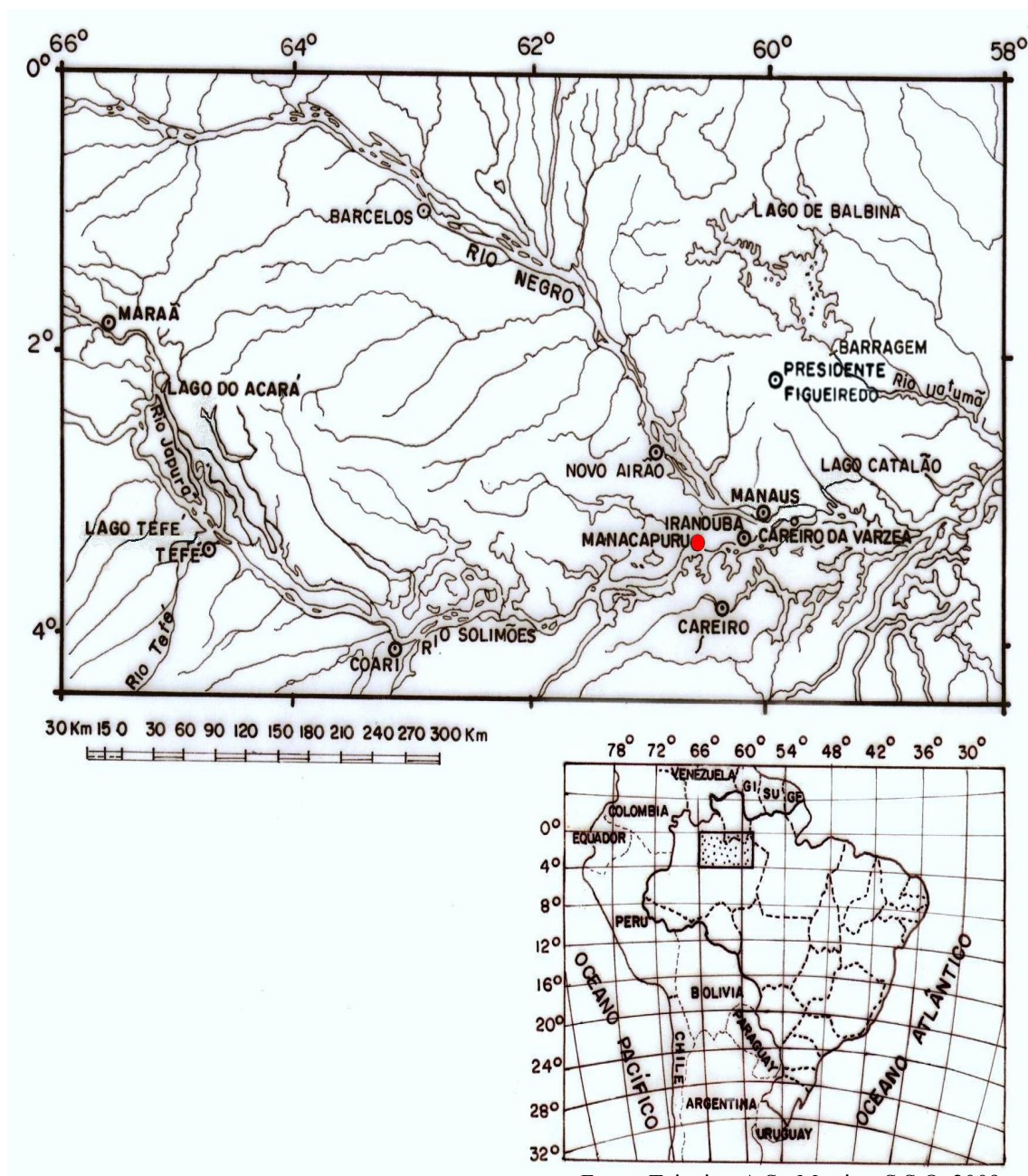
As amostras férteis foram prensadas entre folhas de jornal alternadas com placas de papelão em grades de madeira. Após a desidratação, as prensas foram retiradas e o material vegetal seco foi amarrado apenas no jornal e guardada com naftalina, em ambiente com temperatura e umidade baixas.

O material vegetal foi identificado e classificado pelo Prof. Dr. Franciscon - Curador do Herbário do Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA (FRANCISCON, 2005). A exsicata foi incorporada ao acervo do referido herbário, sob registro n° 224976 (Figuras 4 e 5).

#### 4.2 Material Biológico

Nos testes farmacológicos foram utilizados ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus albinus*) pesando 250 – 400 g e camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, entre 30 – 40 g, machos e ou fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

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



Fonte: Teixeira, A.S.; Martins, S.S.O. 2009

Figura 3 - Área de coletas (cascas, folhas e frutos), da espécie *Geissospermum urceolatum* A.H.Gentry. Município de Manacapuru, Km 60 – Comunidade Nova Esperança, Manaus/AM, nas coordenadas Latitude: 3°16'28" e Longitude: 60°32'53"



Foto: Martins, S.S.O. 2007

Figura 4 - Acariquara-branca (*Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry). Árvore de dossel, folhas concolores, com reticulação evidente em ambas as faces. Consideradas espécies dicotiledôneas bem evoluídas, são caracterizadas normalmente pela presença de látex. Frequentemente encontradas em áreas de platô e vertente na Amazônia Central, Oriental e Guiana



Foto: Martins, S.S.O. 2008

Figura 5 – Frutos de acariquara-branca (*Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry), com 7 a 10 cm de comprimento, cascas com sabor doce-amargo. Frutos indeiscentes e sementes não aladas. Alimentos de primatas e pássaros



### 4.3 Material Químico

Todo o material químico utilizado no trabalho foi adquirido de revendedores credenciados e sempre que possível de grau analítico.

#### 4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais

Acetona P.A (Nuclear-Brasil), acetonitrila grau HPLC (Merck-Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear-Brasil), ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec-Brasil), ácido fosfórico 85 % P.A (C.P.Q), ácido bórico P.A (Synth-Brasil), ácido sulfúrico P.A (Nuclear-Brasil), bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), 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), cloreto de cálcio P.A (Merck-Brasil), dietilamina (Nuclear-Brasil), etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), fosfato monossódico P.A (Merck-Brasil), glicose P.A (C.P.Q), hidróxido de sódio P.A (Reagen-Brasil), hidróxido de amônio P.A (ECIBRA-Brasil), iodeto de potássio P.A (Sigma-Brasil), metanol P.A (Nuclear-Brasil), molibdato de amônio (Reagen-Brasil), subnitrito de bismuto (Nuclear-Brasil).

#### 4.3.2 Drogas

Acetilcolina (Sigma-Brasil), atropina (Sigma-Brasil), diazepam (Rambaxy S.A), L-NAME (Sigma – Brasil), noradrenalina (Sigma-Brasil), pentobarbital (Sigma-Brasil), uretana (Sigma-Brasil).

### 4.3.3 Soluções e Reagentes

As soluções nutritivas e reagentes foram preparadas na hora do uso controlando-se o pH.

- **Líquido Nutritivo Tyrode:** NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,0 mM; NaHCO<sub>3</sub> 15,0 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,0 mM; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,0 mM; glicose 11,0 mM.
- **Líquido Nutritivo LNV:** NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO<sub>3</sub> 15 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; Glicose 5,5 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM.
- **Solução Nutritiva de Krebs-Bicarbonato:** NaCl 119,0 mM; KCl 4,6 mM; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 15,0 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,5 mM; glicose 11,0 mM.
- **Solução Krebs despolarizante contendo KCl 80 mM:** NaCl 100,0 mM; KCl 80,0 mM; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,2 mM; NaHCO<sub>3</sub> 15,0 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1,2 mM; glicose 11,0 mM.
- **Reagente de Dragendorff:** Solução A (subnitrito de bismuto, ácido acético 20 %) e Solução B (iodeto de Potássio).

#### 4.4 Obtenção dos extratos (EA, EETOH e EHA)

Cascas de *G. urceolatum* (1,5 kg) foram secas à sombra em temperatura ambiente e depois moídas em moinho de facas tipo Croton (Modelo MA 580 - Marconi), no Laboratório de Farmacologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas. O pó das cascas foi armazenado em sacos plásticos, ao abrigo da luz.

Com o pó das cascas foram realizados três procedimentos de extração: **1.** Extração aquosa (EA), obtida por infusão do pó a 2,5 % com água destilada a 77 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. **2.** Extração hidroalcoólica (EETOH), por agitação do pó a 2,5 % com etanol 50 % à temperatura ambiente (25 °C) por 24 h. **3.** Extração hidroalcoólica (EHA) à quente, de 100 g de pó das cascas em Soxhlet com 800 mL de etanol 80 %. Os rendimentos foram 12 % (EA), 13 % (EETOH) e 28,7 % (EHA).

Os extratos foram filtrados e concentrados em rota evaporador (RE47 –Yamato) à 50 °C e liofilizados (Modelo Modulayo – ThermoFischer).

##### 4.4.1 Obtenção da Fração Alcalóides Totais (FAT)

A obtenção da fração foi realizada sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra Mirtes Midori Tanae. Para isso o EHA concentrado foi suspenso em 500 mL de clorofórmio e extraído em funil de separação com 300 mL de água acidificada (HCl pH 3,0), por três vezes. Desse processo de partição foram obtidas a fração clorofórmica (FCHCl<sub>3</sub>) e a fração aquosa rica em alcalóides (FAT) (Figura 6).

*Geissospermum urceolatum*

(100 g)

800 mL de etanol 80 %

soxhlet

filtração

concentração a vácuo

## Extrato hidroalcoólico (EHA)

suspensão em clorofórmio

partição com água ácida (pH 3,0)

## Fração Alcalóides Totais (FAT)

purificação em CLAE; coluna C18

água/acetonitrila 10 a 20 % em 30 min



Figura 6 – Fluxograma da extração e fracionamento da fração alcalóides totais (FAT) de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry

#### 4.4.2 Cromatografia em Camada Delgada

As cromatografias em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm) Merck. A fase móvel utilizada foi clorofórmio: acetona: dietilamina (50:40:10).

Os reveladores utilizados foram reagente de Dragendorff e lâmpada de UV 254 nm e 330 nm. A FAT apresentou oito bandas com R<sub>f</sub>s de 0,02 a 0,6 (Figura 7).

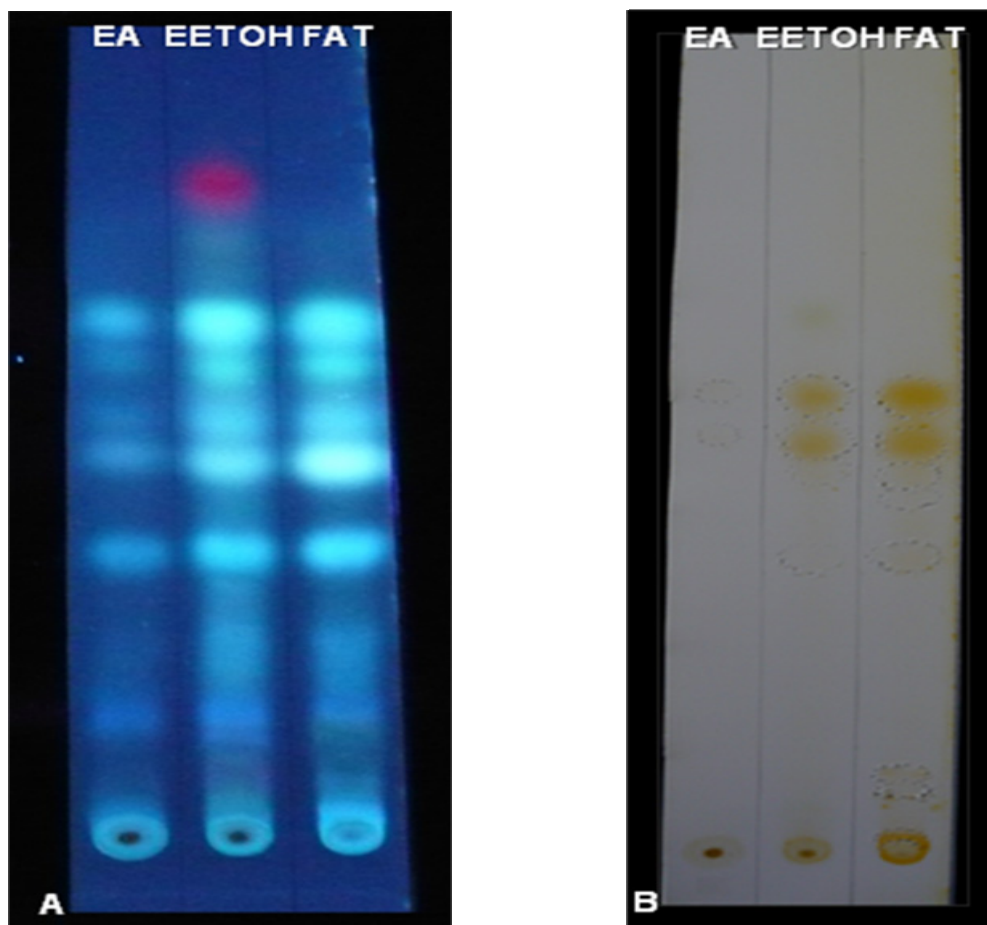


Figura 7 - Cromatografia em camada delgada do EA, ETOH e FAT de *Geissospermum urceolatum* A.H.Gentry, utilizando clorofórmio:acetona:dietilamina (50:40:10) como fase móvel. Revelação em UV 254 nm (A) e com Reativo de Dragendorff (B)

#### **4.4.3 Purificação da FAT por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep) e padronização da FAT**

A purificação e padronização da FAT em CLAE foram realizadas pela Dra Mirtes Midori Tanae, da Disciplina de Farmacologia Celular da UNIFESP, em São Paulo, como segue:

Para padronizar quimicamente a fração de alcalóides utilizada nas experiências desta Dissertação, a FAT foi purificada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas injetoras (LC-8A), controlador (SCL-8A), integrador CR4A, coletor de frações (FCV-100B) e detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-6A), operando a 210 nm.

