



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

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS SECOS  
PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *Picrolemma sprucei* Hook  
COLETADAS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

**ANDREZZA MINÁ BARBOSA**

**MANAUS**

**2012**



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

ANDREZZA MINÁ BARBOSA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS SECOS  
PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *Picrolemma sprucei* Hook  
COLETADAS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio José Lapa

**Co-orientadora:** Dra. Mirtes Midori Tanae

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Barbosa, Andrezza Miná

B238e      Estudo farmacológico de extratos secos padronizados de folhas de *Picrolemma sprucei* Hook coletadas na Amazônia Ocidental / Andrezza Miná Barbosa. - Manaus: UFAM, 2012.  
131 f.; il. color.

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-orientador: Prof. Dr. Mirtes Midori Tanae

1. Caferana 2. Farmacologia 3. Fitoterápicos 4. Plantas medicinais I. Lapa, Antonio José (Orient.) II. Tanae, Mirtes Midori (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 633.88(811.3)(043.3)

ANDREZZA MINÁ BARBOSA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS SECOS  
PADRONIZADOS DE FOLHAS DE *Picrolemma sprucei* Hook  
COLETADAS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

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

Aprovado em 28 de Junho de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Antonio José Lapa  
Universidade Federal de São Paulo – EPM/UNIFESP

Prof. Dr. Luiz Carlos Abech D'Ângelo  
Universidade Estadual do Amazonas – UEA

Profa. Dra. Milena Rodrigues Soares Mota  
Faculdade Literatus

## **DEDICATÓRIA**

A minha querida e amada mãe Maria Eunice Miná (*in memoriam*), por ter me ensinado a ser  
uma pessoa forte, honrada e de caráter.

Aos meus familiares e amigos por sempre me incentivarem na busca do conhecimento, sendo  
exemplos de competência, garra e determinação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida, força e amparo.

A João Carlos, meu esposo, pela compreensão, carinho, amor e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio José Lapa por todo aprendizado. Agradeço pela dedicação, orientação, paciência, comprometimento e apoio para a realização deste trabalho. A você meu caro professor, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus familiares e amigos, pelo amor, carinho e apoio incondicional à minha busca pelo crescimento acadêmico e por fazerem de mim uma pessoa feliz.

À minha cara co-orientadora Dra Mirtes Midori Tanae pela paciência, amizade, serenidade, profissionalismo, estímulo e dedicação de sempre.

À Dra Caden Souccar, Dra Tereza Cristina Monteiro Lima, Dra Maria Teresa R. Lima-Landman pelos ricos ensinamentos farmacológicos.

À equipe do Laboratório de Farmacologia, Toxicologia de Medicamentos e Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia: Alzemir, Antônio, Claudia, Celina, Daniel, Danilo, Fabíola, Geane, Hélio, Jackeline, Juliana, Karla, Kaori, Leandro, Maciel, Michael, Ricardo, Rosangela, Siglia, Stener, Suelen, Suzana, Thiago, Thais, Tânia, Tony, Vânia, pelo companheirismo, auxílio e fundamental contribuição na execução dos experimentos.

Aos meus colegas de mestrado: Francianny, Jefferson, Márcia Caroline e Marnyce, pelo convívio, incentivos e por todos esses momentos vividos e partilhados.

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

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelos ensinamentos e trocas de conhecimentos.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade concedida.

À Fundação Djalma Batista e a Fundação de apoio Institucional Rio Solimões pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Everaldo Pereira e ao Dr. Francisco Cleber Felix de Barros pelo apoio prestado na coleta do material vegetal e pelo respeito, comprometimento e amizade.

Ao Dr. Franciscon pelo auxílio dado para o depósito da exsicata.

A todos que contribuíram de alguma forma para execução e enriquecimento desta etapa de minha formação acadêmica.

Muito Obrigada!

“Para que nada seja em vão, só  
lute pelo que mereça a sua dedicação  
e o seu esforço!”

Emile Quédia



## RESUMO

*Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) conhecida como caferana, é amplamente distribuída na Região Amazônica. o chá das folhas e das raízes é utilizado no tratamento de gastrite, como febrífugo, anti-helmíntico e antimalárico. Considerando as informações etnobotânicas existentes, e o pequeno número de atividades comprovadas, este trabalho propõe a realização de estudos farmacológicos com um extrato padronizado de folhas de caferana no comportamento e funções vitais de roedores, como também analisar os mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos observados. Folhas foram coletadas em Manaus/AM, secas à sombra e trituradas. Infusão a 2,5% originou o extrato aquoso (EA) que rendeu 15% e a fração butanólica (FBut) foi gerada pela partição do EA com n-butanol. A purificação da FBut em CLAE originou 4 frações com TRs: F1=5,4 a 12 min, F2 =12,1 a 19 min, F3=19,1 a 27,7 min; F4= 27,8 a 38 min. A administração oral do EA e da FBut (1,0 g/kg) foi letal. Com o EA (0,1 a 1,0 g/kg, v.o.) os animais apresentaram hipotermia, e as lesões da mucosa gástrica desencadeadas por estresse a frio em camundongos foram reduzidas. O EA, a FBut e a fração F4 inibiram a secreção ácida gástrica em ratas com ligadura pilórica. No entanto, o EA (1 a 300 µg/mL) não inibiu a atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. Em ratas anestesiadas a FBut (3 mg/kg, e.v.) produziu efeito duplo na pressão arterial (PA) e na frequência cardíaca (FC): a injeção de 3,0 mg/kg reduziu a PA de 22 mmHg e a FC de 20 bpm com pico máximo após 1,5 min e reversão em 5 min; este efeito foi seguido de hipotensão maior (90 mmHg), mais tardia (4,5 min) e duradoura, concomitante à diminuição da FC. A vagotomia, ou a administração de atropina, bloquearam os efeitos tardios na PA e na FC. As frações F1 (0,2 a 5,4 mg/kg, e.v.) e F3 (0,3 a 2,4 mg/kg, e.v.) da FBut produziram hipotensão (5 a 40 mm Hg) proporcional às doses. A FBut (10 a 100 µg/mL) diminuiu a frequência de batimentos espontâneos do átrio direito isolado de rato, sem alteração do inotropismo do átrio esquerdo. O tônus induzido pela noradrenalina em anéis de aorta de rato com endotélio foi relaxado com a adição de FBut. Este efeito não foi abolido pela destruição mecânica do endotélio, indicando um mecanismo de ação independente da síntese de NO. O EA e a FBut por via oral foram letais na maior dose, a F4 foi a fração identificada com o poder letal. O efeito tóxico foi tardio e provavelmente relacionado a atividade de compostos originados do metabolismo hepático.

**Palavras-chave:** caferana, secreção ácida, pressão arterial, toxicidade e antiúlcera

## ABSTRACT

*Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) known as caferana, is widely distributed in the Amazonian Region. The tea of the leaves and the roots is used to treat gastritis, fever, as anti-helminthic and as anti-malarial. Considering the ethnobotanical information and the small numbers of works with proven activities, this work proposes a pharmacological study with a standardized extract obtained from the plant leaves on behavior and vital functions in rodents, and also to analyze the molecular mechanisms responsible for the observed effects. The plant leaves were collected in Manaus/AM, dried in the shade and ground. The aqueous extract (AE) was obtained from the leaves infusion (2.5%), yielding 15%, and the butanolic fraction (BuF) was obtained from the AE partition with butanol. The BuF purification in HPLC yielded 4 fractions with RTs: F1=5,4 to 12 min, F2 =12,1 to 19 min, F3=19,1 to 27,7 min; F4= 27,8 to 38 min. The oral administration of AE or BuF (1,0 g/kg) was lethal within 24 h. The treatment with AE (0,1 to 1,0 g/kg, p.o.) caused hypothermia and reduced the cold stress-induced gastric ulcers in mice. The AE, BuF and F4 inhibited the gastric acid secretion in rats with pylorus ligation. However, the AE (1 to 300 µg/mL) did not inhibit the H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase pump *in vitro*. In anesthetized rats, the BuF (3 mg/kg, e.v.) produced a double depression on the arterial blood pressure (BP) and on the heart rate (HR): the dose of 3.0 mg/kg reduced the BP by 22 mm Hg and the HR by 20 bpm with the maximal effect after 1,5 min and reversion in 5 minutes; this effect was followed by late long lasting hypotension (90 mm Hg), concomitant to a HR decrease. Vagotomy or atropine (0.1 mg/kg e.v.) blocked the later effects on BP and on HR. The fractions F1 (0.2 to 5.4 mg/kg, e.v.) and F3 (0.3 to 2.4 mg/kg, e.v.) caused hypotension (5 to 40 mm Hg) related to the doses. The BuF (10 to 100 µg/mL) inhibited the spontaneous beats of the isolated rat right atrium without altering the BuF inotropic effect in the isolated left atrium. In aorta rings with intact endothelium, the tonus induced by noradrenalin was relaxed with BuF incubation. This effect was not abolished by the endothelium mechanical destruction, indicating a NO sintase independent mechanism of action. The AE and the BuF oral administration were lethal at the highest dose; the F4 fraction was identified as the lethal fraction of BuF. The toxic effect of AE and BuF was delayed on time and probably unrelated to the original plant extract, but to compounds produced during their liver metabolism.

**Key-words:** caferana, gastric acid secretion, anti-ulcer, arterial blood pressure and toxicity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica no Brasil.....	28
Figura 2 -	Fruto de <i>P. sprucei</i> .....	29
Figura 3 -	Inflorescência de <i>P. sprucei</i> .....	29
Figura 4 -	Quassinoides naturais isobruceína B (1) e neosergeolida (2) e semi-sintéticos conhecidos 1,12-diacetil-isobruceína B (3) e 12-acetil-neosergeolida (4) obtidos de <i>P. sprucei</i> .....	36
Figura 5 -	Fisiologia da secreção gástrica.....	39
Figura 6 -	<i>Picrolemma sprucei</i> Hook.....	46
Figura 7 -	Área de coleta de <i>P. sprucei</i> Hook no município de Manaus/AM (S 03°05'07.4"; W059°57'02.2").....	47
Figura 8 -	Teste da temperatura corporal, realizado em camundongos adultos machos.....	55
Figura 9 -	Teste suspensão pela cauda, realizado em camundongos machos adultos.....	56
Figura 10 -	Teste sono barbitúrico.....	56
Figura 11 -	Teste sono induzido por éter etílico.....	57
Figura 12 -	Testes do labirinto em cruz elevado, realizado em camundongos (n=6/grupo).....	59
Figura 13 -	Perfis cromatográficos do EA e FBut de <i>P. sprucei</i> em CLAE utilizando coluna C18, eluída com gradiente de água/acetonitrila de 5 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e $\lambda$ 260 nm.....	72
Figura 14 -	Perfis cromatográficos das frações F1 a F4 obtidas da purificação da FBut de <i>P. sprucei</i> em CLAE utilizando coluna C18 eluída com gradiente de água/acetonitrila de 5 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e $\lambda$ 260 nm.....	73
Figura 15 -	Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações de <i>P. sprucei</i> Hook.....	74
Figura 16 -	Efeito do tratamento prévio (1 h) com o EA de <i>P. sprucei</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na temperatura corporal em camundongos. As colunas e barras representam as médias $\pm$ erros padrão (n=5 animais/grupo) da variação da temperatura em cada grupo. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett).....	77
Figura 17 -	Efeitos da administração oral de água (controle, C) e do EA de <i>P. sprucei</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg) no número de úlceras e no índice de lesão da mucosa gástrica induzidos pelo estresse por imobilização a frio (4°C) em camundongos (n=5/ grupo).....	79
Figura 18 -	Lesões da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse por imobilização a 4 °C, após 2 horas dos tratamentos. Indicando em <b>A</b> : controle lesado; <b>B</b> : mucosa gástrica de animal tratado com EA 0,1 g/kg; <b>C</b> : mucosa gástrica de animal tratado com EA 0,3 g/kg; <b>D</b> : mucosa gástrica de animal tratado com EA 1,0 g/kg. Notar as úlceras (pontos escuros) e o edema da mucosa (ausência de pregas) em <b>A</b> e <b>B</b> .....	79

- Figura 19 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) do EA de *P. sprucei* (0,3 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pela histamina e a inibição produzida pelo tratamento prévio com o EA no grupo controle e no grupo tratado com histamina (10 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo histamina \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle)..... 81
- Figura 20 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) do EA de *P. sprucei* (0,3 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pelo betanecol e a inibição produzida pelo tratamento prévio com o EA no grupo controle e no grupo tratado com betanecol (20 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo betanecol; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle)..... 82
- Figura 21 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) da FBut de *P. sprucei* (0,03 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pela histamina e a inibição produzida pelo tratamento prévio com a FBut no grupo controle e no grupo tratado com histamina (10 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo histamina; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle)..... 83
- Figura 22 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) da FBut de *P. sprucei* (0,03 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pelo betanecol e a inibição produzida pelo tratamento prévio com a FBut no grupo controle e no grupo tratado com betanecol (20 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , em relação ao grupo controle)..... 84

Figura 23 -	Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) das fracções F1 (18 mg/kg), F2 (9 mg/kg), F3 (30 mg/kg) e F4 (6 mg/kg) de <i>P. sprucei</i> , no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ ) em relação ao grupo controle.....	85
Figura 24 -	Efeito do EA 1, 3, 10, 30, 100 e 300 µg/mL de <i>P. sprucei</i> na atividade da H <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase isolada da mucosa gástrica de porco, incubada por 30 minutos a 37 °C (à esquerda) e efeito do controle positivo SCH28080 (à direita). Os símbolos e barras representam as médias ± erros padrão de 3 ensaios em triplicata.....	86
Figura 25 -	(A) Registro típico do efeito da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> e da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).....	87
Figura 26 -	(A) Efeito da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> e da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) relação dose-efeito do padrão positivo ACh (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.). Notar que a FBut não modificou a resposta à ACh.....	88
Figura 27 -	(A) Registro típico do efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> , da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).....	89
Figura 28 -	Efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> , da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na PA de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4). As drogas foram injetadas na sequência indicada.....	89
Figura 29 -	(A) Registro típico do efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> na pressão arterial de rata adulta normotensa anestesiada com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e vagotomizada; (B) registro da frequência cardíaca (bpm) concomitante. Notar que não ocorreu a hipotensão secundária, nem paradas cardíacas.....	90
Figura 30 -	(A) Efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> e da noradrenalina (0,1 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) relação dose-efeito obtida com o padrão positivo noradrenalina (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.).....	91
Figura 31 -	Efeito das frações de <i>P. sprucei</i> na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). (A) F1 (0,2; 0,6; 1,8 e 5,4 mg/kg, e.v.), (B) F2 (0,1; 0,3; 0,9 e 2,7 mg/kg, e.v.), (C) F3 (0,27; 0,8 e 2,4 mg/kg, e.v.) e (D) F4 (0,07; 0,2; 0,6 e 1,8 mg/kg, e.v.) A acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) foi utilizada como padrão positivo. As colunas e barras representam as médias ± erros padrão (n=5).....	92

Figura 32 -	(A) Registro típico do efeito da F1 (1,8 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> , da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).....	93
Figura 33 -	(A) Registro típico do efeito da F3 (2,4 mg/kg, e.v.) de <i>P. sprucei</i> , da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).....	94
Figura 34 -	Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de <i>P. sprucei</i> na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C, bpm = batimentos por minuto. Dados expressos como médias ± desvios (n=3).....	95
Figura 35 -	Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de <i>P. sprucei</i> na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato, a 35 °C. Dados expressos como médias ± desvio (n=3).....	95
Figura 36 -	Relaxamento produzido pela FBut de <i>P. sprucei</i> (10, 30 e 100 µg/mL) no tônus induzido por noradrenalina (10 <sup>-7</sup> M) em anéis de aorta de rato com endotélio. O tempo 0 é o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação da FBut. Dados expressos como médias ± erros padrão (n=4).....	96
Figura 37 -	Efeito produzido pela FBut de <i>P. sprucei</i> (10, 30 e 100 µg/mL) no tônus induzido por noradrenalina (10 <sup>-7</sup> M) em anéis de aorta de rato sem endotélio. O tempo 0 é o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação da FBut. Dados expressos como médias ± erros padrão (n=4).....	97
Figura 38 -	Efeito produzido pelas frações F1, F2, F3 e F4 de <i>P. sprucei</i> (3, 10 e 30 µg/mL), no tônus induzido por noradrenalina (10 <sup>-7</sup> M) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio. As frações foram adicionadas cumulativamente ao banho em intervalos de 10 min para cada concentração, O zero representa o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação das frações. Os símbolos e barras representam as médias ± erros padrão (n=4).....	98
Figura 39 -	Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de <i>P. sprucei</i> na concentração de cálcio citosólico livre em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (A), e em células de útero mantidas em cultura (B). As colunas e barras representam as médias ± erros padrão (n = 3, em triplicata). O KCl 70 mM foi utilizado para promover a abertura dos canais de cálcio e o verapamil (100 µM) como controle positivo de antagonista dos canais de cálcio tipo L.....	99

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comportamento de camundongos tratados com apomorofina e correspondentes graus de estereotipia.....	60
Tabela 2 -	Parâmetros para medir o índice de lesão gástrica.....	61
Tabela 3 -	Efeitos do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) de <i>P. sprucei</i> Hook em atividades específicas do sistema nervoso central de camundongos..	76
Tabela 4 -	Efeitos da FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o.) de <i>P. sprucei</i> Hook nas atividades do sistema nervoso central avaliadas em camundongos.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitros

$\mu\text{M}$  – Micromolar

$\mu\text{mol}$  – Micromolar

ACh – Acetilcolina

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – Adenosina trifosfato

ATR – Atropina

bpm – batimentos por minuto

CBA - Centro de Biotecnologia da Amazônia

CLAE – Cromatografia líquida de alta resolução

cm – Centímetro

D-MEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

e.v. – Via endovenosa

EA – Extrato aquoso

EC<sub>50</sub> – Concentração efetiva 50%

F1 – Fração um

F2 – Fração dois

F3 – Fração três

F4 – Fração quatro

FBut – Fração butanólica

FLIPR – *fluorescent imaging plate reader*

g – Grama



HBSS – *Hank's balanced salt solution* (solução salina balanceada de Hank)

Hz – Hertz

i.d. – Intraduodenal

i.p. – Intraperitoneal

IC<sub>50</sub> – Concentração inibitória 50%

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

kg – Quilograma

L – Litro

M – Mol/litro

mEq – Miliequivalente

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mM – Milimolar

ms – Milissegundos

N – Normal

n – Número de animais

nm – Nanômetro

NO – Óxido nítrico

NOR – Noradrenalina

°C – Grau celsius

PRZ – Prazosin

SNC – Sistema nervoso central

TR – Tempo de retenção

TYRODE – Líquido nutritivo de Tyrode

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

v.o. – Via oral

WHO – World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Sigma$  – Somatória

$\geq$  – Maior igual

$\pm$  – mais ou menos

$\Delta$  – Variação

$\alpha$  – Alfa

$g$  – Giros por minuto

## SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	Simaroubaceae.....	26
1.2	A espécie vegetal.....	27
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo geral.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	31
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
3.1	<i>Picrolemma sprucei</i> Hook.....	33
3.2	Fisiologia e regulação da secreção gástrica.....	36
3.3	Fisiologia cardiovascular.....	39
3.3.1	Barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares.....	40
3.3.2	Homeostasia do íon cálcio no sistema cardiovascular.....	42
4	MATERIAL.....	45
4.1	Material vegetal.....	46
4.2	Animais.....	48
4.3	Material químico.....	48
4.3.1	Drogas, reagentes e sais.....	48
4.3.2	Soluções utilizadas nos experimentos.....	49
5	MÉTODOS.....	51
5.1	Tratamento do material vegetal.....	52
5.2	Obtenção do extrato aquoso (EA).....	52
5.3	Obtenção da fração butanólica (FBut).....	52
5.4	Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica).....	52
5.5	Purificação da FBut de <i>P. sprucei</i> Hook L. por cromatografia líquida de alta eficiência Preparativa (CLAE-PREP).....	53
5.6	Avaliação da atividade farmacológica.....	54
5.6.1	Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1968; MALONE; ROBICHAUD, 1962).....	54
5.7	Atividades no sistema nervoso central.....	54
5.7.1	Avaliação da temperatura corporal.....	54
5.7.2	Avaliação da atividade tipo-antidepressiva.....	55
5.7.2.1	Teste de suspensão pela cauda.....	55
5.7.3	Avaliação da atividade hipnosedativa.....	56
5.7.3.1	Sono induzido por barbitúrico (CARLINI <i>et al</i> , 1986).....	56
5.7.3.2	Sono induzido por éter etílico.....	57
5.7.4	Avaliação da coordenação motora.....	57
5.7.4.1	Teste do “rota-rod”.....	57
5.7.4.2	Teste do arame – “wiring test”.....	58
5.7.5	Teste de atividade exploratória.....	58
5.7.5.1	Teste do campo aberto – “open-field”.....	58
5.7.6	Avaliação da ação do tipo ansiolítica.....	59
5.7.6.1	Labirinto em cruz elevado.....	59
5.7.7	Avaliação de estereotipias.....	60
5.7.7.1	Teste de subida na grade – “Climbing behavior”.....	60
5.8	Avaliação da atividade anti-úlceras do extrato aquoso e da fração butanólica de <i>P. sprucei</i> Hook.....	60
5.8.1	Lesão gástrica induzida por estresse e imobilização a frio (4 °C).....	60
5.9	Avaliação da atividade anti-secretora ácida.....	62

5.9.1	Ligadura pilórica <i>in situ</i> .....	62
5.10	Avaliação da ação da fração butanólica (FBut) de <i>P. sprucei</i> Hook na atividade da H <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase.....	62
5.10.1	Isolamento de microsomas gástricos e da H <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase gástrica.....	62
5.10.2	Determinação do teor de proteína.....	63
5.10.3	Medida da atividade da H <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPase gástrica.....	64
5.11	Atividade cardiovascular.....	64
5.11.1	Avaliação da ação da FBut e suas frações na pressão arterial de ratas anestesiadas.....	64
5.11.2	Avaliação da ação da FBut em átrios isolados de rato.....	65
5.11.3	Avaliação da ação da FBut e frações semipurificadas de <i>P. sprucei</i> em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina.....	66
5.12	Cultura de músculo cardíaco de rato.....	66
5.13	Cultura de útero de rata.....	67
5.14	Medida do cálcio citosólico livre por fluorimetria em células de útero e cardiomiócitos de rato mantidos em cultura.....	68
5.15	Análises estatísticas.....	69
6	RESULTADOS.....	70
6.1	Obtenção do extrato aquoso (EA).....	71
6.2	Obtenção da fração butanólica (FBut).....	71
6.3	Padronização do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de <i>P. sprucei</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	71
6.4	Purificação da FBut de <i>P. sprucei</i> Hook L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-PREP).....	72
6.5	Resultados farmacológicos.....	75
6.5.1	Triagem farmacológica geral.....	75
6.5.2	Atividades no sistema nervoso central.....	76
6.5.3	Efeito do EA de <i>P. sprucei</i> Hook nas lesões gástricas induzidas por estresse a frio (4 °C, por 2 horas).....	78
6.5.4	Secreção gástrica após ligadura pilórica <i>in situ</i> : ação da histamina, do betanecol e do EA de <i>P. sprucei</i> .....	79
6.5.5	Efeitos da FBut de <i>P. sprucei</i> nos parâmetros da secreção ácida gástrica estimulada por histamina ou por betanecol.....	82
6.5.6	Efeitos das frações semipurificadas de <i>P. sprucei</i> nos parâmetros da secreção ácida gástrica.....	85
6.5.7	Efeito do EA de <i>P. sprucei</i> na atividade da H <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase isolada da mucosa gástrica de porco.....	86
6.5.8	Ação cardiovascular das frações da <i>P. sprucei</i> .....	86
6.5.8.1	Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) na pressão arterial de ratas anestesiadas.....	86
6.5.8.2	Efeito das frações semipurificadas de <i>P. sprucei</i> (F1, F2, F3 e F4) na pressão arterial de ratas anestesiadas.....	91
6.5.8.3	Efeito da FBut (10 30 e 100 µg/mL) de <i>P. sprucei</i> na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato.....	94
6.5.8.4	Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de <i>P. sprucei</i> na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato sob estimulação elétrica.....	95
6.5.8.5	Efeito da FBut de <i>P. sprucei</i> em anéis de aorta torácica de rato com endotélio integro, pré-contraídos com noradrenalina (10 <sup>-7</sup> M).....	96

6.5.8.6	Efeito da FBut de <i>P. sprucei</i> em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M).....	96
6.5.8.7	Efeitos das frações semipurificadas de <i>P. sprucei</i> em anéis de aorta torácica de rato com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M).....	97
6.5.8.8	Efeito da FBut de <i>P. sprucei</i> na concentração de cálcio citosólico livre em células de útero e cardiomiócitos de rato mantidos em cultura primária.....	98
7	DISCUSSÃO.....	100
8	CONCLUSÕES.....	113
9	RESUMO E CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS.....	118

# ***INTRODUÇÃO***

As plantas medicinais têm sido uma rica fonte para a obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente (FOGLIO *et al*, 2006). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 70-95% da população de países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde (WHO, 2011). No Brasil, não se sabe com exatidão o número de pessoas que utilizam as plantas, mas, seguramente, essa tendência mundial também é seguida, desde o consumo da planta fresca e preparações extemporâneas, até o fitoterápico. Balunas e Kinghorn (2005) defendem que aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais.

Plantas medicinais podem ser capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades e por isso, possuem tradição de uso em uma população ou comunidade. A ANVISA (2010) define planta medicinal como “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”. Varanda (2006) afirma que as plantas medicinais são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelo para a síntese de um grande número de fármacos. O medicamento fitoterápico é obtido empregando-se exclusivamente derivado de droga vegetal como constituintes ativos, caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de uso, assim como pela constância de sua qualidade (ANVISA, 2011; ver também NETTO *et al*, 2006).

Segundo França *et al* (2008), estudos sobre a medicina popular vêm merecendo atenção cada vez maior devido ao contingente de informações e esclarecimentos que vem sendo oferecido à Ciência. Esse fenômeno tem propiciado o uso de chás, decoctos, tisanas e tinturas fazendo com que, na maioria dos países ocidentais, os medicamentos de origem vegetal sejam retomados de maneira sistemática e crescente na profilaxia e tratamento das doenças, ao lado da terapêutica convencional. A flora brasileira, especialmente a Floresta Amazônica é uma grande fonte inexplorada de moléculas com potencial farmacológico



(ANDRADE-NETO *et al*, 2007). No campo da descoberta de novos fármacos seria de se esperar que o Brasil fosse um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001).

O uso de produtos medicinais a base de plantas é prática comum na medicina tradicional, desde os tempos mais remotos. Polezzi *et al* (2004) relatam que o conhecimento sobre a utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos vem sendo passado de geração a geração ao longo dos séculos. Cerca de 80% da população mundial já teve alguma experiência de utilização com fins preventivos ou curativos (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007).

O mercado de fitoterápicos decaiu muito com o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos após a segunda guerra mundial, porém, vem apresentando um crescimento marcante nas últimas décadas, pois, está sendo utilizado como tratamento alternativo aos medicamentos sintéticos da medicina convencional. Uma grande parcela da população não tem acesso aos medicamentos sintéticos seja devido ao alto custo dos medicamentos industrializados, ou pela dificuldade de acesso ao sistema público de saúde. Assim, as plantas medicinais continuam ocupando lugar de destaque social no arsenal terapêutico de muitos grupos étnicos (MACEDO; OSHIWA; GUARIDO, 2007). O retorno financeiro para os povos que auxiliam as indústrias farmacêuticas nas descobertas de novos medicamentos a partir de suas plantas medicinais é estimado em menos de 0,0001% dos lucros do setor. Estes valores alcançam a ordem de centenas de bilhões de dólares por ano (AZEVEDO, 2003).

É oportuno acentuar, que o uso do conhecimento tradicional atua como um “filtro” através do qual ocorre a inovação, seja na localização de novas plantas, seja na sugestão de sua atividade farmacológica dos recursos da biodiversidade (REZENDE; RIBEIRO, 2005). Na indústria farmacêutica, por sua organização e poderio econômico, estão concentrados os conhecimentos tradicionais e os recursos da biodiversidade com maior potencial inovador

atraindo um grande número de interessados na sua realização. Calcula-se que aproximadamente 25% de todos os fármacos receitados provem de fontes botânicas e que cerca de 70% das drogas derivadas de plantas foram desenvolvidas com base no conhecimento tradicional associado à biodiversidade, utilizando plantas dos países em desenvolvimento (PEREIRA; LIMA, 2008; QUEZADA *et al*, 2005; WHO, 2011).

Apesar da recente globalização da indústria química e a utilização de medicamentos sintéticos, o retorno econômico obtido com produtos derivados de plantas medicinais no ano de 2008 foi estimado em 83 bilhões de dólares por ano, com taxa de crescimento exponencial (WHO, 2011). No Brasil, o valor estimado gasto em fitoterápicos é da ordem de 300 milhões de dólares, relativamente pequeno, representando cerca de 4% do total do mercado farmacêutico, da ordem de 7,4 bilhões de dólares (MARQUES, 1999). Vale salientar que este valor refere-se apenas aos fitoterápicos industrializados, não correspondendo ao mercado total de produtos obtidos de plantas medicinais. Existe no mercado ainda os fitoterápicos manipulados, os produtos cadastrados na ANVISA como alimentos ou cosméticos, além dos produtos artesanais e a planta medicinal *in natura*, utilizados amplamente na medicina popular.

Para Simões e Shenkel (2002), o valor do mercado brasileiro de fitoterápicos é pequeno se comparado aos valores publicados para a Europa e Estados Unidos, o equivalente a 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, no ano de 2000, respectivamente. O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies vegetais do planeta (CARVALHO *et al*, 2007; SANT'ANA; SAAD, 2002). Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (RODRIGUES, 2006). O país exporta cerca de 7 milhões de dólares em extratos vegetais de alcaçuz, aloés, bardana, catuaba, ipeca e quina. O autor enfatiza também que por outro lado o Brasil importa uma quantidade considerável de

hormônios esteroides, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (PINTO *et al*, 2002).

Siani e Gilbert (2011) defendem que um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil, ou a sua exportação é a falta do *status* de medicamento ético que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade. Rosa e colaboradores (2011) acrescentam a necessidade de uma maior divulgação dos estudos acerca das comprovações científicas. No Brasil, a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos industrializados é realizada pela ANVISA, órgão federal do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, responsável pelo registro de medicamentos e outros produtos destinados à saúde. A RDC nº 14, de 31 de março de 2010 dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2011).

