

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS E DA VIA DO
ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO ESPASMOLÍTICO DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS OBTIDA DE *Solanum paludosum* Moric.
(SOLANACEAE)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA
“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

João Pessoa - PB

2009

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS E DA VIA DO
ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO ESPASMOLÍTICO DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS OBTIDA DE *Solanum paludosum* Moric.
(SOLANACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa – PB

2009

M775p Monteiro, Fabio de Souza.
Participação de receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcalóides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric: (Solanaceae). – João Pessoa, 2009.
81.f. :il.
Orientador: Bagnólia Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado) – UFPb – CCS/LTF
1. Produtos Naturais. 2. *Solanum paludosum*. 3. Óxido nítrico.

UFPb/BC

CDU: 547.9(043)

FABIO DE SOUZA MONTEIRO

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS E DA VIA DO
ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO ESPASMOLÍTICO DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS OBTIDA DE *Solanum paludosum* Moric.
(SOLANACEAE)**

Aprovada em 13/03/2009

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
Orientadora**

**Prof. Dr. Márcio Roberto Viana dos Santos
(Universidade Federal de Sergipe)
Examinador externo**

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno**

Dedicatórias

Aos meus pais,
Marcos Antônio Monteiro e Maria de Fátima de Souza Monteiro, por
todo apoio e incentivo que me deram ao longo da minha formação.

Aos meus irmãos,
Marcos Antônio Monteiro Júnior e Marilene de Souza Monteiro, pelos
conselhos e a amizade conferida.

A minha noiva,
Mônica Moura de Almeida, pelo companheirismo, amor e incentivo em
continuar lutando pelo conhecimento.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado força, coragem, esperança e sonhos para alcançar os objetivos.

A minha orientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, por ter me encaminhado no ramo da pesquisa científica e mostrado as oportunidades e como alcançá-las. Por sua competência em compreender os meus defeitos, nunca desistindo de ensinar e dar conselhos para formação de uma equipe.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por ter me ajudado a resolver os mais diversos problemas ao longo do mestrado e por sua amizade.

À Doutoranda Rosimeire Ferreira dos Santos por ter me ajudado nos muitos momentos de elaboração de relatórios da iniciação científica ou da dissertação de mestrado.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela contribuição na identificação da espécie em estudo e pelos dados cedidos no tocante às espécies do gênero *Solanum* e sobre a família Solanaceae.

Ao Prof. Dr. Jnanabrata Bhattacharyya e ao Doutorando Ionaldo José Lima Diniz Basílio pelo fornecimento da fração de alcalóides totais, objeto de estudo deste trabalho e pelas várias discussões da química dos alcalóides.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Ítalo Martins, Cibério Macêdo, Rafael Travassos, Ana Carolina Correia, Joelmir Silva, Juliana Carreiro, Ana Caroline Silva, Núbia Melo, Gislaine Oliveira, pela ajuda, compreensão e momentos de descontração no laboratório.

A Tânia Alves de Araújo pela desenvoltura para resolver os assuntos burocráticos da pós-graduação.

A José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico nos mais variados problemas, que surgiam no dia-a-dia do laboratório.

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro pela colaboração no Biotério.

Aos demais funcionários do LTF que contribuíram desde a limpeza até a segurança.

Aos meus amigos e colegas da turma do Mestrado 2007: Meri Emili, Fabíola Fialho, Vicente Costa, Marianne Guedes, Solange Canavieiras, Analúcia Guedes, Aron de Miranda, Naiana Gondim, Kelly Samara, Daniel Magalhães, Maria Angélica e Glaucia Veríssimo, pela amizade e discussões científicas.

Aos demais amigos que estão ou fizeram parte do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Silvia de Siqueira, Rodrigo Molina, Kiriaki Nurit, Adriana Fernandes, Sócrates Golzio, Fabrício Garcia, Roberto Nascimento, Franklin Nóbrega, Ápio Cláudio, Francisco Júnior, Renata Moura e demais amigos que acreditaram em mim e passaram energia positiva para o meu sucesso.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS/LTF nas pessoas de Prof. José Maria Barbosa Filho e Eduardo de Jesus Oliveira, pela dedicação, empenho e competência.

À Diretoria do LTF/UFPB pela excelente infra-estrutura e pelo apoio financeiro, na pessoa da Profa. Silvana Teresa Lacerda Jales.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, através da concessão da bolsa de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico científico através do Portal Periódico.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, Bagnólia Araújo, Bruno Lira, José Maria Barbosa, Emídio Cunha, Isac Medeiros, Jacicarlos Alencar, Liana Clébia, Lourdes Pereira, Margareth Diniz, Rui Macêdo, Temilce Assis, Leônia Batista entre outros, muito obrigado, por todos os ensinamentos.

Fabio de Souza Monteiro

Resumo

RESUMO

Solanum paludosum Moric. (Solanaceae) é uma espécie herbácea, conhecida popularmente como “jurubeba-roxa” no Nordeste do Brasil (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999). O estudo químico e farmacológico com a casca da raiz desta espécie mostrou a presença de glicoalcalóides, e que o extrato etanólico e a fase aquosa obtidos da mesma parte mostraram atividade espasmolítica (ATAÍDE, 1982; BARBOSA-FILHO et al., 1991; BASÍLIO, 2008). Como muitos glicoalcalóides são conhecidos por apresentarem citotoxicidade e muitas espécies de *Solanum* apresentam atividade espasmolítica, decidiu-se estudar a fração de alcalóides totais obtida da casca da raiz de *S. paludosum* (FAT-SP) em relação ao potencial citotóxico em eritrócitos de rato e investigar uma possível atividade espasmolítica em útero de rata, aorta de rato, íleo e traquéia de cobaia. A FAT-SP não mostrou atividade hemolítica, mas apresentou efeito espasmolítico não seletivo. A triagem farmacológica preliminar mostrou que a FAT-SP, em útero de rata, não inibiu as contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina, mas inibiu de maneira significativa as contrações induzidas por 10^{-5} M de CCh; em traquéia de cobaia, foi cerca de 2,2 vezes mais potente em relaxar a traquéia pré-contraída com 10^{-6} M de CCh na ausência ($CE_{50} = 159,4 \pm 23,0$ µg/mL) do que na presença ($CE_{50} = 353,2 \pm 15,2$ µg/mL) de epitélio funcional; em íleo de cobaia, inibiu as contrações fásicas induzida por 10^{-6} M de CCh ($CI_{50} = 129,8 \pm 3,7$ µg/mL) de maneira mais potente em relação às contrações induzidas por 10^{-6} M de histamina ($E_{max} = 18,4 \pm 2,3\%$) e em aorta de rato, foi observado que a FAT-SP relaxa a aorta de rato pré-contraída com 3×10^{-7} M de fenilefrina de maneira mais potente na presença ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2$ µg/mL) do que na ausência ($CE_{50} = 242,8 \pm 11,7$ µg/mL) de endotélio funcional. De acordo com o parâmetro de potência a FAT-SP foi mais potente em íleo de cobaia e aorta de rato. Diante disso, decidiu-se investigar um possível mecanismo de ação nestes órgãos. A FAT-SP relaxou o íleo de cobaia de maneira significativa e dependente de concentração pré-contraído com 10^{-6} M de CCh ($CE_{50} = 37,4 \pm 3,2$ µg/mL) ou de histamina ($CE_{50} = 54,2 \pm 2,9$ µg/mL), mas não com 40 mM de KCl ($E_{max} = 28,6 \pm 2,8\%$). Visto que, a FAT-SP foi mais potente em relaxar o íleo pré-contraído com carbacol, isto é sugestivo do envolvimento dos receptores muscarínicos neste efeito. Esta hipótese foi confirmada em nível funcional pela observação de que a FAT-SP deslocou para direita as curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh sem alteração do E_{max} , o que é característico de antagonismo competitivo ao CCh. O relaxamento produzido pela FAT-SP em aorta de rato na presença de 10^{-5} M de L-NAME ($CE_{50} = 147,0 \pm 22,1$ µg/mL), inibidor da sintase do NO endotelial, foi atenuado, mas não na presença de 10^{-6} M de atropina ($CE_{50} = 93,3 \pm 10,0$ µg/mL), um antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, ou de 10^{-5} M de indometacina ($CE_{50} = 90,7 \pm 13,2$ µg/mL), um inibidor não seletivo da COX, sugerindo assim, a participação da sintase do NO endotelial. Além disso, na presença de 3×10^{-5} M de hidroxocobalamina ($CE_{50} = 294,9 \pm 20,4$ µg/mL), sequestrador do NO, ou de 10^{-5} M de ODQ ($CE_{50} = 228,2 \pm 30,9$ µg/mL), inibidor seletivo da GC solúvel, a curva de relaxamento da FAT-SP foi atenuada, sugerindo a participação da via NO/CG no efeito espasmolítico da FAT-SP.