A fase móvel consistiu em gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 20 % em 30 minutos, em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 10 mL/min.

A FAT foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL, coletando-se 14 frações, referentes aos picos com áreas maiores que 1 % da área total do cromatograma.

A purificação da FAT em CLAE-prep resultou em 14 frações com rendimentos: F1 0,4 %, F2 2 %, F3 1,2 %, F4 1,2 %, F5 1,6 %, F6 0,3 %, F7 0,6 %, F8 0,4 %, F9 10 %, F10 1,9 %, F11 2,6 %, F12 1,5 %, F13 0,3 %, F14 0,5 %.

As frações isoladas durante o processo de purificação foram recromatografadas em CLAE analítica e enviadas para identificação química.

#### 4.4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica e padronização da FAT

A FAT e frações isoladas de *G. urceolatum* em CLAE preparativa foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas analíticas LC-10AD, módulo de comunicação CBM-10A, detector UV-VIS SPD-10A, operando a 210 nm e um detector de diodo SPD-M10Avp. O sistema estava acoplado a um computador operado por software Shimadzu, versão 1.61, 3.84 CBM 10A.

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

Nestas condições, a CLAE da fração alcalóides totais de *Geissospermum urceolatum* na concentração de 2 mg/mL mostrou que a FAT é composta por um mínimo de 14 substâncias com tempos de retenção variando de 4,7 a 29,0 min (Figura 8).

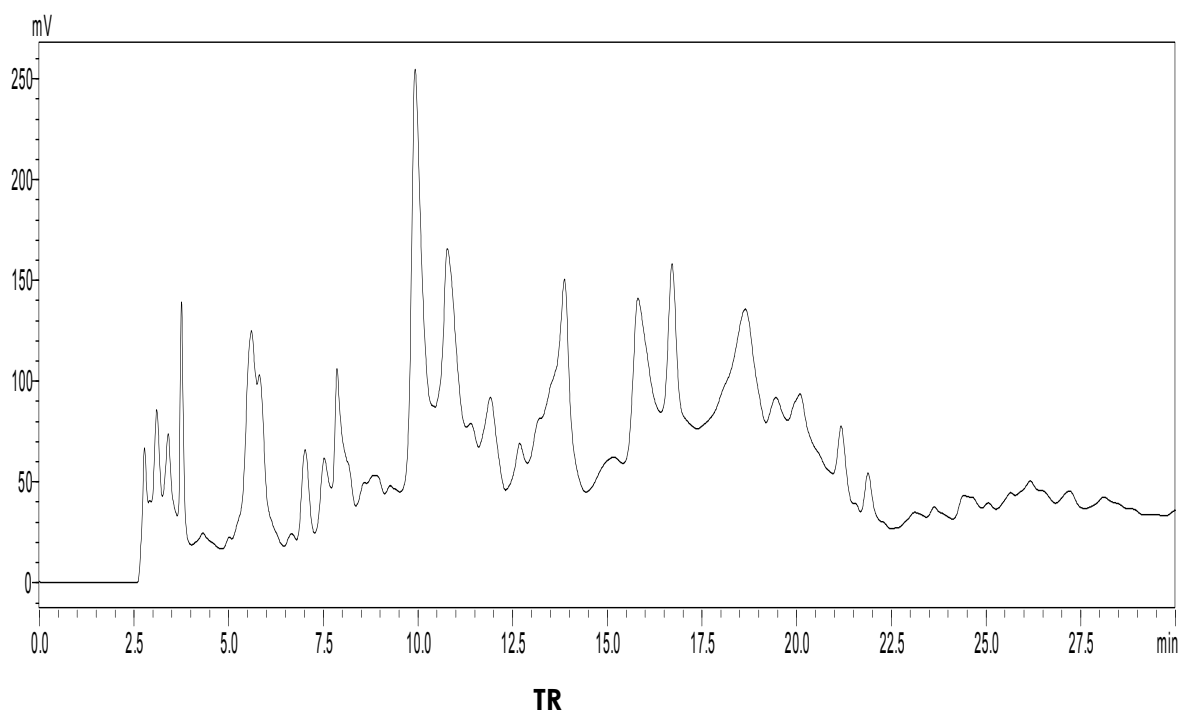


Figura 8 - Perfil cromatográfico da fração alcalóides totais (FAT) de *Geissospermum urceolatum* A.H.Gentry em CLAE analítica, utilizando-se coluna C18, gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 20 % em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm. TR = tempo de retenção

Os 6 picos majoritários escolhidos para a padronização química (fingerprint) da FAT apresentaram tempos de retenção (TR) 9,6; 10,4; 15,5; 15,9; 18,0 e 20,6 min, com áreas representando 12,3; 12,9; 9,2; 11,1; 8,4 e 10,6 % do total do cromatograma, respectivamente, que caracterizam a constituição química do extrato utilizado nas experiências farmacológicas (Figura 9).

A recromatografia em CLAE analítica das frações de *G. urceolatum* obtidas em CLAE preparativa mostrou um bom perfil cromatográfico da maioria das frações. As mais puras foram enviadas para identificação química.



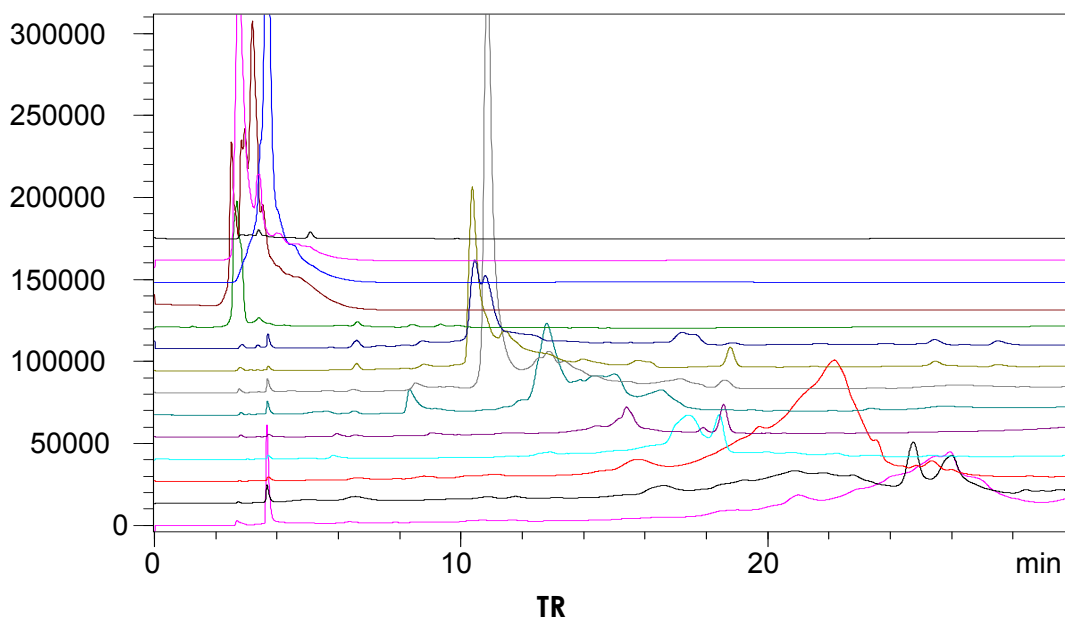


Figura 9 - Perfis cromatográficos das frações isoladas da FAT de *Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry em CLAE analítica, utilizando-se coluna C18, gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 20 % em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm

#### 4.4.5 Teste preliminar da atividade anti-plasmodium da FAT de *G. urceolatum*

A caracterização da FAT padronizada, como descrito acima, foi completada com o teste preliminar da atividade antiparasitária contra *Plasmodium chabaudi*. Esses testes foram realizados no Setor de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da UNIFESP, em São Paulo, pela Dra Maria Teresa R. de Lima-Landman e pela bióloga Marcela B. Nering para subsidiar os resultados obtidos nos testes farmacodinâmicos desta dissertação.

Os resultados *in vitro* mostraram que a FAT (3 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ) incubada na cultura de *Plasmodium chabaudi* diminuiu o número de hemácias parasitadas proporcionalmente à concentração. No entanto, o tratamento *in vivo* de camundongos com a FAT (100 mg/kg/dia, 4 dias) administrada por via oral durante 4 dias, não foi eficaz, pois não alterou o número de hemácias infectadas durante o tratamento. Ao contrário, o tratamento com cloroquina (10 mg/kg/dia, por 4 dias) durante o mesmo período interrompeu a progressão da infecção em

camundongos infectados. Esses dados indicaram que os alcalóides podem ser ativos se estiverem em contato com o parasita, mas indicam também a possibilidade dos compostos constituintes da FAT terem baixa biodisponibilidade (Figura 10).

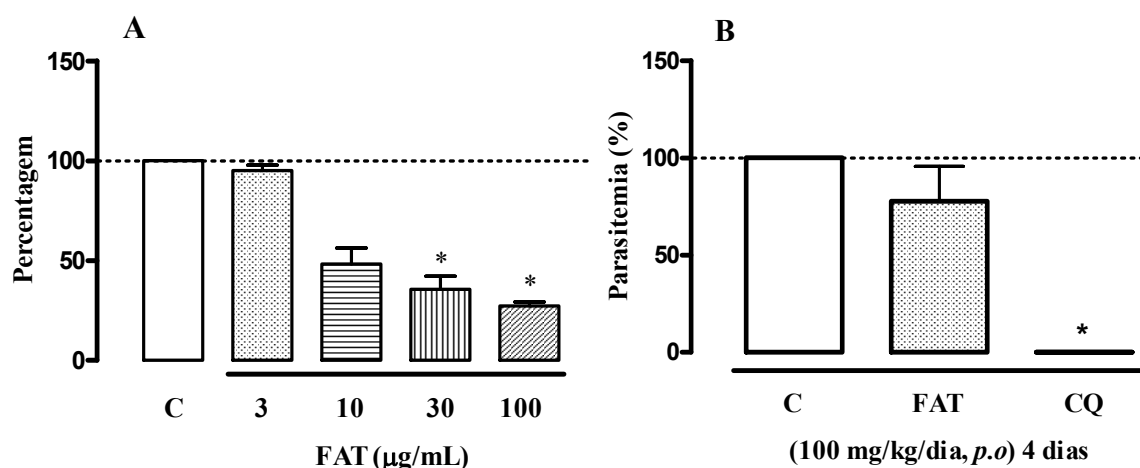


Figura 10 – Teste da atividade anti-malária da fração alcalóides totais (FAT) de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry **A** - Teste *in vitro* em cultura de sangue parasitado com *Plasmodium chabaudi* - As colunas mostram a porcentagem de células infectadas após incubação com FAT (3 - 100 µg/mL) por 24 h (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) determinada em citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton-Dickinson) utilizando acridina orange como corante. **B** – Teste *in vivo* - Porcentagem de células infectadas após inoculação intraperitoneal de *Plasmodium chabaudi* em camundongos Balb/C tratados com FAT (100 mg/kg/dia, *p.o.*, 4 dias). A parasitemia foi determinada por microscopia em lâminas coradas com Leishman. O dissulfato de cloroquina (10 mg/kg/dia, *v.o.*, 4 dias) foi utilizado como controle positivo



## **5.1 Métodos Farmacológicos para avaliação da atividade do extrato etanólico (EETOH) de *Geissospermum urceolatum***

Para o estudo da atividade farmacológica geral foram utilizados camundongos adultos, machos. Os animais ficaram em sala a 23 °C, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto na vigência dos experimentos. 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.*, 2003), com as devidas adaptações.