Dados científicos mostraram que existe uma maior probabilidade de encontrar um fármaco com grande valor terapêutico nos países em desenvolvimento pelo estudo de fitoterápicos e plantas medicinais do que obtenção sintética, verificada nas nações que dispõem de tecnologia em química fina farmacêutica (LAPA, 1995; ver também SIXEL; PECINALLI, 2005). Como o número de plantas medicinais estudadas sob a ótica da farmacologia e toxicologia, com o intuito de comprovar o seu uso popular e segurança, ainda é bastante pequeno em nosso país, é de suma importância a realização de estudos voltados para busca e comprovação dos efeitos terapêuticos das plantas medicinais.

Nesse contexto, nosso trabalho realizou estudos farmacológicos com extratos padronizados da *Picrolemma sprucei* Hook, uma Simaroubaceae comum na região de Manaus. A *P. sprucei* é uma planta nativa da Região Amazônica e no Brasil é conhecida na medicina popular como caferana (NUNOMURA, 2006). Alguns estudos químicos já revelaram a presença de quassinoides com atividades antileucêmica, antimalárica, citotóxica e anti-helmíntica nas folhas, caule e raízes dessa planta (BARROS; POHLIT; CHAVES, 2004). Os estudos farmacológicos da planta são poucos e de difícil reprodução, porque os extratos

não foram padronizados. No presente trabalho, o extrato aquoso obtido das folhas e sua fração butanólica semipurificada foram padronizados em cromatografia líquida e as ações farmacológicas foram estudadas *in vivo* no comportamento e nas funções vitais de roedores. A seguir, os possíveis mecanismos responsáveis pelos principais efeitos gastrintestinais e cardiovasculares foram estudados utilizando técnicas moleculares envolvendo enzimas e preparações isoladas.

## 1.1 Simaroubaceae

De acordo com Ribeiro *et al* (1999) a família tem cerca de 25 gêneros e 200 espécies com centro de diversidade na região neotropical. No campo, costuma ser confundida com Meliaceae, Sapindaceae, Anacardiaceae e outras famílias da Ordem Sapindales. Os gêneros nativos de Simaroubaceae são: *Castela*, *Picrasma*, *Picrolemma*, *Quassia*, *Simaba* e *Simarouba* (SOUZA, 2008).

São arbustos ou árvores, suas folhas são alternas ou muito raramente opostas, compostas pinadas ou raramente simples, sem estípulas, margem inteira ou serrada. Inflorescência geralmente cimosa, suas flores pouco vistosas, unicelulares ou raramente bissexuadas, actinomorfas, diclamídeas ou dificilmente monoclamídeas. Fruto geralmente apocárpico, drupáceo ou samaróide (SOUZA, 2008). Segundo Ribeiro *et al* (1999) os frutos são subcarnosos, de cores vivas quando maduros, alaranjados, rubros e enegrecidos. O interesse econômico da família concentra-se no uso medicinal das espécies com compostos amargos e no uso da madeira, destacando-se, neste caso, o marapá (*Simarouba amara*).

Plantas da família Simaroubaceae são utilizadas na medicina tradicional no tratamento da malária, câncer, disenteria, como anti-inflamatórias, antileucêmicas, fago-inibidora em insetos, antiviral e outras doenças prevalentes ao redor do mundo (ENGLER; PRANTL, 1872

*apud* ARRAIGA *et al*, 2002; MILLIKEN, 1997; MUHAMMAD *et al*, 2004; OKANO *et al*, 1990 *apud* OKUNADE *et al*, 2003).

Simaroubaceae é constituída por inúmeras espécies pantropicais, e tem sido fonte de muitas substâncias amargas conhecidas como quassinoides (CONNOLLY; OVERTON; POLONSKY, 1970 *apud* VIEIRA *et al*, 2000; MILLIKEN, 1997; SHING; JIANG, 2000). Estas substâncias são consideradas marcadores taxonômicos desta família (SARAIVA, 2003).

De fato, os quassinoides constituem uma classe de substâncias encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Simaroubaceae; quimicamente, são considerados triterpenos biodegradados com alto padrão de oxigenação, sendo-lhe conferidas muitas atividades biológicas que explicam o seu uso como: anticâncer, antimalárica, fitotóxica, fago-inibidora em insetos, inseticida, amebicida, nematocida, antiviral, antiúlcera, antituberculose, afrodisíaco, antifertilidade masculina, antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (DEWICK, 2002; POLONSKY; FORTSCHR, 1985 *apud* ALMEIDA *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2007a).

Devido ao grande espectro de ação, o interesse científico tem sido despertado pela possibilidade de utilização em diversas atividades agrícolas, pecuárias e, especialmente, médicas. As moléculas bioativas estão predominantemente presentes nos gêneros *Brucea*, *Ailanthus*, *Castela*, *Simaba*, *Simarouba*, *Quassia*, *Pricrasma* e *Picrolemma* da família Simaroubaceae (para revisão ver ALMEIDA *et al*, 2007).

## 1.2 A espécie vegetal

A *P. sprucei* Hook é uma planta nativa da Região Amazônica e sua sinonímia é *P. pseudocoffea* Ducke. É conhecida popularmente no Brasil como caferana (NUNOMURA, 2006; POHLIT *et al*, 2009a; POHLIT *et al*, 2009b; RIBEIRO *et al*, 1999) devido à sua semelhança com a *Coffea arábica* L. das Rubiaceae. No Peru, é conhecida popularmente

como Sacha-café (DUKE; VASQUEZ, 1994) e na Guiana Francesa como café Iane (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987; VIGNERON *et al*, 2005).

A distribuição geográfica brasileira de *P. sprucei* é no norte do país, nos Estados do Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia (PIRANI; THOMAS, 2012) (Figura 1).



Figura 1 - Distribuição geográfica no Brasil.

FONTE: Retirado de <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB001307>

Acesso em 15 novembro 2012.

*P. sprucei* é um arbusto que atinge até 2,5 m de altura, com folíolos cartáceos simétricos, verde-escuros e brilhantes (para revisão ver, AMORIM; POHLIT, 2006; RIBEIRO *et al*, 1999; SARAIVA *et al*, 2003). Apresenta flores de pétalas alaranjadas e estames amarelos (Figura 3). Os frutos são apocárpicos e, quando maduros, são de cor alaranjada (Figura 2). Os caules são ocos e frequentemente habitados por formigas, destacando-se por ser a parte mais utilizada na medicina popular da Amazônia brasileira (RIBEIRO *et al*, 1999). A raiz central é espessa e penetrante (AMORIM; POHLIT, 2006).



Figura 2 - Fruto de *P. sprucei*

FONTE - Retirado de <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=9402>.  
Acesso em 12 novembro de 2012.



Figura 3 - Inflorescência de *P. sprucei*.

## ***2 OBJETIVOS***



## 2.1 Objetivo geral

Realizar a triagem farmacológica de um extrato aquoso padronizado das folhas da *Picrolemma sprucei* Hook nativa em Manaus e estudar os mecanismos das principais ações.

## 2.2 Objetivos específicos

- padronizar o extrato aquoso em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)
- realizar a triagem farmacológica preliminar do extrato padronizado
- identificar os efeitos no SNC
- identificar as ações no sistema gastrointestinal e os mecanismos de ação
- identificar as ações no sistema cardiovascular e os mecanismos da ação pressórica- purificar o extrato aquoso padronizado e identificar as frações ativas resultantes
- purificar a(s) fração(ões) ativas, estudar as ações das frações purificadas e identificar as responsáveis pelos principais efeitos observados na triagem farmacológica

## ***3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

### 3.1 *Picrolemma sprucei* Hook

*P. sprucei* Hook, sinonímia *P. pseudocoffea* Ducke é planta nativa da Região Amazônica e conhecida popularmente como caferana (POHLIT *et al*, 2009a).

A planta é utilizada contra vermes no Peru (DUKE; VASQUEZ, 1994), na Guiana Francesa (GRENAND; MORETTI; JACQUEMIN, 1987) e no Brasil (LE COINTE, 1947). Remédios são preparados por maceração do tronco ou da casca com rum ou por infusão da planta inteira (NUNOMURA *et al*, 2006)

No Brasil e no Peru, o chá das folhas e das raízes é usado no tratamento de gastrite, febres e helmintíase (DUKE; VASQUEZ, 1994; LE COINTE, 1947). Infusões do caule, da raiz ou de toda a planta são utilizadas no tratamento da malária na região amazônica (MILLIKEN, 1997 *apud* POHLIT *et al*, 2009a). No oeste da Amazônia brasileira, os caules secos são comercializados em mercados locais por curandeiros tradicionais, ou raizeiros, e normalmente são utilizados como infusos para a ingestão oral; em doses elevadas, a infusão da *P. sprucei* é utilizada como abortiva (AMORIM; POHLIT, 2006; POHLIT *et al*, 2009b).

O uso popular da caferana é bastante difundido no Estado do Amazonas, especialmente na região de Manaus, onde é comum encontrar o caule sendo comercializado como antimalárico e febrífugo no Mercado Municipal Adolpho Lisboa (FERREIRA, 2000 *apud* SARAIVA *et al*, 2003). O caule é a parte da planta mais utilizada na medicina popular (AMORIM; POHLIT, 2006). Estudos químicos isolaram a isobruceína B e a neosergeolida, entre outros quassinoides (MORETTI *et al*, 1982; VIEIRA *et al*, 2000; ZUKERMAN-SCHPECTOR; CASTELLANO, 1994). Posteriormente, a presença dessas substâncias no caule e na raiz da planta foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (SILVA *et al*, 2007b). Silva *et al* (2009b) descreveram um novo método para obtenção de isobruceína B e neosergeolida por cristalização fracionada.

Nunomura *et al* (2006) demonstraram atividade anti-helmíntica *in vitro* da isobruceína B e do neosergeolideo isolados da fração clorofórmica de *P. sprucei* contra *Haemonchus contortus*, um nematóide que parasita o sistema gastrointestinal de carneiros e outros animais. Outros estudos *in vitro* relatam atividades antitumoral, antimalárica, anti-helmíntica, citotóxica, inseticida e anti-leishmania da neosergeolida e da isobruceína B (ALMEIDA *et al*, 2007; SILVA *et al*, 2009b).

A partir do extrato das folhas de *P. pseudocoffea* foi isolado o quassinoide 15-desacetilsergeolida (POLONSKY; BHATNAGAR; MORETTI, 1984). Esta substância foi ativa contra células de leucemia murina P-388 e parece ser menos tóxica que a sergeolida.

*P. pseudocoffea* foi citada por Vigneron *et al* (2005) como uma planta utilizada na prevenção e no tratamento da malária. Estudos de Bertani *et al* (2005) demonstraram que o extrato aquoso de *P. sprucei* tem atividade *in vitro* em eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* ( $CI_{50} = 1,43 \mu\text{g/mL}$ ) e *in vivo* na dose de 95 mg/kg inibiu 78% do crescimento de *Plasmodium yoelii* em camundongos infectados. Em outro estudo, a sergeolida isolada de *P. pseudocoffea* mostrou que a  $CI_{50}$  variou entre 0,002 e 0,006  $\mu\text{g/mL}$  *in vitro* e 0,21 mg/kg/dia *in vivo*; a  $DL_{50}$  foi de 1,8 mg/kg em camundongos (FANDEUR; MORETTI; POLONSKY, 1985).

Apesar da forte reputação como antimalárica, a toxicidade da planta é reconhecida e sua administração não indicada para crianças (BOTSARIS *et al*, 2007; MORETTI, 1986 *apud* BERTANI *et al*, 2005).

Alguns autores relatam que a planta deveria ser usada na malária, somente em associação com a *Geissospermum spp.* e *Quassia amara* (ANDRADE-NETO *et al*, 2007; VIGNERON *et al*, 2005), sendo a dose indicada 3 copos de 50 mL por dia. No entanto, a atividade preventiva de malária não foi confirmada e o extrato das folhas de *P. pseudocoffea* não mostrou atividade no estágio intra-hepático do *Plasmodium* (BERTANI *et al*, 2005).

Barros e colaboradores (2004) enfatizam que apesar do potencial farmacológico, estudos agronômicos sistemáticos não foram realizados com esta espécie, sendo necessário um aprofundamento nesta área.

Estudos contra células tumorais humanas *in vitro*, mostraram que a neosergeolida e a isobruceína B exibiram citotoxicidade com  $CI_{50}$  entre 5-27  $\mu\text{g/L}$ . Em cepas multi-resistentes a drogas K1 de *P. falciparum* a  $CI_{50}$  foi de 1-4  $\mu\text{g/L}$ . Em células leucêmicas (HL-60) a 1,12-diacetil-isobruceína B foi citotóxica com  $CI_{50}$  de 1,8  $\mu\text{g/L}$ . Os quassinoides neosergeolida e isobruceína B ( $CL_{50} = 3,2-4,4 \text{ mg/L}$ ) demonstraram maior letalidade que o derivado 12 acetil-neosergeolida ( $CL_{50} = 75,0 \text{ mg/L}$ ) contra as larvas de *A. aegypti*, enquanto 1,12-diacetil-isobruceína B foi inativa (SILVA *et al*, 2009a) (Figura 4).

Os quassinoides sergeolida, isobruceína B e 15-desacetilsergeolida apresentaram potente atividade antifágica e inibição do crescimento do verme *Heliothis virescens* f. (lagarta do broto do tabaco ou lagarta-da-maçã), e da praga do milho *Agrotis ipsilon* Hfn. (lagarta-rosca negra) (LIDERT *et al*, 1987). Polonsky *et al* (1989) relataram que a isobruceína B manifestou forte atividade antifágica frente ao pulgão *Myzus persicae* s.s. (Sulzer) (Hemíptera, Aphididae).

Daido *et al* (1995) demonstraram que a isobruceína B apresentou atividade antifágica e inseticida frente a larvas da traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* L.). Extratos metanólicos de casca e raízes, bem como o extrato aquoso de raízes de *P. sprucei*, provocaram mortalidades de 57%, 74% e 44%, respectivamente, frente a larvas de *A. aegypti* (POHLIT *et al*, 2004).

Nenhum desses trabalhos postula um mecanismo para a ação tóxica.

Silva *et al* (2007a) sugerem a neosergeolida e a 12-acetil-neosergeolida como substâncias promissoras para a realização de testes pré-clínicos de novos antimaláricos.

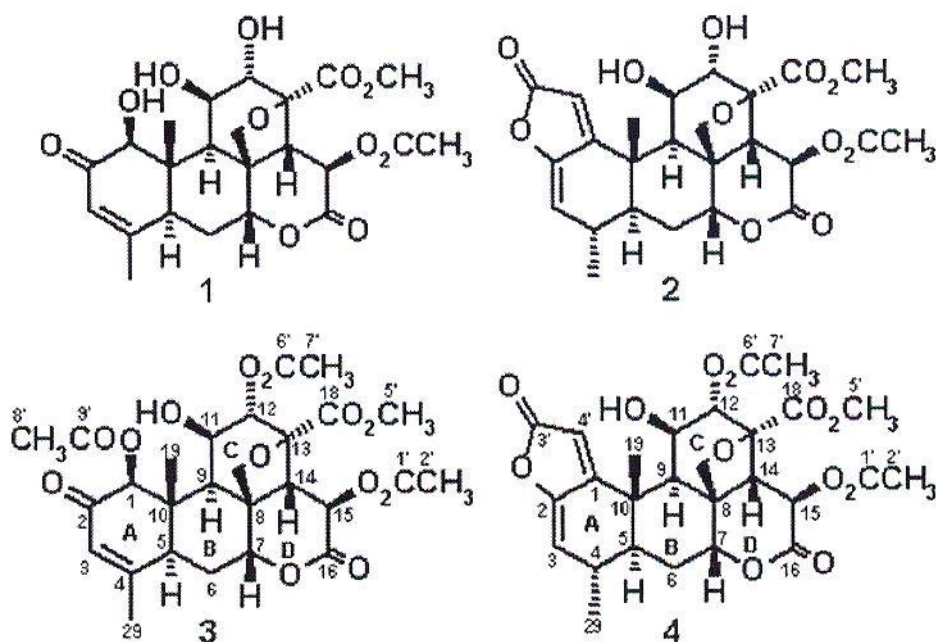


Figura 4 - Quassinoides naturais isobruceína B (1) e neosergeolida (2) e semi-sintéticos conhecidos 1,12-diacetil-isobruceína B (3) e 12-acetil-neosergeolida (4) obtidos de *P. sprucei*.  
Fonte: (SILVA, 2009a)

Barros *et al* em estudos ainda não publicados utilizou o marcador molecular AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) para determinar a diversidade genética de três populações de *P. sprucei* do município de Manaus, tendo sido identificada a diversidade dentro e entre as populações, os resultados mostraram que a variabilidade genética da espécie é bastante alta, fato que vem reforçar a necessidade imperiosa de padronização química para estudos da atividade dos extratos.

Barros e Costa (2012) empregando a técnica de germinação demonstraram que as sementes de caferana germinaram melhor em substratos com maior quantidade de partículas retentoras de umidade como húmus e argila.

### 3.2 Fisiologia e regulação da secreção gástrica

Digestão e a absorção de nutrientes são as funções do sistema gastrintestinal (CONSTANZO, 2004). O estômago exibe três divisões anatômicas: fundo, corpo e piloro (SILVERTHORN, 2010). É considerada secreção, a adição de líquidos, enzimas e muco à luz

do sistema gastrointestinal. Tais secreções são: secreção salivar, secreção gástrica, secreções pancreáticas e bile. O suco gástrico é secretado pelas células da mucosa gástrica, e é constituído por ácido clorídrico (HCl), pepsinogênio, fator intrínseco e muco. Úlceras gástricas são provenientes de desequilíbrios entre fatores agressores, HCl e pepsina, e mecanismos gastroprotetores, muco, bicarbonato e prostaglandinas (FERNANDES *et al*, 2012; MUTRA *et al*, 1996 *apud* HARIPRASATH; JEGADEESH; RAAMAN, 2012).

Mecanismos nervosos, hormonais e parácrinos regulam as secreções gástricas, exócrina e endócrina (YAO; FORTE, 2003). Esses mecanismos são modulados por fatores centrais, periféricos e intracelulares. A modulação central é cumprida pelo tronco cerebral através de arcos reflexos vagais provenientes do complexo dorsal vagal. Fibras emergentes deste complexo realizam sinapses com os neurônios entéricos que influenciam a secreção ácida direta e indiretamente por meio de outros neurônios e células endócrinas. A visão, o cheiro, o pensamento do alimento e a presença deste na boca ou no estômago são capazes de ativar essas vias, estimulando a secreção ácida gástrica mediada por atuação direta da acetilcolina nas células parietais e da atuação indireta nas células parácrinas (OLBE; CARLSSON; LINDBERG, 2003; SOUCCAR, 2003b).

A histamina, a acetilcolina e a gastrina são os secretagogos endógenos para o ácido nas células parietais (LULLMANN; MOHR, 2004). Suas ações são mediadas por receptores histaminérgicos do tipo H<sub>2</sub>, receptores muscarínicos do subtipo M<sub>3</sub> e receptores gastrinérgicos do tipo da colecistoquinina 2 (CCK<sub>2</sub>), respectivamente (WOLFE; SOLL, 1988). São encontrados também, receptores para prostaglandinas do tipo E (PGE<sub>2</sub>), que ao serem ativados, inibem a secreção ácida gástrica (MCQUAID, 2005). A somatostatina inibe a secreção ácida basal quando ativa receptores sst<sub>2</sub> nas células parácrinas impedindo a liberação de histamina. A somatostatina estimula a secreção ácida quando ativa receptores sst<sub>3</sub> presentes no tronco cerebral.

Células parietais secretam HCl e fator intrínseco; as células principais secretam pepsinogênio, as células G secretam gastrina na circulação sanguínea e as células mucosas do colo secretam muco, bicarbonato e pepsinogênio.

Uma camada protetora inerte formada por bicarbonato e muco reveste a mucosa das ações do suco gástrico mantendo o pH 6-7 na superfície. As prostaglandinas  $E_2$  e  $I_2$  estimulam essas secreções.

Quando estimulada por gastrina ou acetilcolina, a secreção ácida é mediada por ativação da fosfolipase C, proporcionando a hidrólise de fosfolípidos presentes na membrana plasmática, gerando trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol. O trifosfato de inositol libera cálcio do retículo endoplasmático, que irá se acoplar a calmodulina, proporcionando alterações conformacionais na proteína quinase, que fosforila proteínas envolvidas na ativação da  $H^+K^+$ -ATPase. Outra via de estimulação da secreção ácida se dá pela interação da histamina com os receptores  $H_2$  das células parietais, gerando AMPc, que ativa a proteína quinase A, que por sua vez, fosforila proteínas citoplasmáticas provocando alterações conformacionais e ativação da  $H^+K^+$ -ATPase (Figura 5).

Nas células parietais, a membrana luminal contém  $H^+K^+$ -ATPase e canais de  $Cl^-$ , e a membrana basolateral,  $Na^+K^+$ -ATPase e trocadores de  $Cl^-HCO_3^-$  (MEJIA; KRAFT, 2009; SACHS, 1995). A  $H^+K^+$ -ATPase realiza a troca do  $K^+$  luminal pelo  $H^+$  intracelular. Quando a célula parietal encontra-se inativa, a  $H^+K^+$ -ATPase localiza-se em vesículas tubulares subapicais separadas dos canalículos e, uma vez ativadas, fundem-se com os canalículos secretores apicais (FORTE; ZHU, 2010; MEJIA; KRAFT, 2009).



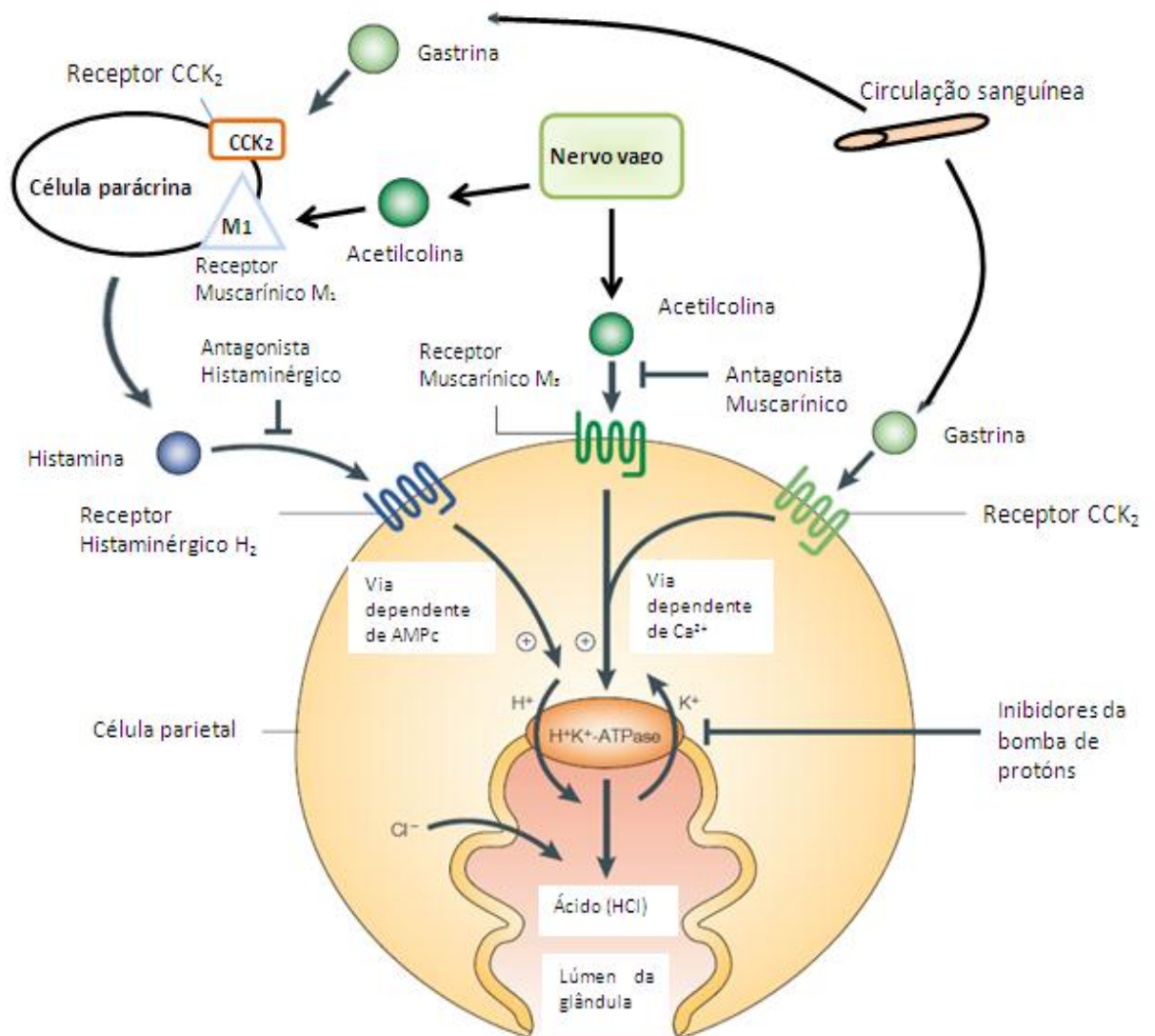


Figura 5 – Fisiologia da secreção gástrica. Esquema original modificado  
 Fonte – (OLBE; CARLSSON; LINDBERG, 2003)

### 3.3 Fisiologia cardiovascular

O sistema cardiovascular é formado pelo coração, vasos sanguíneos, células, plasma sanguíneo e por quatro válvulas que garantem o fluxo sanguíneo unidirecional. O coração trabalha como uma bomba que, ao se contrair, é capaz de gerar uma pressão arterial que impulsiona o sangue através dos vasos sanguíneos (CONSTANZO, 2004; ROGER, 1999).

A pressão arterial média é o produto entre o débito cardíaco e a resistência periférica (ROGER, 1999). O diâmetro dos vasos venosos regula a oferta de sangue ao coração e o diâmetro dos vasos arteriais determina a resistência periférica (LULLMANN; MOHR, 2004). Portanto, mudanças na resistência periférica alteram a pressão arterial e o retorno venoso. A resistência vascular periférica é modulada fisiologicamente pelo tônus do músculo liso vascular. Arteríolas e veias, principalmente, têm inervação simpática dos neurônios emergentes do centro vasomotor bulbar, tonicamente ativo e responsável pela manutenção permanente do tônus simpático. Por sua vez, o tônus do sistema simpático é modulado por mecanismos reflexos envolvendo barorreceptores (TAVARES; PLAVNIK, 1998).

### 3.3.1 Barorreceptores, quimiorreceptores e receptores cardiopulmonares

O organismo conta com mecanismos para manter a pressão arterial estável com o mínimo de variação que garanta a perfusão tecidual adequada (SILVA; GARRIDO; ASSUNÇÃO, 2001). Esta regulação é exercida pelo reflexo barorreceptor e, em segunda instância, a longo prazo, pela ativação do sistema renina-angiotensina.

O reflexo barorreceptor tem resposta rápida, é mediado por sensores neurais e sua ação controla as eferências nervosas dos sistemas simpático e parassimpático. Os sensores pressóricos são fibras sensitivas encontradas predominantemente nas paredes dos seios carotídeos e do arco aórtico. Com a distensão da parede vascular, potenciais de ação são gerados nessas terminações que transmitem informações da pressão sanguínea aos centros vasomotores localizados no tronco cerebral. Na sístole cardíaca, que eleva a pressão arterial a seus valores máximos, a frequência dos potenciais de ação gerados nos barorreceptores é elevada, diminuindo durante a diástole. O mesmo ocorre na hipertensão e na hipotensão, respectivamente. Nesses casos, as informações processadas no tronco cerebral desencadeiam respostas coordenadas dos neurônios eferentes simpáticos e parassimpáticos que produzem

alterações cardiovasculares para restabelecer os níveis basais da pressão arterial (VALENTI, *et al*, 2007).

Fisiologicamente, é conhecido que a informação do valor pressórico captada no seio carotídeo é transportada ao tronco cerebral pelo nervo do seio carotídeo (ramo do nervo glossofaríngeo) e por fibras aferentes vagais originadas no arco aórtico. A integração dessas informações ocorre no núcleo do trato solitário localizado no tronco cerebral que, imediatamente, projeta informações inibidoras para o centro vasomotor bulbar e informações ativadoras para o núcleo motor do vago localizado na ponte cerebral (CAMPAGNOLE-SANTOS; KAIBARA, 2001; ZAGO; ZANESCO, 2006). O centro vasomotor bulbar é a via comum da emergência simpática e sua ativação produz vasoconstrição nas arteríolas e nas vênulas, aumenta a frequência cardíaca (cronotropismo +), a velocidade de condução no nodo atrioventricular (dromotropismo +) e aumenta a contratilidade do miocárdio (inotropismo +). O núcleo motor do vago é o centro cardioinibidor cuja ativação diminui a frequência cardíaca (CONSTANZO, 2004; SILVERTHORN, 2010). A inervação parassimpática não existe nos ventrículos cardíacos e nos vasos sanguíneos.

Desse modo, os barorreceptores são os principais responsáveis pela regulação rápida da pressão arterial (SANTOS, 2007).

Reflexos cardiopulmonares, ou reflexo Bezold-Jarisch, também participam do controle da pressão arterial de forma semelhante aos barorreceptores promovendo hipotensão e bradicardia (VERBERNE; GUYENET, 1992). Os receptores são encontrados em sua maioria, dentro do sistema de baixa pressão cuja estimulação se dá principalmente por elevação do volume sanguíneo (GRASSI; MANCIA 1994 *apud*. CAMPAGNOLE-SANTOS; KAIBARA, 2001).

Quimiorreceptores são sensores de pH, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> centrais e periféricos importantes no controle da pressão arterial: os sensores periféricos estão localizados nos corpos carotídeos e

nos corpos aórticos e os centrais na medula espinhal (GUIMARÃES *et al*, 2011). Quando a pressão parcial de O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) diminui e aumenta a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO<sub>2</sub>), ocorre bradicardia transitória por estímulo da atividade vagal, seguida de taquicardia e hipertensão persistente por ação simpática. Quimiorreceptores realizam ajustes na ventilação e na pressão arterial a fim de garantir uma pressão de perfusão tecidual adequada (CAMPAGNOLE-SANTOS; KAIBARA, 2001).

### 3.3.2 Homeostasia do íon cálcio no sistema cardiovascular

A parede das arteríolas é composta de músculo liso, sendo este o local de maior resistência ao fluxo sanguíneo. O grau de dilatação ou constrição arteriolar é controlado pela inervação simpática do músculo liso vascular e por metabólitos vasoativos nos tecidos.