Palavras-chave: *Solanum paludosum*, atividades citotóxica e espasmolítica, receptores muscarínicos, via do óxido nítrico.

Abstract

ABSTRACT

Solanum paludosum Moric. (Solanaceae) is an herbaceous species, known popularly as "jurubeba-roxa" in the Northeast of Brazil (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999). The chemical and pharmacological studies with root bark of this species showed the presence of glycoalkaloids, and that the ethanol extract and aqueous phase obtained the same parts showed spasmolytic activity (ATAÍDE, 1982; BARBOSA-FILHO et al., 1991; BASÍLIO, 2008). As glycoalkaloids are known to present cytotoxicity and many species of *Solanum* present spasmolytic activity, decided to study the total alkaloids fraction from root bark of *S. paludosum* (FAT-SP) on the cytotoxic potential in rat's erythrocytes and to investigate the spasmolytic activity in rat uterus, rat aorta and guinea-pig ileum and trachea. FAT-SP did not show hemolytic activity but presented non-selective spasmolytic effect. The preliminary pharmacological screening showed that FAT-SP on rat uterus, did not inhibit the oxytocin (10^{-2} IU/mL)-induced phasic contractions, but significantly inhibited the CCh (10^{-5} M)-induced phasic contractions ($IC_{50} = 178.8 \pm 7.1 \mu\text{g/mL}$). On guinea-pig trachea, was about 2.2 times more potent in relax the trachea pre-contracted with CCh 10^{-6} M in the absence ($EC_{50} = 159.4 \pm 23.0 \mu\text{g/mL}$) than in the presence ($EC_{50} = 353.2 \pm 15.2 \mu\text{g/mL}$) of functional epithelium; on guinea-pig ileum, inhibited the CCh (10^{-6} M)-induced phasic contractions ($IC_{50} = 129.8 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$) and was more potent in relation to histamine (10^{-6} M)-induced contractions ($E_{\text{max}} = 18.4 \pm 2.3\%$) and on rat aorta, we observed that FAT-SP relaxes the rat aorta pre-contracted with phenylephrine 3×10^{-7} M of manner more potent in the presence ($EC_{50} = 75.4 \pm 6.2 \mu\text{g/mL}$) than absence ($EC_{50} = 242.8 \pm 11.7 \mu\text{g/mL}$) of functional endothelium. According with the parameter of potency FAT-SP was more potent on guinea-pig ileum and rat aorta. Thus, we decided to investigate a possible mechanism of action in these organs. FAT-SP relaxed in a significant and concentration dependent manner the guinea-pig ileum pre-contracted with 10^{-6} M CCh ($EC_{50} = 37.4 \pm 3.2 \mu\text{g/mL}$) or histamine ($EC_{50} = 54.2 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$), but not with 40 mM KCl ($E_{\text{max}} = 28.6 \pm 2.8\%$). Since, FAT-SP was more potent to relax the ileum pre-contracted with carbachol, this is suggestive the involvement of muscarinic receptors in this effect. This hypothesis was confirmed in functional level by the observation that the FAT-SP shifted to the right the cumulative concentration-response curves to CCh without changing the E_{max} , which is characteristic of competitive antagonism to the CCh. The relaxation produced by FAT-SP on rat aorta in the presence of L-NAME 10^{-5} M ($EC_{50} = 147.0 \pm 22.1 \mu\text{g/mL}$), the NO synthase inhibitor, was attenuated, but not in the presence of atropine 10^{-6} M ($EC_{50} = 93.3 \pm 10.0 \mu\text{g/mL}$), a non-selective muscarinic receptor antagonist, or indomethacin 10^{-5} M ($EC_{50} = 90.7 \pm 13.2 \mu\text{g/mL}$), a non-selective COX inhibitor, thus suggesting the involvement of the endothelial NO synthase. Furthermore, in the presence of hydroxocobalamin 3×10^{-5} M ($EC_{50} = 294.9 \pm 20.4 \mu\text{g/mL}$), a scavenger of NO, or ODQ 10^{-5} M ($EC_{50} = 228.2 \pm 30.9 \mu\text{g/mL}$), a selective blocker of soluble GC, the relaxation curve of FAT-SP was attenuated, suggesting the involvement NO/CG pathway in the spasmolytic effect of the FAT-SP.

Keywords: *Solanum paludosum*, cytotoxic activity, spasmolytic effect, muscarinic receptor, nitric oxid pathway.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da solamargina	5
Figura 2 – <i>Solanum paludosum</i> Moric.	6
Figura 3 – (A) espectrofotômetro Ultraspec 1100 pro; (B) sistema para o registro das contrações isotônicas composto por cuba para banho de órgãos isolados, alavanca de inscrição frontal e cilindro esfumado de um quimógrafo e (C) sistema para o registro das contrações isométricas composto por cuba, transdutor de força, amplificador e aquisição digital	20
Figura 4 – Registro original representativo das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na ausência (A) e na presença (B) de 750 µg/mL da FAT-SP.	40
Figura 5 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (A) e na presença de L-NAME (B).	43
Figura 6 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (A) e na presença de hidroxocobalamina (B).	46
Figura 7 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (A) e na presença de ODQ (B).	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito hemolítico da FAT-SP em eritrócitos de rato. Triton X 100 1% (controle positivo) e NaCl + CaCl ₂ (controle negativo).	31
Gráfico 2 – Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina (A) ou 10 ⁻⁵ M de CCh (B) em útero isolado de rata.	33
Gráfico 3 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de traquéia de cobaia pré-contraídos com 10 ⁻⁶ M de CCh na presença ou na ausência de epitélio funcional.	34
Gráfico 4 – Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por 10 ⁻⁶ M de histamina (A) ou de CCh (B) em íleo isolado de cobaia.	36
Gráfico 5 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com 3 x 10 ⁻⁷ M de fenilefrina na presença e na ausência de endotélio funcional.	37
Gráfico 6 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl, 10 ⁻⁶ M de CCh ou de histamina.	39
Gráfico 7 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na ausência e na presença da FAT-SP: 27; 81; 243; 500 e 750 µg/mL, em íleo isolado de cobaia.	41
Gráfico 8 – Valores de CE ₅₀ do CCh na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da FAT-SP	41
Gráfico 9 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta isolado de rato com endotélio funcional na ausência e na presença de atropina ou de indometacina em (A) e de L-NAME em (B).	44
Gráfico 10 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato com endotélio funcional na ausência e na presença de hidroxocobalamina.	47
Gráfico 11 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato com endotélio funcional na ausência e na presença de ODQ.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de De Jalon.	17
Tabela 2 – Composição da solução de Krebs modificado.	18
Tabela 3 – Composição da solução de Krebs normal.	18

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Processo para obtenção da FAT-SP, a partir da casca da raiz de *Solanum paludosum* Moric. 11

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i	concentração intracelular do íon cálcio
[Ca²⁺₄-CaM]	complexo cálcio – calmodulina
[K⁺]_e	concentração extracelular do íon potássio
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
Ca²⁺-ATPase	bomba de Ca ²⁺
CCh	carbacol
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_vL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CE₅₀	concentração de uma droga que produz 50% de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
e.p.m	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FAT-SP	fração de alcalóides totais obtida das raízes de <i>Solanum paludosum</i> Moric.
FEN	fenilefrina
FHDEs	fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
FRDEs	fatores relaxantes derivados do endotélio
G_{12/13}	proteína G ₁₂ e G ₁₃
G_{q/11}	proteína G _q e G ₁₁

GC	ciclase de guanilil
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5–trifosfato de inositol
L-NAME	cloridrato de N-omega-nitro-L-arginina metil éster
LTF	laboratório de tecnologia farmacêutica
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinoxalina-1-ona
PGI₂	Prostaciclina
PKA	proteína cinase A
PKG	proteína cinase G
RS	retículo sarcoplasmático
RhoA	pequena proteína Rho ligante de GTP
ROK	cinase associada à pequena proteína Rho ligante de GTP
$\bar{x} \pm \text{e.p.m.}$	média \pm erro padrão da média
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

OBS.: as abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Material	15
3.1.1 Material botânico	15
3.1.2 Preparação da solução da fração de alcalóides totais	15
3.1.3 Animais.....	16
3.1.4 Substâncias	16
3.1.5 Soluções nutritivas	17
3.1.6 Aparelhagem	19
3.2 Métodos	21
3.2.1 Avaliação toxicológica da FAT-SP	21
3.2.1.1 Efeito da FAT-SP em eritrócitos de rato	21
3.2.2 Triagem farmacológica preliminar	22