### **5.1.1 Teste geral da atividade farmacológica (Teste de Irwin ou Hipocrático)**

Os testes gerais foram realizados com camundongos machos adultos, n=8/grupo. Os animais foram tratados com extrato etanólico (EETOH) da casca de *G. urceolatum* (1,0 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H<sub>2</sub>O, 5 mL/kg, v.o.) e o diazepam (1,5 mg/kg, v.o.) foi usado como padrão positivo. Os animais foram colocados em caixas-moradia e utilizando manobras padronizadas, foram observados em intervalos de tempos de 30 min a 24 h após os tratamentos. Entre os intervalos, os animais foram submetidos a testes de avaliação da atividade exploratória no campo aberto, desempenho motor do rota-rod e na resposta a estímulos nociceptiva. O resultado das observações foi condensado em tabela de efeitos adaptada pelo grupo de estudos a partir da original publicada por IRWIN (1968).

### **5.1.2 Avaliação da ação cardiovascular da fração alcalóides totais (FAT) de *Geissospermum urceolatum***

#### **5.1.2.1 Avaliação da atividade na pressão arterial de ratos anestesiados**

Ratos normotensos fêmeas adultas foram anestesiados com a associação de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) em mistura. Em seguida, foram fixados em decúbito dorsal, canulando-se a veia ilíaca para a administração das drogas e da fração. A artéria carótida foi utilizada para registrar a pressão arterial. As variações pressóricas foram registradas por um transdutor de pressão conectado ao aparelho PowerLab (ADInstruments) que transmite os dados registrados para um computador utilizando software Chart 5 Pro.

A FAT dissolvida em salina 0,9 % foi injetada e.v. na doses de (1, 3 e 10 mg/kg). Como a fração produziu respostas hipotensoras, alguns animais foram tratados com atropina (1,0 mg/kg, e.v.) 5 min antes de uma nova dose da FAT.

Em todos os animais a atividade vascular foi testada com acetilcolina (0,1; 0,3; 1,0  $\mu$ g/kg, e.v.) e noradrenalina (0,1; 0,3; 1,0  $\mu$ g/kg, e.v.), injetadas antes e após a FAT.

#### **5.1.2.2 Avaliação da ação da FAT no músculo papilar e no átrio de rato**

Ratos foram anestesiados com éter etílico, sacrificados por decapitação e o coração retirado rapidamente através de toracostomia. Após remoção do pericárdio, os átrios e os músculos papilares do ventrículo direito foram isolados. O átrio direito apresentou batimentos espontâneos e foi utilizado para verificar *in vitro* a ação sobre a frequência do marcapasso. A preparação não serviu, no entanto, para evidenciar ação inotrópica porque a força de contração é dependente e inversamente proporcional à frequência cardíaca.

O átrio esquerdo, ao contrário, não mostrou atividade própria. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio, e ligada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g. A contração muscular foi estimulada com pulsos transmuralis supramáximos com duração de 2 ms e frequência de 1 Hz. Após 30 minutos de estabilização, a tensão de estiramento para contração máxima foi ajustada. Nessas condições, a FAT foi

incubada em concentrações cumulativas crescentes em escala logarítmica (10, 30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ), registrando-se os efeitos até estabilização da resposta contrátil. Somente uma concentração foi testada por preparação.

### **5.1.2.3 Avaliação da ação da FAT no inotropismo produzido pela noradrenalina no músculo papilar de rato**

Ratos foram anestesiados com éter etílico, sacrificados por decapitação e o coração retirado rapidamente através de toracostomia. Após remoção do pericárdio, os músculos papilares do ventrículo direito foram isolados. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio ( $\text{O}_2$  95 %  $\text{CO}_2$  5 %), pH 7,4 e ligada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g. A contração muscular foi estimulada com pulsos transmuralis supramáximos com duração de 2 ms e frequência de 1 Hz. Após 30 minutos de estabilização, foram feitas curvas de contração à adição cumulativa de noradrenalina ( $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M), antes e 10 min após a incubação da FAT (10, 30, e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Somente uma concentração foi testada por preparação.

As contrações em porcentagem da contração máxima produzida pela curvas controles de noradrenalina foram relacionadas aos logaritmos negativos das concentrações molares do agonista. Das curvas concentração-efeito obtidas, foram determinadas a  $\text{CE}_{50}$  (concentração efetiva 50 %) e o valor do efeito máximo.

### **5.1.2.4 Avaliação da ação da FAT em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M). Ação do L-NAME ( $10^{-5}$ M)**

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

Anéis de aorta torácica de aproximadamente 2 mm de comprimento foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba para órgão isolado com capacidade para 2 mL, contendo solução nutritiva de Krebs a 35 °C aerada com carbogênio (O<sub>2</sub> 95 % CO<sub>2</sub> 5 %), pH 7,4. A destruição do endotélio vascular, quando necessária, foi realizada mecanicamente pela introdução e giro de uma haste metálica roçando intraluminalmente o endotélio. Após 30 minutos de estabilização, a presença de endotélio foi testada observando-se o relaxamento induzido pela incubação de acetilcolina (10<sup>-6</sup> M) em anéis previamente contraídos por noradrenalina (10<sup>-7</sup> M). O efeito de concentrações individuais da FAT (1, 3 e 10 µg/mL) foi testado em preparações com e sem endotélio, previamente contraídas por noradrenalina (10<sup>-7</sup> M).

Em preparações com endotélio, os efeitos da FAT também foram avaliados 45 min após a incubação de L-NAME (N<sup>o</sup> – nitro-arginina metil éster) 10<sup>-5</sup> M.

Os efeitos foram medidos em g de tensão e expressos em percentagem da contração máxima produzida por noradrenalina 10<sup>-7</sup> M.

#### **5.1.2.5 Avaliação da ação da FAT nas curvas cumulativas de noradrenalina (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-6</sup> M) obtidas em anéis de aorta de rato sem endotélio**

Ratos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Após dissecação da aorta torácica e remoção do endotélio, anéis de aorta foram isolados e montados em cubas de 2 mL como descrito acima. Após 30 minutos de estabilização, a

ausência de endotélio foi testada com a incubação de acetilcolina ( $10^{-6}$  M) em tônus induzido pela noradrenalina ( $10^{-7}$  M). O efeito da FAT (30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi obtido após 10 min da incubação prévia à curva de noradrenalina ( $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M).

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

#### **5.1.2.6 Avaliação da ação da FAT em veia porta de rato despolarizada com KCl 80 mM em meio sem cálcio**

A eutanásia dos animais foi realizada com éter etílico, seguida por deslocamento cervical. Após exsanguinação, a cavidade abdominal foi exposta, a veia porta foi cuidadosamente isolada e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-bicarbonato. Os tecidos adjacentes e o sangue presente na luz do vaso foram removidos e as preparações montadas em cubas de vidro para órgão isolado com capacidade para 2 mL contendo solução de Krebs à 35 °C aerada constantemente com carbogênio ( $O_2$  95 %  $CO_2$  5 %), pH 7,4. Para o registro das contrações, a amarra costal foi fixada a uma haste de vidro dentro da cuba e a amarra tendínea a um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 5.

Após 30 minutos de estabilização, o líquido nutritivo foi substituído por solução Krebs despolarizante contendo KCl 80 mM sem cálcio, lavando a preparação a cada 15 minutos até a recuperação do tônus basal anterior à despolarização.

Após estabilização foram feitas curvas de contração à adição cumulativa de  $CaCl_2$  ( $10^{-5}$  a  $10^{-1}$  M) na ausência e na presença da FAT (10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ). O intervalo entre as



curvas foi de 30 min para recuperação do músculo. Somente uma concentração foi testada por preparação.

### **5.1.3 Avaliação da ação no músculo liso da fração alcalóides totais (FAT) de *Geissospermum urceolatum***

#### **5.1.3.1 Avaliação da atividade em curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato**

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

O músculo foi posicionado em uma cuba contendo LNV borbulhado com mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) à 30 °C, pH 7,4. Para o registro das contrações, as amarras foram fixadas a uma haste de vidro e a um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 5.

Após 30 minutos de estabilização, foram feitas curvas de contração à adição cumulativa de noradrenalina ou acetilcolina (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-4</sup> M), antes e 10 min após a incubação da FAT (100 e 300 µg/mL). Somente uma concentração foi testada por preparação.

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

#### **5.1.3.2 Avaliação da atividade em jejuno de rato**

O jejuno é um órgão de inervação predominantemente colinérgica e possui receptores muscarínicos majoritariamente do tipo M<sub>3</sub>, sendo por isso muito utilizado para teste da ação farmacológica na atividade parassimpática.

Ratos foram anestesiados com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. O jejuno foi retirado e colocado em placa de Petri com líquido nutritivo a 30 °C para dissecção fina. Os tecidos circunjacentes foram removidos e a luz do jejuno lavada. Após a montagem em cuba contendo Tyrode borbulhado com mistura carbogênica (95 % O<sub>2</sub> e 5 % CO<sub>2</sub>) à 30 °C, pH 7,4, sob tensão de 1,0 g e estabilização do órgão, foram feitas curvas cumulativas concentração-efeito de acetilcolina (ACh 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-4</sup> M) antes (curva controle) e 20 min após a incubação da FAT (10, 30, 100 e 300 µg/mL).

## 5.2 Análises Estatísticas

Os resultados relativos às concentrações efetivas (CE<sub>50</sub>) foram expressos como médias geométricas e limites de confiança (LC) e os valores comparados por análise de variância (ANOVA) não paramétrica (teste de Newman-Keuls). Os resultados com distribuição normal foram expressos como médias ± erro padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para  $p < 0,05$  pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett e ou Bonferroni, utilizando-se o Programa Graphpad Prism® versão 5.0.



### **6.1 Efeito do extrato etanólico (EETOH) de *G. urceolatum* (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin)**

No teste geral de atividades, o EETOH solúvel em água foi administrado em dose única elevada de 1,0 g/kg, v.o. Os camundongos tratados (n=3) não apresentaram sinais evidentes de atividade farmacológica do extrato: a motilidade e a deambulação não foram alteradas nas 3 horas iniciais ou 24 h após administração. Sinais de ataxia, incoordenação motora, quietação, sedação, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos não foram registrados em nenhum período de observação. Tampouco foram observados sinais de alteração autonômica como salivação, lacrimejamento, defecação aumentada ou de consistência pastosa. Não houve diferença significativa nos resultados comparados ao controle. Doses menores de EETOH não foram estudadas em vista da ausência de qualquer sinal indicativo da ação do extrato.

## 6.2 Ação cardiovascular

### 6.2.1 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (3 mg/kg) na pressão arterial de ratos anestesiados

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

A injeção da FAT (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) produziu hipotensão proporcional a alteração da pressão arterial à dose até 3 mg/kg, cuja injeção produziu hipotensão de 30 mm Hg com pico em 30 segundos e reversão à pressão basal em 3 minutos (Figura 11). Doses maiores produziram respostas irregulares com reversão demorada. A injeção da noradrenalina (0,1 a 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) produziu hipertensão variável proporcional à dose, de  $5,9 \pm 1,3$  mm Hg;  $11,7 \pm 0,7$  mmHg e  $17,8 \pm 1,8$  mm Hg. A injeção de acetilcolina (0,1 a 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) produziu hipotensão variável relacionada à dose de  $23,6 \pm 2,3$  mm Hg;  $37,2 \pm 4,4$  mm Hg e  $44,9 \pm 3,7$  mm Hg. A FAT (3 mg/kg, e.v.) injetada 1 min antes não alterou o efeito hipertensor da noradrenalina (0,1 a 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) ou a hipotensão produzida pela acetilcolina (0,1 a 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) (Figuras 12 e 13).