A contração vascular é também controlada por hormônios circulantes e mediadores locais liberados pelas terminações nervosas simpáticas e células endoteliais (ROSA, 2008). O endotélio desempenha uma função importante na modulação do tônus vascular e na atividade contrátil da musculatura lisa (RIGATTO, 2002). Células endoteliais sintetizam substâncias vasoativas relaxantes como: óxido nítrico, prostaciclina e fator hiperpolarizante do endotélio, e substâncias contráteis como endotelina e tromboxano (GIRARDI; GIRARDI, PETERS, 2006; ZAGO; ZANESCO, 2006).

O óxido nítrico é sintetizado no endotélio a partir da ação da enzima NO sintase (NOS) sob a L-arginina (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; MONCADA, 1997). A ativação da NOS ocorre por estímulos químicos por meio de interações agonista-receptor de acetilcolina, ATP e bradicinina, elevando a concentração de cálcio intracelular, ou por estímulos físicos gerados pela força de cisalhamento do sangue no endotélio (ZAGO; ZANESCO, 2006). Depois de formado, o NO difunde-se para o músculo liso vascular, ativa a guanilato ciclase solúvel levando à formação de GMPc, que diminui a concentração

intracelular de cálcio promovendo o relaxamento vascular e hipotensão (SZABÓ, 1995). As prostaglandinas PGI<sub>2</sub> agem sobre os receptores de prostanoídes, que ativam a adenilato ciclase, resultando na formação de AMPc que provoca a vasodilatação (FELIZZOLA *et al*, 1996; GIRARDI; GIRARDI, PETERS, 2006).

O cálcio é fundamental aos mecanismos de excitação e contração da musculatura do miocárdio e dos vasos (OIGMAN; FRITSCH, 1998). Portanto, diversos aspectos ligados ao ritmo cardíaco estão relacionados às correntes de cálcio que controlam a frequência e o ritmo cardíaco.

O potencial de ação gerado no nodo sinoatrial propaga-se para os átrios, por meio das fibras internodais, e simultaneamente, em sentido ao nodo atrioventricular, propagando pelo feixe de His, às fibras de Purkinje e ao miocárdio ventricular (ROGERS, 1999).

Depois que o potencial de ação é originado abrem-se os canais de cálcio voltagem-dependentes, associados aos receptores de diidropiridina presentes na membrana da célula do miocárdio, ocorrendo o influxo de cálcio. A concentração de cálcio intracelular eleva-se, levando à liberação de mais cálcio pelos receptores de rianodina localizados no retículo sarcoplasmático (RS), processo conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio - CICR, *calcium induced calcium release* (BERRIDGE, 1997). A saída de cálcio do RS para o citoplasma provoca o acoplamento eletromecânico da contração cardíaca. A concentração de cálcio citosólico é controlada também pelo transporte ativo do íon de volta para os reservatórios (recaptação) via Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA); e para o meio extracelular por uma Ca<sup>2+</sup>-ATPase localizada na membrana plasmática (PAMCA) e por um permutador de 3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> que é induzido pelo gradiente eletroquímico de Na<sup>+</sup> entre os dois lados da membrana celular (MACE *et al*, 2003).

A despolarização da membrana plasmática, ativa canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L e do tipo T e a desativação se dá pelo processo de repolarização ou hiperpolarização por abertura de canais de potássio, provocando o efluxo deste íon.

Os níveis intracelulares de cálcio elevam-se também pela interação de agonistas com receptores acoplados à proteína G presentes na membrana plasmática da musculatura lisa vascular, ativando fosfolipases que liberam o inositol 1,4,5 trisfosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG). O IP3 libera cálcio do retículo sarcoplasmático e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC), aumentando a condutância dos canais de cálcio transmembranares. No citoplasma, o cálcio liga-se à calmodulina gerando mudanças conformacionais, permitindo sua interação com a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), deslocando a sequência inibitória da MLCK que fosforila a miosina, formando o complexo actomiosina, resultante da ligação da miosina com a actina, permitindo o deslizamento de um filamento sobre o outro. No estado de repouso, os sítios de ligação da actina com a miosina estão ocupados pelo complexo tropomiosina-caldesmon, sendo necessária uma alteração conformacional na proteína caldesmon induzida pelo complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, permitindo a ligação da actina com a miosina. O ATP liberado pela miosina ATPase após sua interação com a actina fornece a energia necessária para o processo. As contrações do músculo liso vascular são do tipo tônico, por manterem o tônus constante e serem mais lentas (PAIVA; FARIAS, 2005). O relaxamento ocorre por meio da reversão dos processos mencionados anteriormente, por recaptação do cálcio pelo retículo sarcoplasmático, e por extrusão do cálcio pelas ATPases presentes na membrana plasmática.

Quando a concentração do íon cálcio se eleva no endotélio ocorre relaxamento na musculatura lisa adjacente. Este efeito vasodilator acontece devido ao acoplamento entre o endotélio e o músculo liso vascular via *gap junctions* (GRGIC *et al*, 2009).

***4 MATERIAL***

#### 4.1 Material vegetal

Folhas de *P. sprucei* Hook (Figura 6) foram coletadas no município de Manaus (AM) sob as coordenadas: 03° 05' 07. 4" S e 059° 57' 02. 2" W.Gr., em altitude de 111,5 pés ou cerca de 34 m acima do nível do mar, em maio de 2010 (Figura 7). Uma exsicata foi depositada no herbário do INPA sob o registro número 240640.



Figura 6 - *Picrolemma sprucei* Hook



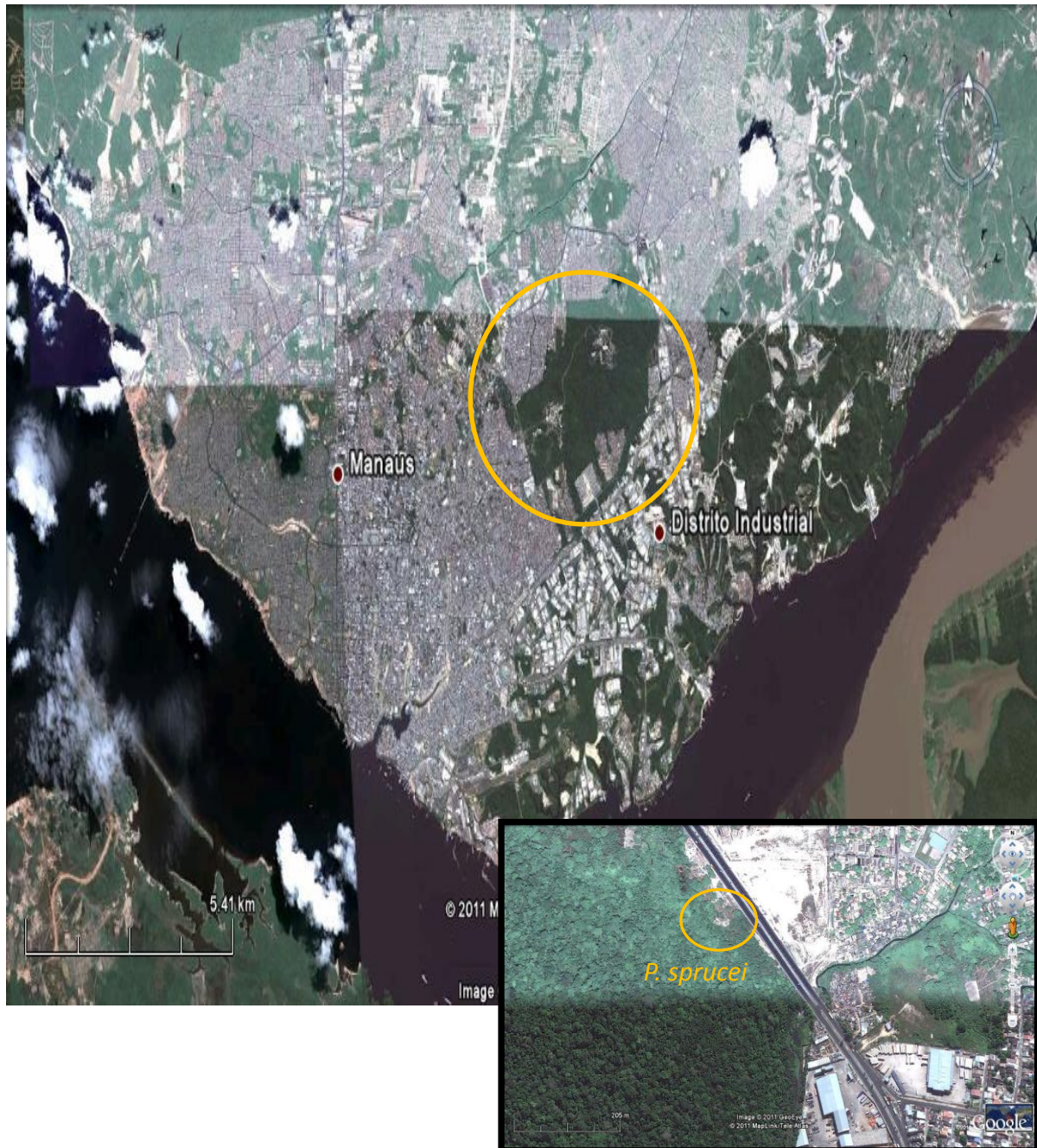


Figura 7 - Área de coleta de *P. sprucei* Hook no município de Manaus/AM (S 03°05'07.4"; W059°57'02.2").  
FONTE: Google Earth 6.0.3.2197

## 4.2 Animais

Nas experiências farmacológicas foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) entre 200-250 g e camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, entre 30-50 g, machos e fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA. Os animais permaneceram em sala com temperatura de 23 °C, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto na hora dos experimentos. Porcos jovens pesando cerca de 20 kg provenientes de fornecedores locais foram utilizados nos experimentos moleculares.

Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo os Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de Animais (GILES, 1987). O projeto de estudo de *P. sprucei* Hook foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFESP (CEP/EPM 0760/07).

## 4.3 Material químico

### 4.3.1 Drogas, reagentes e sais

Acetilcolina (Sigma-Brasil), acetonitrila grau HPLC (Merck), ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), ácido clorídrico, ácido ascórbico, ácido etileno diamino-tetra acético (EDTA), ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, adenosina-5-trisfosfato sódica (ATP), albumina de soro bovino, atropina (Sigma), bicarbonato de sódio, *calcium-4 assay kit* (Molecular Devices), colagenase tipo IA, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio P.A (Merck-Brasil), *coomassie brilliant blue G-250*, estreptomicina, etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), fenoltaleína, Ficol 400, heparina, HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico), hidróxido de amônio, *loading buffer* (Fura-4), molibdato de amônio, *n*-butanol (Synth-Brasil), penicilina, pentobarbital (Sigma), piperazine-1,4-bis (ácido 2-ethanesulfônico), prazosin, probenecida,

reagente de Bradford, sacarose, soro de cavalo, soro fetal bovino, tripsina, trizma base e verapamil.

#### 4. 3. 2 Soluções utilizadas nos experimentos

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

**Líquido Nutritivo Tyrode:** NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,0 mM;  $\text{NaHCO}_3$  15,0 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,0 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,0 mM; glicose 11,0 mM.

**Solução Krebs-Bicarbonato:** NaCl 119,0 mM; KCl 4,6 mM;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2 mM;  $\text{NaHCO}_3$  15,0 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,2 mM;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1,5 mM; glicose 11,0 mM; ácido ascórbico 0,28 mM.

**Solução Salina Tamponada:** (PBS, pH 7,4): NaCl 150,0 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,0 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,64 mM.

**Solução de HBSS (mM):** KCl 5,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,4; NaCl 136,9;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,34; D-glucose (1 mg/mL);  $\text{NaHCO}_3$  4,2 mM

**Solução Tampão PIPES/Trisma:** 4 mM, pH 7,4 contendo sacarose 300 mM

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

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

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

## ***5 MÉTODOS***

## **5.1 Tratamento do material vegetal**

O material vegetal coletado foi selecionado manualmente e seco à temperatura ambiente ao abrigo da luz por um período de 42 dias. Após secagem, o material foi triturado em liquidificador e armazenado em sacos plásticos lacrados, protegidos de luz e umidade.

## **5.2 Obtenção do extrato aquoso (EA)**

O extrato aquoso (EA) foi preparado por infusão a 2,5% a 72 °C. O infuso obtido foi filtrado em papel filtro, concentrado em rotaevaporador a 50 °C (Yamato modelo RE 47) e liofilizado (Modulayod-Thermo Electron Corp.). O rendimento do EA foi de 15%.

## **5.3 Obtenção da fração butanólica (FBut)**

O extrato aquoso (10 g do pó liofilizado) foi dissolvido em 500 mL de água destilada e particionado com porções de 300 mL de n-butanol em funil de separação, originando a fração butanólica. Após concentração a vácuo e liofilização, o rendimento da FBut foi de 10%.

O extrato aquoso e fração butanólica de *P. sprucei* foram acondicionados em frascos fechados e mantidos em dessecador ao abrigo de luz.

## **5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE analítica)**

A padronização e purificação do extrato e fração de *P. sprucei* Hook em CLAE foram realizadas pela Dra. Mirtes Midori Tanae da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

O EA e FBut de *P. sprucei* (1 mg/mL) foram padronizados em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas injetoras LC–

20AT, módulo de comunicação CBM-20A e detector UV-VIS SPD-10A, operando a 260 nm. O sistema estava acoplado a um computador, sendo operado por software Shimadzu LC solution, versão 1.21, SP1.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila de 5 a 50% em 30 minutos, em coluna analítica C18 (25 x 0,46 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 1,0 mL/minuto. As amostras foram dissolvidas em água/acetonitrila 5%, filtradas em filtro de 0,22 µm (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 20 µL.

### **5.5 Purificação da FBut de *P. sprucei* Hook L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-PREP)**

A FBut foi purificada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (Shimadzu – Japão) composto por 2 bombas injetoras LC-8A, controlador SCL-8A, integrador CR4A, coletor de frações FCV-100B e detector espectrofotométrico UV-Vis SPD-6A, operando a 260 nm.

A fase móvel consistiu em gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 60% por 40 minutos, em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm, em fluxo constante de 8 mL/minuto.

A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL, coletando-se as frações.

## 5.6 Avaliação da atividade farmacológica

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

O teste foi realizado para determinação de doses efetivas, vias de administração, tempo de observação relativo e principais efeitos a serem comprovados com outros testes. Grupos de camundongos (n=3) foram tratados com o extrato aquoso, com a fração butanólica e com a fração aquosa (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) ou (0,1 e 0,3 g/kg, i.p.), e observados em caixa de observação após 30 minutos, uma, duas, três e 24 horas. Nesses intervalos foram avaliados: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, secreção brônquica, convulsão e morte. Posteriormente, para observar o poder letal do extrato e das frações purificadas, ratos foram tratados com 1,0 g/kg de extrato aquoso, fração butanólica ou fração aquosa, e camundongos foram tratados intraperitonealmente com as frações semipurificadas F1 (0,064 g/kg), F2 (0,028 g/kg), F3 (0,082 g/kg) e F4 (0,019 g/kg) (n=2).

## 5.7 Atividades no sistema nervoso central

### 5.7.1 Avaliação da temperatura corporal

O estudo da temperatura retal avalia o efeito de uma substância natural ou sintética sobre a temperatura corporal, que pode ser indicativo de alterações em mecanismos de homeostasia controlados no sistema nervoso central.

Os testes foram realizados em camundongos machos adultos (n=6/grupo), tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) ou FBut (0,03 g/kg, v.o.) de *P. sprucei*; o grupo controle



recebeu o veículo (água, 10 mL/kg v.o.). A temperatura retal dos animais foi medida com termômetro digital, antes e após 1 hora dos tratamentos (Figura 8).



Figura 8 - Teste da temperatura corporal, realizado em camundongos adultos machos

## 5.7.2 Avaliação da atividade tipo-antidepressiva

### 5.7.2.1 Teste da suspensão pela cauda

O teste da suspensão pela cauda avalia os efeitos dos anti-depressivos em geral, que aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais. Os testes foram realizados em camundongos adultos machos (n=6/grupo). Os animais foram tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de *P. sprucei*; o grupo controle recebeu água (10 mL/kg, v.o.). Os animais foram suspensos pela cauda, por um período de 6 minutos, registrando-se o tempo de imobilidade para cada animal e a latência para o aparecimento da mesma (Figura 9).



Figura 9 - Teste suspensão pela cauda, realizado em camundongos machos adultos

### 5.7.3 Avaliação da atividade hipnosedativa

#### 5.7.3.1 Sono induzido por barbitúrico (CARLINI *et al*, 1986)

Grupos de camundongos machos foram tratados com veículo (água, 10 mL/kg, v.o.), EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=5/grupo) ou com a FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o., n=6/grupo). Sessenta minutos após os tratamentos foi injetado pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e mediou-se o tempo de indução do sono, a latência e a duração do sono, até no máximo 3 horas após a injeção de barbitúrico (Figura 10).

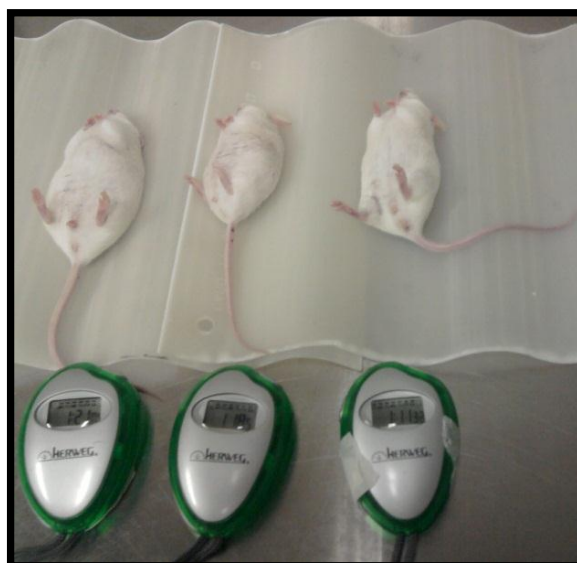


Figura 10 - Teste sono barbitúrico

### 5.7.3.2 Sono induzido por éter etílico

Camundongos machos (n=6/grupo) foram tratados com veículo (água, 10 mL/kg, v.o.), EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) ou com a FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o.), 1 h antes do experimento. Após os tratamentos, os animais foram colocados em uma câmara de vidro transparente fechada (30 cm x 20 cm de diâmetro) saturada com éter etílico 10 minutos antes. Foram registradas a latência e a duração da hipnose induzida pelo éter etílico (Figura 11).



Figura 11 - Teste sono induzido por éter etílico

### 5.7.4 Avaliação da coordenação motora

#### 5.7.4.1 Teste do “rota-rod”

O aparelho utilizado neste teste é constituído de uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro subdividida em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 rpm. Os animais foram selecionados 24 h antes do teste, em sessões de 2 minutos de duração, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período. No dia do teste, os animais selecionados foram tratados com veículo (água, 10 mL/kg, v.o.), EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=4/grupo) ou com a FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o., n=3/grupo). As leituras foram realizadas aos 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas após os tratamentos. Os animais foram colocados para andar na barra durante o intervalo de um minuto. A latência para a

primeira queda e o tempo total de permanência na barra (com três reconduções no máximo) foram registrados e analisados.

#### 5.7.4.2 Teste do arame - “wiring test”

Camundongos foram selecionados antes do teste para verificar a capacidade normal de preensão. Nesse teste, os animais foram suspensos pela cauda e suas patas dianteiras foram colocadas num arame com 1 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento a 20 cm de altura. Quando os animais agarraram o arame com as patas dianteiras, eles foram tracionados horizontalmente e soltos, o tempo que os animais levaram para agarrar o arame com as patas traseiras foi registrado (BOISSIER *et al*, 1961). Os camundongos que não agarraram o arame em duas tentativas, com cinco minutos de intervalo, foram descartados do teste. Os animais selecionados foram tratados com veículo (água, 10 mL/kg, v.o.), EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=4/grupo) ou com a FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o., n=3/grupo). Após 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas, os camundongos foram novamente avaliados quanto à capacidade de preensão.

#### 5.7.5 Teste de atividade exploratória

##### 5.7.5.1 Teste do campo aberto - “open-field”

O campo aberto consiste de uma placa de acrílico (30 x 30 x 15 cm) com marcações para avaliar a atividade exploratória dos animais. Camundongos foram tratados com veículo (água, 10 mL/kg, v.o.), EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=4/grupo) ou com a FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o., n=3/grupo). Após 30 minutos, 1, 2, 4, 8 e 24 horas dos tratamentos foram

avaliados o número de cruzamentos, o número de levantares e o tempo de imobilidade dos animais durante cinco minutos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946).

## 5.7.6 Avaliação da ação do tipo ansiolítica

### 5.7.6.1 Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado consiste de um aparato formado por 2 braços de acrílico transparente com assoalho preto, abertos (30 x 5 x 25 cm) e 2 braços fechados de mesma medida, opostos em forma de cruz grega. Os braços são conectados por uma placa central (5 x 5 cm) e todo o sistema mantido a 45 cm do chão.

Os testes foram realizados em camundongos adultos machos (n=6/grupo), tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de *P. sprucei*; o grupo controle recebeu água (10 mL/kg, v.o.). Após os tratamentos, os animais foram colocados na plataforma central com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o comportamento observado durante cinco minutos medindo-se a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados. Foram avaliados também comportamentos etológicos como o número de imersões de cabeça e número de levantares com as patas anteriores, que avaliam a atividade exploratória, e o comportamento de estiramento que avalia a ansiedade (Figura 12).



Figura 12 - Testes do labirinto em cruz elevado, realizado em camundongos (n=6/grupo).

### 5.7.7 Avaliação de estereotípias

#### 5.7.7.1 Teste de subida na grade - “Climbing behavior”

Camundongos machos foram tratados com veículo (água 10 mL/kg, v.o.) ou EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) uma hora antes do experimento (n=6/grupo). Transcorridos 30 minutos do tratamento, os animais foram injetados com cloridrato de apomorfina (10 mg/kg, i.p.) e colocados em gaiolas de arame. O comportamento dos animais de subir as grades foi observado por 30 minutos, a intervalos de cinco minutos, atribuindo um grau de estereotípias como indicado na tabela 1.

Tabela 1- Comportamento de camundongos tratados com apomorfina e correspondentes graus de estereotípias

COMPORTAMENTO APRESENTADO	GRAU DE ESTEREOTÍPIA
4 Patas no piso da gaiola	0
2 Patas na grade da gaiola	1
4 Patas intermitentes nas grades	2
4 Patas constantes nas grades	3

## 5.8 Avaliação da atividade anti-úlceras do extrato aquoso e da fração butanólica de *P. sprucei* Hook

### 5.8.1 Lesão gástrica induzida por estresse e imobilização a frio (4 °C)

O experimento foi realizado segundo método descrito por Senay e Levine (1967). Camundongos adultos machos mantidos em jejum por 16 horas e com acesso livre à água foram tratados com o veículo (água, 10 mL/kg v.o.) ou com o EA de *P. sprucei* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) (n=5/ grupo). Após uma hora, os animais foram imobilizados em contêntores

apropriados e mantidos em câmara fria (4 °C) por duas horas. Ao final desse período, os animais foram sacrificados por anestesia etérea profunda, seus estômagos foram removidos e seccionados ao longo da curvatura maior para possibilitar a exposição da mucosa e quantificação das lesões sob microscópio óptico. O índice de lesão gástrica foi quantificado cumulativamente de acordo com os parâmetros abaixo (GAMBERINI *et al*, 1991; TAKAGI *et al*, 1989) (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros para medir o índice de lesão gástrica

PARÂMETROS	PONTUAÇÃO
Edema leve	1
Edema moderado	2
Edema intenso	3
Petéquias leves	1
Petéquias moderadas	2
Petéquias intensas	3
Muco leve	1
Muco moderado	2
Muco intenso	3
Hemorragia leve	1
Hemorragia moderada	2
Hemorragia intensa	3
Úlceras menores que 1mm <sup>2</sup>	1
Úlceras maiores que 1mm <sup>2</sup>	Tamanho em cm x 1,5 + $\sum$ demais pontos
Hiperemia	1
Ausência de hiperemia	0
Presença de pregas	0
Ausência de pregas	1

## **5.9 Avaliação da atividade anti-secretora ácida**

### **5.9.1 Ligadura pilórica *in situ***

Ratas foram mantidas em jejum por 16 horas com acesso livre à água (n=5/grupo). Os animais foram anestesiados com éter etílico, a cavidade abdominal foi exposta e o piloro foi ligado com linha de sutura. Após a ligadura, o veículo salina 0,9%, o EA (0,3 g/kg), a FBut (0,03 g/kg) e as frações F1 (18 mg/kg), F2 (9,0 mg/kg), F3 (30 mg/kg) e F4 (6,0 mg/kg) foram injetados na luz duodenal (i.d.). Após uma hora da cirurgia, alguns grupos foram tratados com histamina (10 mg/kg, s.c.) ou betanecol (20 mg/kg, s.c.). Transcorridas 4 horas da cirurgia, os animais foram mortos por anestesia etérea profunda, seus estômagos foram removidos e os conteúdos gástricos foram coletados para medidas do volume, do pH e da acidez total. O volume de secreção gástrica e o pH foram determinados por medida direta. A acidez total foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N utilizando fenolftaleína 2% como indicador de neutralização. O número de equivalentes de NaOH necessários para titular o ácido foi considerado da acidez total (mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h).

## **5.10 Avaliação da ação do extrato aquoso (EA) de *P. sprucei* Hook na atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase**

### **5.10.1 Isolamento de microssomas gástricos e da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gástrica**

O isolamento dos microssomas gástricos e da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase foi realizado no Setor de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da UNIFESP, em São Paulo, pela Dra. Caden Souccar como segue:



As membranas contendo  $H^+-K^+$ -ATPase foram obtidas da fração microsomal extraída da mucosa gástrica de suíno pelo método descrito por Rabon *et al* (1988). O animal foi obtido de fornecedor credenciado e morto de acordo com as normas. O estômago foi removido, seccionado ao longo da curvatura menor, lavado com PBS e transferido para um béquer contendo tampão de homogeneização. O fundo do estômago foi isolado e estendido em placa de vidro sobre gelo, o muco foi removido e as glândulas gástricas foram isoladas. O material foi homogeneizado em homogeneizador de vidro contendo tampão de homogeneização (20 – 30 mL) a 3000 rpm. O homogenato foi centrifugado a 13000 g por 15 minutos, o *pellet* foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 g por 60 minutos. O *pellet* (fração microsomal) foi ressuspensa em tampão de homogeneização (18 mL), aplicado em gradiente de Ficol (4% e 12%) e centrifugado a 24.000 rpm por 60 minutos. A fração contendo a  $H^+-K^+$ -ATPase foi coletada na interface do Ficol 12%, ressuspensa em tampão de homogeneização (6 mL) contendo sacarose 30% e homogeneizada em homogeneizador de vidro. Os microsomas gástricos foram conservados em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios de atividade enzimática.

### 5.10.2 Determinação do teor de proteína

A concentração de proteína das amostras membranares foi determinada pelo método de Bradford (1976). O método baseia-se na mudança de coloração vermelha do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250, presente no reagente de Bradford, para coloração azul após sua ligação à proteína das amostras. As determinações foram feitas em triplicata e as leituras das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu-Japão) a 595 nm. A concentração de proteína foi determinada por interpolação da curva padrão obtida com albumina de soro bovino (1 a 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.10.3 Medida da atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gástrica

Para as medidas da atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase gástrica, amostras microssomais (0,9 - 1 µg) foram incubadas em tampão Tris-HCl 50 mM, contendo ouabaína 1 mM (para eliminar a Na<sup>+</sup>-ATPase presente no homogenato) em volume final de 100 µL. Foram utilizadas microplacas transparentes de 96 poços. O EA foi testado em triplicata nas concentrações de 1 a 300 µg/mL. A reação foi iniciada adicionando-se 20 µL de ATP 5 mM e incubando-se as amostras a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 µL de TCA 50% a 4 °C. Adicionou-se às amostras 200 µL de solução ácida de molibdato de amônio (0,36 g de ácido ascórbico para 15 mL de solução, segundo Hossein *et al* (1993), incubou-se a 37 °C por 10 minutos. Para o controle positivo foram feitas determinações da atividade em amostras contendo o antagonista específico experimental da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Schering 28080 (3 a 1000 µM).

A leitura das absorbâncias foi feita a 820 nm em leitor de placa (Spectramax M2-Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

## 5.11 Atividade cardiovascular

### 5.11.1 Avaliação da ação da FBut e suas frações na pressão arterial de ratas anestesiadas

Ratas normotensas foram anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). Em seguida, os animais foram fixados em decúbito dorsal em placa de cortiça, a veia ilíaca foi canulada para a administração de drogas e das frações em doses estabelecidas. 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 7.

Apenas a FBut e frações semipurificadas foram injetadas por via parenteral. Doses da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg) e das frações semipurificadas F1 (0,2; 0,6; 1,8 e 5,4 mg/kg), F2 (0,1; 0,3; 0,9 e 2,7 mg/kg), F3 (0,27; 0,8 e 2,4 mg/kg) e F4 (0,07; 0,2; 0,6 e 1,8 mg/kg), calculadas proporcionalmente aos rendimentos na purificação, foram convenientemente dissolvidas em salina a 0,9% e injetadas e.v. Como a FBut produziu respostas hipotensoras, alguns animais foram tratados com atropina (1,0 mg/kg, e.v.) 3-5 minutos antes de uma nova dose de FBut e das frações F1 (1,8 mg/kg) e F3 (2,4 mg/kg). Alguns animais receberam o antagonista  $\alpha_1$ - adrenérgico prazosin (1,0 mg/kg, e.v.), e em todos os animais, a atividade vascular foi testada com as drogas padrões, acetilcolina e noradrenalina, injetadas antes e após a FBut e as frações semipurificadas. A pressão arterial de ratas também foi avaliada após a secção cirúrgica dos nervos vagos, próximo da carótida, na presença da FBut.

### 5.11.2 Avaliação da ação da FBut em átrios isolados de rato

Ratos foram anestesiados superficialmente com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. Em seguida, por toracostomia, os átrios foram isolados. As preparações foram montadas em cuba de vidro de 5 mL contendo líquido nutritivo de Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio (O<sub>2</sub> 95% e CO<sub>2</sub> 5%). Os órgãos foram amarrados a um transdutor de força sob tensão inicial de 1 g. A contração muscular foi estimulada com pulsos transmuralis de 2 ms, 1 Hz e voltagem supramáxima. Após 30 minutos de estabilização, a FBut (10 a 100 µg/mL) foi incubada por 30 minutos. Somente uma concentração foi testada por preparação.