3.2.2.1 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata	22
3.2.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traquéia isolada de cobaia	23
3.2.2.3 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia.....	24
3.2.2.4 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de rato	25
3.2.3 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em íleo isolado de cobaia.....	26
3.2.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina.....	26
3.2.3.2 Efeito da FAT-SP frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao CCh	26
3.2.4 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional.....	27
3.2.4.1 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de L-NAME, atropina ou indometacina	27
3.2.4.2 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de hidroxocobalamina	28
3.2.4.3 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de ODQ.....	28
3.2.5 Análise estatística.....	29

4 RESULTADOS	30
4.1 Avaliação toxicológica da FAT-SP	31
4.1.1 Efeito da FAT-SP em eritrócitos de rato	31
4.2 Triagem farmacológica preliminar	32
4.2.1 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata	32
4.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traquéia isolada de cobaia.....	34
4.2.3 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia	35
4.2.4 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de rato	37
4.3 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em íleo isolado de cobaia.....	38
4.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina.....	38
4.3.2 Efeito da FAT-SP frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao CCh.....	40
4.4 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional.....	42

4.4.1 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de L-NAME, atropina ou indometacina	42
4.4.2 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de hidroxocobalamina.....	45
4.4.3 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de ODQ.....	48
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES	62
7 PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS	67
ANEXO A- Certidão de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA/LTF)	81

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A busca para o alívio e/ou a cura das doenças pelo homem por milhares de anos era conseguida através da utilização dos produtos naturais, os quais existiam na forma de tinturas, chás e pós (BALICK, 1997; VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Antes da “era sintética”, no início do ano de 1900, registrou-se que 80% dos remédios eram obtidos através de raízes, cascas e folhas (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

Na década de 40, com a segunda guerra mundial, os conflitos entre os povos impulsionaram o desenvolvimento tecnológico, principalmente da indústria farmacêutica. Esta aproveitou o desenvolvimento da informática e investiu no planejamento racional de fármacos. A idéia que se tinha era a de que seria possível a descoberta de moléculas biologicamente ativas e que combateriam todos os males da sociedade. Porém, a indústria farmacêutica em 2004 divulgou que o investimento na química computacional não correspondeu ao lançamento de fármacos inovadores. Além disso, a maioria da população não tem poder aquisitivo para compra de medicamentos inovadores (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Diante disso, houve um ressurgimento dos produtos naturais para a descoberta de novos fármacos ou mesmo de fitoterápicos, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente (SIXEL; PECINALLI, 2005; LÓPES, 2006).

As plantas são consideradas verdadeiros laboratórios fornecedores dos mais variados princípios ativos ou metabólitos especiais que representam autênticos protótipos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos (BARREIRO, 1990).

O Brasil é um importante fornecedor de material botânico para o mercado farmacêutico nacional e internacional, devido à diversidade de plantas que apresenta. Por exemplo, a pilocarpina obtida das folhas do jaborandi (*Pilocarpus*

microphyllus Stapf ex Wardleworth, Rutaceae); alfa-bisabolol, obtido da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae) e rutina, obtida dos frutos da favela (*Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae) (BRANDÃO et al., 2008).

A região Nordeste do Brasil apresenta uma flora rica em várias famílias, entre elas, a Solanaceae que compreende 106 gêneros e aproximadamente 2300 espécies (OLMSTEAD et al., 1999).

Muitas espécies da família Solanaceae são utilizadas na alimentação humana, por exemplo, a batatinha (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicum* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.); bem como produtoras de drogas de interesse farmacológico, por exemplo a atropina (*Atropa belladonna* L.), a nicotina (*Nicotiana tabacum* L.) entre outras (AGRA, 2000).

O gênero *Solanum*, pertencente à família Solanaceae, é um dos mais amplos do reino vegetal com cerca de 1700 espécies (HUNZIKER, 2001). No Brasil, o gênero está representado nas regiões Sudeste com 193 espécies (CARVALHO, COSTA; DUARTE, 1996), Sul com 87 (MENTZ; OLIVEIRA, 2004) e Nordeste com 80 espécies (AGRA, 1999). Este gênero tem sido bastante estudado devido principalmente às atividades biológicas apresentadas por várias de suas espécies, e tem como característica a produção de uma variedade de glicoalcalóides (FERREIRA et al., 1996).

Em relação às atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Solanum* podemos citar as atividades hipotensora, apresentada por *Solanum paniculatum* L., *Solanum stipulaceum* Roem.; Schult., *Solanum melongena* L e *Solanum sisymbriifolium* Lam. (ALMEIDA et al., 1985; RIBEIRO et al., 1986; SHUM; CHIU, 1991; IBARROLA et al., 2000; RIBEIRO et al., 2002); antitumoral, relatada para *Solanum dulcamara* L. e *Solanum sodomaeum* L. (KUPCHAN et at., 1965; CHAM, 1994); depressora sobre o Sistema Nervoso Central, referida para *Solanum nigrum* L. (PEREZ et al., 1998); antimicrobiana, mencionada para *Solanum torvum*

Sw. (CHAH; MUKO; OBOEGBULEM, 2000) e moluscicida, apresentada por *Solanum aculeastrum* Dunal (WANYONYI et al., 2002). Além dessas atividades, muitas espécies também apresentam efeito espasmolítico, como por exemplo, *Solanum dulcamara* L. (BOYD, 1928), *Solanum torvum* Sw (BHAKUNI et al., 1969), *Solanum indicum* L (ABRAHAM et al., 1986). *Solanum paraibanum* Agra (OLIVEIRA et al., 2001; SILVA, 2007), *Solanum jabrense* Agra; Nee (CAVALCANTE, 2001; CLAUDINO, 2003), *Solanum agrarium* Sendtn., (SANTOS et al., 2004), *Solanum megalonyx* Sendtn e *Solanum asterophorum* Mart. (OLIVEIRA et al., 2006a,b), *Solanum paniculatum* L. (SILVA, 2006) e *Solanum asperum* Rich (COSTA, 2006; CORREIA, 2007; GARCIA, 2007).

Os glicoalcalóides presentes no gênero *Solanum* apresentam-se como alcalóides esteroidais glicosilados que são formados a partir de unidades isoprênicas. Consistem em dois componentes estruturais básicos (Figura 1): uma parte hidrofóbica, com esqueleto colestano de 27 carbonos (aglicona), e outra hidrofílica, com uma cadeia lateral formada por unidades de aldoses (D-glicose, D-galactose, D-xilose e L-ramnose) geralmente ligadas à posição 3-hidroxi das agliconas, podendo conter de uma até quatro unidades de aldoses (SCHREIBER, 1968). Esses glicoalcalóides são produzidos pelas plantas com a finalidade de defesa contra insetos e microrganismos (JADHAV et al., 1997). Além disso, muitos glicoalcalóides são citotóxicos, por exemplo, solamargina de *Solanum incanum* Chinês, que possui potente atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000).

Com a descoberta de que as agliconas dos glicoalcalóides podem ser utilizadas comercialmente como precursores de hormônios esteroidais, aumentou o interesse por espécies do gênero *Solanum* (SATO et al., 1951; KUHN; LOEW; TRISCHMAN, 1952). Além do mais, muitas atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Solanum* são atribuídas à presença de glicoalcalóides, por exemplo, as atividades antipirética e antiinflamatória apresentadas pela fração glicoalcaloídica da espécie *Solanum linguistrinum* Lood. (DELPORTE et al., 1998); antiviral contra *Herpes genitalis*, *Herpes simplex* e *Herpes zoster* apresentada pelos

glicoalcalóides solamargina e solasonina de *Solanum americanum* Miller (CHATAING et al., 1999); antibacteriana contra *Corynebacterium sepedonicum* apresentada por α -chaconina e a α -solanina de *Solanum tuberosum* L. (PAQUIN; LACHANCE, 1964); antitumoral atribuída aos glicoalcalóides solamargina e solasonina de *Solanum sodomaeum* L. (CHAM, 1994).

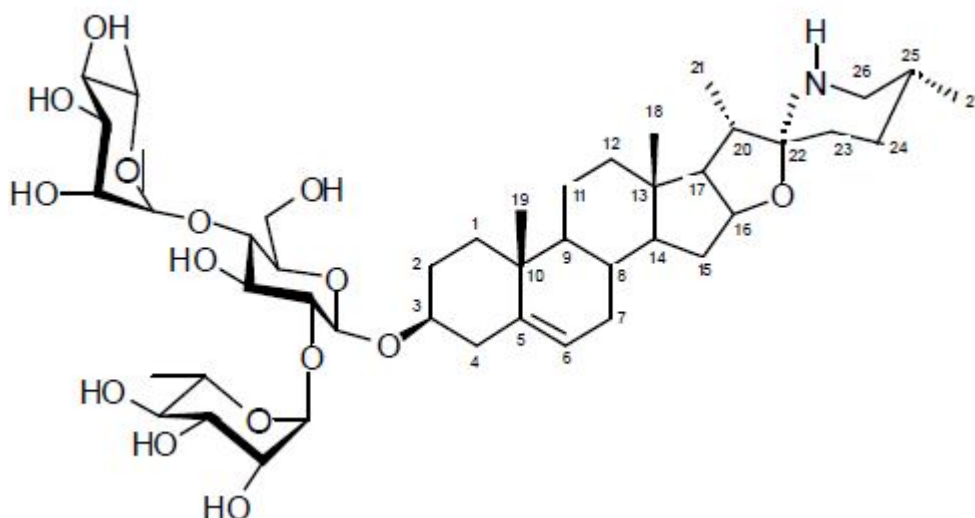


Figura 1 – Estrutura da solamargina (SILVA et al., 2006).