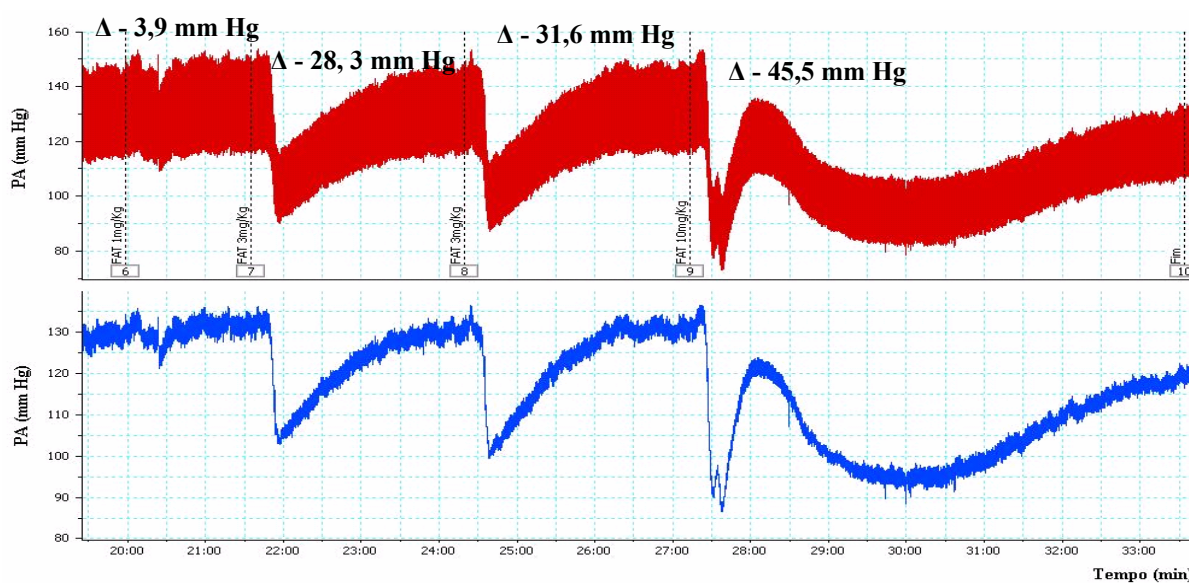


Figura 11 – Efeitos da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.) (n = 3)

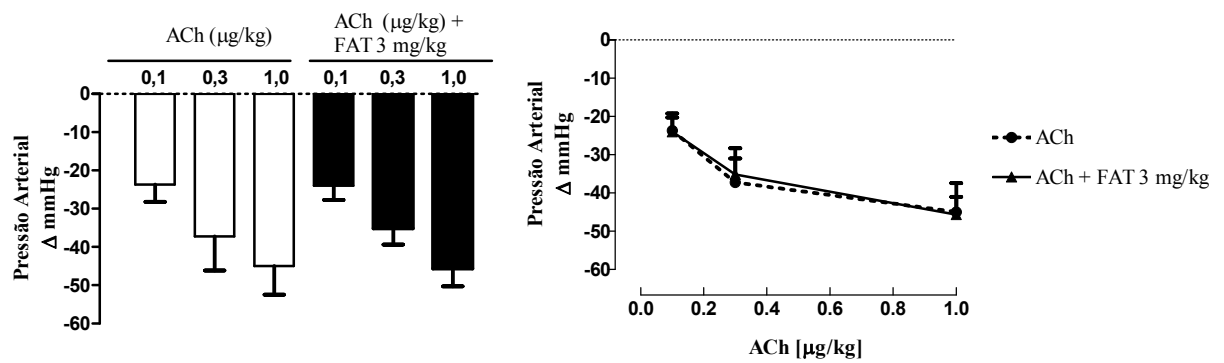


Figura 12 – Efeitos pressóricos da injeção de acetilcolina (0,1; 0,3 e 1,0 μg/kg, e.v.) antes e após a injeção de FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (3 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódio (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 3)

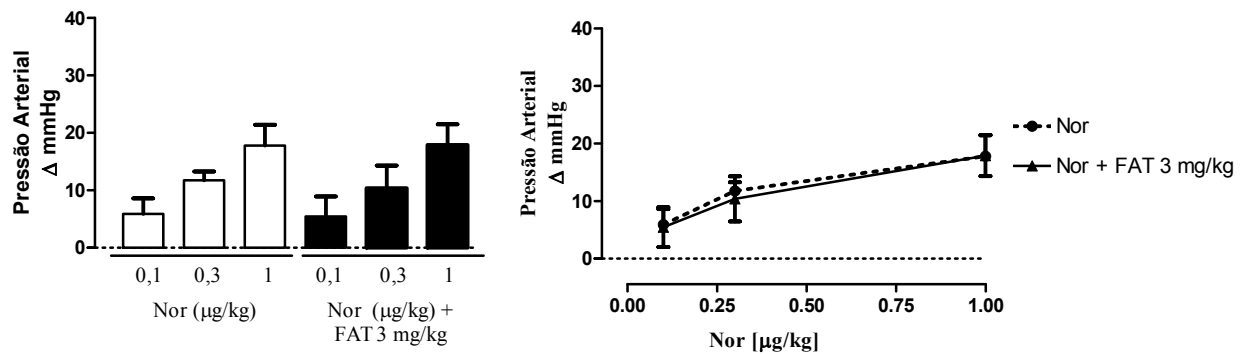


Figura 13 – Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,1; 0,3 e 1,0 μg/kg, e.v.) antes e após a injeção de FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (3 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com pentobarbital sódio (40 mg/kg i.p.). Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 3)

### 6.2.2 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (10 a 300 µg/mL) no músculo papilar de rato

Após 30 minutos de estabilização a 35 °C, o músculo papilar de rato apresentou tensão média de contração igual a  $195 \pm 59$  mg. Com a incubação de FAT nas concentrações de 10, 30, 100 e 300 µg/mL as contrações médias foram:  $209 \pm 63$  mg;  $217 \pm 61$  mg;  $212 \pm 53$  mg e  $165 \pm 38$  mg, respectivamente (n= 5), não diferentes da tensão basal (Figura 14).

As médias das velocidades máximas de contração e de relaxamento calculadas pela primeira derivada da contração dos músculos controles foram:  $4,1 \pm 1,1$  g/s e  $3,5 \pm 1,1$  g/s, respectivamente. Com a incubação da FAT 10, 30, 100 e 300 µg/mL as médias das velocidades máximas de contração e de relaxamento não foram diferentes dos valores basais: FAT 10 µg/mL ( $4,1 \pm 1,1$  e  $3,9 \pm 1,1$ ), FAT 30 µg/mL ( $4,2 \pm 1,0$  e  $3,9 \pm 1,0$ ), FAT 100 µg/mL ( $4,3 \pm 1,0$  e  $3,3 \pm 1,1$ ) e FAT 300 µg/mL ( $3,4 \pm 0,9$  e  $3,1 \pm 0,8$ ), respectivamente.

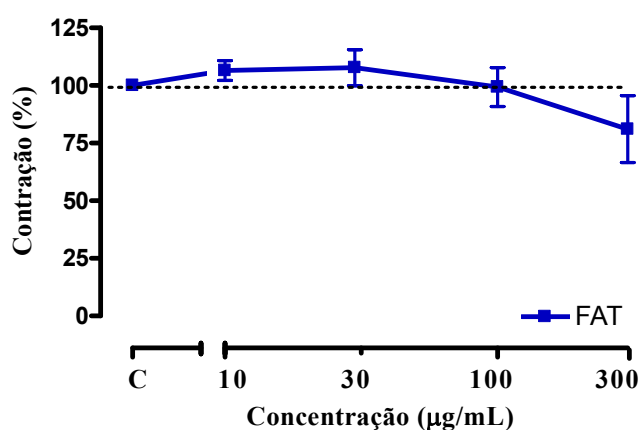


Figura 14 - Efeito da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (10 a 300 µg/mL) na força de contração do músculo papilar de rato estimulado a 1 Hz, 2 ms e voltagem supramáxima, T = 35 °C. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 5)

### 6.2.3 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (10 a 300 µg/mL) na frequência de contração 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 200 a 220 bpm (n=4).

A incubação da FAT (10 a 300 µg/mL) diminuiu o automatismo do átrio direito de 10 a 35 % a partir da concentração de 10 µg/mL (Figura 15).

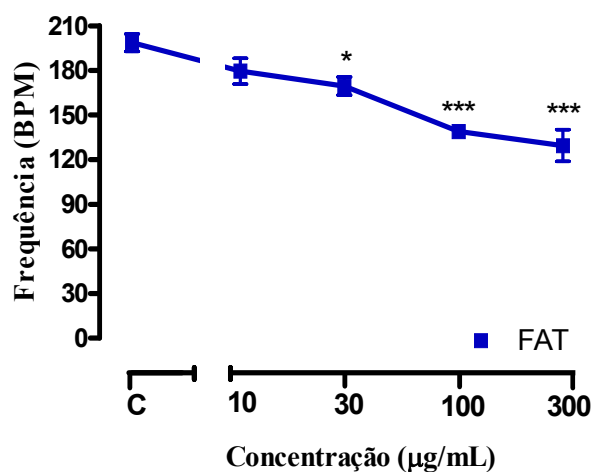


Figura 15 - Efeito da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (10 a 300 µg/mL) na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C. BPM = batimentos por minuto. Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 4). \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado ao controle (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett)



#### 6.2.4 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (10 a 100 µg/mL) no inotropismo produzido pela noradrenalina ( $10^{-8}$ a $10^{-5}$ M) no músculo papilar de rato

Em músculo papilar de rato estimulado eletricamente (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima) a incubação de noradrenalina ( $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M) aumentou a força de contração do músculo papilar de 4 a 33% do controle. A incubação prévia da FAT 10, 30 e 100 µg/mL, não alterou significativamente a resposta máxima à noradrenalina em relação à resposta controle, mas as respostas na presença das maiores concentrações de FAT foram significativamente menores que as respostas à noradrenalina na presença da menor concentração de FAT (Figura 16).

No entanto, em nenhum caso os valores da  $CE_{50}$  da noradrenalina foram alterados com a incubação de FAT 10, 30 e 100 µg/mL: 0,18 µM (LC 0,01 a 5,20 µM), 0,15 µM (LC 0,02 a 0,91 µM) e 0,12 µM (LC 0,01 a 1,14 µM), respectivamente, em relação ao controle 0,22 µM (LC 0,02 a 1,87 µM).

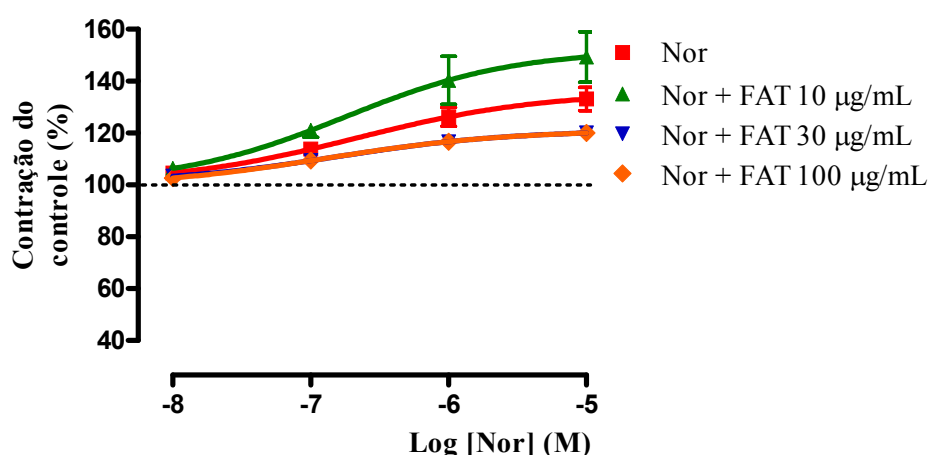


Figura 16 – Efeitos da noradrenalina (Nor  $10^{-8}$  a  $10^{-5}$  M) e da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (10, 30 e 100 µg/mL) incubada 30 min antes da noradrenalina, nas contrações do músculo papilar de rato, a 35 °C. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 4), relativamente à contração basal antes da adição de drogas

### 6.2.5 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M). Ação do L-NAME ( $10^{-5}$ M)

A incubação de noradrenalina ( $10^{-7}$  M) contraiu a aorta e manteve o tônus contrátil (100 %) durante tempo maior que 30 min.

A incubação da FAT 1, 3 e 10  $\mu\text{g/mL}$  em anéis de aorta pré-contraídos relaxou o tônus de maneira concentração-dependente após 30 min da incubação. As percentagens de relaxamento em relação ao tônus imediatamente antes da incubação foram de 10, 15 e 39 %, respectivamente. Com a incubação prévia de L-NAME ( $10^{-5}$  M) por 45 minutos, as percentagens de relaxamento foram 9, 8 e 25 %, não diferente do grupo controle (Figura 17 A e B).

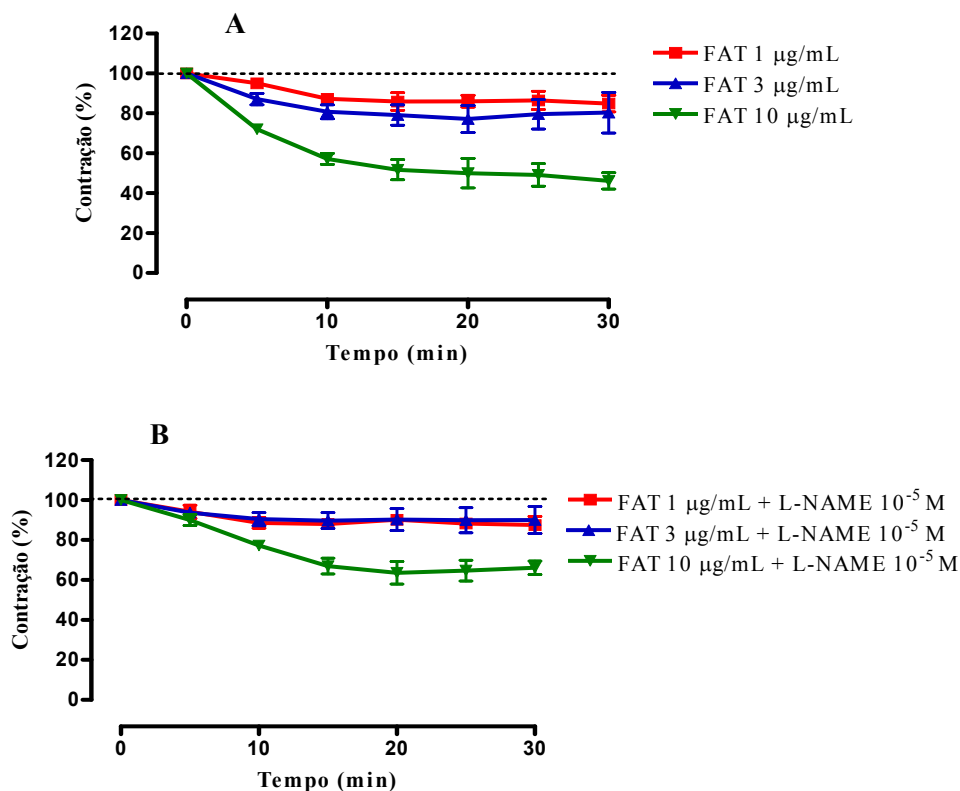


Figura 17 – Relaxamento produzido pela FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (1, 3 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) na contração induzida por noradrenalina ( $10^{-7}$  M) em anéis de aorta de rato em condições controle com endotélio (A) e na presença de L-NAME ( $10^{-5}$  M) (B), incubado 45 min antes. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 4)

### 6.2.6 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (1, 3 e 10 µg/mL) em anéis de aorta de rato sem endotélio, pré-contraindidos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M)

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

Em anéis de aorta de rato comprovadamente sem endotélio, previamente contraídos com Nor ( $10^{-7}$  M), a incubação da FAT (3 e 10 µg/mL) relaxou o tônus em 14 % e 56 %, respectivamente, após 30 min (Figura 18).