### 5.11.3 Avaliação da ação da FBut e frações semipurificadas de *P. sprucei* em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina

Para a avaliação da FBut na musculatura lisa vascular, ratos adultos foram anestesiados superficialmente com éter etílico e mortos por deslocamento cervical. A aorta torácica foi removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-bicarbonato a 35 °C para dissecação.

Anéis de aorta torácica com aproximadamente 2 mm de comprimento foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba de vidro para órgão isolado com capacidade de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs-bicarbonato a 35 °C aerada com carbogênio (O<sub>2</sub> 95% CO<sub>2</sub> 5%) e pH 7,4. Após 30 minutos de estabilização, o órgão foi pré-contraído com noradrenalina 10<sup>-7</sup> M, e em seguida, a presença do endotélio foi testada com a indução do relaxamento pela incubação de acetilcolina 10<sup>-6</sup> M. O efeito de concentrações individuais da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) e das frações F1, F2, F3 e F4 (3; 10 e 30 µg/mL), incubadas cumulativamente em intervalos de 10 min, foi avaliado em preparações com e sem endotélio, previamente contraídas com noradrenalina 10<sup>-7</sup> M. A destruição do endotélio foi realizada mecanicamente pela introdução e cuidadosa manipulação de uma haste metálica intraluminalmente.

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

## 5.12 Cultura de músculo cardíaco de rato

Ratos recém-nascidos com um dia de vida, machos ou fêmeas foram mortos por inalação de gás carbônico; a cavidade torácica foi aberta e o coração retirado. Após dissecação

em solução de HBSS, o músculo cardíaco ventricular foi picado com tesoura fina durante 20 minutos e incubado por uma hora em solução com colagenase,  $\text{CaCl}_2$  e albumina bovina a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, as células foram homogeneizadas com pipeta Pasteur de ponta fina, centrifugadas (2500 rpm, 5 minutos,  $23^\circ\text{C}$ ) e o sobrenadante desprezado. A colagenase foi lavada das células por ressuspensão e centrifugação sucessivas em HBSS, nas mesmas condições anteriores. Foram adicionados às células 10 mL de meio de cultivo D-MEM, acrescido de 10% de soro de cavalo, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Em seguida, a suspensão celular foi filtrada em malha de nylon de  $10\ \mu\text{M}$ . As células do filtrado foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de  $0,4 \times 10^6$  células em placas de 35 mm cobertas com colágeno. No terceiro dia pós-plaqueamento, o meio de cultivo foi trocado para D-MEM acrescido de 10% de soro de cavalo, 2% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As culturas foram mantidas em incubadora a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , trocando-se o meio de cultura em dias alternados até a confluência das células (quinto dia de cultura) e utilizadas após 6 a 7 dias de cultivo.

### **5.13 Cultura de útero de rata**

Ratas adultas foram superficialmente anestesiadas com éter e exsanguinadas por incisão da carótida; a cavidade abdominal foi aberta, o útero retirado e transferido para placa contendo HBSS para dissecção fina. Os órgãos foram cortados em pedaços menores, o tecido adiposo foi desprezado e as camadas serosa e circular foram descamadas com bisturi. Os úteros foram lavados com HBSS (4x) e adicionada tripsina (15 minutos,  $37^\circ\text{C}$ , com agitação a cada 5 minutos). Após novas lavagens com HBSS (4x), os órgãos foram delicadamente picados durante 30 minutos, foi adicionada colagenase seguida por incubação a  $37^\circ\text{C}$  por 1,5 h com agitação a cada 5 minutos. O homogenato foi centrifugado (2500 rpm, 10 minutos), o

sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspenso em 10 mL de D-MEM; o processo de lavagem foi repetido por 4 vezes. O *pellet* obtido foi suspenso em D-MEM acrescido de 10% de soro fetal de cavalo e 1% de antibiótico (penicilina 10.000 UI + estreptomicina 10 mg). Após contagem em placa de Neubauer, as células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células/placa. As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, trocando-se o meio de cultura em dias alternados e utilizadas após 15 dias de cultivo.

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

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

### **5.15 Análises estatísticas**

Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  erros padrão das médias, com exceção dos valores de IC<sub>50</sub> que foram expressos como médias geométricas e limites de confiança (LC) superior e inferior.

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

## ***6 RESULTADOS***



### **6.1 Obtenção do extrato aquoso (EA)**

O extrato aquoso obtido por infusão em água destilada a 72 °C na concentração de 2,5%, apresentou pH de 5,6 e rendimento de 15% após o processo de liofilização.

### **6.2 Obtenção da fração butanólica (FBut)**

O extrato aquoso passou pelo processo de partição com n-butanol originando as frações, aquosa (FA) e butanólica (FBut), que foram concentradas em rotaevaporador e liofilizadas, obtendo-se 10% de rendimento na FBut relativo ao EA.

### **6.3 Padronização do extrato aquoso (EA) e da fração butanólica (FBut) de *P. sprucei* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

O EA apresentou 6 picos principais com tempos de retenção em 2,7; 2,9; 5,1; 6,9; 7,7 e 17,2 minutos, representando 2,6; 1,4; 3,9; 3,8; 2,5 e 32,5% do total do cromatograma, respectivamente. A FBut apresentou 9 picos principais com tempos de retenção de 2,9; 3,7; 5,2; 7,0; 7,7; 11,8; 15,7; 17,3 e 25,2 minutos, representando 1,5; 1,2; 3,0; 6,1; 1,6; 1,1; 9,0; 26,2 e 2,3 % do total do cromatograma, respectivamente (Figura 13).

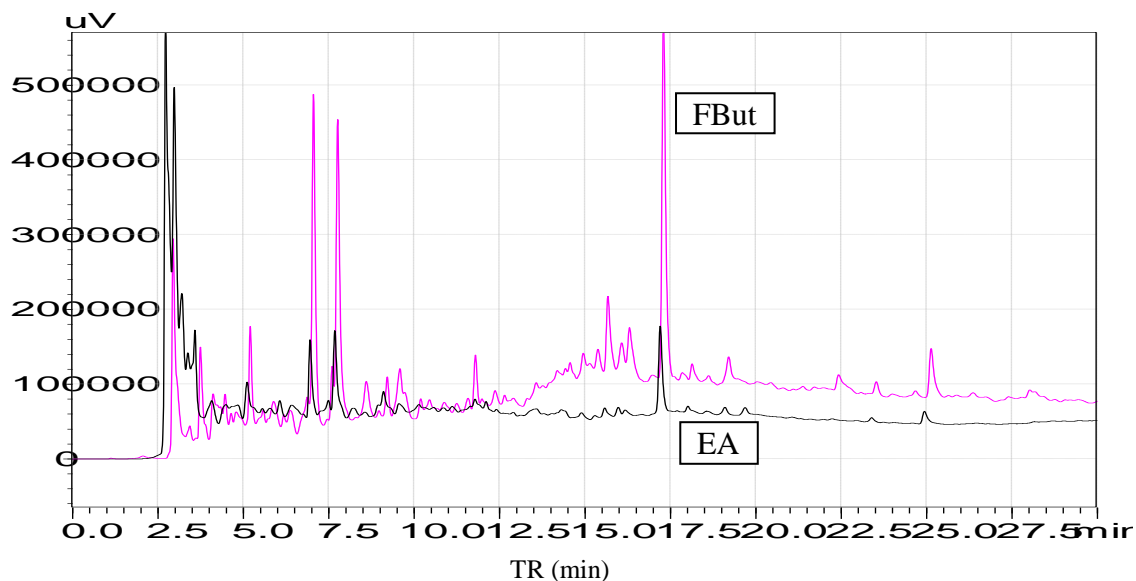


Figura 13 - Perfis cromatográficos do EA e FBut de *P. sprucei* em CLAE utilizando coluna C18, eluída com gradiente de água/acetonitrila de 5 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e  $\lambda$  260 nm.

#### 6.4 Purificação da FBut de *P. sprucei* Hook L. por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-PREP)

A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL (100 mg/mL), coletando-se 4 frações, cada uma delas composta por um conjunto de picos com tempos de retenção característicos: F1: 5.4 a 12 min; F2: 12.1 a 19 min; F3: 19.1 a 27.7 min e F4: 27.7 a 38 min e rendimento ponderal de F1 21,5%; F2 9,6%; F3 27,5% e F4 6,6% (Figura 14 e 15). Os picos com TR < 5 minutos não foram considerados.

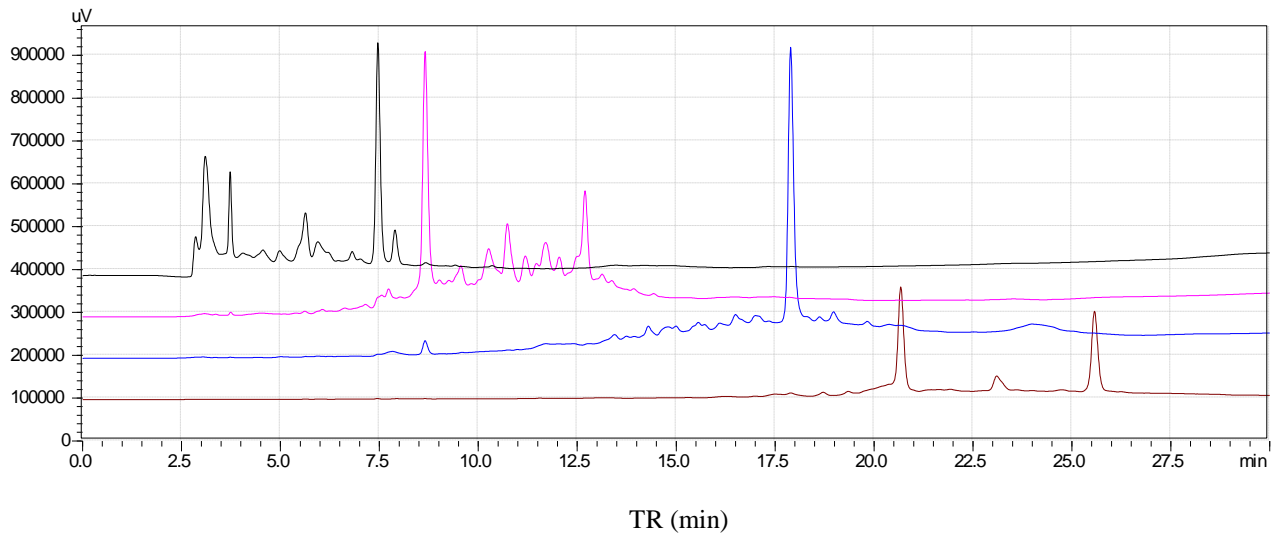


Figura 14 - Perfis cromatográficos das frações F1 a F4 obtidas da purificação da FBut de *P. sprucei* em CLAE utilizando coluna C18 eluída com gradiente de água/acetonitrila de 5 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e  $\lambda$  260 nm.

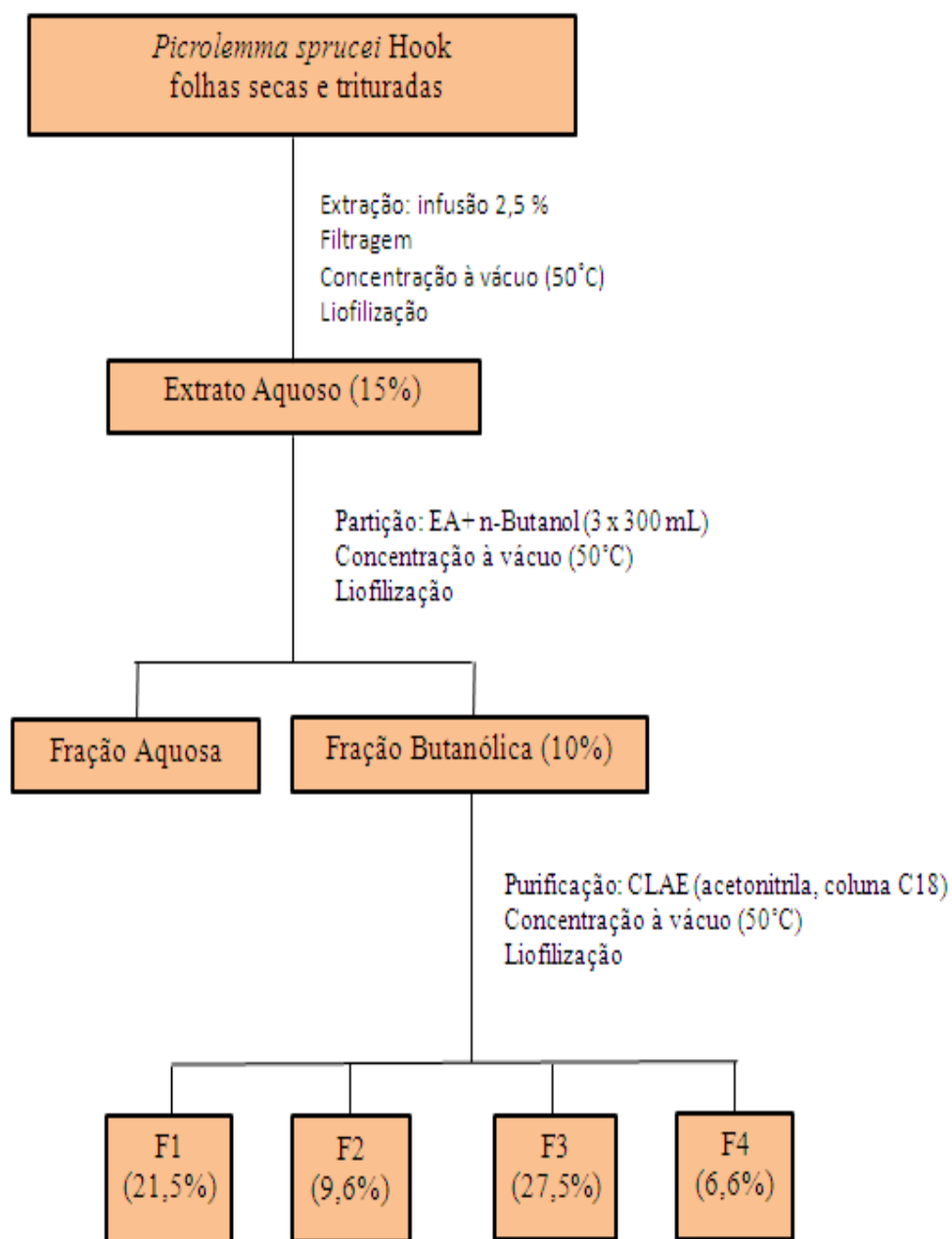


Figura 15 - Fluxograma de obtenção e purificação do extrato e frações de *P. sprucei* Hook

## 6.5 Resultados farmacológicos

### 6.5.1 Triagem farmacológica geral

No teste geral de atividades, o EA de *P. sprucei* foi administrado nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o. (n =3/grupo). Os camundongos tratados com a dose de 0,3 g/kg apresentaram sinais de irritabilidade após uma hora do tratamento e tremores, piloereção e ptose após 2 horas do tratamento. Nenhum animal morreu em 24 h. No grupo que recebeu a maior dose (1,0 g/kg, v.o.) foram observadas piloereção, menor movimentação após 1 e 2 horas do tratamento e, na leitura de 24 horas, as extremidades apresentaram-se cianóticas e os três animais deste grupo foram a óbito.

A FBut 0,1 e 0,3 g/kg por via oral não foi letal, mas os animais apresentaram cauda cianótica, contorções e tremores de pequena intensidade. Nos camundongos tratados com FBut 1,0 g/kg por via oral foram observadas piloereção, sedação, ptose, diminuição da movimentação, respiração forçada, cianose e óbito.

Em ratos, o EA e a FBut (1,0 g/kg, v.o.) foram letais em menos de 24 horas. Nos camundongos tratados com EA, FA ou FBut (0,1 e 0,3 g/kg, i.p.) todos apresentaram contorções abdominais nas primeiras leituras, e apenas o grupo que recebeu 0,3 g/kg de FBut apresentou ptose. O EA e a FBut (0,1 e 0,3 g/kg, i.p.) foram letais depois de 24 horas e os animais que receberam as frações F3 e F4 apresentaram contorções abdominais, tremores e dificuldade de locomoção nas primeiras horas, e extremidades cianóticas, quietação, piloereção e ptose na leitura de 24 horas. No entanto, os animais não perderam o reflexo de endireitamento e todos os tratados com F4 morreram após 24 horas.

### 6.5.2 Atividades no sistema nervoso central

Nos vários testes realizados para avaliar as atividades centrais do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de *P. sprucei*, a diminuição da temperatura corporal foi o único resultado estatisticamente significativo (Tabela 3).

Tabela 3- Efeitos do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg v.o.) de *P. sprucei* Hook em atividades específicas do sistema nervoso central de camundongos.

<b>ATIVIDADES CENTRAIS</b>	Efeitos
Avaliação da Temperatura Corporal	Hipotermia nas 3 doses testadas
Avaliação da atividade Antidepressiva: Teste da suspensão pela cauda	Aumentou a latência, mas não diminuiu significativamente o tempo de imobilidade
Avaliação da atividade hipnosedativa: Sono induzido por barbitúrico	Sem efeito
Avaliação da atividade hipnosedativa: Sono induzido por éter etílico	Aumentou a latência na dose de 0,3 g/kg, mas não diminuiu significativamente a duração do sono
Avaliação da coordenação motora: Teste do Rota-rod	Sem efeito
Avaliação da coordenação motora: Teste do Arame	Sem efeito
Avaliação da atividade exploratória: Teste do campo-aberto	Sem efeito
Avaliação da ação do tipo ansiolítica: Labirinto em cruz elevado	Sem efeito
Avaliação de estereotípias: Teste de subida na grade	Sem efeito

Na avaliação da temperatura corporal foi observada uma diminuição significativa em todos os grupos tratados com EA, comparativamente ao grupo controle (Controle =  $38,4 \pm 0,1$ ; EA 0,1 g/kg =  $36,4 \pm 0,2$ ; EA 0,3 g/kg =  $36,3 \pm 0,2$ ; EA 1,0 g/kg =  $35,4 \pm 0,3$  °C) (Figura 16). Entretanto, esta diminuição de temperatura não foi observada no tratamento com FBut 0,03 g/kg.

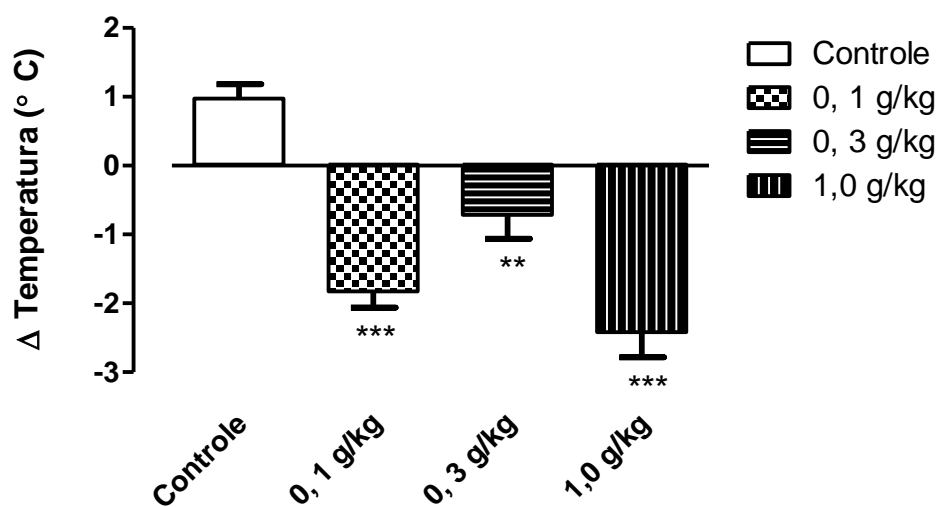


Figura 16 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com o EA de *P. sprucei* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na temperatura corporal em camundongos. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  erros padrão (n=5 animais/grupo) da variação da temperatura em cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA de 1 via e teste de Dunnett).

Nos testes para a avaliação das atividades centrais da FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o.) de *P. sprucei* Hook, as doses testadas não produziram efeitos significativamente diferentes nos animais tratados comparativamente ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4- Efeitos da FBut (0,003; 0,01 e 0,03 g/kg, v.o.) de *P. sprucei* Hook nas atividades do sistema nervoso central avaliadas em camundongos.

<b>ATIVIDADES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL</b>	Efeitos
Avaliação da atividade hipnosedativa: Sono induzido por barbitúrico	Reduziu a latência nas 3 doses, mas não aumentou significativamente a duração do sono
Avaliação da atividade hipnosedativa: Sono induzido por éter etílico	Reduziu a latência nas 3 doses, mas não alterou significativamente a duração do sono
Avaliação da coordenação motora: Teste do Rota-rod	Sem efeito
Avaliação da coordenação motora: Teste do Arame	Sem efeito
Avaliação da atividade exploratória: Teste do campo-aberto	Sem efeito

### 6.5.3 Efeito do EA de *P. sprucei* Hook nas lesões gástricas induzidas por estresse a frio (4 °C, por 2 horas)

Em camundongos controles submetidos ao estresse por imobilização a frio, 4 °C por 2 horas, o número de úlceras foi  $14 \pm 2$  e o índice de lesão da mucosa gástrica foi  $29 \pm 2$  (n=5). O tratamento prévio com 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg do EA de *P. sprucei* por via oral, diminuiu o número de úlceras de 36%, 85% e 98% do controle, respectivamente, enquanto que o índice de lesão da mucosa foi reduzido 18%, 57% e 64% do controle, respectivamente (Figura 17 e 18).



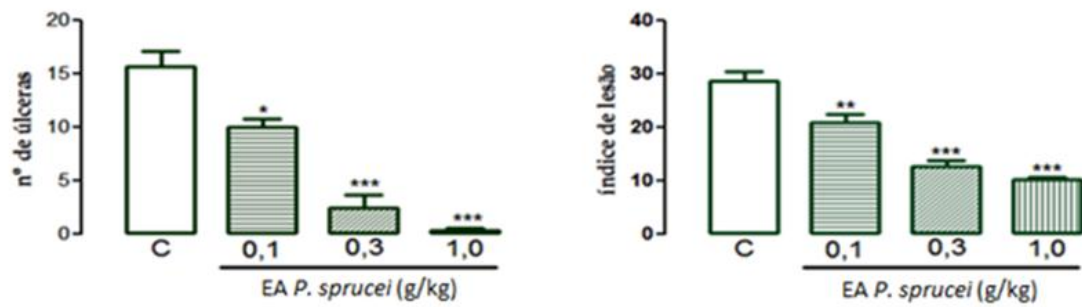


Figura 17 - Efeitos da administração oral de água (controle, C) e do EA de *P. sprucei* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg) no número de úlceras e no índice de lesão da mucosa gástrica induzidos pelo estresse por imobilização a frio (4°C) em camundongos (n=5/ grupo).

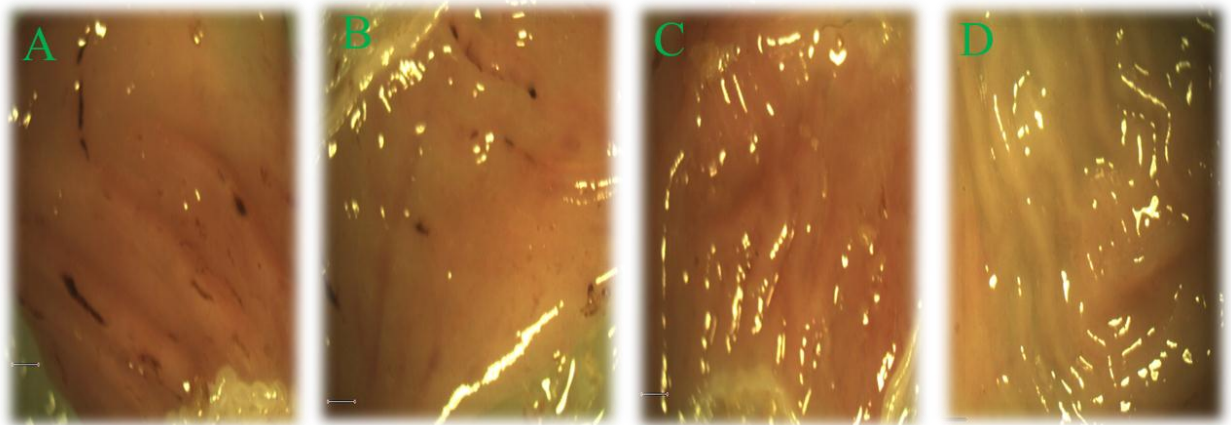


Figura 18 - Lesões da mucosa gástrica de camundongos submetidos a estresse por imobilização a 4 °C, após 2 horas dos tratamentos. Indicando em **A**: controle lesado; **B**: mucosa gástrica de animal tratado com EA 0,1 g/kg; **C**: mucosa gástrica de animal tratado com EA 0,3 g/kg; **D**: mucosa gástrica de animal tratado com EA 1,0 g/kg. Notar as úlceras (pontos escuros) e o edema da mucosa (ausência de pregas) em **A** e **B**.

#### 6.5.4 Secreção gástrica após ligadura pilórica *in situ*: ação da histamina, do betanecol e do EA de *P. sprucei*

Após 4 horas de ligadura pilórica, o volume da secreção gástrica coletada de ratas controles foi de  $2,5 \pm 0,7$  mL com  $\text{pH} = 2,5 \pm 0,5$  e acidez titulável de  $7,3 \pm 1,3$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h) (n = 5).

O tratamento prévio dos animais com 0,3 g/kg de *P. sprucei*, injetado na luz duodenal (i.d.) 30 minutos antes, reduziu o volume da secreção e a acidez gástrica de 95% e 90,5% dos

valores controles, respectivamente ( $n = 5$ ). O pH da secreção foi proporcionalmente aumentado (Figura 19).

Nas ratas tratadas com histamina (10 mg/kg, s.c.) o volume da secreção gástrica aumentou para  $11,8 \pm 0,7$  mL, com pH de  $1,0 \pm 0,0$  e acidez total de  $6,4 \pm 1,2$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h. Nas ratas pré-tratadas com EA (0,3 g/kg, i.d.), a secreção induzida pela histamina (10 mg/kg, s.c.) foi diminuída de 95,4% no volume e de 86,4 % na acidez total ( $n = 5$ ); nesses animais, o pH aumentou de 3 unidades (pH = 4).

Os efeitos produzidos pela histamina na secreção gástrica foram significativamente diferentes dos controles, e todos os efeitos produzidos pelo EA na secreção gástrica foram estatisticamente diferentes dos valores obtidos no grupo controle e nas ratas tratadas com histamina (Figura 19).

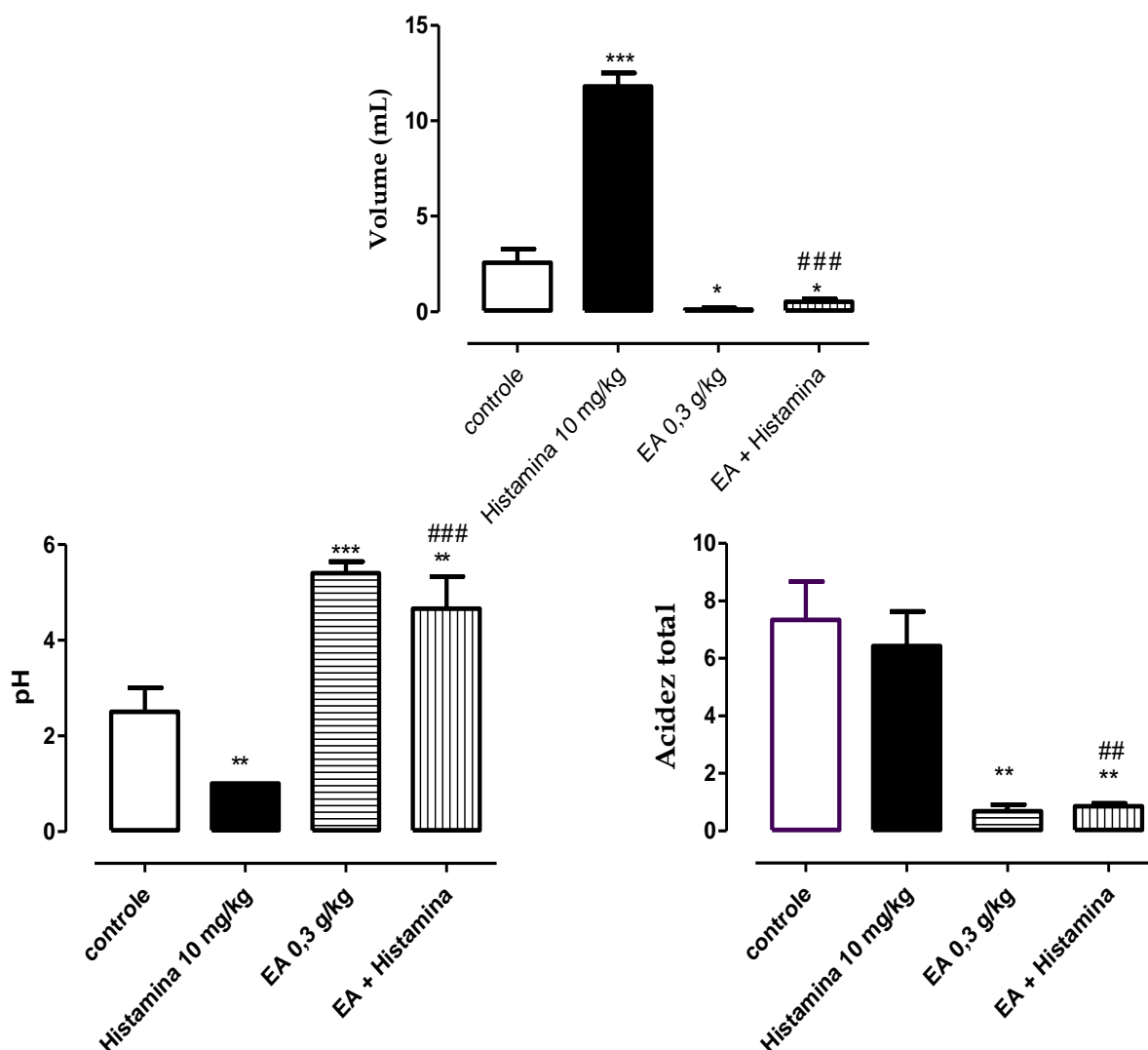


Figura 19 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) do EA de *P. sprucei* (0,3 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pela histamina e a inibição produzida pelo tratamento prévio com o EA no grupo controle e no grupo tratado com histamina (10 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo histamina; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle).