A espécie *Solanum paludosum* Moric. (Figura 2) está incluída no subgênero *Leptostemonum* que se apresenta na forma de arbusto, sendo conhecida popularmente como “jurubeba”, “jurubeba-roxa” ou “jurubeba-brava”, e é utilizada na medicina popular para o tratamento de problemas hepáticos (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999). Esta espécie possui ampla distribuição, ocorrendo na Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e no Brasil (de Norte a Sudeste), em áreas costeiras, orlas de matas, restingas, tabuleiros, em solos arenosos, argilo-arenosos e salinos (AGRA, 2004).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstract, NAPRALERT (NATURAL PRODUCTS ALERT), teses, dissertações e sites de

busca, *Solanum paludosum* vem sendo estudada do ponto de vista, botânico, químico e farmacológico.



Figura 2 – Fotografia de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae).

A primeira descrição botânica de *S. paludosum* foi feita por Stefano Moricand (1833-1846), que descreve o seu habitat em lugares pantanosos. Isto originou o nome do epíteto “*paludosum*”, de palustre, alagado (ATAÍDE, 1982). Já o estudo farmacobotânico, descreve as diferenças macroscópicas e microscópicas das folhas, caules e raízes de *S. paludosum* em relação a outras espécies de *Solanum* (BASÍLIO; AGRA; BHATTACHARYYA, 2007).

Os estudos do ponto de vista químico foram realizados com a casca da raiz, os frutos e as partes aéreas de *S. paludosum*. Os constituintes majoritários isolados da casca da raiz e dos frutos são alcalóides esteroidais e seus glicosídeos (BHATTACHARYYA, 1984; BARBOSA-FILHO et al., 1991; VALVERDE et al., 1993; BASÍLIO, 2008), já das partes aéreas são os flavonóides (SILVA et. al., 2002).

Os estudos farmacológicos realizados com o extrato etanólico e sua fase aquosa da casca da raiz de *S. paludosum* mostraram atividades espasmolítica em jejuno isolado de rato e hipotensora em ratos (ATAÍDE, 1982). Além disso, foi realizada uma monitoração farmacológica de extratos fases e flavonóides isolados, obtidos das partes aéreas de *S. paludosum*, em músculos lisos de aorta isolada de rato, útero isolado de rata, traquéia e íleo isolados de cobaia e observou-se atividade espasmolítica não seletiva (SILVA et al., 2002; DUARTE et. al., 2003; SILVA, 2005; SANTOS, 2006).

Há um grande interesse em se investigar drogas obtidas diretamente de plantas ou seus derivados que atuem sobre a musculatura lisa, pois esse músculo é o principal responsável pelo controle da maioria dos órgãos ocos dos sistemas do corpo. As células da musculatura lisa estão presentes nas paredes de vários órgãos do corpo, incluindo os vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga e vias aéreas (WEBB, 2003).

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ é a causa primária para a produção da contração e está igualmente envolvida na proliferação celular no músculo liso (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_i$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do potencial de membrana (V_m) (REMBOLD, 1996).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização do Ca^{2+} , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997). O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel necessário a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose, e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI, 2002). Em geral, existem duas fontes

deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (R.S.) que liberam Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração externa de K^+ ($[\text{K}^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), causando influxo de Ca^{2+} no citoplasma e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando a proteína $\text{G}_{q/11}$ -fosfolipase C (PLC). O IP_3 liga-se a um receptor de IP_3 permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que favorecerá a formação do complexo Ca^{2+}_4 -CaM disparando o início do mecanismo contrátil (GARRET; GRISHAM, 1995); (2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do canal de Ca^{2+} tipo L por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana e (3) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do RS (KOMORI et al., 1995).

A diminuição dos níveis de Ca^{2+} intracelular para os níveis basais desativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O relaxamento do músculo liso ocorre através da ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que desfosforila a cadeia leve da miosina (MLC). Esta reação é relativamente lenta, por isso as contrações do músculo liso são tipicamente mais sustentadas e se dissipam mais lentamente que as do músculo estriado (GARRET; GRISHAM, 1995).

Há na literatura o relatado de uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso, a modulação da MLCP. O equilíbrio entre a MLCK e a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) age como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integram a contração no músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A MLCP consiste em 3 subunidades: uma

catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 KDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da pequena proteína ligante de GTP (RhoA), dependente de $G_{12/13}$. A RhoA-GTP estimula a sua cinase associada (ROK) (KIMURA et al., 1996; KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997). A ativação desta cinase pode resultar da ativação, dependente de G_q , da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bifosfato de inositol (PIP_2). A ROK e a PKC agem isolada ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização do cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos Thr696 e Thr853 da MYPT1 humana. A ROK pode também fosforilar o resíduo Thr38 da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a MLCP por mais de 1000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

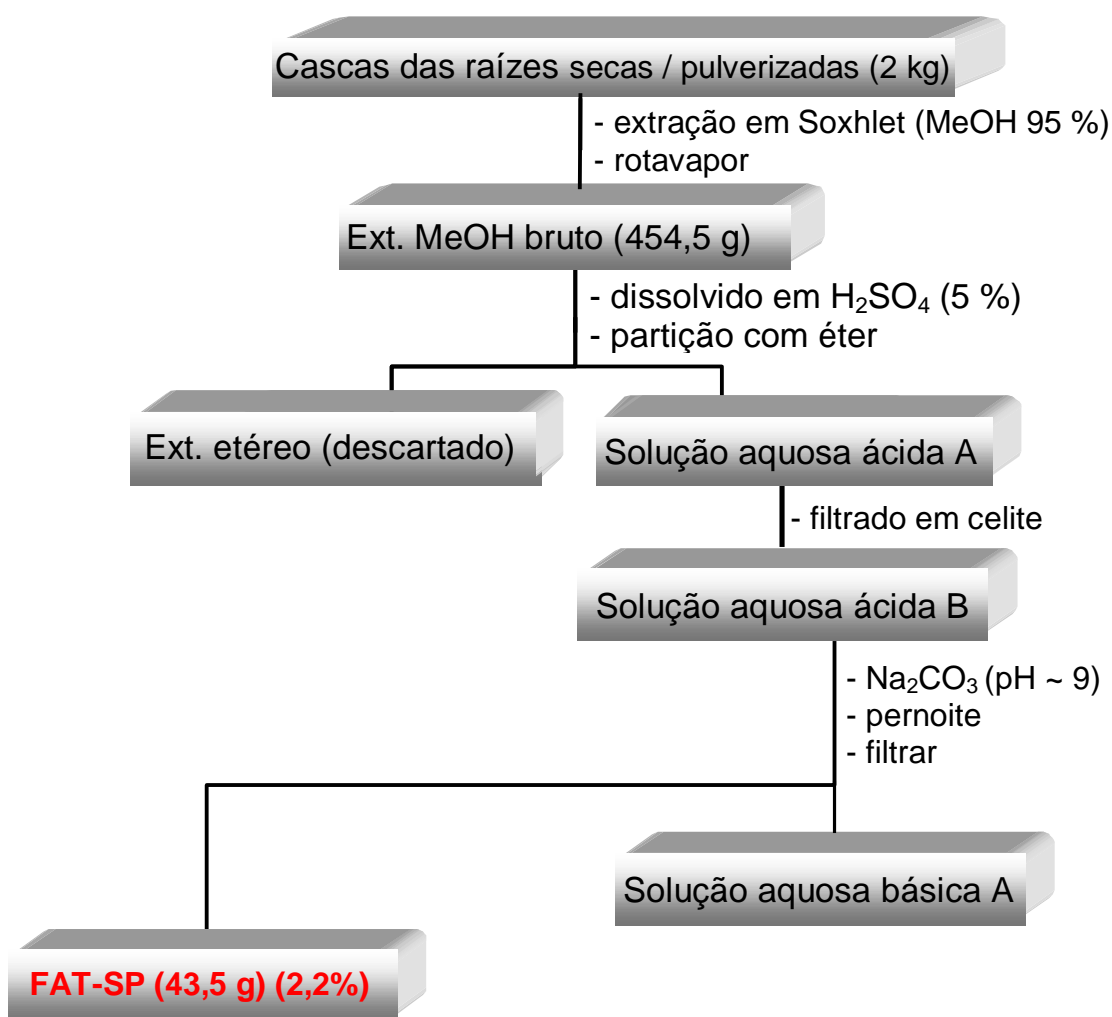
O relaxamento do músculo liso pode ocorrer pelo mecanismo eletromecânico que é a hiperpolarização. Este evento pode ocorrer diretamente, pela abertura de canais K^+ na membrana celular, que pode ser produzida por drogas (por exemplo: cromacalina, levcromacalina e nicorandil) ou pelos fatores hiperpolarizantes derivado do endotélio (FHDEs) (NAGAO; VANHOUTTE, 1993; CAMPBELL et al., 1996; VANHEEL; VAN DE VOORDE, 2000; MEDHORA et al., 2001; ARCHER et al., 2003), portanto aumentando o efluxo de K^+ da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994). Ou indiretamente, em função da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), como o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), ou a prostaciclina (PGI_2) (DUSTING; MONCADA; VANE, 1977). O NO ativa uma ciclase de guanilil (GC) solúvel, produzindo monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o aumento na [GMPc] ativa uma proteína cinase G (PKG). Enquanto que a ligação da PGI_2 ao seu receptor ativa diretamente uma ciclase de adenilil (AC) particulada, resultando na formação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), que ativa a proteína cinase A (PKA), e em altas concentrações ativa a PKG. Em ambos