Note-se que o relaxamento do tônus adrenérgico na presença da FAT foi igual nos anéis de aorta com e sem endotélio, indicando outra via de relaxamento que não a via do óxido nítrico (NO).

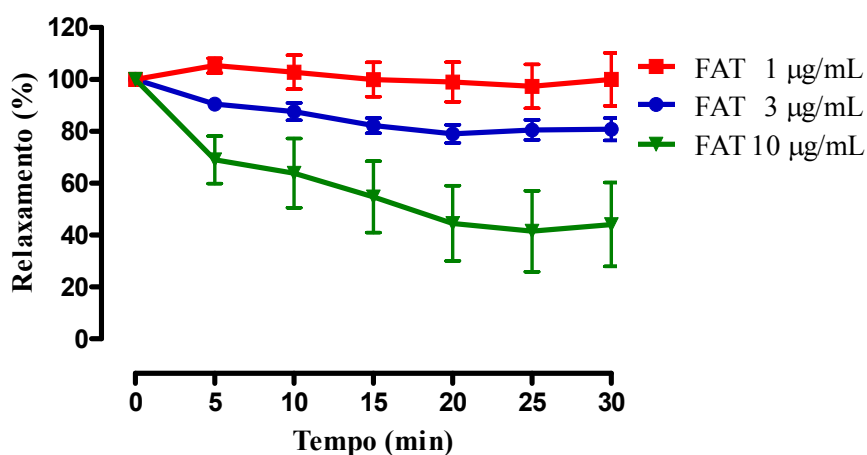


Figura 18 – Relaxamento produzido pela FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (1, 3 e 10 µg/mL) no tônus induzido por noradrenalina ( $10^{-7}$  M) em anéis de aorta de rato sem endotélio. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 4)

### 6.2.7 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (30 e 100 µg/mL) em anéis de aorta de rato sem endotélio. Curvas cumulativas de noradrenalina ( $10^{-9}$ a $10^{-6}$ M)

Os anéis de aorta comprovadamente sem endotélio contraíram à adição cumulativa de Nor  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M com respostas proporcionais às concentrações. A incubação prévia da FAT 30 e 100 µg/mL reduziu a contração máxima à Nor em 17 % e 31 %, respectivamente. Não houve diferença entre os valores da  $CE_{50}$  da noradrenalina: 0,05 µM, (LC 0,03 a 0,09 µM), 0,10 µM, (LC 0,07 a 0,14 µM) e 0,13 µM, (LC 0,03 a 0,50 µM) calculados das curvas controle e das obtidas na presença de FAT 30 e 100 µg/mL respectivamente (Figura 19).

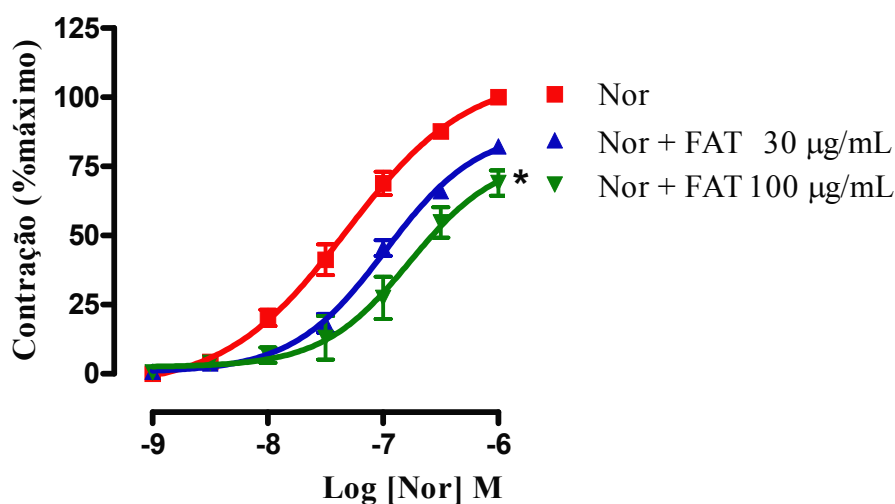


Figura 19 – Efeito da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (30 e 100 µg/mL) na contração de anéis de aorta de rato sem endotélio produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor,  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  M), a 30 °C. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 4). \* $p < 0,05$ , comparado ao controle (ANOVA de 1via e teste de Neuwman-Keuls)

### 6.2.8 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (10, 30 e 100 µg/mL) em veia porta de rato despolarizada com KCl 80 mM em meio sem cálcio

Na exposição a uma solução nutritiva despolarizante (KCl 80 mM) e sem cálcio extracelular, a atividade contrátil espontânea na veia porta foi inibida. A adição progressiva de CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> a 10<sup>-1</sup> M) ao meio nutritivo permitiu a obtenção de curvas concentração-efeito proporcionais à concentração.

Na presença da FAT 10, 30 e 100 µg/mL as respostas máximas das preparações ao CaCl<sub>2</sub> foram reduzidas em 15, 22 e 28 %, respectivamente (Figura 20). Os valores da CE<sub>50</sub> para o CaCl<sub>2</sub> foram: 7,6 mM (LC 5,3 a 10,9 mM), 13,9 mM (LC 3,8 a 50,1 mM) e 18,6 mM (LC 5,7 a 60,0 mM) na presença da FAT, respectivamente. Esses valores foram significativamente diferentes da CE<sub>50</sub> controle 3,8 mM (LC 2,3 a 6,1 mM).

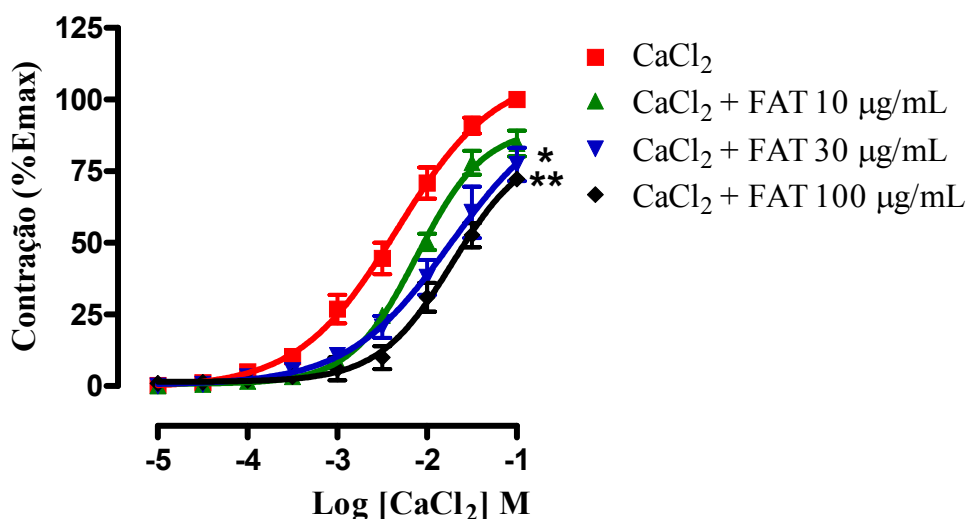


Figura 20 - Curvas concentração-efeito de CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-5</sup> a 10<sup>-1</sup> M) obtidas na ausência e na presença da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (10, 30 e 100 µg/mL), em preparações de veia porta de rato despolarizadas com KCl 80 mM em líquido nutritivo sem cálcio a 35 °C. Os símbolos e barras verticais representam as médias ± erros padrão das contrações obtidas com adição cumulativa do CaCl<sub>2</sub> à cuba (n = 4). \**p* < 0,05 e \*\* *p* < 0,01, comparado ao controle (ANOVA de 1 via e teste de Neuwman-Keuls)

### 6.3 Ação no músculo deferente e jejuno de rato

#### 6.3.1 Efeito da fração alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (100 e 300 µg/mL) em curvas cumulativas de noradrenalina e acetilcolina em ducto deferente de rato

A incubação da noradrenalina ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M,) produziu contrações proporcionais à concentração. A  $CE_{50}$  da noradrenalina foi 2,6 µM, (LC 1,8 a 3,8 µM). A FAT (100 e 300 µg/mL) incubada 30 min antes, potenciou a contração produzida no ducto deferente de rato pela incubação de noradrenalina, sem modificar a afinidade da droga por seus receptores (Figura 21, Tabela 1).

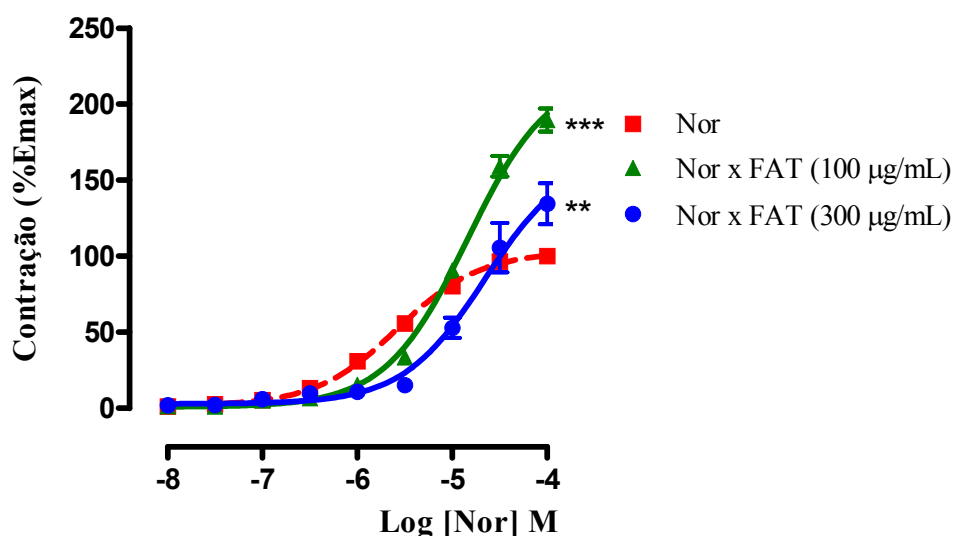


Figura 21 - Efeito da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (100 e 300 µg/mL) na contração da porção prostática do ducto deferente de rato, produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor,  $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M), a 30 °C. A FAT foi incubada 30 min antes da adição do agonista. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 5). \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado ao controle (ANOVA de 1via e teste de Neuwman-Keuls)

A acetilcolina ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), produziu contração do ducto deferente proporcional à concentração. A  $CE_{50}$  da acetilcolina foi 88,0 µM, (LC 43,8 a 179,9 µM). A FAT (100 e 300 µg/mL) incubada 30 min antes, potenciou o efeito máximo produzido pela acetilcolina, sem alterar a  $EC_{50}$  deste agonista muscarínico (Figura 22, Tabela 1).