Nas ratas tratadas com betanecol (20 mg/kg, s.c.), o volume da secreção gástrica foi  $7,7 \pm 0,9$  mL, com pH de  $1,0 \pm 0,0$  e acidez total de  $7,3 \pm 0,9$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h). Nos animais tratados com EA (0,3 g/kg, i.d.) + betanecol 20 mg/kg (s.c.) uma hora após a cirurgia, houve diminuição de 72,5% no volume e 65% na acidez total (n = 5/grupo).

O pH da secreção dos animais tratados com betanecol foi uma unidade maior após o tratamento prévio com o EA (Figura 20).

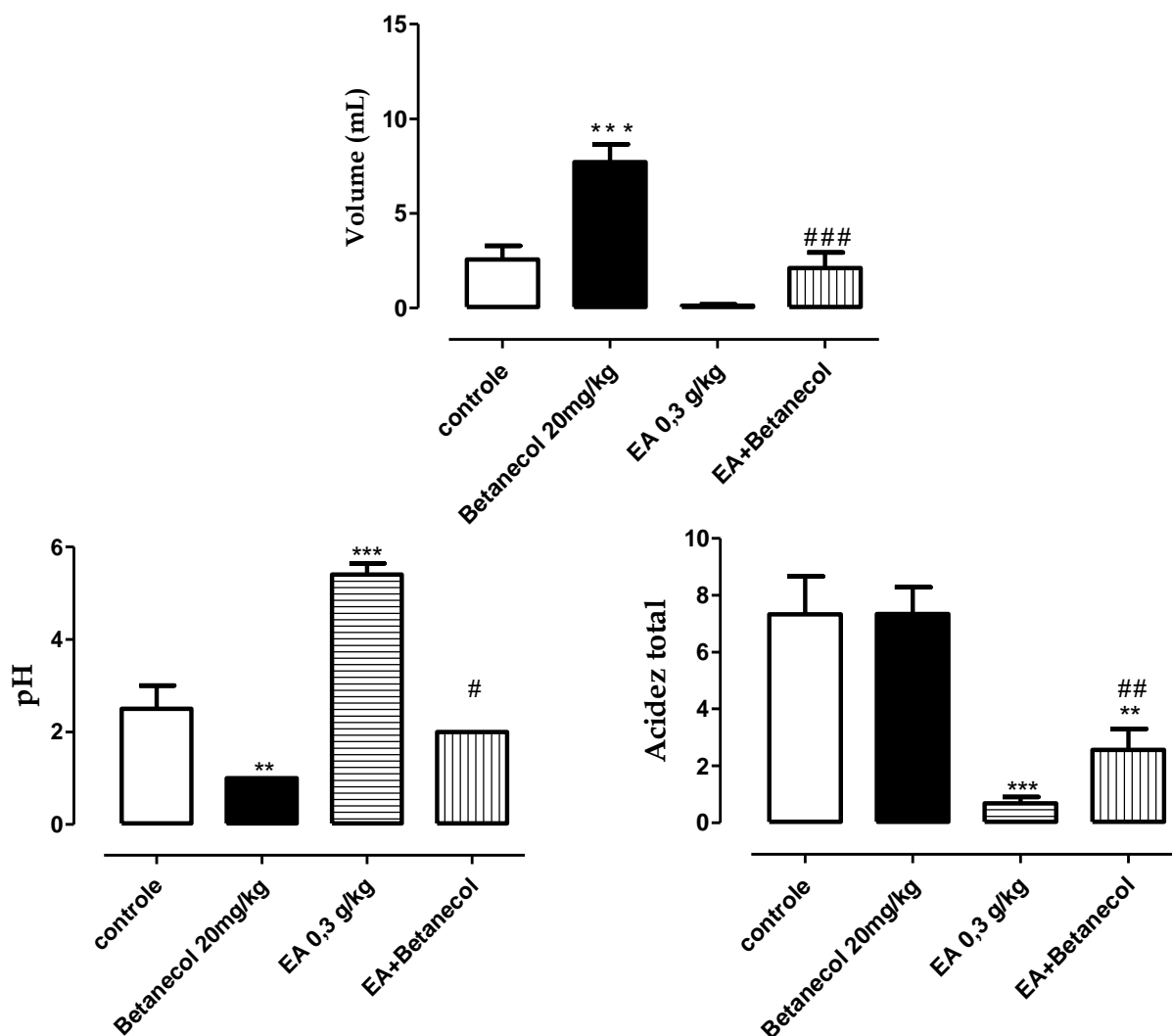


Figura 20 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) do EA de *P. sprucei* (0,3 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratos submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pelo betanecol e a inibição produzida pelo tratamento prévio com o EA no grupo controle e no grupo tratado com betanecol (20 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo betanecol; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle).

### 6.5.5 Efeitos da FBut de *P. sprucei* nos parâmetros da secreção ácida gástrica estimulada por histamina ou por betanecol

Decorridas 4 horas da ligadura pilórica, o volume da secreção gástrica coletada de ratos controles foi de  $2,5 \pm 0,3$  mL, com  $\text{pH} = 2,0 \pm 0,5$  e acidez titulável de  $1,5 \pm 0,1$

mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h. O tratamento dos animais com FBut 0,03 g/kg, i.d., reduziu o volume da secreção e a acidez gástrica de 62% e 65% dos valores controles, respectivamente (n = 5/grupo). O pH da secreção aumentou de 2 unidades.

Nos animais tratados com histamina (10 mg/kg, s.c.) o volume da secreção gástrica aumentou para  $8,7 \pm 0,5$  mL, com pH de  $2,0 \pm 0,3$  e acidez total de  $2,1 \pm 0,1$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h. No grupo tratado previamente com FBut (0,03 g/kg, i.d.) a secreção estimulada pela histamina (10 mg/kg, s.c.), foi diminuída de 89% no volume e 58% na acidez total (n = 5/grupo); nesses animais, o pH da secreção aumentou de 2 unidades (Figura 21).

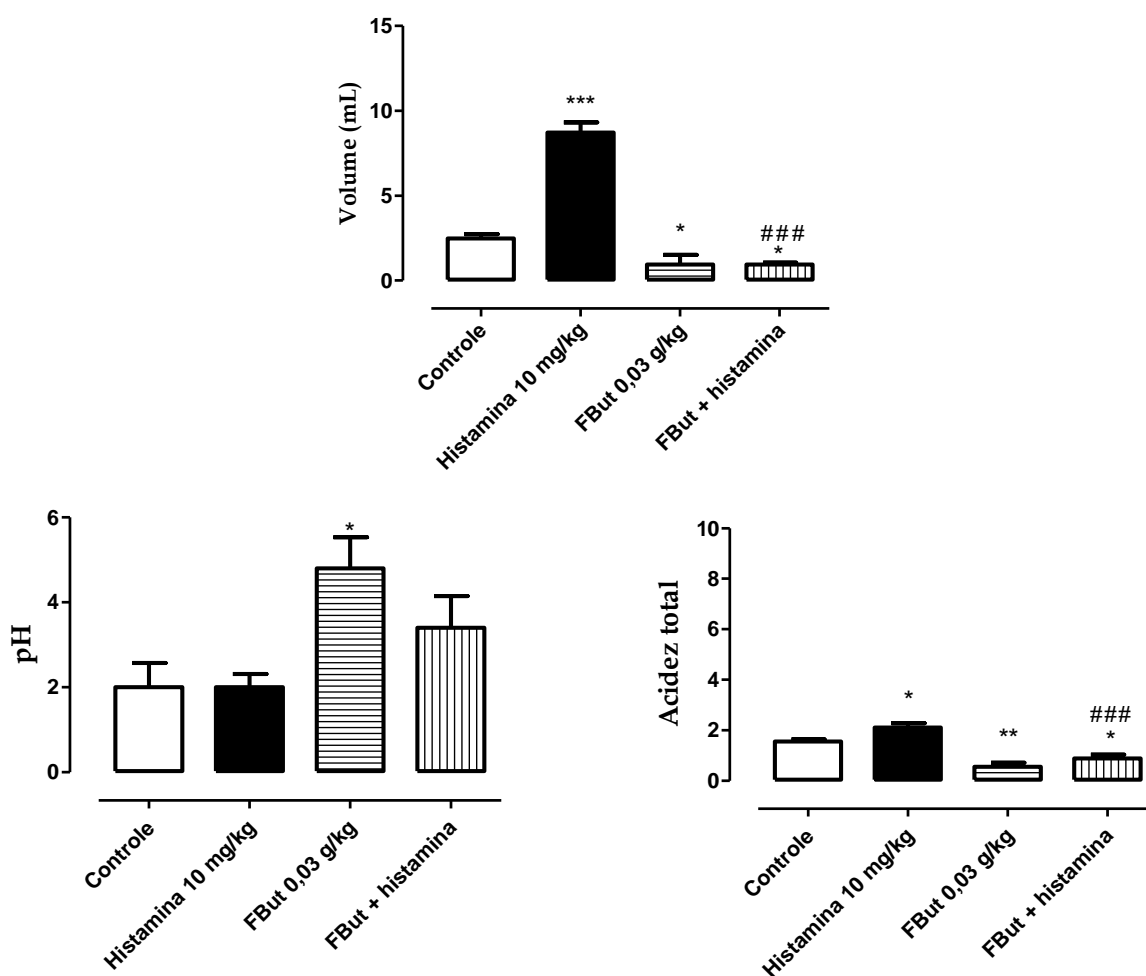


Figura 21 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) da FBut de *P. sprucei* (0,03 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratos submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pela histamina e a inibição produzida pelo tratamento prévio com a FBut no grupo controle e no grupo tratado com histamina (10 mg/kg, s.c.). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo histamina; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle).

Nas ratas tratadas com betanecol (20 mg/kg, s.c.) o volume da secreção gástrica aumentou para  $5,3 \pm 0,2$  mL, com pH de  $1,0 \pm 0,0$  e acidez total  $6,4 \pm 1,1$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h. O tratamento prévio dos animais com FBut de 0,03 g/kg, i.d., reduziu o volume da secreção e a acidez gástrica de 62% e 38% dos valores controles, respectivamente.

Nos animais tratados com FBut 0,03 g/kg, i.d. com secreção estimulada pelo betanecol 20 mg/kg, s.c., o volume foi reduzido em 15% e a acidez total em 25% (n = 5/grupo). No grupo tratado apenas com a FBut o pH foi aumentado de 2 unidades (Figura 22).

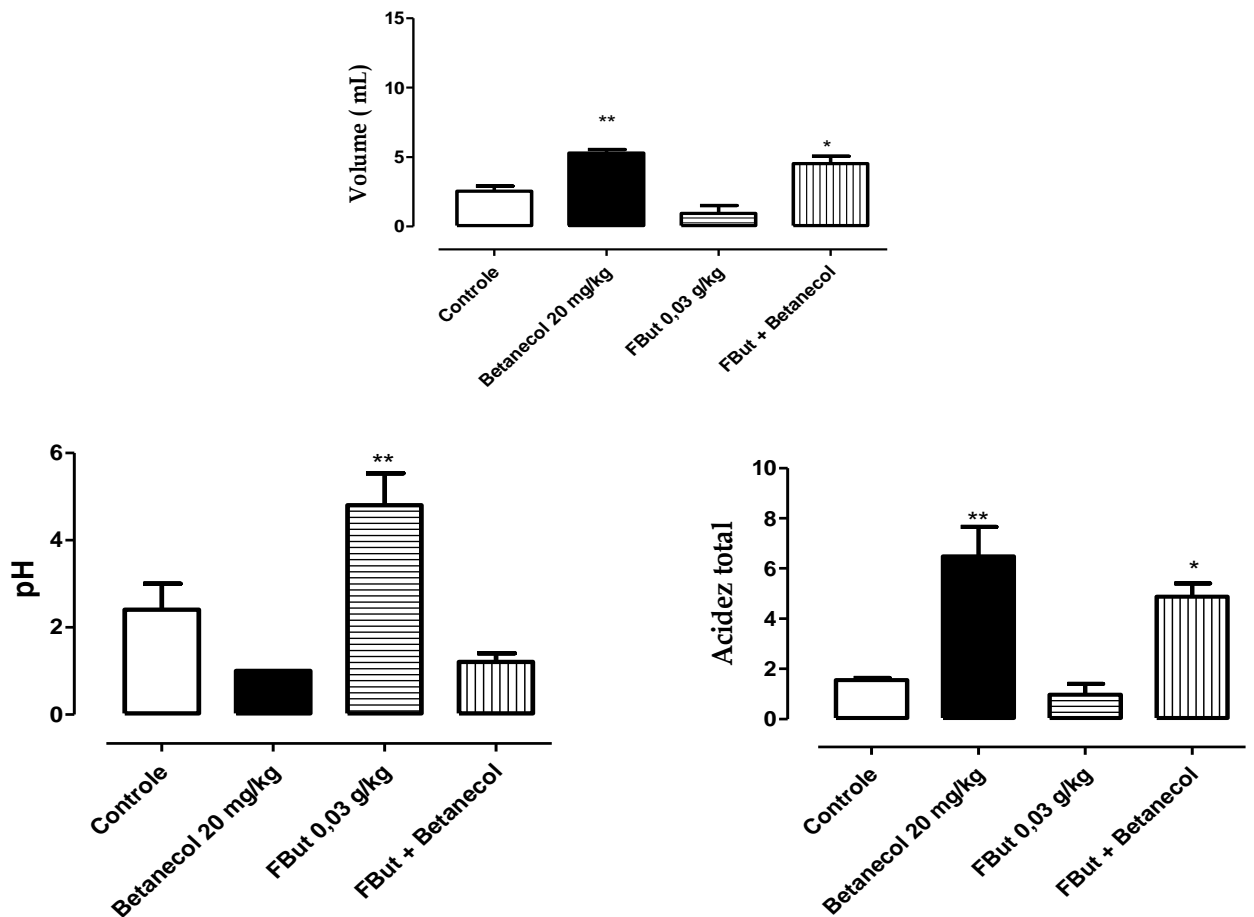


Figura 22 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) da FBut de *P. sprucei* (0,03 g/kg), no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratas submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. Notar o estímulo da secreção produzido pelo betanecol e a inibição produzida pelo tratamento prévio com a FBut no grupo controle e no grupo tratado com betanecol (20 mg/kg, s.c). As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ , em relação ao grupo controle).

### 6.5.6 Efeitos das frações semipurificadas de *P. sprucei* nos parâmetros da secreção ácida gástrica

Nos animais tratados com a fração F4 (6 mg/kg) o volume da secreção gástrica foi reduzida para  $2,8 \pm 0,2$  mL, com  $\text{pH} = 3,3 \pm 0,9$  e acidez total  $1,2 \pm 0,3$  mEq[H<sup>+</sup>]/L/4h, correspondendo a 67,7% e 82,9%, respectivamente (n = 5). Além disso, o pH aumentou 2 unidades (Figura 23).

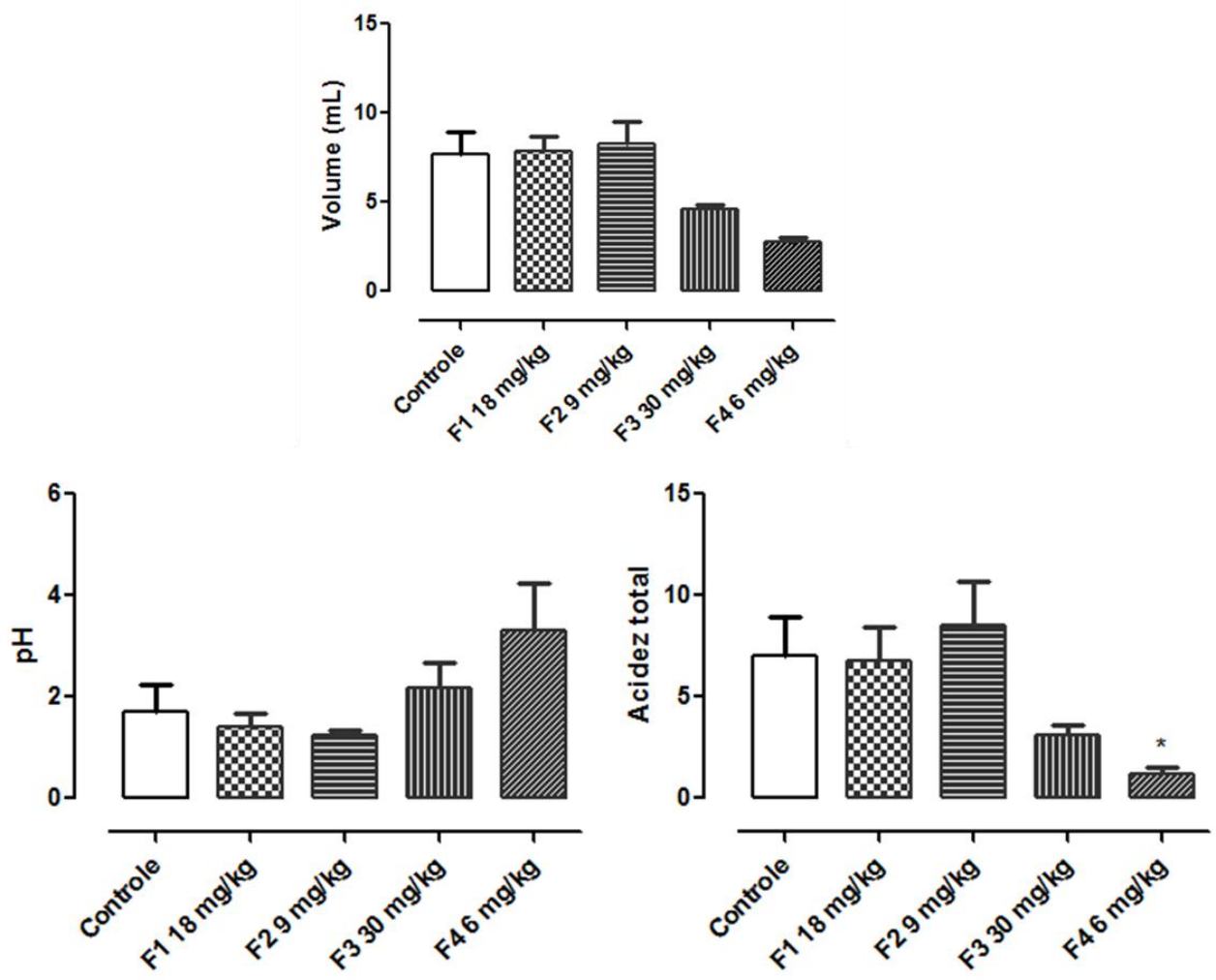


Figura 23 - Efeitos da administração intraduodenal (i.d.) das frações F1 (18 mg/kg), F2 (9 mg/kg), F3 (30 mg/kg) e F4 (6 mg/kg) de *P. sprucei*, no volume, no pH e na acidez total da secreção gástrica de ratos submetidas à ligadura pilórica de 4 horas. As colunas e barras verticais representam as médias e erros padrão das médias de 5 animais por grupo. (ANOVA seguida por teste de Newman-Keuls onde \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle).

### 6.5.7 Efeito do EA de *P. sprucei* na atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase isolada da mucosa gástrica de porco

Em condições basais, a atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase isolada da mucosa gástrica de porcos foi considerada 100% e a inibição produzida pelo controle positivo (SCH28080) foi calculada em relação ao valor basal. A incubação de SCH28080 (3 a 1000 μM) por 30 minutos a 37 °C inibiu a atividade enzimática de até 70% com IC<sub>50</sub> de 467 μM. Na presença de EA (1, 3, 10, 30, 100 e 300 μg/mL) a atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase não foi alterada (Figura 24).

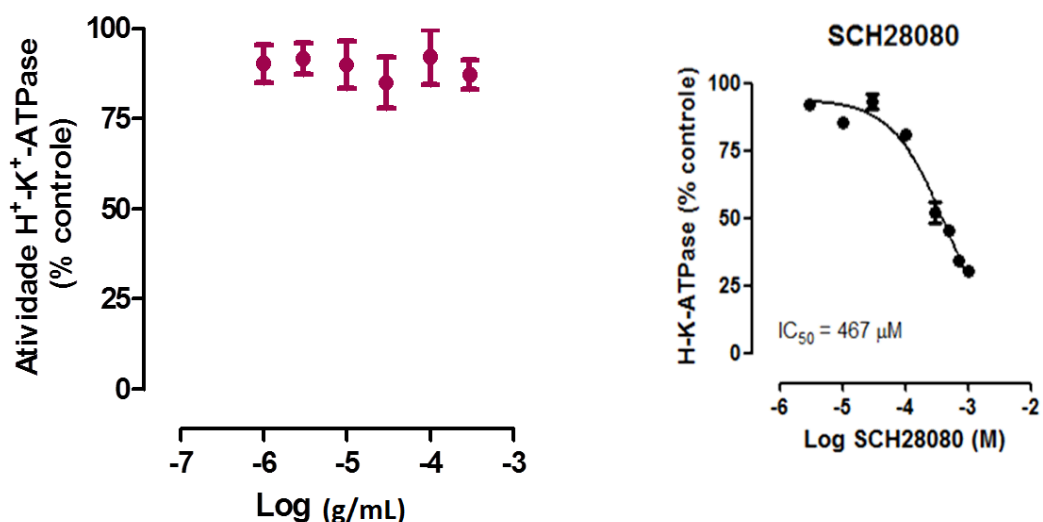


Figura 24 - Efeito do EA 1, 3, 10, 30, 100 e 300 μg/mL de *P. sprucei* na atividade da H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase isolada da mucosa gástrica de porco, incubada por 30 minutos a 37 °C (à esquerda) e efeito do controle positivo SCH28080 (à direita). Os símbolos e barras representam as médias ± erros padrão de 3 ensaios em triplicata.

### 6.5.8 Ação cardiovascular das frações da *P. sprucei*

#### 6.5.8.1 Efeito da FBut (10, 30 e 100 μg/mL) na pressão arterial de ratas anestesiadas

Ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) apresentaram pressão arterial média de 112,5 mm Hg após 30 minutos da anestesia (n= 4).



A administração da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, e.v.) produziu hipotensão rápida e passageira acompanhada de bradicardia; com a maior dose (3,0 mg/kg) houve queda inicial de 22 mm Hg e bradicardia de 20 bpm, com pico máximo em 80 segundos e reversão aos valores basais em 5 minutos. O efeito hipotensor inicial foi seguido de hipotensão maior (90 mm Hg) e mais duradoura (4 minutos e 35 segundos) concomitante com a diminuição da frequência cardíaca de 58 bpm. Nesta segunda fase, sinais de diminuição acentuada dos batimentos cardíacos foram frequentes durante a hipotensão (Figuras 25 e 26).

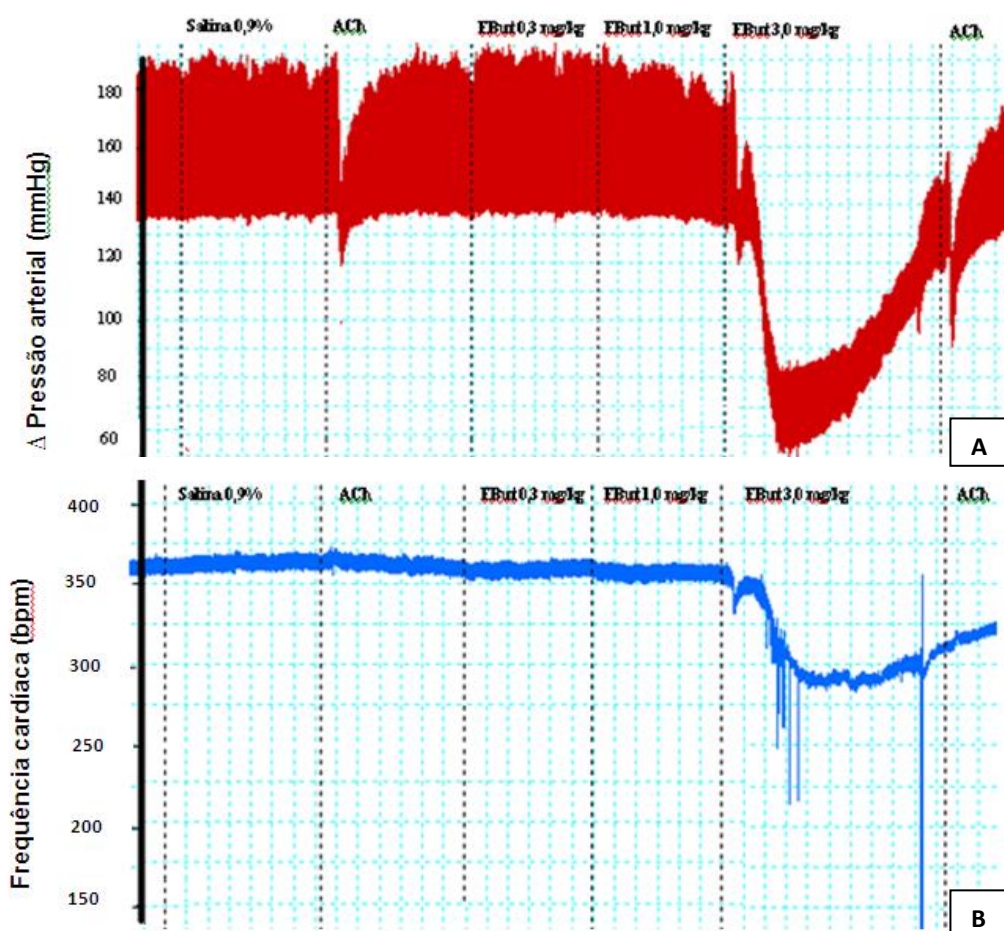


Figura 25- (A) Registro típico do efeito da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei* e da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).

A quantificação da hipotensão e da bradicardia iniciais está mostrada na Figura 26. Após a administração da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) o efeito da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) não foi alterado.

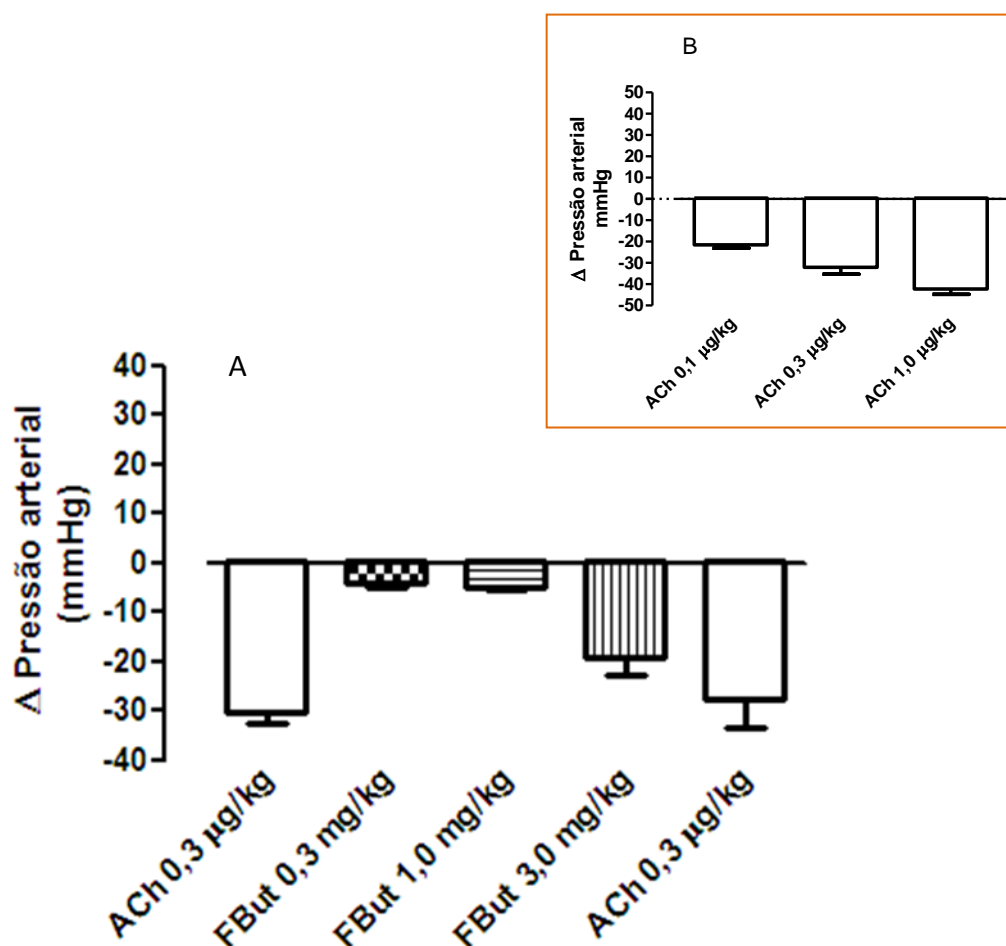


Figura 26 - (A) Efeito da FBut (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei* e da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) relação dose-efeito do padrão positivo ACh (0,1; 0,3 e 1,0 µg/kg, e.v.). Notar que a FBut não modificou a resposta à ACh.

A injeção de atropina (1,0 mg/kg, e.v.) produziu hipotensão de pequena intensidade ( $6 \pm 5$  mm Hg, n=4), bloqueou a hipotensão produzida pela acetilcolina, mas não interferiu com o efeito inicial da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) (Figuras 27 e 28).