os casos, o resultado é a ativação de canais de K^+ por essas cinases (LINCOLN et al., 1996). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_vL , diminuindo portanto a $[Ca^{2+}]_i$, a fosforilação da miosina e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) Aumento na atividade da enzima Ca^{2+} – ATPase (bomba de Ca^{2+}), tanto do R.S. como da membrana plasmática, através da fosforilação pela PKG e/ou PKA, levando a um aumento do sequestro e da extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_i$; (2) Diminuição da formação do IP_3 e conseqüente diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao IP_3 ; (3) Redução da $[Ca^{2+}]_i$ via GMPc/PKG ou AMPc/PKA por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente, por hiperpolarização, ou por agir diretamente nos Ca_vL inativando-os e finalmente (4) Diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} na membrana plasmática (BLAUSTEIN, 1989).

Diante dessas premissas e tendo em vista que muitos glicoalcalóides presentes em espécies de *Solanum* são citotóxicos e além disso, vários estudos mostram que *S. paludosum* apresenta atividade espasmolítica, decidimos avaliar o potencial citotóxico, bem como, investigar uma possível atividade espasmolítica com a fração de alcalóides totais obtida da casca da raiz de *S. paludosum* Moric. (FAT-SP) (Esquema 1).

Esquema 1 – Processo para obtenção da FAT-SP, a partir das cascas das raízes de *Solanum paludosum* Moric. (comunicação pessoal¹).



¹Dados fornecidos pelo pesquisador Jnanabrata Bhattacharyya colaborador do Laboratório de Química Orgânica do LTF/UFPB.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para o estudo farmacológico da família Solanaceae, fornecendo conhecimento relativo às atividades farmacológicas da espécie *Solanum paludosum* Moric., especialmente com o estudo da fração de alcalóides totais (FAT-SP) obtida das cascas das raízes desta espécie, com a finalidade posterior de descobrir drogas com melhor potencial terapêutico ou que sirvam como ferramenta farmacológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o potencial citotóxico da FAT-SP em eritrócitos de rato.

Investigar um possível efeito espasmolítico da FAT-SP através da abordagem “*in vitro*” em útero isolado de rata; traquéia e íleo isolados de cobaia e aorta isolada de rato.

Avaliar o mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP no(s) órgão(s) em que esta se apresentar mais potente.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material Botânico

A espécie *Solanum paludosum* Moric. foi coletada no município de Santa Rita-PB, em novembro de 2005. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF). A exsicata da planta (Agra & Basílio 6734) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.1.2 Preparação da solução da fração de alcalóides totais para a realização dos ensaios farmacológicos

A fração de alcalóides totais (FAT-SP) foi cedida pelo Prof. Dr. Jnanabrata Bhattacharyya e era solubilizada em água destilada até a concentração de 10 mg/mL (solução estoque), conservada a 0 °C e diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental. As concentrações da FAT-SP foram utilizadas em multiplus 3, sendo a concentração submáxima 243 µg/mL. Apenas a concentração máxima não seguiu essa sequência, uma vez que a concentração máxima utilizada em experimentos com órgãos isolados é de 500 µg/mL (EXPERIMENTS ON ISOLATED PREPARATIONS, 1970). Quando nestas concentrações o efeito observado era superior a 50%, procurava-se a concentração que dará 0% de efeito.

3.1.3 Animais

Foram utilizados ratas virgens Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 150–250 g, ratos Wistar pesando entre 250–350 g e cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos pesando entre 300–500 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do LTF da UFPB.

Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso à água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06h00 às 18h00. Todos os experimentos eram realizados no período de 08h00 às 20h00.

Todos os animais eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA/LTF), certidão número 0204/08.

Em cada protocolo experimental eram utilizados no mínimo três e no máximo cinco animais.

3.1.4 Substâncias

O sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de cálcio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de potássio (KCl) e o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram obtidos da Vetec (Brasil).

O ácido araquidônico (AA), o dietilestilbestrol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o cloridrato de histamina, o sulfato de atropina, a indometacina, o *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), a fenilefrina (FEN), o Triton X-100 e o 1H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

O fosfato monossódico 1-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e o fosfato de potássio monobásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Nuclear (Brasil).

O cloreto de sódio (NaCl), o cloridrato de acetilcolina (ACh) e o cloridrato de carbamilcolina (CCh) foram obtidos da Merck (Brasil).

A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil). O cloridrato de hidroxocobalamina foi obtido da Bristol-Myers Squibb (Equador). A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

Todas as substâncias foram mantidas em um “freezer” à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (exceto a hidroxocobalamina que foi mantida a temperatura ambiente), dissolvidas e diluídas em água destilada (exceto o ácido araquidônico e o dietilestilbestrol que foram dissolvidos em etanol absoluto, a indometacina que foi dissolvida e diluída em solução de NaHCO_3 a 0,2 M e o ODQ que foi dissolvido em DMSO).

3.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os protocolos experimentais realizados eram utilizadas várias soluções nutritivas (pH 7,4), aeradas com a mistura carbogênica e mantidas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (menos para o experimento com útero isolado de rata, que era mantido a $31\text{ }^\circ\text{C}$), cujas composições estão descritas a seguir.

Tabela 1 – Composição da solução de De Jalon (DE JALON; BAYO; DE JALON, 1945)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,6
CaCl_2	0,27
NaHCO_3	5,9
Glicose	2,8

Tabela 2 – Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	117,0
KCl	4,7
NaH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,3
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

Tabela 3 – Composição da solução de Krebs normal

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,6
KH ₂ PO ₄	1,1
MgSO ₄	5,7
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

3.1.6 Aparelhagem

Para a determinação da atividade hemolítica, as soluções contendo eritrócitos de rato eram centrifugadas em centrífuga modelo 206 (FANEM, Brasil) e as leituras realizadas em espectrofotômetro Ultraspec 1100 pro (AMERSHAM BIOSCIENCES) (Figura 3A).

Para registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de 6 mL e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil) (Figura 3B). As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força isométricos FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M, ambos da World Precision Instruments, Inc. (WPI) (Sarasota, FL), os quais estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital (BioData, Brasil) instalada em um computador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 (Figura 3C).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas 597 (FISATOM, Brasil) ou do modelo POLYSTAT 12002 (Cole-Palmer, EUA).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semi-analítica, ambas da GEHAKA (Brasil).

A



B



C



Figura 3 – (A) espectrofotômetro Ultraspec 1100 pro; (B) sistema para o registro das contrações isotônicas composto por cuba para banho de órgãos isolados, alavanca de inscrição frontal e cilindro esfumado de um quimógrafo e (C) sistema para o registro das contrações isométricas composto por cuba, transdutor de força, amplificador e sistema de aquisição digital.