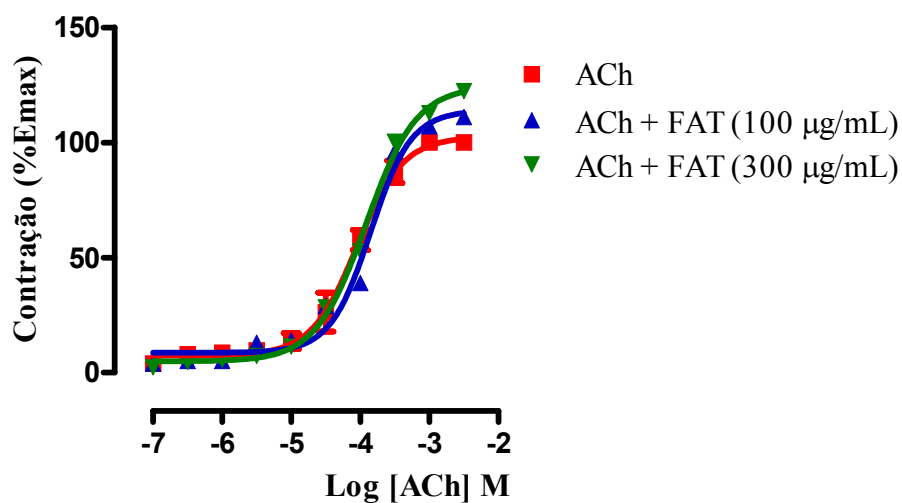


Figura 22 - Efeito da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ) na contração da porção prostática do ducto deferente de rato produzida pela adição cumulativa de acetilcolina (ACh,  $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), a  $30^{\circ}\text{C}$ . A FAT foi incubada 30 min antes da adição do agonista. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n =4)

Tabela 1 – Efeito máximo e concentração efetiva média ( $\text{CE}_{50}$ ) obtidos de curvas concentração-efeito de noradrenalina ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  M) e de acetilcolina ( $10^{-7}$  a  $10^{-2}$  M), na ausência e após a incubação da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry nas concentrações indicadas

Agonista	Noradrenalina			Acetilcolina			
	FAT $\mu\text{g/mL}$	0	100	300	0	100	300
Emax %		100	190	140	100	111	122
$\text{CE}_{50}$ $\mu\text{M}$ (LCi-LCs)		2,6 (1,8 - 3,8)	12,0 *** (11,8 - 12,3)	18,0 ** (12,3 - 26,5)	88,0 (43,8 - 179,9)	141,7 (138,5 - 145,1)	116,1 (58,9 - 228,9)

Os valores são médias geométricas e limites de confiança (n = 4) \* diferentes do controle (ANOVA e Neuwman-Keuls)

### 6.3.2 Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) de *G. urceolatum* (10 a 300 µg/mL) em jejuno de rato

Em jejuno de rato, a incubação de ACh ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) produziu contração relacionadas as concentrações com  $CE_{50}$  0,6 µM (LC 0,4 - 0,8 µM). A incubação de FAT 10, 30, 100 e 300 µg/mL, 15 min antes da ACh, inibiu as contrações máximas de ACh a  $100 \pm 0,0$ ;  $99,0 \pm 0,9$ ;  $100,0 \pm 0,0$ ;  $100,0 \pm 0,0$  % em relação ao controle, respectivamente. As  $CE_{50}$  na presença de FAT foram 0,8 µM (LC 0,7 – 1,1 µM); 1,0 µM, (LC 0,6 – 1,7 µM); 1,5 µM (LC 0,6 – 4,0 µM) e 3,7 µM (LC 2,4 – 5,8 µM), respectivamente. Esses efeitos foram significativamente diferentes do controle na presença de FAT 300 µg/mL (Figura 23, Tabela 2).

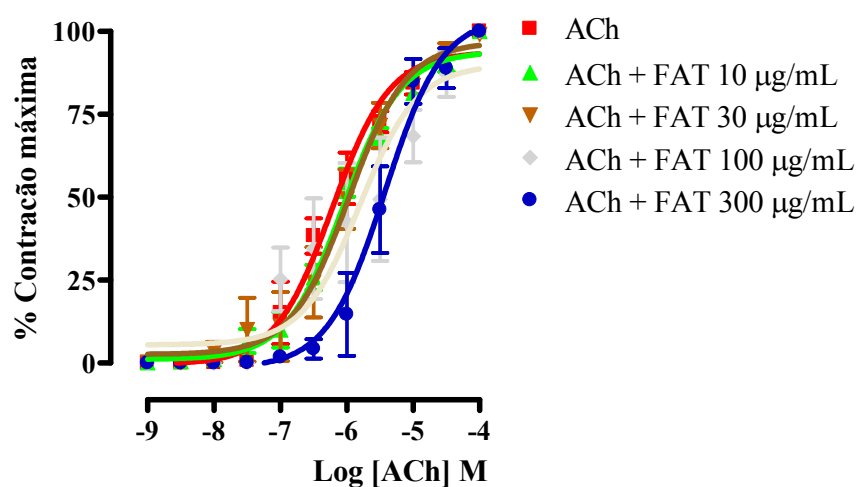


Figura 23 – Curvas concentração-efeito de acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) obtidas antes controle e após incubação de FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry (10, 30, 100 e 300 µg/mL) em preparações de jejuno isolado de rato. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n = 4).  $p < 0,05$  comparado ao controle (ANOVA de 1 via e teste de Neuwman-Keuls)



Tabela 2 – Valores da concentração efetiva média ( $CE_{50}$ ) obtidos de curvas concentração-efeito da acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) registrados antes e após a incubação da FAT de *Geissospermum urceolatum* A. H. Gentry nas concentrações indicadas

<b>Agonista</b>	<b>Acetilcolina</b>				
<b>FAT</b>	<b>0</b>	<b>10 µg/mL</b>	<b>30 µg/mL</b>	<b>100 µg/mL</b>	<b>300 µg/mL</b>
<b><math>CE_{50}</math> µM (LCi-LCs)</b>	0,6 (0,4 – 0,8)	0,8 (0,7 – 1,1)	1,0 (0,6 – 1,7)	1,5 (0,6 – 4,0)	3,7 (2,4 – 5,8)

Os valores são médias geométricas e limites de confiança (n = 4) \* diferentes do controle (ANOVA e Neuwman-Keuls)



O presente trabalho teve como objetivo estudar as ações farmacológicas do extrato etanólico da *Geissospermum urceolatum*. A literatura científica consultada (Pubmed, Scielo e Lillacs) não lista trabalhos com *Geissospermum urceolatum*. Pesquisa em base de dados genérica de acesso popular (Google) realizada até a presente data mostrou apenas alguns de nossos próprios resultados preliminares com a planta. Chegou ao nosso conhecimento um estudo qualitativo realizado por QUEIROZ (2002) durante estágio supervisionado na UFAM utilizando *G. urceolatum* da Reserva Ducke, trabalho não publicado, no qual detectou, com técnica farmacognóstica, a presença de flavonóides e alcalóides no extrato etanólico da casca. Estudos com as espécies *Geissospermum vellosii*, *G. sericeum* e *G. argenteum* foram mais frequentes na literatura; em nenhum trabalho encontrou-se informação quanto à padronização química do extrato, ou descrição quantitativa dos alcalóides isolados da espécie em estudo. À exceção dos estudos químicos de RAPOPORT *et al.*, (1960) com a *G. laeve*, PACCIONI; HUSSON (1978) com a *G. argenteum* e os de STEELE *et al.*, (2002) com a *G. sericeum*, as proporções relativas dos compostos nos extratos não foram determinadas, o que dificulta uma padronização e futuros estudos comparativos da atividade da mistura.

O gênero *Geissospermum* é rico em alcalóides (JANOT, 1961), que também foram detectados no extrato padrão de *G. urceolatum* utilizado neste estudo. Estas espécies tem a mesma referência popular de uso (para revisão ver OLIVEIRA *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2000; BERTANI *et al.*, 2005). Estudos anti-plasmodium *in vitro* com extratos e frações são encontrados na literatura, sem resultados conclusivos *in vivo* (STEELE *et al.*, 2002).

No início do nosso trabalho, a fração “alcalóides totais” do extrato etanólico foi avaliada quanto à atividade nos testes utilizando *Plasmodium chabaudi*, com resultado positivo *in vitro*, mas negativo em camundongos Balb C infectados *in vivo* (testes realizados pela Dra M.T. Lima-Landman, da UNIFESP, não publicados). Os resultados *in vitro* mostraram que a incubação de FAT diminuiu o número de hemácias parasitadas

proporcionalmente à sua concentração. No entanto, o tratamento *in vivo* com FAT administrado por via oral durante (4) dias, não foi eficaz para proteger camundongos infectados, pois não alterou a parasitemia. Vale notar, que o tratamento com cloroquina durante o mesmo período e pela mesma via interrompeu a progressão da infecção em camundongos. Esses dados indicaram que os alcalóides podem ser ativos se tiverem contato com o parasita, mas indicam também a possibilidade dos compostos constituintes da FAT terem baixa biodisponibilidade. Esses estudos da atividade anti-malárica não foram continuados porque foi necessário determinar com antecedência se os alcalóides da *G. urceolatum* podiam ser absorvidos por via oral. Confirmar esta informação foi a primeira meta do estudo farmacológico então iniciado.

A informação popular refere o uso medicinal do chá e do extrato etanólico das cascas do caule da acariquara-branca. Os dois extratos foram comparados no início do nosso trabalho. Verificamos que o rendimento do extrato aquoso foi de 12%, não diferente da extração etanólica a frio (13%). A extração etanólica sob refluxo em soxhlet foi mais eficiente, com rendimento de 28,7%. A comparação dos 3 extratos na cromatografia em placa de sílica gel mostrou que os cromatogramas diferiu macroscopicamente apenas na concentração dos compostos agrupados por Rf. A revelação das mesmas placas com o reagente de Dragendorff confirmou a presença dos alcalóides em maior concentração na FAT. Na purificação da FAT em CLAE foram coletadas 14 frações bem individualizadas referentes aos picos majoritários (>1% da área total do cromatograma), esses compostos tem tempos de retenção caracterizados em CLAE e serão identificados e avaliados farmacologicamente. Na padronização química imediata realizada para o estudo farmacológico do presente trabalho, foram considerados os 6 componentes químicos com os maiores picos na CLAE a 210 nm; as FAT de diferentes extrações foram comparadas pelos tempos de retenção e área desses picos em CLAE nas condições cromatográficas definidas no estudo. Estes componentes foram

enviados para identificação química e estão sendo obtidos em quantidade para estudos da atividade e do mecanismo de ação. Nas experiências aqui relatadas, em vista da quantidade de material necessária para a avaliação das atividades farmacológicas sistêmicas e porque as indicações populares apontam a ingestão do extrato como forma usual de uso, os estudos farmacológicos foram iniciados com a mistura de compostos encontrada na FAT.

A triagem geral da atividade farmacológica foi iniciada com o método de observação, ou Teste hipocrático (IRWIN, 1968). A administração oral, do EETOH administrado em dose única elevada de 1,0 g/ kg, v.o., não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica nos animais. Com a administração sistêmica por via intraperitoneal, no entanto, o extrato diminuiu a motilidade, a frequência respiratória e produziu cianose nos animais, sendo todos os efeitos de aparecimento e intensidades proporcionais à dose. Estudo anterior de outros autores com o extrato etanólico da espécie *G. laeve* administrado na mesma dose por via oral, mostrou uma discreta diminuição da motilidade, não ocorrendo o aparecimento de qualquer outro efeito. A administração intraperitoneal do extrato diminuiu a motilidade, a frequência respiratória e produziu cianose proporcionalmente à dose. Mostraram os autores, que estes efeitos estavam relacionados a uma atividade curarizante do extrato; frente a esses resultados, a interpretação dos efeitos *in vivo* com manifestações motoras, como as alterações no comportamento e as manifestações autonômicas desencadeadas pela dificuldade respiratória ficaram comprometidas (RIBEIRO, 1986).

Ação curarizante *in vivo*, dispnéia e cianose, foram também observadas após administração intraperitoneal da FAT (100 a 300 mg/kg) da *G. urceolatum* comprovando a baixa biodisponibilidade oral dos extratos. Os efeitos foram mais rápidos e intensos que os produzidos pelo extrato etanólico confirmando também a maior concentração dos compostos na FAT. Notadamente, a ação curarizante de doses baixas da FAT (1 a 10 mg/kg)

administradas endovenosamente não interferiu no registro da pressão arterial de ratos anestesiados.

A injeção e.v. da FAT em ratos anestesiados produziu hipotensão rápida, proporcional à dose, e passageira. O efeito não foi acompanhado de alteração da frequência cardíaca, e a repetição da fração, no mesmo animal, não foi acompanhada de dessensibilização. Durante a ação da fração, as respostas aos mediadores autonômicos principais, noradrenalina e acetilcolina, não foram alteradas, indicando que as vias de respostas ativadas por receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos e muscarínicos  $M_3$  não foram comprometidas pela fração. Como será discutido mais à frente, a FAT não estimulou a contração do jejuno isolado de rato, eliminando também uma interação agonista com receptores  $M_3$ . Da mesma forma, a FAT não pareceu interferir com o débito cardíaco porque, quando incubados no músculo papilar *in vitro*, os alcalóides da FAT não inibiram o inotropismo até a concentração de 0,3 mg/mL. Esta concentração de FAT corresponde à concentração plasmática esperada de uma dose de 15 mg/kg (em cálculos aproximados considerando o volume plasmático como 6% da água corpórea). Note-se, porém, que *in vitro* essa concentração deprimiu o automatismo cardíaco, o que não foi observado na frequência cardíaca *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que a ação cardíaca da FAT não deve ser responsável pela hipotensão.