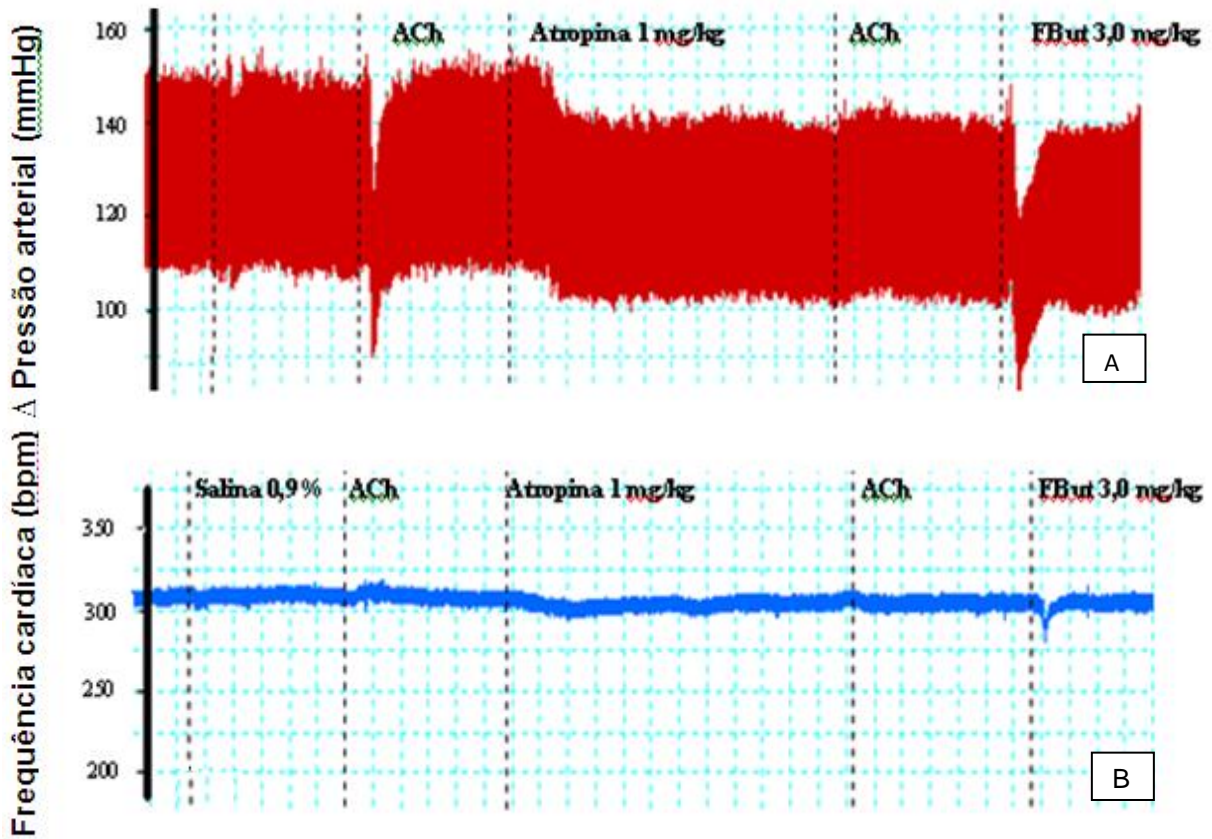


Figura 27 - (A) Registro típico do efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei*, da acetilcolina (0,3  $\mu$ g/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).

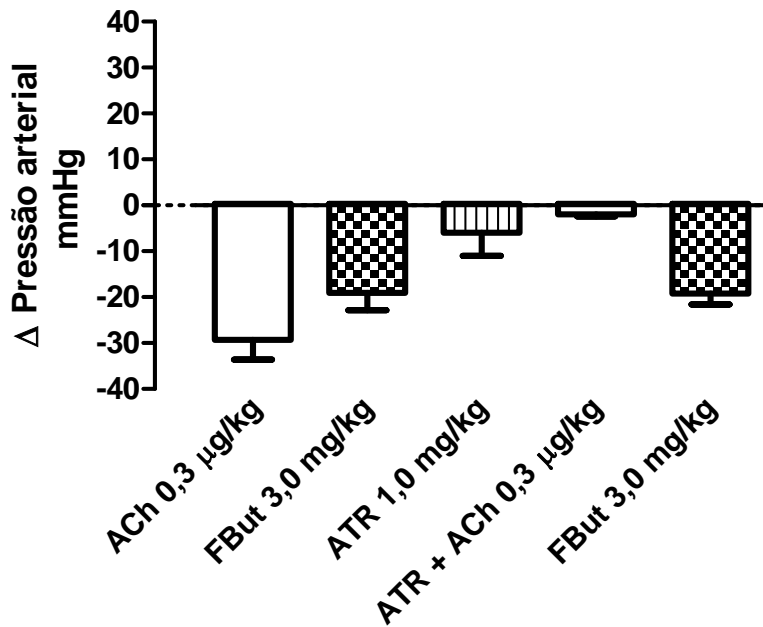


Figura 28 - Efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei*, da acetilcolina (0,3  $\mu$ g/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na PA de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4). As drogas foram injetadas na sequência indicada.

O tratamento prévio com atropina (1,0 mg/kg, e.v.) bloqueou a resposta hipotensora e a bradicardia tardias produzidas pela FBut 3,0 mg/kg, e.v. (Figura 27).

A vagotomia prévia também suprimiu a resposta hipotensora secundária e a bradicardia induzidas pela FBut (Figura 29).

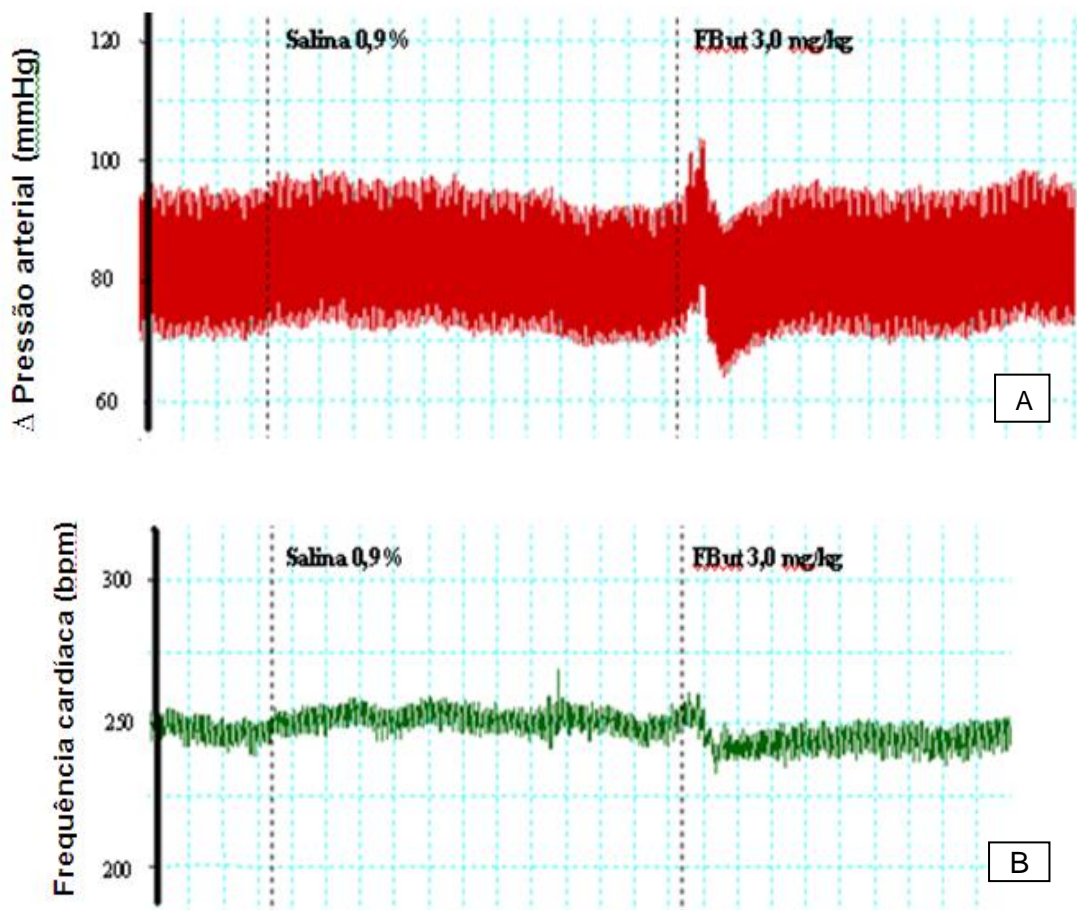


Figura 29 - (A) Registro típico do efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei* na pressão arterial de rata adulta normotensa anestesiada com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e vagotomizada; (B) registro da frequência cardíaca (bpm) concomitante. Notar que não ocorreu a hipotensão secundária, nem paradas cardíacas.

A administração de noradrenalina (0,1 a 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) produziu efeito hipertensor reversível, proporcional à dose, de 10 a 20 mm Hg (Figura 30 B).

A injeção prévia de FBut (3,0 mg/kg, e.v.) não alterou a hipertensão produzida pela noradrenalina (0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , e.v.) em ratas anestesiadas (Figura 30 A).

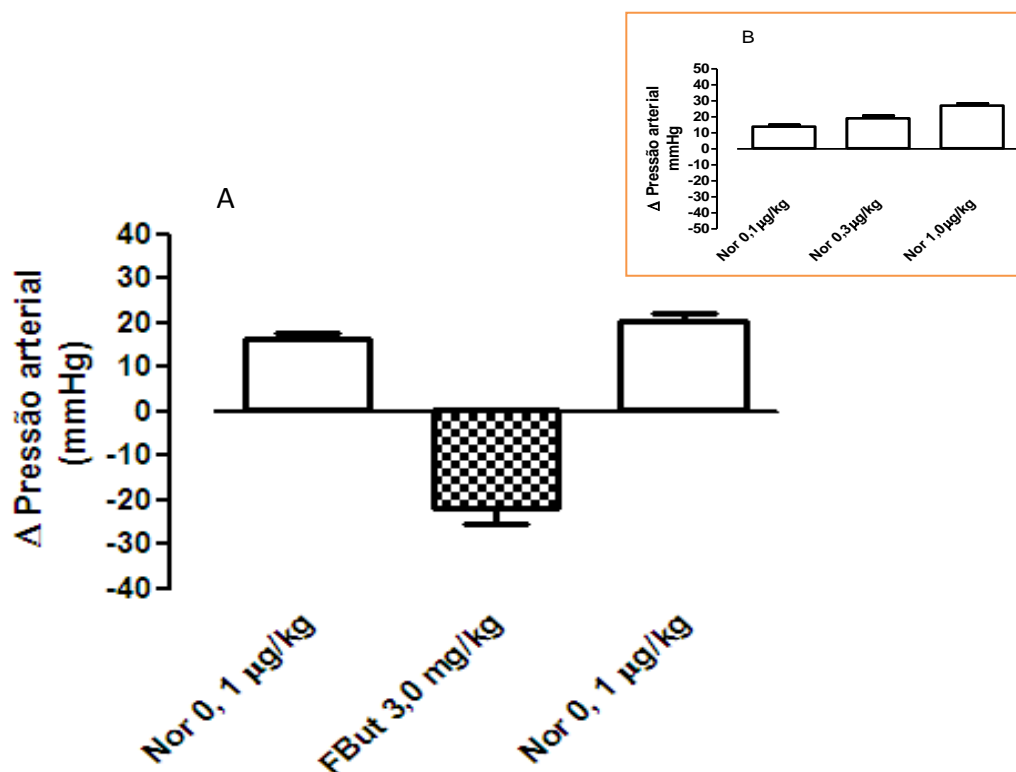


Figura 30 - (A) Efeito da FBut (3,0 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei* e da noradrenalina (0,1 µg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) (n=4) e (B) relação dose-efeito obtida com o padrão positivo noradrenalina (0,1; 0,3 e 1 µg/kg, e.v.).

#### 6.5.8.2 Efeito das frações semipurificadas de *P. sprucei* (F1, F2, F3 e F4) na pressão arterial de ratas anestesiadas

As frações F1 e F3 produziram hipotensão de maneira dose-dependente acompanhada de alterações na frequência cardíaca. A F1 (1,8 mg/kg, e.v.) diminuiu a pressão arterial em 12 mm Hg após 12 segundos da injeção, com bradicardia de 21 bpm. Com a F3 (2,4 mg/kg, e.v.), o efeito hipotensor de 62 mm Hg atingiu o pico máximo após 108 segundos com bradicardia de 36 bpm, indicando que, possivelmente, a hipotensão tardia produzida pela FBut (3,0 mg/kg, e.v) foi originada da ação dos compostos presentes nas duas frações F1 e F3 (Figura 31 A e B).

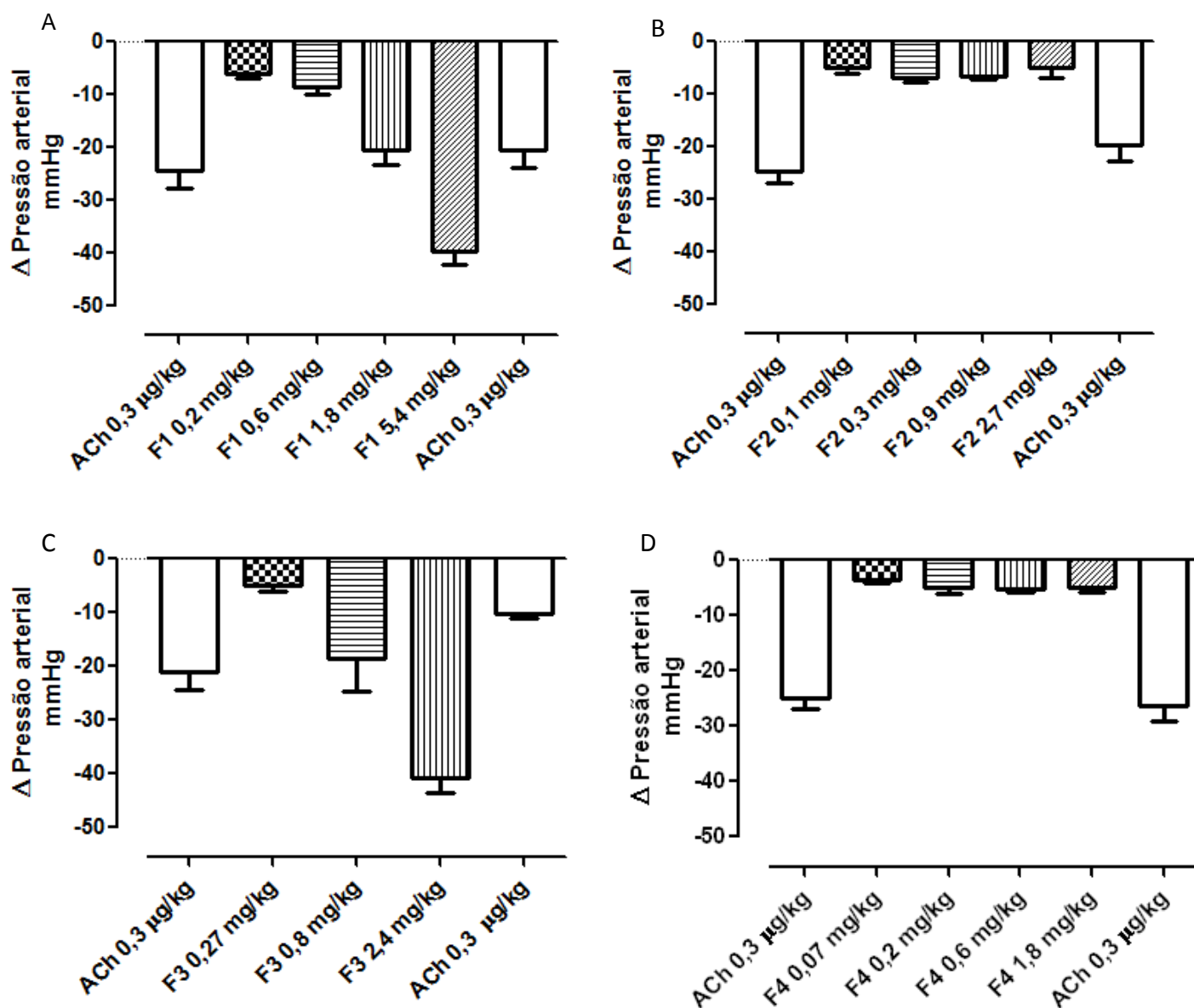


Figura 31 - Efeito das frações de *P. sprucei* na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). (A) F1 (0,2; 0,6; 1,8 e 5,4 mg/kg, e.v.), (B) F2 (0,1; 0,3; 0,9 e 2,7 mg/kg, e.v.), (C) F3 (0,27; 0,8 e 2,4 mg/kg, e.v.) e (D) F4 (0,07; 0,2; 0,6 e 1,8 mg/kg, e.v.) A acetilcolina (0,3  $\mu$ g/kg, e.v.) foi utilizada como padrão positivo. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  erros padrão (n=5)

O tratamento prévio com atropina não bloqueou a resposta hipotensora nem a bradicardia produzidas por F1 e F3, como anteriormente observado com a FBut 3,0 mg/kg, e.v. (Figura 32 e 33).

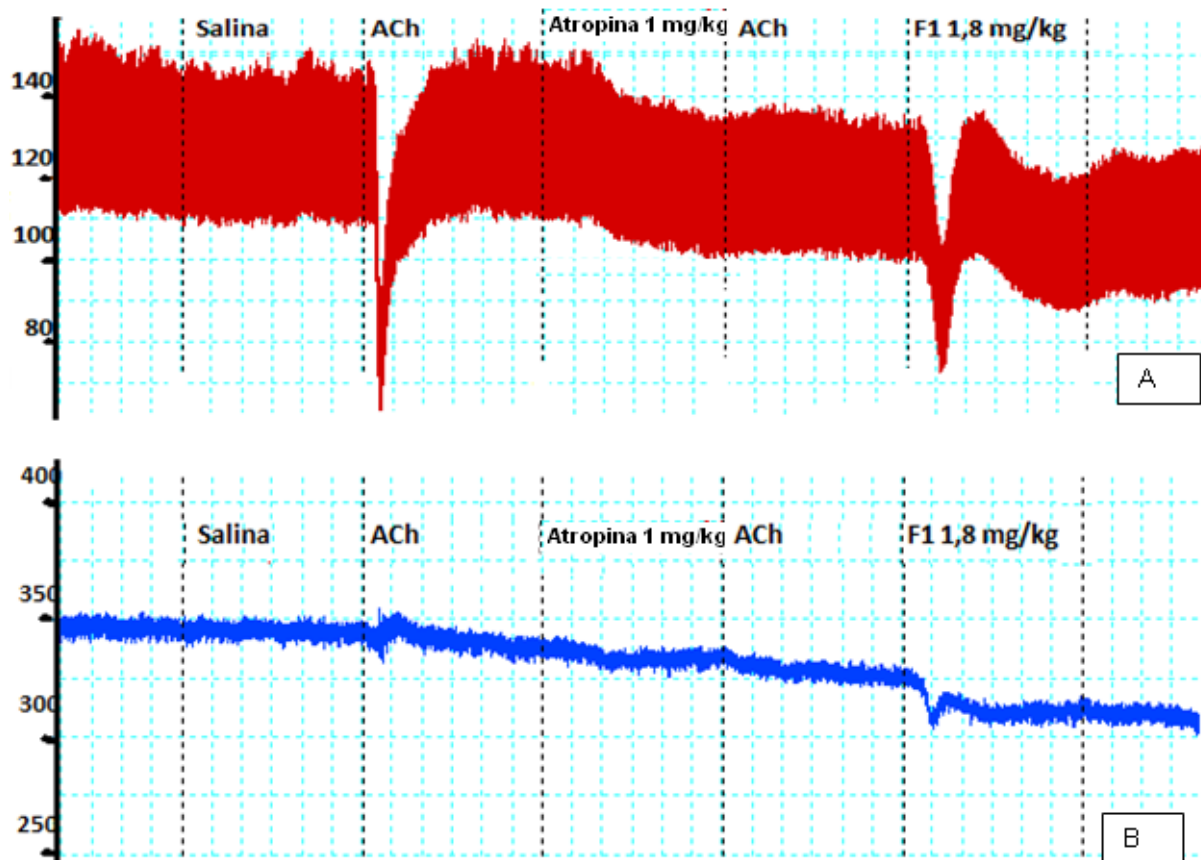


Figura 32 - (A) Registro típico do efeito da F1 (1,8 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei*, da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).

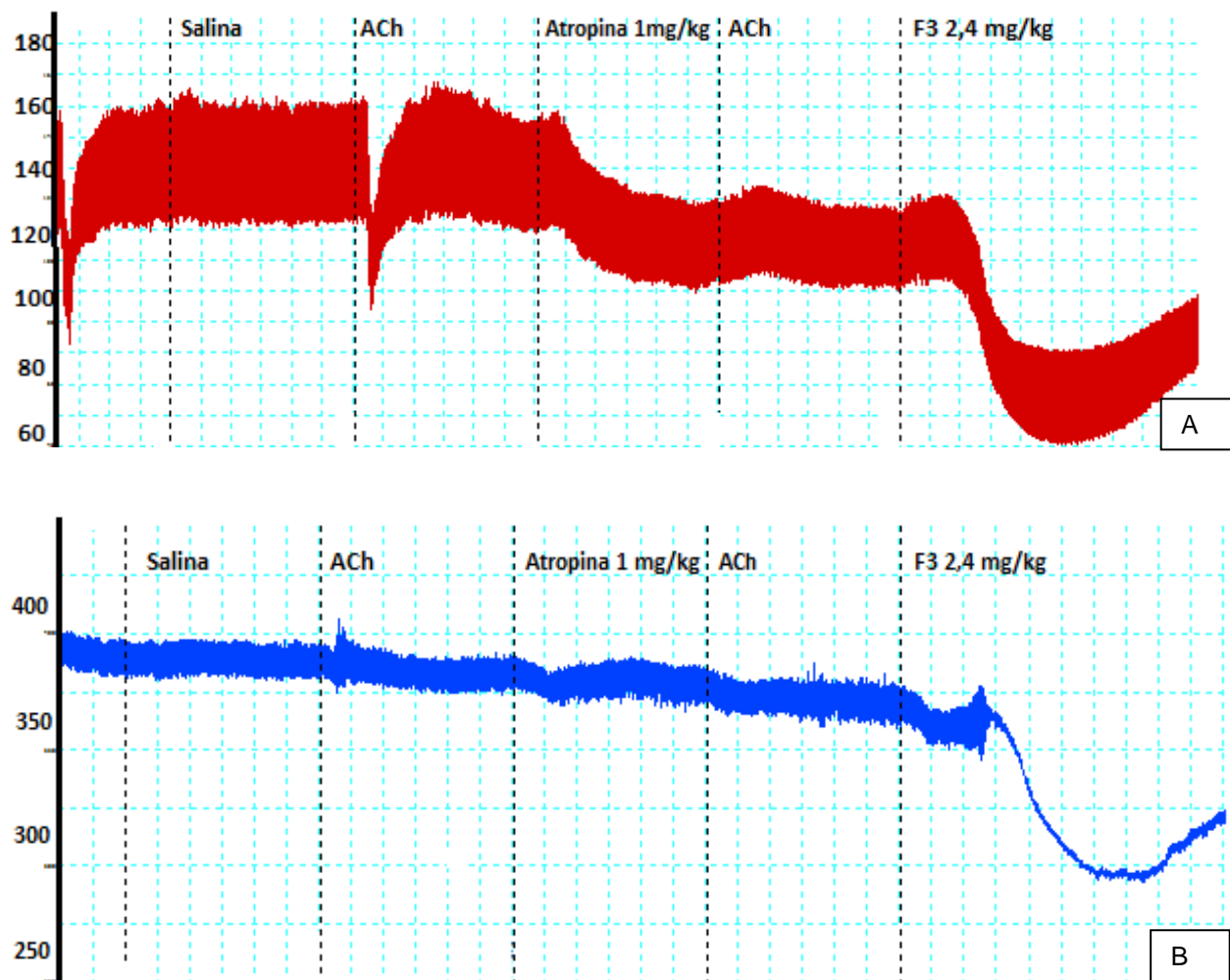


Figura 33 - (A) Registro típico do efeito da F3 (2,4 mg/kg, e.v.) de *P. sprucei*, da acetilcolina (0,3 µg/kg, e.v.) e da atropina (1,0 mg/kg, e.v.) na pressão arterial de ratas adultas normotensas anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) e (B) registro concomitante da frequência cardíaca (bpm).

### 6.5.8.3 Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de *P. sprucei* na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato

Após 30 minutos de estabilização em Tyrode a 35 °C, o átrio direito de rato apresentou batimentos espontâneos com frequência média de 175 bpm (n=3).

A incubação de FBut (10, 30 e 100 µg/mL) a frequência de batimentos do átrio direito isolado não foi alterada nos 30 min de incubação (Figura 34).



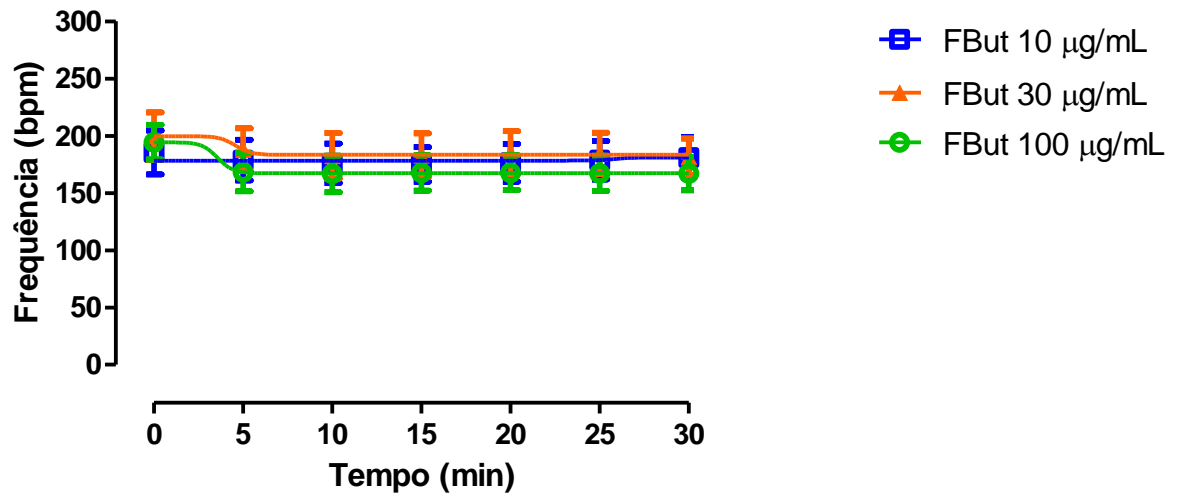


Figura 34 - Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de *P. sprucei* na frequência de batimentos do átrio direito isolado de rato, a 35 °C, bpm = batimentos por minuto. Dados expressos como médias ± desvios (n=3).

#### 6.5.8.4 Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de *P. sprucei* na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato sob estimulação elétrica

A incubação de FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de *P. sprucei* não alterou a força de contração do átrio esquerdo isolado de rato durante os 30 min de incubação (Figura 35).

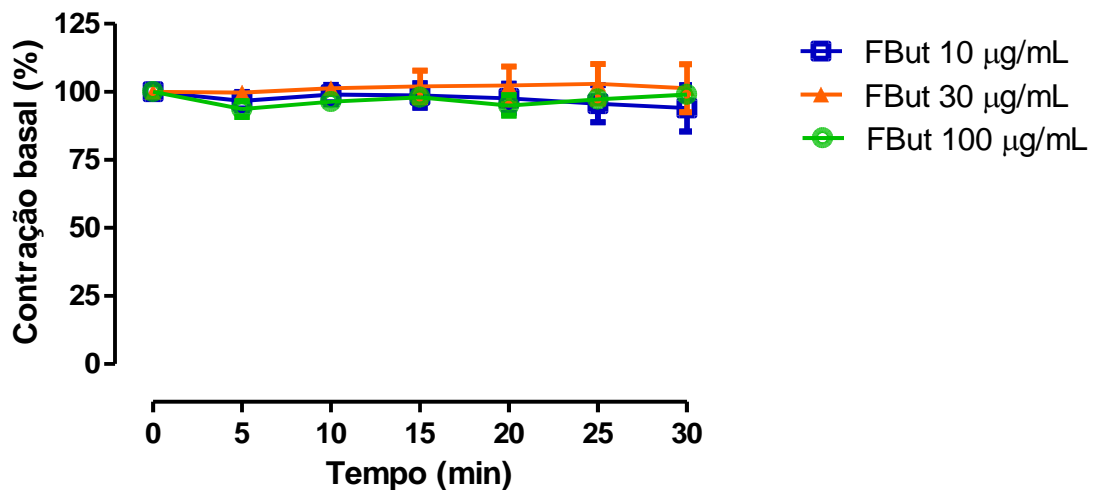


Figura 35 - Efeito da FBut (10, 30 e 100 µg/mL) de *P. sprucei* na força de contração do átrio esquerdo isolado de rato, a 35 °C. Dados expressos como médias ± desvio (n=3).

#### 6.5.8.5 Efeito da FBut de *P. sprucei* em anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M)

Em anéis de aorta de rato previamente contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$  M) e comprovadamente com endotélio funcional (resposta à ACh  $\geq 80\%$ ), a incubação da FBut (10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) por 30 minutos relaxou o tônus proporcionalmente à concentração da FBut a 30 % na presença da maior concentração (Figura 36).

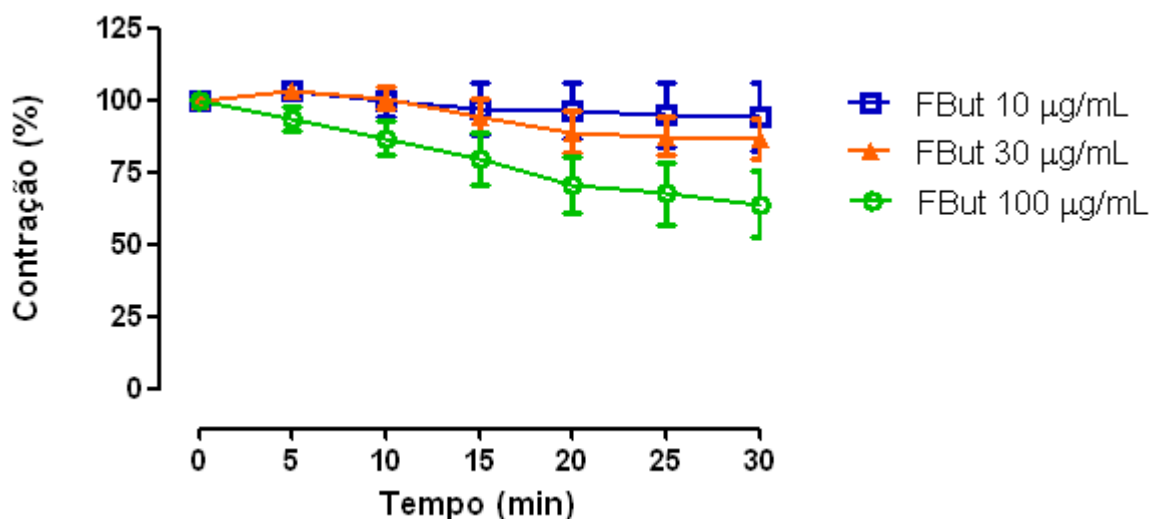


Figura 36 - Relaxamento produzido pela FBut de *P. sprucei* (10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) no tônus induzido por noradrenalina ( $10^{-7}$  M) em anéis de aorta de rato com endotélio. O tempo 0 é o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação da FBut. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n=4).

#### 6.5.8.6 Efeito da FBut de *P. sprucei* em anéis de aorta torácica de rato sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina ( $10^{-7}$ M)

A incubação de FBut (10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) relaxou o tônus da aorta de rato em 25% após 30 minutos. No entanto, o efeito não foi relacionado à concentração de FBut ou ao tempo de incubação, sendo maior na presença da menor concentração de FBut (Figura 37).