3.2 Métodos

3.2.1 Avaliação toxicológica da FAT-SP

3.2.1.1 Efeito da FAT-SP em eritrócitos de rato

Esse procedimento seguiu a metodologia descrita por Rangel et al. (1997). Os ratos pesando entre 200 e 300 g eram mantidos em jejum por um período de 12 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período, eram eutanasiados por deslocamento cervical e uma amostra de sangue era coletada através do plexo braquial, e imediatamente misturada com uma solução (pH = 7,4) de NaCl (0,9%) e CaCl₂ (10 mM) na proporção de 1:30 sob agitação lenta e constante para evitar coagulação e centrifugada a 2500 rpm durante 5 min para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento era repetido mais uma vez e o sedimento da última centrifugação era ressuspensão a 0,5% em solução de NaCl (0,9%) e CaCl₂ (10 mM). A FAT-SP era adicionada a 4 mL da suspensão de eritrócitos em várias concentrações e em preparações diferentes para um volume final de 4,5 mL. O controle negativo era montado com suspensão de eritrócitos mais NaCl e CaCl₂ (0% de hemólise) e o controle positivo com suspensão de eritrócitos mais 100 µL de Triton X-100 1% (100% de hemólise). As amostras eram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo eram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 min e a hemólise era quantificada por espectrofotometria a 540 nm e expressa em percentagem.

Quando a hemólise era quantificada em até 50% esta era considerada uma atividade hemolítica moderada, acima disto a hemólise era considerada alta (PROKOF'EVA et al., 2004).

3.2.2 Triagem farmacológica preliminar

3.2.2.1 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea, para indução do estro. Decorrido este tempo, as ratas eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. Após aberta a cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de De Jalon a 31 °C, gaseificada com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (6 mL). Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 min antes do contato com qualquer agente, sob tensão de 0,5 g, efetuando neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 min. Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de amplitudes similares, com intervalos de 15 min, eram obtidas com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou 10^{-5} M de CCh, concentração sub-máxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumado de um quimógrafo. A FAT-SP era incubada por 15 min em preparações diferentes e a inibição da resposta submáxima da ocitocina e do CCh era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição a cuba. Os valores de CI_{50} (concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista) eram obtidos por regressão não-linear.

3.2.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traquéia isolada de cobaia

Os cobaias eram sacrificadas por concussão cerebral seguida por secção dos vasos cervicais. O método de descolamento cervical não foi utilizado para não provocar danos devido a um estiramento demasiado da traquéia. O tórax do cobaia era aberto e dissecado, a traquéia era retirada e limpa de todo o tecido conjuntivo. O órgão era dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 anéis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução nutritiva de Krebs normal sob tensão de 1 g. Estes segmentos eram mantidos à temperatura de 37 °C e permaneciam em repouso durante 60 min, sendo a solução trocada a cada 15 min. Após esse período de estabilização, eram obtidas duas contrações tônicas (com intervalos de 15 min entre as contrações), de magnitudes similares induzidas por 10^{-6} M de CCh e consideradas como controle.

A integridade do epitélio traqueal era verificada pela adição de ácido araquidônico (AA) à cuba na concentração de 10^{-4} M (TSCHIRHART et al., 1987) durante a fase tônica da resposta induzida por CCh. Os anéis que apresentaram relaxamentos iguais ou superiores a 50% eram considerados com epitélio. Já os anéis de traquéia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo por atrito da parede interna do órgão com uma haste envolta em algodão e embebida com solução de Krebs. A retirada do epitélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, sendo este anel considerado sem epitélio funcional. Durante a fase tônica da segunda resposta ao CCh, a FAT-SP era adicionada de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por CCh e os valores de CE_{50} (concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo) foram obtidos por regressão não-linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para a FAT-SP em anéis com e sem epitélio funcional.

3.2.2.3 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia

Os cobaias eram mantidos em jejum não hídrico por 18 horas e eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro de 6 mL e deixados em repouso por 30 min sob tensão de 1 g, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Após este período, duas contrações fásicas de amplitudes similares, com intervalos de 15 min, eram obtidas com 10^{-6} M de histamina ou de CCh, concentração sub-máxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. A FAT-SP era incubada por 15 min em preparações diferentes e a inibição da resposta submáxima da histamina e do CCh era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição a cuba. Os valores de CI_{50} eram obtidos por regressão não-linear.

3.2.2.4 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de rato

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. Os anéis aórticos de 3–5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo a partir da aorta torácica. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma haste de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução de Krebs normal a 37 °C. As preparações eram estabilizadas por um período de uma hora, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 g. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 min para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização era induzida uma contração com fenilefrina (3×10^{-7} M) e durante o componente tônico, 12 a 15 min da resposta, era adicionado 10^{-6} M de acetilcolina a todas as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento igual ou superior a 50% (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). A retirada do endotélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de acetilcolina à cuba ou quando este relaxamento era inferior a 10%, sendo este anel considerado sem endotélio funcional. Após a lavagem, esperava-se 30 min e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, a FAT-SP era adicionada, de maneira cumulativa à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por fenilefrina e os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para a FAT-SP em anéis com e sem endotélio funcional.

3.2.3 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em íleo isolado de cobaia

3.2.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.3. Após o período de estabilização, uma contração sub-máxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital era obtida com 40 mM de KCl, para verificação da funcionalidade do órgão e durante a fase tônica sustentada (8 – 10 min) de uma segunda contração induzida por 40 mM de KCl, 10^{-6} M de CCh ou de histamina, a FAT-SP era adicionada de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelos agentes contráteis. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear.

3.2.3.2 Efeito da FAT-SP frente às curvas contrações-resposta cumulativas ao CCh

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.3. Após o período de estabilização de 30 min, duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares eram obtidas com o uso do CCh. Em seguida, na ausência do CCh, a FAT-SP era incubada por 15 min em diferentes concentrações e preparações. Passado esse tempo, uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao CCh era obtida, na presença da FAT-SP. Comparando-se as potências relativas e a eficácia máxima das curvas de CCh na ausência (controle) e na presença da FAT-SP foi avaliado o tipo de antagonismo.

3.2.4 Investigação do possível mecanismo de ação da FAT-SP em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional

3.2.4.1 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de L-NAME, atropina ou indometacina

A aorta era montada como descrito no item 3.2.2.4. Após a obtenção das duas curvas similares concentração-resposta simples à fenilefrina, a preparação com endotélio era incubada, separadamente, por 15 min com 10^{-5} M de L-NAME, bloqueador da sintase do óxido nítrico (REES et al., 1990), com 10^{-6} M de atropina, antagonista muscarínico não seletivo (JAISWAL et al., 1991) ou com 10^{-5} M de indometacina, bloqueador não seletivo das ciclooxygenases (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 1996). Ainda na presença dos bloqueadores, uma nova contração com fenilefrina era obtida. Em seguida, a FAT-SP era adicionada cumulativamente à cuba, sobre o componente sustentado da contração. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela fenilefrina. Os valores de CE_{50} foram obtidos por regressão não-linear a partir das curvas de relaxamento, obtidas na ausência e na presença dos bloqueadores.

3.2.4.2 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de hidroxocobalamina

A aorta era montada como descrito no item 3.2.2.4. Após a obtenção das duas curvas similares concentração-resposta simples à fenilefrina, a preparação com endotélio íntegro era incubada por 30 min com 3×10^{-5} M de cloridrato de hidroxocobalamina, um sequestrador de NO radicalar (BRODERICK et al., 2005). Ainda na presença do bloqueador, uma nova contração com fenilefrina era obtida. Em seguida, a FAT-SP era adicionada cumulativamente à cuba, sobre o componente sustentado da contração. O relaxamento e os valores de CE_{50} foram determinados como descrito no item 3.2.4.1.

3.2.4.3 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de ODQ

A aorta era montada como descrito no item 3.2.2.4. Após a obtenção das duas curvas similares concentração-resposta simples à fenilefrina, a preparação com endotélio era incubada por 15 min com 10^{-5} M de ODQ, bloqueador específico da ciclase de guanilil solúvel (GARTHWAITE et al., 1995). Ainda na presença do bloqueador, uma nova contração com fenilefrina era obtida. Em seguida, a FAT-SP era adicionada cumulativamente à cuba, sobre o componente sustentado da contração. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pela fenilefrina. O relaxamento e os valores de CE_{50} foram determinados como descrito no item 3.2.4.1.

3.2.5 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média ($\bar{x} \pm$ e.p.m.) e foram analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” ou análise de variância (ANOVA) “one-way” ou “two-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os valores de CI_{50} e CE_{50} (JENKINSON et al., 1995) foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 3,02 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA.).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação toxicológica da FAT-SP

4.1.1 Efeito da FAT-SP em eritrócitos de rato

Na avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos de ratos, a FAT-SP, nas concentrações de 81, 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$, não induziu hemólise dos eritrócitos de maneira significativa (Gráfico 1, $n = 3$).