A pressão arterial é resultante do produto entre o débito cardíaco e a resistência periférica ao fluxo sanguíneo ( $PA=DC \times RP$ ). Em condições normais, sem perda de sangue e manutenção do volume sistólico, o débito cardíaco está relacionado à força de contração ventricular e à frequência cardíaca ( $DC=f \times FC$ ), enquanto a resistência periférica depende do tônus do músculo liso vascular, isto é, do grau de contração dos vasos, principalmente as arteríolas. Do que foi comentado acima, a atividade da FAT na contração cardíaca (inotropismo) não seria um mecanismo importante da hipotensão produzida pelos alcalóides. Considerando os possíveis mecanismos de ação vasculares, a ação da FAT foi avaliada em

anéis de aorta torácica de rato com tônus vascular induzido pela Noradrenalina ( $10^{-7}$  M) *in vitro*. A noradrenalina é o principal mediador simpático e vasoconstritor fisiológico, ainda que outras substâncias como a angiotensina e endotelina possam ter contribuição na manutenção do tônus vascular. O tônus adrenérgico vascular resulta da ativação de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos acoplados à proteína  $G_s$  que, quando ativada, ativa também a ação da fosfolipase C da membrana celular, com liberação dos segundo-mensageiros intracelulares trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG) (TOGNARINI; MOUDS, 1997). A ativação de receptores de  $IP_3$  localizados na membrana do retículo endo/sarcoplasmático libera  $Ca^{2+}$  reticular para o citosol, enquanto que o DAG ativa quinases protéicas (proteínas quinases do tipo C, PKC) que fosforilam e ativam canais de cálcio da membrana (WALSH *et al.*, 1994). Com o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, ocorre a contração do músculo liso vascular (WALSH *et al.*, 1994). Em nossas experiências, a FAT relaxou o tônus muscular produzido pela noradrenalina na aorta de rato com endotélio, mas, após o bloqueio da NOS (sintase do óxido nítrico) com L-NAME, o relaxamento foi reduzido de apenas 40%, indicando um outro mecanismo independente de NO na ação relaxante da FAT. Esta possibilidade foi confirmada quando a FAT também relaxou a aorta desprovida de endotélio.

O relaxamento da musculatura lisa vascular produzido pela acetilcolina é dependente da liberação de óxido nítrico (NO) pela célula endotelial (FURCHOTT, 1984). A interação da acetilcolina com os receptores muscarínicos  $M_3$  leva a ativação da sintase do óxido nítrico (NOS) endotelial, promovendo a síntese de NO. Uma vez sintetizado, o NO difunde para o músculo liso vascular e ativa uma guanilato ciclase solúvel (GCS) que estimula a produção de monofosfato cíclico de 3',5' guanosina (GMPc) na musculatura (FEELISCH; NOACK, 1987). Esse segundo-mensageiro, por sua vez, ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG) induzindo relaxamento vascular por mecanismos diversos (para revisão ver MURAD *et al.*, 1987) entre eles desfosforilação direta da cadeia leve da miosina, e a redução da

concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (CARVAHAL *et al.*, 2000; MURAD *et al.*, 1987; WEISBROD *et al.*, 1998).

Dando continuidade ao estudo das ações farmacológicas no sistema cardiovascular, o efeito da FAT foi avaliado em preparações de veia porta despolarizada de rato. É conhecido que a contração da musculatura lisa vascular é proporcional às concentrações intracelulares de cálcio citosólico livre o qual resulta da mobilização dos estoques sensíveis ao trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ), à cafeína ou à rianodina e do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais iônicos na membrana celular (TRIBE *et al.*, 1994). A substituição do líquido nutritivo normal por uma solução contendo alta concentração de  $\text{K}^+$  (KCl 80 mM) e sem cálcio, produz contração seguida de relaxamento da preparação. O aumento da concentração de  $\text{K}^+$  extracelular despolariza a membrana muscular e leva à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (do tipo L) na membrana celular, e o músculo contrai; a lavagem repetida da preparação com líquido nutritivo sem cálcio acaba por depletar os estoques intracelulares de cálcio, forçando o relaxamento muscular, mesmo na vigência da despolarização da membrana. Nestas condições, a preparação desenvolve contração muscular proporcional à concentração de cálcio adicionada (BEECH, 1997). Na veia porta despolarizada, a FAT reduziu a contração máxima produzida pela adição de  $\text{CaCl}_2$ , indicando bloqueio dos canais de cálcio pelos alcalóides. Desta forma a ação da FAT no influxo de cálcio foi avaliada sem serem excluídas outras ações em etapas intracelulares mais tardias.

Estudos complementares no ducto deferente de rato mostraram que a FAT potencializou a contração máxima produzida pela incubação de noradrenalina, e diminuiu a afinidade ( $\text{CE}_{50}$ ) da droga pelos receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Essas duas ações simultâneas não são explicadas pelo mesmo mecanismo. Na mesma preparação as respostas à incubação de acetilcolina não foram alteradas.

A diminuição da afinidade da Nor na presença da FAT, com deslocamento da curva



concentração-efeito para a direita, foi observada também na aorta, sem que o efeito máximo do agonista fosse aumentado nesta preparação. Ao contrário, o efeito máximo da Nor na aorta foi inibido na presença da FAT. Esta ação pode ser explicada por interação extracelular dos alcalóides com os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mas até o momento não existe estudo específico dessa interação molecular esperando-se o isolamento e identificação dos componentes químicos da FAT.

A potenciação da contração máxima produzida pela Nor não tem a mesma explicação. O efeito não pode ser explicado por ação extracelular mediada por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos; portanto, deve ser pensado em ação intracelular da FAT. Nesse caso, porém, a permeabilidade dos alcalóides através da membrana é questionável, haja vista a baixa biodisponibilidade da FAT por via oral, como descrito anteriormente.

Até o momento, não encontramos na literatura, menção a outra droga com ação semelhante à esta da FAT.

À guisa de discussão, lembramos que a potenciação da contração máxima da Nor na presença da FAT ocorreu no ducto deferente, mas não na artéria. O ducto deferente é uma estrutura com inervação simpática privilegiada, onde a co-transmissão simpática de ATP + Noradrenalina pode ser evidenciada na contração do órgão (BURNSTOCK, 2006). Os dois mediadores são agonistas independentes no ducto deferente: o ATP produz contração rápida e a noradrenalina contração tônica. Em 2004 (SMITH; BURNSTOCK) mostraram que a exposição prévia à Noradrenalina potencia a contração produzida pelo ATP, mas que a ação prévia do ATP não potencia a contração da noradrenalina. Efeito semelhante ocorre com a histamina no ducto deferente da cobaia. A histamina e a noradrenalina contraem o ducto via receptores  $H_1$  e  $\alpha_1$ , respectivamente. Esses dois receptores são acoplados a proteína  $G_o$ , à estimulação da fosfolipase C, ativação dos segundo-mensageiros  $IP_3$  e DAG, que agem sinergicamente na contração do músculo liso, mobilizando  $Ca^{2+}$  e ativando a PKC,

respectivamente. Os autores concluíram que a potenciação da contração ao ATP pode ocorrer por mecanismo mediado pela PKC ativada pelo DAG da seguinte forma: a PKC inibiria a fosfatase da MLC responsável pela inativação da MCLK; como consequência haveria sensibilização das miofibrilas ao cálcio citosólico (SMITH; BURNSTOCK, 2004). Não contamos no momento com nenhuma evidência que ocorra ação semelhante com a FAT: o ducto deferente do rato não é sensível à histamina e a ação da acetilcolina que estimula a ativação da cascata de IP<sub>3</sub> e DAG após interação com receptores muscarínicos do tipo M<sub>3</sub> não foi potenciada pela FAT.

Estes resultados mostraram que a FAT potenciou a ação de segundo-mensageiros da via adrenérgica, mas não potenciou a contração quando os segundo-mensageiros foram ativados pela estimulação dos receptores muscarínicos. O estudo dos alcalóides purificados será essencial para o entendimento dos mecanismos das ações até agora evidenciadas.

Em resumo, o presente trabalho apresentou resultados que mostram ação vasodilatadora que pode ser explicada por dois mecanismos: indireta via ativação de NOS endotelial e direta na musculatura lisa, aparentemente por bloquear o influxo de íons cálcio. Esta ação, no entanto, não é tão clara, pois na musculatura do ducto deferente ao mesmo tempo em que a CE<sub>50</sub> da noradrenalina é aumentada na presença da FAT, o efeito contrátil máximo do agonista foi potenciado, aparentando uma sensibilização das miofibrilas contráteis. Os dados atuais não permitem explicar essa ação aparentemente intracelular na cadeia de segundo-mensageiros, principalmente porque a FAT não parece ser permeável à membrana celular. Por outro lado, a mistura de alcalóides na FAT pode estar produzindo efeitos diferentes que dificultam a análise dos resultados. A purificação e isolamento dos constituintes deverá permitir a dissociação dos efeitos observados e a determinação dos mecanismos de ação, principalmente do efeito pouco conhecido que potenciou a contração máxima do agonista total noradrenalina.



O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos dos alcalóides de *Geissospermum urceolatum* A.H. Gentry (acariquara-branca) na pressão arterial e na contração do músculo liso de ratos. A espécie não conta com trabalhos científicos confirmando essas ações.

O pó da casca foi extraído com etanol. Os alcalóides foram obtidos do extrato etanólico.

- 1) A administração oral do EETOH não produziu sinais evidentes de atividade farmacológica nos animais, mas a administração sistêmica por via intraperitoneal diminuiu a motilidade, a frequência respiratória, produziu cianose e morte dos animais; os resultados mostram que o extrato tem baixa biodisponibilidade;
- 2) A FAT tem maior concentração de alcalóides e seus efeitos foram mais rápidos e intensos;
- 3) Na pressão arterial de ratos anestesiados, a FAT produziu hipotensão rápida e passageira, explicada por vasodilatação, sem alterar o efeito hipertensor da noradrenalina, ou a hipotensão produzida pela acetilcolina;
- 4) A FAT relaxou o tônus muscular produzido pela noradrenalina na aorta de rato por 2 mecanismos: via cascata de oxido nítrico (NO) e por bloqueio do influxo de íons cálcio;
- 5) A FAT potenciou a contração máxima produzida pela incubação de noradrenalina em ducto deferente de rato provavelmente por sensibilizar as miofibrilas contráteis a ação do cálcio;
- 6) Alguns efeitos que não tem explicação imediata (menor afinidade de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no ducto deferente de rato, ausência de potenciação dos estímulos colinérgicos) devem ser melhor estudados depois de isolamento dos compostos ativos da FAT.

---

***9 - Referências Bibliográficas***

AGÊNCIA VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA/MS). Portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995. Dispõe sobre a definição de fitoterápico (Plantas Medicinais). Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 5 abril 2010.

AGÊNCIA VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA/MS). Resolução RDC nº 84, DE 19 de março de 2002. Dispõe sobre conceito de medicamento. D.O.U. de 20/03/2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 5 abril 2010.

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. D.O.U. de 5/04/2010. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 5 abril 2010.

AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; FORMIGA, S. C.; LOCATELLI, E. Plantas Medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba: Parte I Subclasse Asterideae. *Revista Brasileira de Farmácia*, 1994. (75): 61 – 64 p.

ALEMÃO, F. F. **Considerações sobre as plantas medicinais da flora cearense**. Rio de Janeiro: *Laemmert*, 1862. 220 p.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais Brasileiras**. Ed. *Hemus*,. SP, Brasil. 1993. 341 p.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.; *Phytochemistry*, 19, 1980. p. 1573.

AVELLAR, M.C.; LÁZARI, M.F.M.; PORTO, C.S. Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *Ann Braz Acad Sci.*, 2009. 81(3):321-344.

AKSOY, M. O.; MURPHY, R. A.; KAMM, K. E. Role of Ca<sup>2+</sup> and myosin light chain phosphorylation in regulation of smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, 1982. 242 (1):109-116.

BARRETO, M. A.; ALVES, V.F.G.; NEVES, L. J. Contribuição ao estudo de *Vernonia condensata* Baker. *Revista Brasileira de Farmácia*, 1994. (75):54-58 p.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária. Minas Gerais, Brasil. 1981. vol 3. 326 p.

BEECH, D.J. Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *Pharmacol Ther.*, 1997. 73(2):91-119.

BENOIT, P. S.; ANGRY, G.; LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; *J. Pharmacol. Sci.*, 62. 1973. p 543.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, P.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *J Ethnopharmacol.*, 2005. (98): 45-54.

BIEL, J. H.; DRUKKER, A. E.; MITCHELL, T. F.; SPRENGELER, E. P.; NUHER, P. A.; CONWAY, A. C.; HORITA, A.; *J. Am. Chem. Soc.* 81, 1959. p 2805.

BoDD (BOTANICAL DERMATOLOGY DATABASE) Disponível em: <http://bodd.cf.ac.uk/BotDermFolder/BotDermA/APOC.html> <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>>. Acesso em: 25 abril 2005. (1984).

BUDMAN NL, BALLY MB, CULLIS PR, MAYER LD, WEBB MS. Encapsulation of vincristine in liposomes reduces its toxicity and improves its antitumor efficacy. *J. Liposome Res*, 1997. (5):523 – 541.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION (OMS). *Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review*, Geneva, 2008.

BUNSTOCK, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(3):131-139.