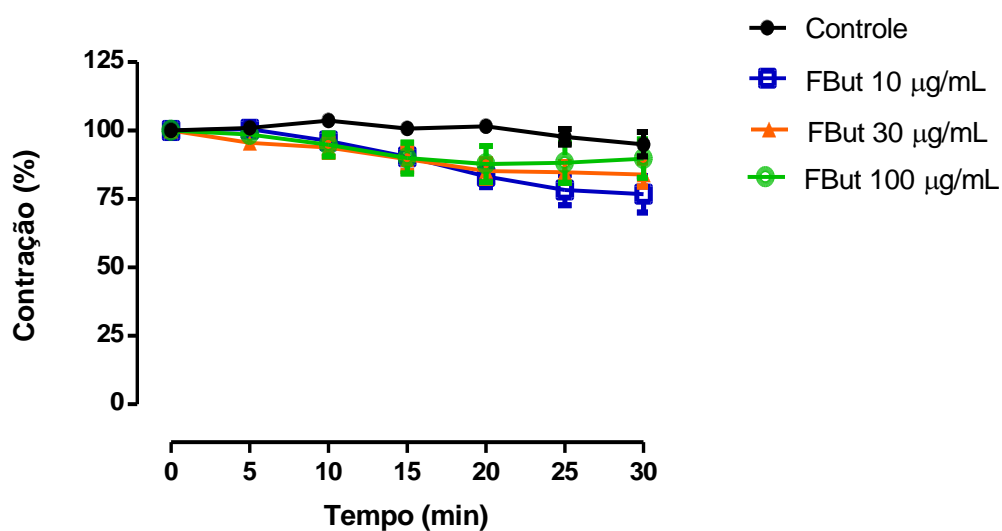


Figura 37 - Efeito produzido pela FBut de *P. sprucei* (10, 30 e 100 µg/mL) no tônus induzido por noradrenalina ( $10^{-7}$  M) em anéis de aorta de rato sem endotélio. O tempo 0 é o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação da FBut. Dados expressos como médias  $\pm$  erros padrão (n=4).

6.5.8.7 Efeitos das frações semipurificadas de *P. sprucei* em anéis de aorta torácica de rato com ou sem endotélio, pré-contráídos com noradrenalina ( $10^{-7}$  M)

As frações da FBut não relaxaram o tônus da aorta com ou sem endotélio. Concentração maiores que 30 µg/mL não foram testadas porque o maior rendimento do processo de purificação foi ao redor de 30% (Figura 38).

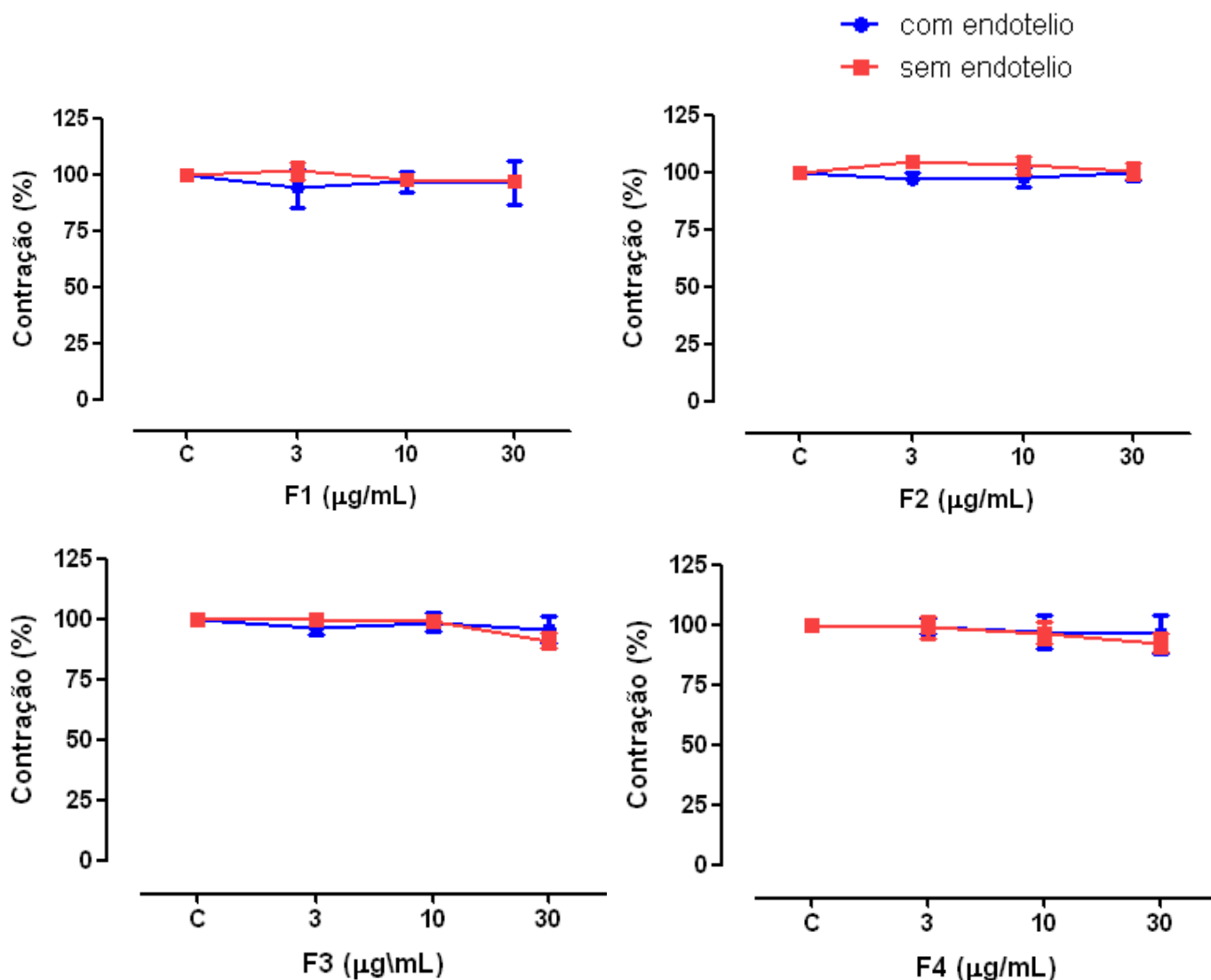


Figura 38 - Efeito produzido pelas frações F1, F2, F3 e F4 de *P. sprucei* (3, 10 e 30 µg/mL), no tônus induzido por noradrenalina ( $10^{-7}$  M) em anéis de aorta de rato com e sem endotélio. As frações foram adicionadas cumulativamente ao banho em intervalos de 10 min para cada concentração. O zero representa o tônus basal (100%), imediatamente antes da incubação das frações. Os símbolos e barras representam as médias  $\pm$  erros padrão (n=4).

#### 6.5.8.8 Efeito da FBut de *P. sprucei* na concentração de cálcio citosólico livre em células de útero e cardiomiócitos de rato mantidas em cultura primária

Em condições controle, o Verapamil 100 µM inibiu o influxo e mobilização de íons cálcio estimulados pela adição de KCl 70 mM nos cardiomiócitos e nas células uterinas em cultura, de 50% e 70% respectivamente. Comparativamente, a incubação de FBut (10, 30 e

100  $\mu\text{g/mL}$ ) não alterou a concentração citosólica de cálcio medida após incubação de KCl 70 mM (n=3, em triplicata) (Figura 39 A e B).

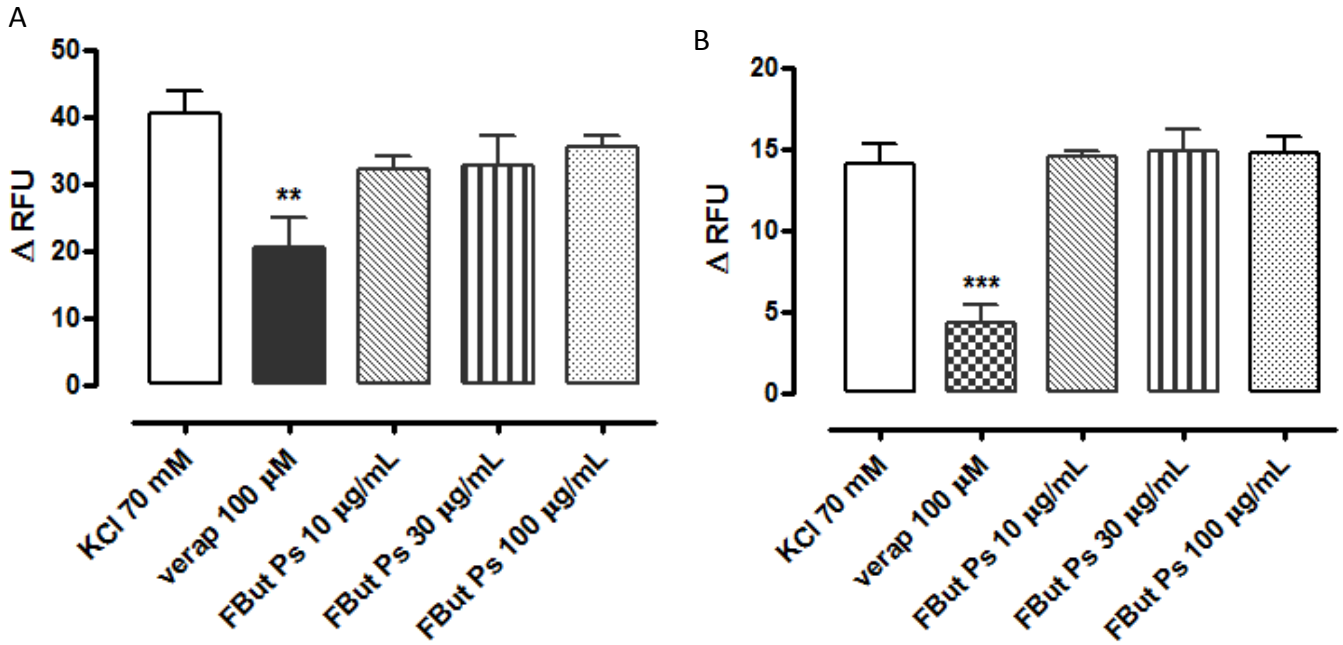


Figura 39 - Efeito da FBut (10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) de *P. sprucei* na concentração de cálcio citosólico livre em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos (A), e em células de útero mantidas em cultura (B). As colunas e barras representam as médias  $\pm$  erros padrão (n = 3, em triplicata). O KCl 70 mM foi utilizado para promover a abertura dos canais de cálcio e o verapamil (100  $\mu\text{M}$ ) como controle positivo de antagonista dos canais de cálcio tipo L.

## ***7 DISCUSSÃO***

*P. sprucei* Hook (Simaroubaceae) conhecida popularmente no Brasil como caferana, é um arbusto muito comum no norte do país. À planta são atribuídas propriedades medicinais e seu uso popular em malária é mencionado frequentemente (BARROS; POHLIT; CHAVES, 2004; MILLIKEN, 1997 *apud* POHLIT *et al*, 2004; para revisão ver, AMORIM; POHLIT, 2006; BOTSARIS, 2007). O uso de extratos aquosos predomina, enquanto extratos hidroalcoólicos são utilizados para enxágues, ou banhos corpóreos com a mesma finalidade (VIGNERON *et al*, 2005). No entanto, os trabalhos científicos acessíveis nas bases de dados consultadas (PubMed, Scielo, NCBI) são poucos, são predominantemente químicos, e descrevem os quassinoides, substâncias características da família, principalmente a isobruceína B e a neosergeolida, ou os análogos semisintéticos (MORETTI *et al*, 1982; SARAIVA, 2001; SILVA *et al*, 2009a; SILVA *et al*, 2009b; POHLIT *et al*, 2009a; POHLIT *et al*, 2009b VIEIRA *et al*, 2000). Os que estudam a atividade farmacológica de extratos e dos compostos dela isolados são relativos à malária (FANDEUR; MORETTI; POLONSKY, 1985; BERTANI *et al*, 2005); a atividade “contra vermes” e problemas gastrintestinais mencionada em textos de etnobotânica (DUKE; VASQUEZ, 1994) foi avaliada em larvas de helmintos *in vitro* (NUNOMURA, 2006); atividade citotóxica foi descrita em células da leucemia murina P-388 (POLONSKY; BHATNAGAR; MORETTI, 1984); atividade inseticida e fago inibidora foi descrita para os quassinoides, dos quais a isobruceína B foi a mais ativa (DAIDO *et al*, 1995); Bertani *et al* (2005) descreveram atividade antiplasmódio *in vitro* e *in vivo* com os extratos de várias plantas, entre elas a *P. sprucei*. A planta e alguns constituintes, principalmente a isobruceína B, tem reputação tóxica, atividade mencionada por quase todos os autores acima e motivo de preocupação etnobotânica com o uso em crianças (BERTANI *et al*, 2005), mas nenhum trabalho estuda esta ação ou tem explicação fisiopatológica para o efeito letal. Por exemplo, a atividade antiplasmódio da sergeolida (relatada em ng/mL de extrato) foi cem vezes maior que a da cloroquina e a toxicidade *in vivo* após injeção

subcutânea em camundongos foi muito elevada (DL50 = 1,8 mg/kg s.c.) (FANDEUR; MORETTI; POLONSKY, 1985), mas este foi o único trabalho encontrado na literatura. No levantamento bibliográfico realizado denota-se uma preocupação constante quanto à toxicidade de *P. sprucei* e seus constituintes, com alguns trabalhos valorizando a eficácia antiplasmódio após administração oral (BERTANI *et al*, 2005). Deve ser realçado, porém, que os extratos de caferana utilizados nesses trabalhos citados acima, não foram padronizados quimicamente, o que torna difícil a comparação científica das atividades/toxicidade dos diferentes extratos de caferana utilizados. Essa foi a primeira preocupação no trabalho atual com a *P. sprucei*. A planta foi colhida de um único lugar nas proximidades de Manaus, evitando-se a mistura de coletas distantes de difícil recomposição. O material foi estabilizado, armazenado em sacos plásticos fechados e extraído sempre da mesma forma, comparando-se o rendimento da extração e os espectros da análise em CLAE para garantir a constância do material de estudo. A FBut apresentou a maioria dos picos observados no EA com áreas cerca de 4 vezes maiores relativamente à área total do cromatograma. Os compostos mais polares, com menores tempos de retenção, foram encontrados na FA, que não apresentou outros picos de mesma intensidade. A purificação inicial da FBut foi realizada em CLAE preparativa que separou 4 frações segundo os tempos de retenção. Na recromatografia das frações ficou evidente que ainda eram misturas de 2 ou 3 compostos, mas que não havia imbricação dos cromatogramas, isto é, as frações separadas por polaridade não apresentaram compostos comuns. Os tempos de retenção e a intensidade (área) dos picos dos principais compostos de espectros obtidos em CLAE padronizada (quanto a coluna, aos eluentes, aos comprimentos de onda de detecção UV) servem como marcadores e podem ser utilizados para identificar um extrato (SHARAPIN, 2000 *apud* NETTO *et al*, 2006). Como já mencionado, os trabalhos encontrados na literatura foram realizados com extratos da caferana não padronizados; a maioria estudou compostos extraídos com solventes orgânicos de baixa polaridade, que



corresponderiam aos compostos encontrados na última fração (F4) do estudo atual. No entanto, novos trabalhos de identificação química serão necessários para essa comprovação.

Os rendimentos de extração das frações da FBut variaram: as mais abundantes em peso foram a F3 (27,5%) e a F1 (21,5%) com atividade cardiovascular. As menos abundantes foram a F4 (6,6%) que inibiu a secreção ácida gástrica e a F2 (9,6%) que foi inativa nos testes realizados, como será discutido a seguir.

Nos testes gerais de atividade, os resultados obtidos com a administração oral de EA (1,0 g/kg) evidenciaram alterações comportamentais de pequena intensidade nas primeiras 8 horas depois do tratamento: diminuição da deambulação, sinais de irritabilidade e piloereção à maior dose. Todos os animais tratados apresentaram hipotermia comparativamente ao grupo controle, o que nos chamou atenção para alguns trabalhos da literatura que relatam o uso popular desta planta como febrífugo (FERREIRA, 2000 apud SARAIVA *et al*, 2003). No entanto, a hipotermia não foi observada nos animais tratados com FBut 0,03 g/kg, v.o., dose esta equivalente à dose intermediária não letal de EA administrada, como será discutido. Da mesma forma, apenas os animais tratados com a maior dose de EA morreram em 24 h; além da cianose que antecedeu a morte, nenhum outro sinal indicativo da toxicidade foi obtido. A administração oral da FBut (0,1 e 0,3 g/kg) não foi letal, mas cianose nas extremidades foi observada. Como o rendimento da partição com butanol foi cerca de 10% relativamente ao EA, a dose de FBut 0,1 g/kg corresponde, em peso, à dose de 1,0 g/kg de EA. Portanto, a FBut parece ser menos tóxica que o EA. No entanto, a dose maior de FBut (1,0 g/kg, v.o.) também foi letal em 24 h da administração. Nesse caso, seria esperado que parte da toxicidade do EA fosse detectada na fração aquosa (FA) resultante da partição com n-butanol. No entanto, o teste da FA em roedores, nos mesmos moldes e doses dos testes com EA e FBut, não mostrou atividade letal da fração. Frente a esses resultados, não foi possível explicar as diferenças de atividade entre a EA e a FBut. Talvez seja necessário um maior número de

animais ou diferentes técnicas para avaliar a biodisponibilidade das frações. Da mesma forma, o estudo do mecanismo da toxicidade não foi conclusivo em nosso estudo. A toxicidade dos extratos da caferana foi novamente considerada durante a avaliação da atividade das frações semipurificadas da FBut. Como será discutido (pagina 112), apenas uma fração foi tóxica por via intraperitoneal. A literatura científica mostra poucos trabalhos nesse sentido: a primeira descrição de toxicidade foi de autores franceses trabalhando com a sergeolideo e com a isobruceina B, quassinoides isolados da *P. pseudocoffea* (sinonímia de *P. sprucei*) da Guiana Francesa (FANDEUR; MORETTI; POLONSKY, 1985; MORETTI *et al*, 1982). A elevada toxicidade do sergeolideo em camundongos ( $DL_{50}=1,8$  mg/kg, s.c.) fez os autores considerarem improvável o uso da planta como antimalárico, apesar da ação antiplasmódio detectada. Bertani *et al* (2005), referem a informação popular quanto à toxicidade dos extratos da *P. pseudocoffea*, mas não a estudam. Posteriormente, a toxicidade *in vitro* dos quassinoides da *P. sprucei* contra larvas de helmintos foi descrita por Nunomura *et al* (2006), mas também sem descrição do mecanismo do efeito letal.

O teste geral da atividade farmacológica dos extratos da caferana indicou que a administração oral do EA diminuiu a deambulação dos camundongos tratados. No entanto, nenhum sinal de depressão do sistema nervoso central foi comprovado nos testes complementares. Por exemplo, nenhuma ação foi obtida no teste do campo aberto utilizado para avaliar a deambulação e para verificar a tendência natural do animal de explorar um ambiente novo, apesar do medo (MONTGOMERY, 1955). Os testes não indicaram ação estimulante, ou depressora central, do EA, ou com a FBut. Da mesma forma o equilíbrio no “rota-rod” e no teste do arame indicaram que os extratos não interferiram com a coordenação motora dos camundongos. Portanto, os testes indicativos de ação central dos extratos da caferana foram negativos.

Da mesma forma, o teste no labirinto em cruz elevado não indicou ação ansiolítica do EA, nem o teste da suspensão pela cauda indicou ação do tipo antidepressiva do extrato. No teste da potenciação do sono barbitúrico, e teste do sono induzido pelo éter etílico, a diminuição da latência para indução do sono nos animais tratados previamente com os extratos poderia indicar depressão central produzida pelos tratamentos, mas como este efeito não foi comprovado na duração do sono, a redução do tempo de indução do sono não tem grande valor indicativo de ação depressora do SNC.

As estereotipias induzidas pela injeção de apomorfina em camundongos, como o aumento da movimentação e o aparecimento de movimentos anômalos, não foram bloqueados pelo tratamento prévio com o EA. Este dado excluiu a possibilidade do extrato bloquear sistemas dopaminérgicos centrais, uma ação que, ao interferir com os mecanismos de regulação da temperatura corporal, pode produzir hipotermia, como descrito para o haloperidol (LIN *et al*, 1979), bloqueador de receptores D2, utilizado como padrão positivo nas experiências de estereotipia (COSTALL; NAYLOR; NOHRIA, 1978).

Portanto, a análise dos efeitos dos extratos de caferana no sistema nervoso central forneceu poucas evidências de ação farmacológica, contrastando com a toxicidade da FBut em altas doses e com o efeito letal após 24 h da administração do EA.

A atividade do EA de *P. sprucei* foi muito evidente no modelo de úlceras gástricas induzidas por estresse a frio. Nesse modelo, os mecanismos responsáveis pela formação de úlceras envolvem ações no sistema nervoso central, principalmente hipotalâmicas, que caracterizam o estado de estresse. A estimulação simpática, e a vasoconstrição consequente, principalmente se ativada a baixa temperatura, reduzem o fluxo sanguíneo no estômago e a perfusão extracelular da mucosa, que fica exposta ao ácido extravasado das glândulas oxínticas. Normalmente o ácido extravasado é tamponado pelo bicarbonato do líquido extracelular (KONTUREK *et al*, 2008). Com o desequilíbrio entre fatores agressivos (ácido

clorídrico) e fatores de proteção da mucosa (muco, bicarbonato, peristaltismo) há o aparecimento das lesões superficiais identificadas como edema, erosão da mucosa, rupturas vasculares, petéquias, e úlceras profundas de tamanhos variáveis (BIONDO *et al*, 2011). Em nossas experiências, a administração do EA da *P. sprucei* inibiu a formação de úlceras e diminuiu o índice de lesão gástrica de maneira dose-dependente, comprovando uma importante ação antiulcerogênica da mucosa gástrica. O mecanismo dessa ação não foi evidente, porque os extratos administrados por gavagem, em contato direto com a mucosa gástrica, podem ter múltiplas ações inibidoras da ação lesiva do ácido. Por exemplo, a administração do extrato na luz gástrica pode revestir e proteger fisicamente a mucosa contra a ação do ácido clorídrico secretado. Da mesma forma, a mucosa pode ser protegida se a secreção de muco for estimulada, ou se o ácido da luz gástrica for tamponado pelo extrato; ou ainda, se a peroxidação lipídica da mucosa exposta ao ácido for interrompida por uma atividade antioxidante do extrato. Atividade antioxidante em plantas é muito comum (para revisão ver REPETTO; LLESUY, 2002).

A influência dos extratos e frações da *P. sprucei* na atividade secretora ácida gástrica foi avaliada fazendo uso do método da ligadura pilórica *in situ*. Este método permite estudar a secreção gástrica e os eventos envolvidos na gastroproteção, como a secreção de ácido, de pepsinogênio, de prostaglandinas e a liberação de enzimas plasmáticas utilizadas indicadoras de lesão celular (LAPA *et al*, 2008). Neste método, a administração diretamente na luz duodenal evita o contato dos extratos com a mucosa gástrica; o método permite avaliar também a biodisponibilidade das substâncias ativas, pois, para interferir com a secreção ácida na célula parietal, elas devem ser previamente absorvidas no intestino.

Fisiologicamente, a secreção ácida gástrica pode ser estimulada por agonistas dos receptores histaminérgicos H<sub>2</sub>, por agonistas dos receptores colinoceptivos M<sub>1</sub> ou M<sub>3</sub>, por ativação de receptores de colecistoquinina pela gastrina, por ativação da cadeia de eventos

intracelulares mediadas pela adenililciclase. O bloqueio da secreção pode ocorrer por mecanismos opostos, bloqueando os receptores dos mediadores fisiológicos, por inibição das enzimas intracelulares, ou da atividade da  $H^+-K^+-ATPase$  (SOUCCAR, 2003b).

A secreção ácida estimulada na célula oxíntica pela gastrina e pela acetilcolina é mediada por ativação inicial da fosfolipase C, que vai catalisar a hidrólise de fosfolípidos da membrana liberando o trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG); estes segundos-mensageiros aumentam a atividade da proteína quinase C (PKC), ativando a bomba de prótons ( $H^+-K^+-ATPase$ ). Quando a secreção ácida gástrica é estimulada por histamina ocorre ativação da adenililciclase, produção de AMP cíclico, ativação da proteína quinase A, (PKA) fosforilação e ativação da bomba de prótons, que aumenta a secreção ácida gástrica (SCHULTZ *et al*, 2007).

Nas nossas experiências, os estudos enzimáticos *in vitro* mostraram que o EA não inibiu a atividade da bomba de prótons  $H^+-K^+-ATPase$  isolada da mucosa gástrica de porco. Como a bomba de prótons é a etapa final comum das duas vias estimuladoras da secreção de ácido nas células parietais ( $AMPc$  e  $IP_3$ ), outros mecanismos foram estudados para explicar a ação inibidora da secreção ácida pelos extratos da caferana.

O efeito dos extratos da caferana na secreção ácida foi avaliado com o método da ligadura pilórica, que permite o acúmulo da secreção gástrica durante algumas horas. O método é antigo e, apesar de invasivo, permite boa avaliação dos mecanismos responsáveis pelo aumento ou inibição da secreção ácida (BIONDO *et al*, 2011; MESÍA-VELA *et al*, 2007). Por exemplo, a ativação específica da via histaminérgica, ou da via colinérgica, com injeção dos agonistas  $H_2$  (histamina) ou  $M_3$  (betanecol) permite identificar qual a via bloqueada por um inibidor da acidez do suco gástrico. Por outro lado, o bloqueio simultâneo das duas vias, como foi o caso, pode ser indicativo de inibição da  $H^+-K^+-ATPase$  (KONTUREK *et al*, 2008; MESÍA-VELA *et al*, 2007; SOUCCAR *et al*, 2008).

Em nossas experiências, a administração do EA, ou da FBut na luz duodenal diminuiu o volume do suco gástrico, aumentou o pH da secreção e reduziu a acidez total de forma bastante significativa nas ratas controle, nos animais com secreção estimulada por histamina, e naqueles com secreção estimulada por betanecol. Nesses testes, a FBut mostrou-se 10 vezes mais ativa que o EA. A probabilidade dos extratos bloquearem simultaneamente os receptores histaminérgicos tipo  $H_2$  e os receptores muscarínicos  $M_3$  nas células oxínticas da mucosa gástrica é pequena. Portanto, o bloqueio simultâneo *in vivo* das duas vias secretagogas favoreceu a interpretação de uma ação inibidora dos extratos exercida na atividade da enzima  $H^+-K^+-ATPase$ . No entanto, este efeito não foi confirmado *in vitro* na atividade da enzima isolada da mucosa gástrica de porco. Portanto, os resultados, não permitiram identificar o mecanismo da ação inibidora dos extratos da caferana na secreção ácida do estômago. No estágio atual é possível afirmar, genericamente, que a proteção da *P. sprucei* contra úlceras ocorre por inibição da secreção gástrica de HCl.

Os resultados obtidos com a administração dos extratos na luz duodenal são provas incontestes, porém, de que alguns compostos ativos são absorvidos no intestino. Esta observação é importante em vista da quase ausência de efeitos comportamentais observada durante os testes da atividade no SNC. Ainda mais, o estudo da atividade das frações purificadas comparativamente à atividade da FBut mostrou que a fração mais apolar, F4, parece ser a responsável pelo efeito antissecretor ácido e antiulcerogênico. Os compostos constituintes da F4 não foram identificados. Sabe-se, porém, que foram eluídos da CLAE com solventes pouco polares e há grande possibilidade de serem relacionados com os constituintes já conhecidos da *P. sprucei* a sergeolida, a isobruceína B, a neosergeolida e derivados (POLONSKY; BHATNAGAR; MORETTI, 1984; MORETTI *et al*, 1982; VIEIRA *et al*, 2000; ZUKERMAN-SCHPECTOR; CASTELLANO, 1994; SILVA, 2009a).

A FBut da caferana injetada e.v. em ratas anestesiadas produziu hipotensão e bradicardia. A hipotensão ocorreu em duas fases, uma imediata de pequena intensidade, rapidamente reversível, e uma segunda, mais lenta e intensa, diretamente relacionada com bradicardia. Sinais de parada cardíaca (na realidade, diminuição mais acentuada e passageira da frequência cardíaca) foram comuns nos registros dos batimentos cardíacos. Estas bradicardias rápidas, intensas e passageiras permearam toda a segunda fase da hipotensão, indicando provável ação vagal estimulada pelos extratos. De fato, o tratamento prévio com atropina e a vagotomia cirúrgica bilateral bloquearam a bradicardia e a hipotensão secundárias produzidas pela injeção de FBut. Provavelmente trata-se de ação reflexa mediada por quimiorreceptores, já referida para outras substâncias, como os alcaloides do veratro e para a nicotina. Após a ingestão do veratro, vômito e dor abdominal, seguida por hipotensão, bradicardia, distúrbios da condução cardíaca e morte foram associados a uma estimulação aumentada do nervo vago via quimiorreceptores (para revisão ver SCHEP; SCHMIERER; FOUNTAIN, 2006). A nicotina atua nos gânglios dos sistemas simpático e parassimpático, e nos quimiorreceptores aórticos e carótídeos sendo capaz de aumentar, no primeiro caso, ou diminuir a frequência cardíaca nas duas outras possibilidades (TAYLOR, 1996; ver também FURTADO, 2002). Efeito semelhante foi descrito para o composto fenólico CAPE (ester fenil etílico do ácido cafeico) extraído do própolis de abelhas (IRAZ *et al*, 2005).

Os quimiorreceptores são células quimio-sensíveis que, fisiologicamente, respondem à falta de O<sub>2</sub>, ao excesso de CO<sub>2</sub> e ao pH sanguíneo. Sua presença varia com a espécie (EASTON E HOWE, 1983 *apud* PENITENTE, 2006), mas estão concentrados bilateralmente nos dois corpos carotídeos e em corpos adjacentes à aorta (MOLINA, 2005).