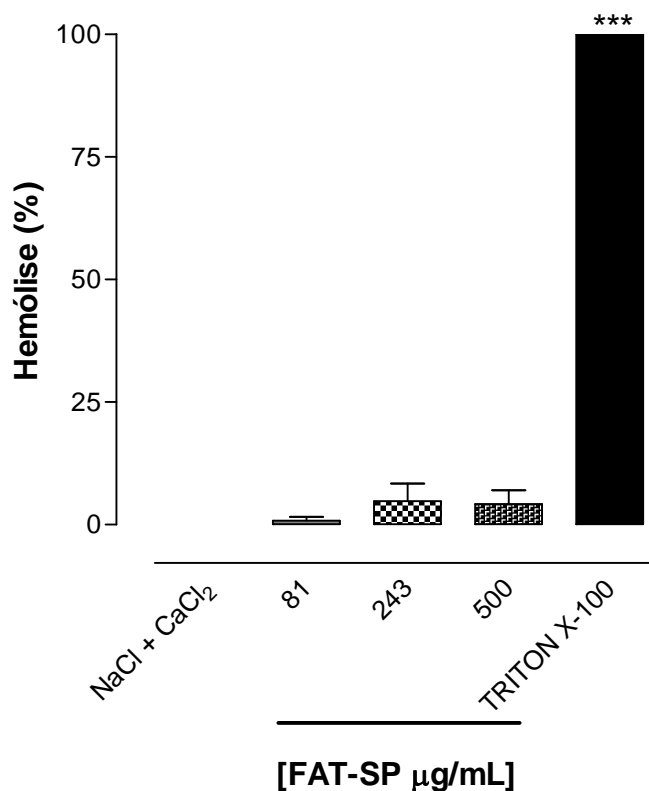


Gráfico 1 – Efeito hemolítico da FAT-SP em eritrócitos de rato ($n = 3$). Triton X-100 a 1% (controle positivo) e NaCl + CaCl₂ (controle negativo). As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle negativo vs. FAT-SP / controle positivo).

4.2 Triagem farmacológica preliminar

4.2.1 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata

A FAT-SP não inibiu de maneira significativa as contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (Gráfico 2A), mas inibiu de maneira significativa as contrações induzidas por 10^{-5} M de CCh (Gráfico 2B) em útero de rata. O valor do efeito máximo (E_{max}) da FAT-SP quando o útero de rata era pré-contraído com ocitocina foi de $4,0 \pm 3,5\%$, e o valor da CI_{50} quando o útero de rata era pré-contraído com CCh foi de $178,8 \pm 7,1$ $\mu\text{g/mL}$. A responsividade do útero ao agonista contrátil CCh testado foi restaurada 45 min após a retirada da FAT-SP da cuba na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (dados não mostrados).

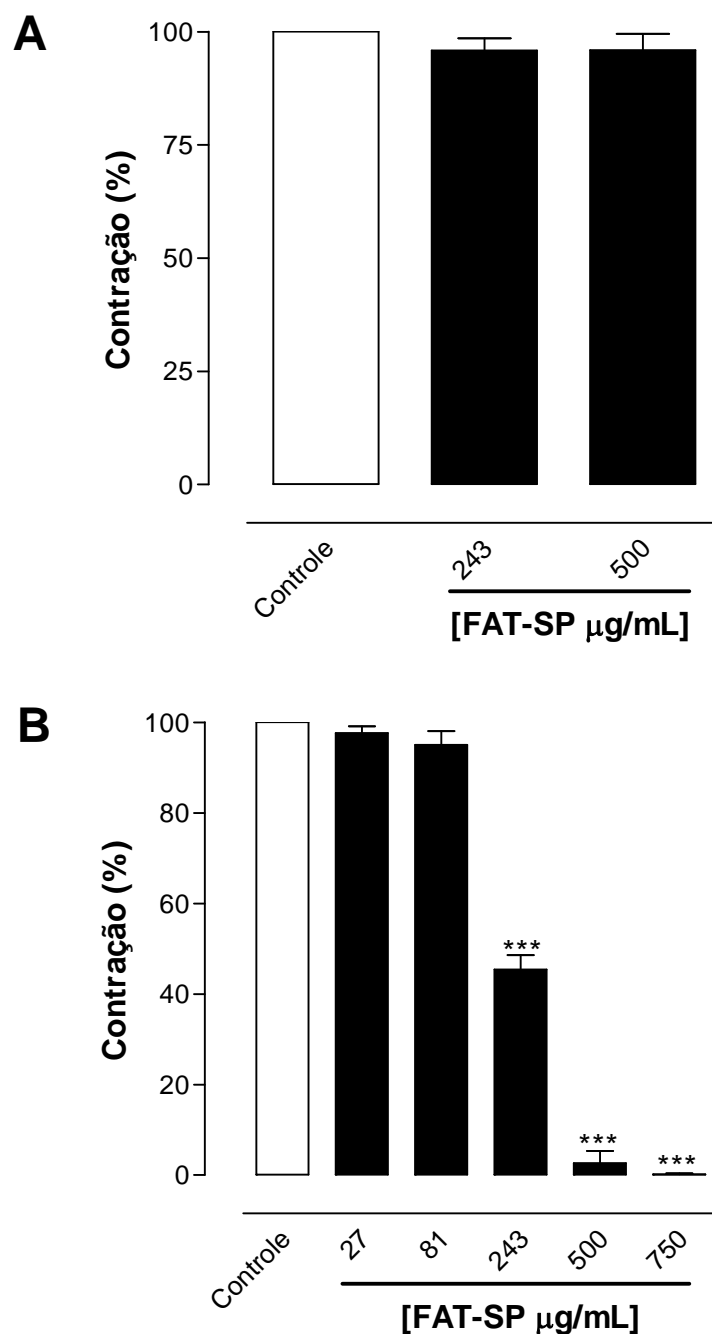


Gráfico 2 – Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**A**, $n = 3$) ou 10^{-5} M de CCh (**B**, $n = 5$) em útero isolado de rata. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. FAT-SP).

4.2.2 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traquéia isolada de cobaia

A FAT-SP relaxou a traquéia pré-contraída com CCh tanto na presença como na ausência de epitélio funcional de maneira dependente de concentração, apresentando valores de CE_{50} de $353,2 \pm 15,2$ e de $159,4 \pm 23,0$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo aproximadamente 2,2 vezes mais potente na ausência de epitélio funcional (Gráfico 3). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença de epitélio funcional foi de $126,3 \pm 10,2$ min, sendo estatisticamente diferente quando se removia o epitélio funcional ($72,2 \pm 11,4$ min). A contração induzida por CCh foi revertida em 80% após 1 hora da retirada da FAT-SP da cuba (dados não mostrados).

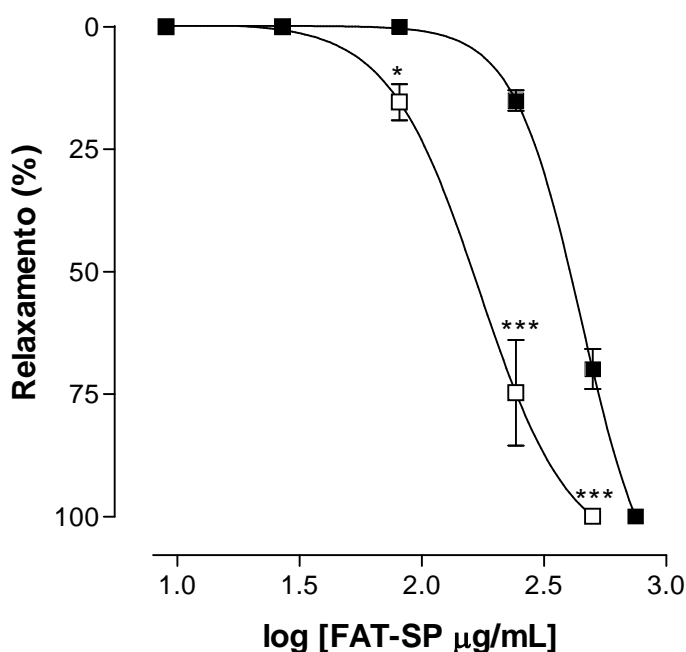


Gráfico 3 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de traquéia de cobaia pré-contraídos com 10^{-6} M de CCh na presença (■) ou na ausência (□) de epitélio funcional ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (com vs sem epitélio).

4.2.3 Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia

A FAT-ST inibiu $18,4 \pm 2,3\%$ as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de histamina até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 4A), por outro lado, inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de CCh (Gráfico 4B). O valor de CI_{50} da FAT-SP quando o íleo era pré-contraído com CCh foi de $129,8 \pm 3,7$ $\mu\text{g/mL}$. A responsividade do íleo ao agonista contrátil CCh testado foi restaurada 45 min após a retirada da FAT-SP da cuba na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (dados não mostrados).