BUNSTOCK, G.; VERKHRATSKY, A. Vas deferens – a model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends Pharmacol Sci*, 2010. 31(3):131-139.

BRANDÃO, M.G.L.; ZANETTI, N.N.S.; OLIVEIRA, G.R.R.; GOULART, L.O.; MONTE-MÓR, R.L. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn*, 2008. 18:127-136.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 de março de 2004 A. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php> Acesso em: 20 jun 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RE 90* de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 de março de 2004 B. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 20 jun 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Instrução normativa nº 5 de 11 de dezembro de 2008. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 5 abril 2010.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de Botânica. Rio de Janeiro:** Tip. Nacional, 1984. 428 p.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D. Floristic Inventory of Tropical Countries: *The Status of Plant systematics, Collections, and Vegetation, plus Recommendations for the Future.* NY Botanical Garden: New York, 1989. p 78.

CARNEIRO, R.C.; MARKUS, R.P.; DUBOCOVICH, M.L. Presynaptic modulation by melatonin of the nicotinic-induced calcium-dependent release of norepinephrine from the rat vas deferens. *Biol. Signals.*, 1993. 2:199-206.

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

DILLON, P. F. Myosin phosphorylation and the cross-bridge cycle in arterial smooth muscle. *Science*, 1981. 211(4481):495-497.

DIXON, J.S; GOSLING, J.A. The distribution of autonomic nerves in the musculature of the rat vas deferens. A light and electron microscope investigation. *J. Comp Neurol.*, 1972. 146(2):175-188.

DRIESSEN, B.; VON KULGELGEN, I.; BULTMANN, R.; ELRICK, D.B.; CUNNANET, T.C.; STARKE, K. The fade of purinergic neurogenic contraction of the guinea-pig vas deferens. An analysis of possible mechanisms. *Naunyn Schmied Arch Pharmacol.*, 1994.(350):482-490.

FEELISCH, M.; NOACK, E. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. *European J. Pharmacology*, 1987. 142(3): 465-469.



FERREIRA, I.C.P. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2004. v.99, n.3, p 325-7.

FRANCISCON, C.H. Manual de Herbário: Apostila de acompanhamento do Curso Internacional de Técnicas de Herbário. Manaus. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 2005. 151 p.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research*, 1984. 53(5):557-573. Disponível em: <http://circres.ahajournals.org>. Acesso em: 23 julho 2010.

GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M.; *Biochemistry*, 1995. Saunders Coll. Publishing: Orlando.

GENTRY, A. H. *Geissospermum* (Apocynaceae): another palaeotropical genus in Central America, Oriental America e Guianas. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 1984. (70): 206-207.

HENRIQUE, M. C.; CHAAR, J. S.; ALECRIM, M. G. C.; POHLIT, Adrian Martin; NUNOMURA, S. M.; HIGUCHI, N.; QUIGNARD, E. L. J.; KATO, M.J. . Estudos da Atividade Biológica de Extratos de *Aspidosperma* e *Geissospermum* Utilizadas nas Medicinas Popular e Indígena. Construção de um Banco de Extratos. In: XI Congresso de Iniciação Científica PIBIC/PIC/UFAM, 2002, Manaus. Anais (PIBIC e PIC) XI Congresso de Iniciação Científica PIBIC/PIC/UFAM. Manaus, Amazonas: Universidade Federal do Amazonas, 2002. p. 143-144.

HIDALGO, A.F. Setor de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Agrárias. In: I Mostra de Produção Técnico-Científica da Universidade do Amazonas, 1999, Manaus-AM. Resumos. Manaus-AM: Universidade do Amazonas, 1999. 42 p.

HOVEVEI-SION, D.; FINBERG, P.M.; BOMZON, A.; YAUDIN, M.B. Effects of forskolin in rat vas deferens – evidence for facilitatory beta-adrenoceptors. *Eur J. Pharmacol.*, 1983. 95(3-4):295-299.

HUIDOBRO-TORO, J.; ROHDE, G.; TATEMOTO, K. Neuropeptide Y (NPY): na endogenous modulator of non-adrenergic transmission in the rat vas deferens? *Eur J. Pharmacol*, 1985. 109:317-318.

IRWIN, S. Comparative observation assessment: I. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology* (Berlim) 13. 1968. 222-257.

JANOT, M.M. *Sur la geissospermine. Tetrahedron*, 1961. (14):113-125.

KAYSER, O.; MASIHI, K.N.; KIDERLEN, A.F. Natural products and synthetic compounds as immunomodulators. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, 2003. (1):319-335.

KALECZYC, J. Origin and neurochemical characteristics of nerve fibres supplying the mammalian vas deferens. *Microscopy Research Technique*. 1998. 42(6):409-22.

KOLBECK, S.C.; STEERS, W. D. Origin of neurons supplying the vas deferens of the rat. *J. Urol*, 1993. 149:918-921.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDAO, M.G.; FERRAR, W.M. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem.Inst.Oswaldo.Cruz*. 2001. 96:1033-1042.

KUJAT, R.; ROSE, C.; ROOTS, L. A 'direct-coloring' thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964. 12:219–221.

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

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA T.C.M. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais. Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais – SBPM. Ed.: Lagoa. Campinas - SP. 2008. 144 p.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H.; *J. Pharm. Sci.* 62 (1973):218.

MILLIKEN, W. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. *Econ Bot.*, 1997. (51): 212-237.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000. 69(2):127-137.

MURPHY, R. A. Músculo. In: BERNE, R. M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. 255-302 p.

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

NEVES, P. D. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1998. 178 p.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, A. A. Consensus classification for the order *Gentianales* with additional details on the suborder Apocynineae. *Rev Botanical*, 1994. 4(60):440-442.

NTOUMI, F.; DJIMDÉ, A. A.; MBACHAM, W.; EGWANG, T. The Importance and Future of Malaria Research in Africa. *Am J. Trop Med Hyg.*, 2007. Dec:7(6):303-313.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F.C.; JÁCOME, R. L.R.P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais – M.G. Anais da Academia Brasileira de Ciências (2009) 81(4):715-740 (*Annals of the Brazilian Academy of Sciences*).

OLIVEIRA, F.Q.; JUNQUEIRA, R.G.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Alcalóides indólicos de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Rev. Bras. Plant. Med.*, 1999. 5(23):113-116.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>>. Acesso em: 11 abril 2007.

PACCIONI, J.P.; HUSSON, H.P. Alcalóides de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). *Phytochemistry*, 1978.v.17 2146 – 2147.

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

POHLIT, A. M.; QUINARD, E. L. J.; NUNOMURA, S. M.; TADEI, W. P.; HIDALGO, A. F. Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for activity against *Aedes aegypti* larvae. *Acta Amaz.*, 2004. 34(197):105.

POLI, E.; TODOROV, S.; POZZOLI, C.; BERTACCINI, G. Presynaptic histamine H<sub>2</sub> receptor modulate the sympathetic nerve transmission in the isolated rat vas deferens; no role for H<sub>3</sub>-receptors. *Ann.Agents Actions.*, 1994. 42: 95-100.

QUEIROZ, M.M.A. Relatório de Estágio Supervisionado do Curso de Bacharelado em Química: Treinamento em Métodos Laboratoriais da Área de Química de Plantas Medicinais: Estudos sobre classes de substâncias químicas das espécies *Geissospermum argenteum* e *Geissospermum urceolatum*. Universidade Federal do Amazonas. 2002. 16 p.

RAPOPORT, H.; WINDGASSEN, J.; HUGHES, N. A.; ONAK, T.P. Alkaloids of *Geissospermum velosii*. Further Studies on Geissospermine and the structures of indolic cleavage products, Geissoschizine and Apogeissoschizine. *J. Am. Chem Soc.*, 1960. 82:4404-4414.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Manaus, 1999. 799 p.

RIBEIRO, J.E.G. Mecanismo da ação curarizante dos extratos do pau-pereira (*Geissospermum laeve* (Vellozo) Babillon). 1986. 85 f. (Dissertação de Mestrado) - Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. São Paulo – SP.

RENGIFO, E.; LASTENIA, R.; SOSA, F.; JUAN, C.; RÍOS, J. Plantas Medicinales y Biocidas de la Amazonía Peruana para Malaria, en Loreto. Programa de Investigación para el aprovechamiento Sostenible da La Biodiversidad (PBIO). 2008. 123 p.

RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; *Biochem. Phys., Part C*, 1999. 122, 27.

ROBINSON, P.M. A cholinergic component of the innervation of the guinea-pig vas deferens: the fine structural localization of cholinesterase. *J. cell. Biol.*, 1969. 41, 462-476.

ROCHA, A. I.; REIS-LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A. *Acta Amaz.*, 1982, 12:381.

ROHDE, G.C., VENEZIAN, E.; HUIDOBRO-TORO, J.P. Asymmetric distribution of purinergic and adrenergic neurotransmission cooperates in the motor activity along the rat vas deferens. *Neurosci. Lett.*, 1986. 71, 197-202.

SAMS-DODD, F. Target-based drug discovery: is something wrong? Review article. *Lindsay Drug Discovery Today*. 2005. Jun:10:(2):139-147.

SCHVARTSMAN, S. Plantas Venenosas. Ed. Sarvier. São Paulo. 1979. 176 p.

SCHVARTSMAN, S. Plantas venenosas. *In: Manual sobre intoxicações alimentares*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 1990.15-24 p.

SMITH, C.F.C.; BENNETT, R.T. Characterization of the inhibitory 5-HT receptor in the rat vas deferens. *Arch Int Pharmacodyn.*, 1990. 308:76-85.

SMITH, N.C.E.; BURNSTOCK, G. Mechanism underlying postjunctional synergism between responses of the vas deferens to noradrenaline and ATP. *European J. Pharmacol.*, 2004. 498:241-248.

SOUCCAR, C.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; TANAE, M.; YSLA, K.K.Y.; GHEDINI, P.C. Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de Animais, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina - UNIFESP. *In: Projeto "Atividade de compostos isolados de Plantas Brasileiras reputadas como antimaláricas na bomba de prótons e na homeostase do cálcio"*. São Paulo, 2007. 10 p.

SOEJARTO, D.; FARNSWORTH, N. Tropical rainforest: Potential source of new drugs? *Perspectives in Biology and Medicine*, 1989. (32):244 - 256.

SOUZA, M.P. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: E.U.F.C., 1991.416 p.

SNEDDON, P.; MACHALY, M. Regional variation in purinergic and adrenergic responses in isolated vas deferens of rat, rabbit and guinea-pig. *J. Auton. Pharmacol.*, 1992. 12:421-428.

STEELE, J.C.; VEITCH, N.C.; KITE, G.C.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHURST, D.C. Indole and  $\beta$ -carboline alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *J. Nat Prod.*, 2002. (65):85-8.

STARKE, K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 1977. 77:1-24.

STARKE, K. Pre-synaptic alpha2-autoreceptors. *Physiol Biochem Pharmacol.*, 1987. 107: 73-146.

STARKE, K.; GOTHERT, M.; KILBINGER, H. Modulation of neurotransmission release by presynaptic autoreceptors. *Physiol Ver.*, 1989. 69(3):864.

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

TANAE, M.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Molecular interaction of *Geissospermum*'s alkaloids with alpha 7 or muscle-type nicotinic receptors (nAChR) subtypes and with acetylcholinesterase (AChE). *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006. (27):347-347. Suppl.

TODOROV, L.; WINDISCH, K.; SHERSEN, H.; PAPASOVA, M.; VIZI, E.S. Prejunctional nicotinic receptors involved in facilitation of stimulation-evoked noradrenaline release from vas deferens of the guinea-pig. *Br J. Pharmacol.*, 1991. 102:186-190.

TORGNARINI, D.P.; MOULDS, R.F.W. Intracellular  $Ca^{2+}$  and contractile responses to  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 1997. 322(1):31-36.

TRIBE, C.R.; BORIN, M.L.; BLAUSTEIN, M.P. Functionally and spatially distinct  $Ca^{2+}$  stores are revealed in cultured vascular smooth muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1994. 91(13):5908-12.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 8.ed.1991. 231 p.

VENTURA, S. Autoinhibition, sympathetic cotransmission and biphasic contractile responses to trains of nerve stimulation in the rodent vas deferens. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 1998. 25:965-973.

VICENTINI, A.; ANGELUS, A. O. Apocynaceae e Asclepiadaceae. *In: Flora da Reserva Ducke - Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central*. 1999. (1):568-581. Manaus: INPA-DFID.

WALSH, M.P. Regulation of vascular smooth muscle tone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1994. 72(8):919-936.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Edu.*, 2003. 27(4):201-201.

WENIGER, B. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001(78):193-200.

WESTFALL, T.D.; WESTFALL, D.P. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the vas deferens. *J. Pharmacol Toxicol Methods*, 2001. 45(3):109-122.

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

WONGSRICHANALAI, C.; MURRAY, C.K.; GRAY, M.R.; MILLER, S.; MCDANIEL, W.; LIAO, J.; PICKARD, A.L.; MAGILL, A.J. Co-infection with Malaria and Leptospirosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2003. 68(5):583-585.