No momento não é possível afiançar a causa da estimulação vagal produzida pela FBut da caferana, mas a estimulação de quimiorreceptores parece ser provável e deverá ser estudada depois de purificadas as frações oriundas da FBut. Até o momento foi possível

identificar que as frações F1 e F3 são hipotensoras: a F1 relacionada com o efeito hipotensor inicial rápido e passageiro não bloqueado por atropina, e a F3 relacionada com a hipotensão tardia, sensível à atropina e à vagotomia. A ausência de efeitos depressores do SNC e a reversibilidade das ações cardiovasculares não permitiram antever o mecanismo da toxicidade que matou os animais em 24 horas. A toxicidade cardíaca também não foi evidente no miocárdio isolado. No átrio direito isolado de rato, por exemplo, a incubação de FBut não alterou significativamente a frequência de batimentos e, no átrio esquerdo isolado de rato comandado por um marcapasso elétrico, não houve alteração na força de contração após a incubação dos extratos. Os resultados negativos *in vitro* indicam que a FBut não tem ação cardíaca direta que possa ser responsável pela bradicardia, pela diminuição do débito cardíaco e pela conseqüente queda da pressão arterial. Portanto, a ação tóxica cardíaca direta dos extratos da caferana parece ser negligível, mas a ação indireta vagal parece ser intensa. No coração, é conhecido que a ativação colinérgica dos receptores  $M_2$  atriais reduz a frequência e a força de contração: o efeito inotrópico negativo é explicado fisiologicamente pela ativação de proteína  $G_i$  que inibe a adenilil ciclase, enquanto a bradicardia é explicada pela ativação de canais de potássio associados ao receptor colinérgico  $M_2$ , cuja ativação hiperpolariza as células do marcapasso atrial, retarda a ativação dos canais de cálcio tipo L e diminui o cronotropismo cardíaco (para revisão ver BRODDE; MICHEL, 1999).

Na ausência de toxicidade cardíaca, outros efeitos, provavelmente vasculares, parecem ser importantes na gênese da hipotensão e na toxicidade das frações, FBut, F1 e F3.

A ação vasodilatadora da FBut e das frações semipurificadas foi estudada *in vitro* na aorta isolada de rato. Nessa preparação, o relaxamento do tônus vascular pela incubação de acetilcolina foi utilizado para demonstrar a presença de endotélio funcional na artéria isolada. Esse efeito é dependente da síntese e liberação de óxido nítrico (NO) pela célula endotelial (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1984; PALMER; ASHTON;



MONCADA, 1988; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Resumidamente, a interação da acetilcolina com os receptores muscarínicos M<sub>3</sub> do endotélio leva à ativação da sintase do óxido nítrico (NOS) endotelial, que sintetiza NO a partir da L-arginina. Uma vez liberado, o NO difunde-se para o músculo liso vascular e ativa uma guanilato ciclase solúvel (GCs), que estimula a produção de monofosfato cíclico de 3', 5'-guanosina (GMPc) (FEELISCH; NOACK, 1987). A seguir, o GMPc ativa proteína quinases intracelulares (PKG) que consomem o estoque de quinases de cadeia leve de miosina (MCLK) necessário à manutenção do tônus vascular. Em consequência, o músculo liso vascular relaxa (CHINKERS; GARBERS, 1991; LINCOLN; CORNWELL, 1993; LINCOLN; CORNWELL; TAYLOR, 1990).

A FBut relaxou o tônus induzido pela noradrenalina na aorta de rato com endotélio íntegro, mas o efeito não foi suprimido pela destruição mecânica do endotélio, indicando uma vasodilatação produzida pela FBut por mecanismo independente da síntese de NO.

O mecanismo de vasodilatação independente de endotélio mais conhecido está relacionado ao bloqueio do influxo e da mobilização intracelular de íons cálcio nas fibras musculares lisas (LEDOUX *et al*, 2006; YOUNG; SCHUMAN; ZHANG, 2001). No entanto, a concentração de cálcio livre no citoplasma de células musculares lisas de útero de rata incubadas na presença da FBut de *P. sprucei*, não foi alterada comparativamente aos controles estimulados com KCl 70 mM. Estes resultados não comprovaram o bloqueio do influxo de cálcio, ou a inibição da mobilização de cálcio intracelular na presença dos extratos de *P. sprucei*. Portanto, a ação vasodilatadora produzida pela FBut na aorta *in vitro* não foi evidente e não explicou a toxicidade dos extratos *in vivo*.

A toxicidade dos extratos de *P. sprucei* é tardia, dependente da dose e da via utilizada para administração. A administração oral da FBut (0,3 g/kg) não foi letal após 24 horas, mas todos os animais apresentaram contorções e tremores de pequena intensidade; a dose de 0,1

g/kg, i.p. da FBut foi letal em 24 horas em todos os animais tratados e a injeção de 3,0 mg/kg, e.v. (0,003 g/kg) produziu alterações pressóricas intensas, o que nos levou a relacionar a toxicidade da FBut a alterações hemodinâmicas. De fato, os camundongos tratados com as frações F3 e F4 i.p. mostraram sinais de toxicidade crescentes com contorções abdominais, tremores e dificuldade de locomoção nas três primeiras horas, acompanhadas posteriormente de extremidades cianóticas, quietação, piloereção e ptose. No entanto, os animais não perderam o reflexo de endireitamento, indicando que a ação tóxica não ocorreu por ação direta no SNC, ou por paralisia muscular esquelética. Aparentemente, alterações hemodinâmicas, talvez choque cardiovascular, são responsáveis pela toxicidade dos extratos.

Alterações cardiovasculares produzidas pelas frações da *P. sprucei* foram observadas na pressão arterial e na frequência cardíaca. Como a pressão arterial é o produto entre o débito cardíaco e a resistência periférica oferecida pelos vasos ao fluxo sanguíneo, os efeitos observados podem levar a alterações hemodinâmicas. As experiências *in vitro* mostraram, porém, que o miocárdio e o tônus da aorta não são grandemente alterados pela incubação da FBut e das frações semipurificadas por períodos curtos (30 min). Portanto, deve ser pensado que a toxicidade cardiovascular possa ocorrer por exposição prolongada às frações, ou que o efeito tóxico não tenha sido produzido diretamente pelas frações do extrato, mas sim por compostos produzidos no metabolismo hepático, capazes de deprimir a contratilidade cardíaca e a reatividade vascular. Não existem evidências experimentais que favoreçam uma dessas hipóteses. A inspeção dos animais na necropsia mostrou, porém, que o fígado dos animais tratados com o EA (1,0 g/kg, v.o.) ou F4 (0,019 g/kg) apresentou coloração esbranquiçada, indicativa de diminuição acentuada da perfusão sanguínea (choque cardiovascular). No entanto, até o fechamento deste trabalho, não foram excluídas outras alterações metabólicas.

## ***8 CONCLUSÕES***

- Os extratos da *P. sprucei* foram tóxicos por via oral;
- O EA e a FBut administrados na luz duodenal inibiram a secreção ácida em camundongos com ligadura pilórica; a inibição foi maior na secreção estimulada pela histamina que na estimulada por betanecol;
- A atividade da  $H^+-K^+$ -ATPase não foi inibida na presença do EA;
- O EA teve ação antiulcerogênica em roedores; a ação antiúlcera pode ser explicada pela inibição da secreção estimulada pela via histaminérgica;
- A Fração F4 purificada da FBut inibiu a secreção ácida;
- A hipotensão e bradicardia iniciais produzidas pela FBut em ratas anestesiadas não são devidas a bloqueio alfa-adrenérgico, ou a atividade colinomimética direta; a hipotensão e bradicardia secundárias são explicadas por ação vagal reflexa, provavelmente ativada via quimiorreceptores. A hipotensão inicial foi relacionada à ação da fração F1 e a hipotensão prolongada à fração F3.
- A FBut relaxou o tônus adrenérgico da aorta de rato (efeito máximo = 20%); o relaxamento vascular não foi explicado por liberação de NO endotelial, ou por inibição do influxo de íons cálcio. As frações purificadas não relaxaram o tônus vascular;
- A ação tóxica dos extratos da *P. sprucei* ocorreu por exposição prolongada às frações da *P. sprucei*. Os efeitos obtidos com administração aguda foram evidentes e às vezes intensos, mas não foram letais. É possível que o efeito tóxico não tenha sido produzido diretamente pelas frações do extrato, mas sim por compostos originados no metabolismo hepático.

## ***9 RESUMO E CONCLUSÕES***

A *P. sprucei* é planta Amazônica conhecida como caferana. O chá das folhas e das raízes é utilizado na medicina popular na dor de estômago, em febres, como vermífugo e para tratar malária. O uso popular não considera a toxicidade da planta, ocasionalmente mencionada em estudos com extratos não padronizados.

Neste trabalho, o extrato aquoso (EA) de caferana coletada e identificada em Manaus foi padronizado com métodos químicos e suas atividades *in vivo* e *in vitro* foram avaliadas com metodologia farmacológica clássica. O EA foi particionado em n-butanol e os mecanismos das ações estudados com a fração butanólica (FBut) semipurificada. Com a purificação secundária da FBut em 4 frações (F1, F2, F3 e F4) identificadas pelo tempo de retenção dos picos do cromatograma em CLAE, a atividade correspondente a cada fração foi avaliada.

Nos testes *in vivo* em ratos e camundongos, a administração oral do EA e da FBut produziu alterações pouco específicas do comportamento após 8 horas da administração. A hipotermia produzida pelo EA foi o sinal mais relevante da atividade tóxica produzida por dose elevada do EA, que matou os animais em 24 horas. Nenhum outro efeito específico de depressão ou estimulação do sistema nervoso central foi evidente. Comparativamente aos outros efeitos farmacológicos observados, a toxicidade da FBut foi menor que a do EA. Estes resultados sugeriram que a toxicidade poderia estar relacionada às substâncias polares que estariam concentradas na fase aquosa (FA) resultante da partição do EA com n-butanol. A FA, no entanto, não foi tóxica na mesma dose das demais frações.

O EA administrado por via oral em doses subletais, reduziu as úlceras gástricas desencadeadas por estresse a frio; o EA e a FBut inibiram a secreção ácida gástrica induzidas pelos secretagogos naturais em ratas, mas a atividade da  $H^+-K^+$ -ATPase não foi inibida *in vitro*. O efeito gástrico foi mimetizado pela fração F4, que contém os compostos menos polares do EA e da FBut.

Em ratos anestesiados, a injeção e.v. de FBut provocou hipotensão inicial rápida e bradicardia reversíveis, seguidas de hipotensão secundária mais intensa e duradoura, também relacionada a bradicardia. Estes últimos efeitos foram bloqueados pela atropina e pela vagotomia indicando tratar-se de ação vagal reflexa, provavelmente mediada por estímulo de quimiorreceptores. A favor dessa conclusão, em miocárdio de ratos *in vitro* a FBut não inibiu o inotropismo, nem reduziu a frequência de batimentos espontâneos do átrio direito. O efeito hipotensor inicial foi mimetizado pelas frações F1 e F3, mas apenas a F3 reproduziu a hipotensão e a bradicardia tardias.

Em anéis de aorta de rato com endotélio íntegro, a FBut relaxou o tônus induzido pela noradrenalina apenas em concentração elevada. Nenhuma fração purificada teve o mesmo efeito vasodilatador.

Em conclusão, o extrato aquoso da caferana é eficaz, mas é tóxico. Em doses subletais, os efeitos mais evidentes foram no trato gastrointestinal e na pressão arterial. A inibição da secreção ácida induzida fisiologicamente pela histamina, ou pela acetilcolina, pode explicar a proteção contra dor de estômago e úlceras gástricas mencionadas no uso popular; o mecanismo molecular, no entanto, não foi relacionado à inibição da  $H^+K^+$ -ATPase. A ação hipotensora dos extratos e frações não foi relacionada a uma ação específica dependente do endotélio, ou a inibição do influxo de íons cálcio. Os extratos produziram bradicardia persistente *in vivo* e *in vitro* aparentemente por estímulo de quimiorreceptores, ação que pode ser tóxica a longo prazo. Os efeitos hemodinâmicos obtidos com administração aguda foram evidentes e às vezes intensos, mas não foram letais. É possível que o efeito tóxico letal não tenha sido produzido diretamente pelas frações do extrato, mas sim por compostos originados no metabolismo hepático capazes de deprimir a contratilidade cardíaca e a reatividade vascular.

## ***REFERÊNCIAS***



AGÊNCIA NACIONAL DE 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: [www.fcfrp.usp.br](http://www.fcfrp.usp.br). Acesso em: 23 junho 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA/MS). Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: [www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm](http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm). Acesso em: 29 setembro 2011.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Ocorrência e atividade biológica de quassinoides da última década. *Química Nova*. v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

AMORIM, R. C. N.; POHLIT, A. M. *Picrolemma sprucei* Hook f.: Uso Tradicional, princípios ativos e seus derivados semi-sintéticos, exploração commercial e econômica. *Revista Fitos*. v. 2, n. 1, p. 19-26, jun./set. 2006.

ANDRADE-NETO, V. F. et al. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 102, n. 3, p. 359-365, jun. 2007.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. *Anim. Behav*. v. 21, n. 2, p. 205-235, 1973.

ARRAIGA, A. M. C. et al. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. *An. Acad. Bras. Cienc*. v. 74, n. 3, p. 415-424, 2002.

AZEVEDO, C. M. A. Bioprospecção: Coleta de materiais biológicos com a finalidade de explorar os recursos genéticos. 2. ed. revisada. Caderno n. 17. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003. 35 p.

BALUNAS, M. J., KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*. v. 78, p. 431-41, 2005.

BARROS, F. C. COSTA, S. S. Germination of *Picrolemma sprucei* in a greenhouse invironment. *Journal of Research in Biology*. v. 2, n. 3, p. 1-3, 2012.

BARROS, Francisco Cleber, et al. Livro da Caferana. Trabalho não publicado.

BARROS, F. C.; POHLIT, A. M.; CHAVES, F. C. M. Crescimento de caferana (*Picrolemma sprucei* Hook. f.) em função do tamanho da muda. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS, XVIII, Manaus, 2004.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology*. v.499, n. 2, p. 291-306. 1997.

BERTANI, S., et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 98, p. 45-54, 2005.

BIONDO, T. M. A. et al. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 136, p. 368-373, 2011.

BOISSIER, J. R., et al. Tentative de pharmacologie previsionelle dans de domain des neuroleptique: actions sedative centrale et adrenergique de la N (dimethoxy-3, 4 phenethyl) N(chloro-2 phenyl) piperazine. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* v. 133, p. 29-32, 1961.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malária in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. v. 18, n. 3, p. 1-8, 2007.

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

BRODDE, O. E.; MICHEL, M. C. Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacological Reviews*. v. 51, n. 4, p.651-689,1999.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Ver. Bras. Hipertens.*, v. 8, n. 1, p. 30-40, jan./mar. 2001.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *J. Ethnopharmacol.* v. 17, n. 1, p. 75-83, 1986.

CARVALHO, A. C. B. et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, ano. 5, n. 11, p. 26-32, jun. 2007.

CHINKERS, M.; GARBERS, D. L. - Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annual Review of Biochemistry*. v. 60, p. 553-575, 1991.

CONSTANZO, L. S. Fisiologia. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 492 p.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J.; NOHRIA, V. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: A potential model for the detection of neuroleptic activity. *European Journal of Pharmacology*.v. 50, n. 1, p. 39-50, 1978.

DAIDO, M. et al. Antifeedant and insecticidal activity of quassonoids against the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and structure-activity relationships. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, n. 6, p. 974-979, 1995.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. 507 p.

DUKE, J. A.; VASQUEZ, R. Amazonian Ethnobotanical Dictionary. USA: CRC, 1994. p. 137.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de patologia e medicina laboratorial*. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FANDEUR, T.; MORETTI, C.; POLONSKY, J. *In vitro* and *in vivo* assesment of the antimalarial activity of sergeolide. *Panta Med*. v. 51, n. 1, p. 20-3, 1985.

FEELISCH, M.; NOACK, E. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobina or non-heme iron. *European Journal of Pharmacology*. v. 142, n. 3, p. 465-469, 1987.

FERNANDES, C. N. et al. Investigation of the mechanisms underlying the gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Journal of Young Pharmacists*. v. 4, p. 28-32, 2012. Disponível em: <http://www.jyoungpharm.in/article.asp?issn=0975-1483;year=2012;volume=4;issue=1;spage=28;epage=32;aulast=Fernandes>. Acesso em: 10 junho 2012.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *MultiCiência*, São Paulo, v. 7, outubro. 2006.

FORTE, J. G.; ZHU, L. Apical recycling of the gastric parietal cell H, K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol*. v. 72, p. 273-96, 2010.

FOSTER, R. Environmental and conservation programs neotropical live plant photos. Disponível em: <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?chkbox=9402>. Acesso em 12 novembro 2012.

FRANÇA, I. S. X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev. Bras. Enferm, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201-8, mar./abr. 2008.

FURTADO, R. D. Implicações anestésicas do tabagismo. Rev. Bras. Anesthesiol. v. 52, n. 3, p. 354-367, 2002.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of the endothelium in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. Annu Ver. Pharmacology Toxicol. v. 24, p. 175-197, 1984.

GAMBERINI, M. T. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera* Mart. Memórias do Instituto Oswaldo Crus. v. 86, p. 137-139, 1991.

GIRARDI, J. M.; GIRARDI, F. A.; PETERS, V. M. Endotélio vascular e efeitos das Estatinas. HU Rev., Juiz de Fora, v.32, n.1, p. 21-25, jan./mar. 2006.

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

GRELAND, P.; MORETTI C.; JACQUEMIN, H. Pharmacopées traditionnelles en Guyane, Guyane Française. Paris: Edition de L'Orstom, 1987. 570 p.

GRGIC, I. et al. Endothelial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug Discovery. British Journal of Pharmacology, v. 157, p. 509–526, 2009.

GUIMARÃES et al. Comportamento dos Quimiorreflexos Central e Periférico na Insuficiência Cardíaca. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 96, n. 2, p. 161-167, 2011.

HARIPRASATH, L.; JEGADEESH, R.; RAAMAN, N. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 140, p. 145-150, 2012.

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

IRAZ, M. et al. Role of vagal activity on bradycardic and hypotensive effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Cardiovascular Toxicology*. v. 5, n. 4, p. 391-396, 2005.

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

KONTUREK, et al. Brain-gut and appetite regulating hormones in the control of gastric secretion and mucosal protection. *Journal of physiology and pharmacology*. v. 59, p. 7-31, 2008.

LAPA, A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Campinas: Sociedade Brasileira de plantas medicinais. 2008. 144p.

LAPA, A. J. Importância da Farmacologia tradicional e novas descobertas no estudo das plantas medicinais. *Revista Arc Cvrandi*. v. 28, p. 46-52, nov/dez. 1995.

LE COINTE, P. *Árvore e plantas úteis (Amazônia brasileira III)*. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1947. 92 p.

LEDOUX, J. et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology*, v. 21, p. 69-79, 2006. Disponível em: [physiologyonline.physiology.org](http://physiologyonline.physiology.org) . Acesso em: 9 junho 2012.

LIDERT, et al. Insect antifeedant and growth inhibitory activity of forty-six quassinoids on two species of agricultural pests. *Journal of Natural Products*. v. 50, n. 3, p. 442-448, 1987.

LIN, M. T. et al. Haloperidol produces hypothermic effects in rats. *Experientia*. v. 35, p. 1469-1470, 1979.

LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T. L.; TAYLOR, A. E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  by cAMP in vascular smooth muscle cells. *The American Journal of Physiology*. v. 258, p. C399-407, 1990.

LINCOLN, T. M.; CORNWELL, T. L. Intracellular cGMP receptor proteins. *FASEB Journal*. v. 7, p. 328-338, 1993.

LULLMANN, L.; MOHR, K. *Farmacologia-texto e atlas*. 4 ed. Porto alegre: Artemed, 2004.381p.

MACE, L. C. et al. Influence of age and run training on cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *J Appl Physiol*.v. 95, p. 1994–2003, 2003.

MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 1, p. 123-128, 2007.

MCQUAID, K. R. In: *Fármacos utilizados no tratamento das doenças gastrintestinais Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro, 2005. 9 ed. p.867-891.

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

MARQUES, L. C. O mercado de produtos fitoterápicos. *Fármacos e Medicamentos*, n.04, p.43-46. 1999.

MEJIA, A. KRAFT, W. Acid peptic diseases: pharmacological approach to treatment. *Exprt. Rev. Clin. Pharmacol*.v. 3, n. 2, p. 1-34, may. 2009.

MESÍA-VELA, S. et al. *In vivo* inhibition of gastric acid secretion by the aqueous extract of *Scoparia dulcis* L. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 111. p. 403-408, 2007.

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

MONCADA, S. Nitric oxide the vasculature: Physiology and Pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences- Atherosclerosis IV*, v. 811, 1997. P. 60-69. Abstracts. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1997.tb51989.x/abstract>. Acesso em: 10 junho 2012.

MOLINA, M. M. 2005. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Estudo do comportamento do sistema nervoso simpático e parassimpático através da análise da variabilidade de frequência cardíaca em pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva classe funcional II e III associada a distúrbios do sono. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

MORETTI, C. et al. Isolation and structure of sergeolide, a potente citotoxic quassioid from *Picrolemma pseudocoffea*. *Tetrahedron Letters.* v. 23, n. 6, p. 647-650, 1982.

MUHAMMAD, I. et al. A new antimalarial quassi-noid from *Simaba orinocensis*. *Journal of Natural Products.* v. 67, p.772-777, 2004.

NETTO, E.M., et al. Comentário sobre o registro de fitoterápicos. *Revista Fitos*, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NUNOMURA, R. C. S., et al. *In vitro* studies of the anthelmintic activity of *Picrolemma sprucei* Hook. f. (Simaroubaceae). *Acta Amazonica*, Manaus, v. 36, n. 3, p. 327-330, 2006.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Antagonistas de canais de cálcio. *HiperAtivo*, v. 5, n. 2, p. 104-109, abr./jun. 1998.

OLBE, L.; CARLSSON, E.; LINDBERG, P. A Proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nature reviews.* v. 2, p. 132-139, feb. 2003.  
OKUNADE, A. L. et al. Antiplasmodial Activity of Extracts and Quassinoids Isolated from Seedlings of *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae). *Phytotherapy Research.* v. 17, p. 675–677, 2003.

OLIVEIRA, C. J.; ARAUJO, T. L. Plantas medicinais: usos crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. *Revista eletrônica de enfermagem.* v. 9. n. 1, p. 93-105, 2007. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n1/v9n1a07.htm>. Acesso em: 10 maio 2011.

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

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factors, *Nature*, v. 327, p. 524-526, jun. 1987.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*, v. 333, p. 664-666, jun. 1988.

PENITENTE, A. R. Participação dos quimiorreceptores carotídeos sobre a regulação cardiovascular em ratos desnutridos. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

PEREIRA, A. M.; LIMA, D. A. L. L. Acordos de bioprospecção e conhecimento tradicionais: as lições de casos nacionais e internacionais. In: Encontro nacional da Anppas, 4, Brasília, 2008.

PINTO, A. C. et al. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. v. 25, p. 45-61, 2002.

PIRANI, J.R., THOMAS, W.W. Simaroubaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:  
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB001307>. Acesso em 15 novembro 2012.

OHLIT, A. M., et al. Análise por LC-ESI-MS/MS de infusão de *Picrolemma sprucei*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32, Fortaleza, 2009a.

POHLIT, A. M., et al. LC-ESI-MS Determination of quassinoids isobrucein B and neosergeolide in *Picrolemma spruce* stem infusions. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 20, n. 6, p. 1065-1070, 2009b.

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

POLEZZI, R. C. S. et al. Intercâmbio de informações entre universidade-escola-comunidade envolvendo uso, cultivo e identificação de plantas medicinais, na vila pernambuco, de Cassilândia, MS. In: Anais do Congresso brasileiro de extensão universitária, 2, Belo Horizonte, 2004.



POLONSKY, J.; BHATNAGAR, S.; MORETTI, C. 15-deacety-sergeolide, a potente antileukemic quassonoid from *Picrolemma sprucei*. *Journal of natural products*. v. 47, n. 6, p. 994-996, 1984.

POLONSKY, J. et al. Activity of quassinoids as antifeedants against aphids. *Journal of Chemical Ecology*. v. 15, n. 3, p. 993-999, 1989.

QUEZADA, F. et.al. *Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad – Capacidades locales y mercados potenciales*. Caracas: Corporación Andina de Fomento, 2005. 114p.

RABON, E.D.; IM, W. B.; SANCHS, G. Preparation of Gastric H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase. *Methods Enzymol*. v. 157. p. 649-654, 1988.

REPETTO, M. G.; LLESUY, S. F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Brazilian Journal Medical and Biological Research*. v. 35. p. 523-534, 2002.

REZENDE, E.A., RIBEIRO, M.T.F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria? *Rev. Bras. Pl. Med*. v. 7, n. 3, p. 37-44, 2005.

RIBEIRO, J. E. L., et al. *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. 799p.

RIGATTO, K. V. *Curso temporal da hipertensão induzida pelo bloqueio da síntese do óxido nítrico: avaliações hemodinâmicas e bioquímicas*. 2002. 140f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RODRIGUES, A. G. Fitoterapia no Sistema Único de Saúde. In: *Anais da Jornada Catarinense*, V, Joinville, 2006. p. 68-69.

ROGERS, J. *Cardiovascular Physiology*.

Disponível em: [http://www.nda.ox.ac.uk/wfsa/html/u10/u1002\\_01.htm](http://www.nda.ox.ac.uk/wfsa/html/u10/u1002_01.htm). Acesso em: 10 junho 2012.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na Atenção básica à saúde. *Ciência saúde coletiva*. v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

ROSA, K. T. Influência dos barorreceptores e da pressão arterial na resposta cardíaca à hipertensão renovascular em ratos. 2008. 221f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

SACHS, G. et al. The Pharmacology of the gastric acid pump: the H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 35, p. 277-305, 1995.

SANT'ANA, P. J. P.; SAAD, A. L. O contexto brasileiro para bioprospecção: a competência científico-tecnológica brasileira. *Biotecnologia ciência e Desenvolvimento*, n. 29, p. 32-37, nov./dez. 2002.

SANTOS, G. M. Estudo da neurotransmissão do quimiorreflexo e do barorreflexo na área A5 de ratos não anestesiados. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SARAIVA, R. C. G. Estudo fitoquímico de *Picrolemma sprucei* Hook (Simaroubaceae) e dosagem dos princípios antimaláricos nos chás do caule e raiz. 2001. 70f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SARAIVA, R. C. G., et al. Anatomia Foliar e caulinar da *Picrolemma sprucei* Hook (SIMAROUBACEAE). *Acta Amazonica*. v. 33, n. 2, p. 213-219, 2003.

SCHEP, L. J.; SCHMIERER, D. M.; FOUNTAIN, J. S. Veratrum poisoning. *Toxicological Reviews*. v. 25, p. 73-78, 2006. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695884](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695884). Acesso em: 16 de setembro de 2011 Abstracts.

SCHULTZ, C. et al. Inhibition of the gastric H<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 111, p. 1-7, 2007.

SENAY, E. C.; LVINE, R. J. Synergism between cold and restraint for rapid production of stress ulcers in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. v. 124, n. 4, p. 1221-3, 1967.

SHING, T. K.M.; JIANG, Q. Total synthesis of (+)-quassin. *J. Org. Chem.* v. 65, p. 7059-7069, 2000.

SIANI, A. C.; GILBERT, B. Fitoterápicos: Estratégias para inserção da fitoterapia em saúde pública. Revista Riopharma. n. 38, p. 18. set/out, 2000. Disponível em: <http://www.crf-rj.org.br/crf/revista/38/?n=38>. Acesso em: 30 de agosto de 2011.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. J. Psychol., v. 21, p. 227-236, 1946.

SILVA, E.; GARRIDO, A. G.; ASSUNÇÃO, M. S. C. Avaliação da perfusão tecidual no chique, Medicina, Ribeirão Preto, v. 34, p. 27-35, jan./mar.2001.

SILVA, E. C. C. et al. Biological activity of neosergeolide and isobrucein B (and two semi-synthetic derivatives) isolated from the Amazonian medicinal plant *Picrolemma sprucei* (Simaroubaceae) Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 104, n. 1, 2009a.

SILVA, E. C. C. et al. Gram-scale isolation of isobrucein B and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* Hook. f. Revista Acta Amazonica. v. 39, n. 1, p. 229-232, 2009b.

SILVA, E. C. C. et al. Derivados semi-sintéticos dos quassinoides nesergeolida e isobruceína B, isolados de *Picrolemma sprucei*. In: Reunião anual da sociedade brasileira de química. 30, Águas de Lindóia, 2007b.

SILVA, E. C. C. et al. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum by neosergeolide and 12-acetyl neosergeolide. In: Brazilian conference on natural products, 1, São Pedro, 2007a.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 992 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. Rev. Brasil. Farmacog. v. 12, n.1, p.35-40, 2002.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. Infarma. v. 16, n. 13-14, 2005.

SOUCCAR, C. et al. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. Phytomedicine . v. 15. p. 462-469, 2008.

SOUCCAR, C. In: Inibidores da secreção ácida e drogas antiúlceras pépticas. Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia. São Paulo, 2003b. v. 1, p. 309-314.

SOUZA, V. C. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 704 p.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock *New Horiz.* v. 3, p. 2-32, 1995.

TAKAGI, H., et al. Expression of Lewis a, Lewis b, Lewis x, Lewis y, sialyl Lewis a, and sialyl Lewis x bloodgroup antigens in human gastric carcinoma and normal gastric tissue. *Cancer Res.* v. 49, p. 745-752, 1989.

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

TAYLOR, P. In: Agentes que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autonômicos. *As Bases farmacológicas da terapêutica.* Rio de Janeiro, 1996. p. 131-145.

VALENTI, V. E. et al. Regulação neural do sistema cardiovascular: centros bulbares. *Rev. Neurociên.* v. 15, n. 4, p. 317-320, 2007.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VERBERNE, A. J.; GUYENET, P. G. Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat. *Am. J. Physiol.* v.263, n. 6, p. R1195-202, 1992.

VIEIRA, I. J. C. et al. Complete <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shift assignments of new C22-quassinoid isolated from *Picrolemma sprucei* Hook by NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* v. 38, p. 805-808, 2000.

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

YAO, X.; FORTE, J.G. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu. Rev. Physiol.* v. 65. p.103 - 31, 2003.

YOUNG, R. C.; SCHUMANN, R.; ZHANG, P. - Intracellular calcium gradients in cultured human uterine smooth muscle: a functionally important subplasmalemmal space. *Cell Calcium,* v. 29, n. 3, p. 183-189, 2001.

YUNES, R. A; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Revista Química Nova*, São Paulo, v. 24, n.1. jan./fev. 2001.

WOLFE, M. M; SOLL, A. H. The physiology of gastric acid secretion. *N. Engl. J. Med.* v. 319, n. 26, p. 1707-15, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world medicines situation 2011. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. (WHO/EMP/MIE/2011. 2.3). Geneva, 2011.

ZAGO, A. S.; ZANECO, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. *Arq Bras. Cardiol.*, São Paulo, v. 87, n. 6, p. e264 - e270, dec. 2006.

ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CASTELLANO, A new quassinoid isolated from *Picrolemma pseudocoffea*. *Acta Cryst.* p. 794-797, 1994.