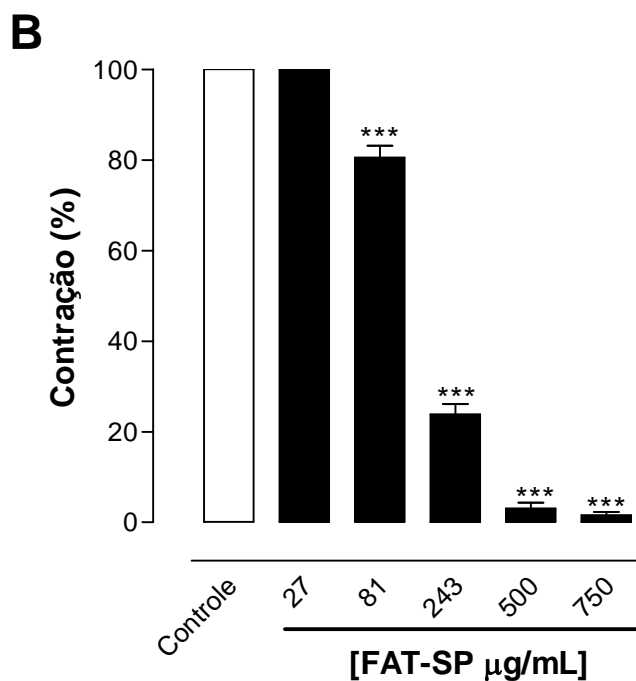
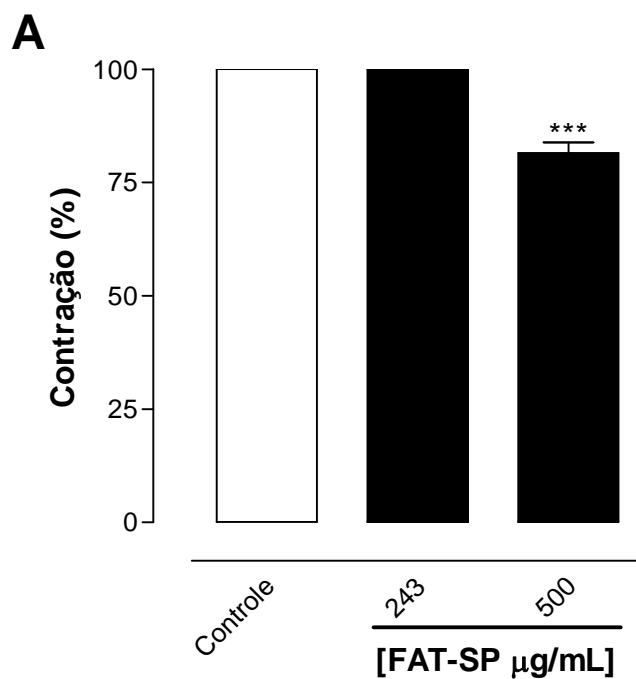


Gráfico 4 – Efeito da FAT-SP frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de histamina (**A**, $n = 3$) ou de CCh (**B**, $n = 5$) em íleo isolado de cobaia. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. FAT-SP).

4.2.4 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em anéis de aorta isolada de rato

A FAT-SP não alterou o tônus basal dos anéis de aorta isolado de rato, mas, relaxou-os quando pré-contraídos com 3×10^{-7} M de fenilefrina de maneira dependente de concentração tanto na presença ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) como na ausência ($CE_{50} = 242,8 \pm 11,7 \mu\text{g/mL}$) de endotélio funcional, sendo aproximadamente 3 vezes mais potente na presença de endotélio funcional (Gráfico 5). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença de endotélio funcional foi de $74,4 \pm 7,4$ min, sendo estatisticamente diferente quando se removia o endotélio funcional ($121,0 \pm 15,1$ min). A contração induzida por fenilefrina foi reversível após 30 min da retirada da FAT-SP da cuba (dados não mostrados).

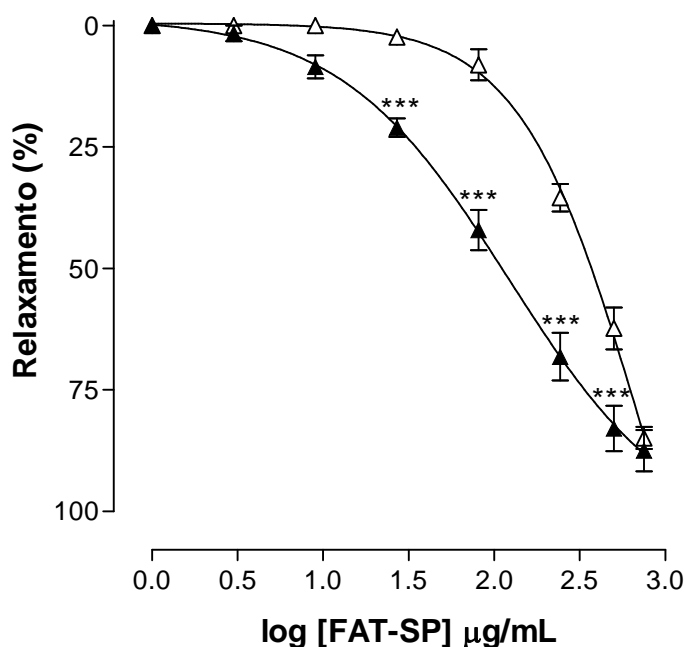


Gráfico 5 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato pré-contraídos com 3×10^{-7} M de fenilefrina na presença (\blacktriangle) e na ausência (\triangle) de endotélio funcional ($n = 5$). Os símbolos e barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (com vs sem endotélio).

4.3 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em íleo isolado de cobaia

4.3.1 Efeito da FAT-SP sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina

O relaxamento do íleo de cobaia promovido pela FAT-SP foi atenuado quando pré-contraído com 40 mM de KCl, apresentando um E_{max} de $28,6 \pm 2,8\%$. Por outro lado, a FAT-SP relaxou o íleo de cobaia de maneira dependente de concentração e significativa quando pré-contraído com 10^{-6} M de CCh ($CE_{50} = 37,4 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$) ou de histamina ($CE_{50} = 54,2 \pm 2,9 \mu\text{g/mL}$), apresentando uma potência relaxante cerca de 1,5 vezes maior quando o órgão era pré-contraído por CCh (Gráfico 6). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} foi de $30,5 \pm 6,4$ min e $41,8 \pm 5,0$ min para as preparações pré-contraídas com CCh e histamina, respectivamente. A contração induzida pelos agentes contráteis testados foi reversível após 45 min da retirada da FAT-SP da cuba (dados não mostrados).

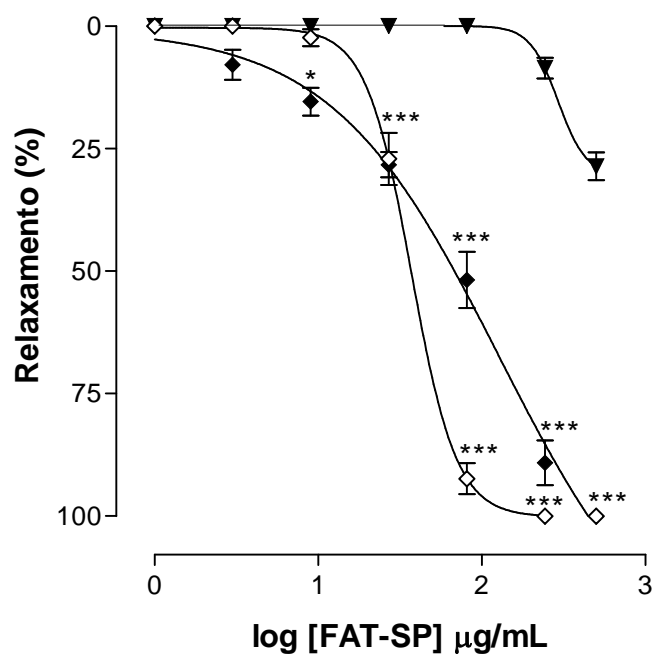


Gráfico 6 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl (▼), 10^{-6} M de CCh (◇) ou de histamina (◆) ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (CCh e histamina vs KCl; CCh vs histamina).

4.3.2 Efeito da FAT-SP frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh

A FAT-SP nas concentrações de 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações induzidas por CCh. As curvas cumulativas ao CCh foram desviadas para a direita de forma paralela, sem alteração do E_{max} (Figura 4 e Gráfico 7). Os valores de CE_{50} para o CCh foram de $1,5 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ M, na ausência da FAT-SP e $4,5 \pm 0,5 \times 10^{-7}$; $7,7 \pm 0,6 \times 10^{-7}$; $1,9 \pm 2,2 \times 10^{-6}$; $5,0 \pm 4,4 \times 10^{-6}$ e $9,0 \pm 2,3 \times 10^{-6}$ M na presença das concentrações 27, 81, 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Comparando-se os valores de CE_{50} do CCh observa-se diferença estatística na presença de 243, 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$ da FAT-SP (Gráfico 8).

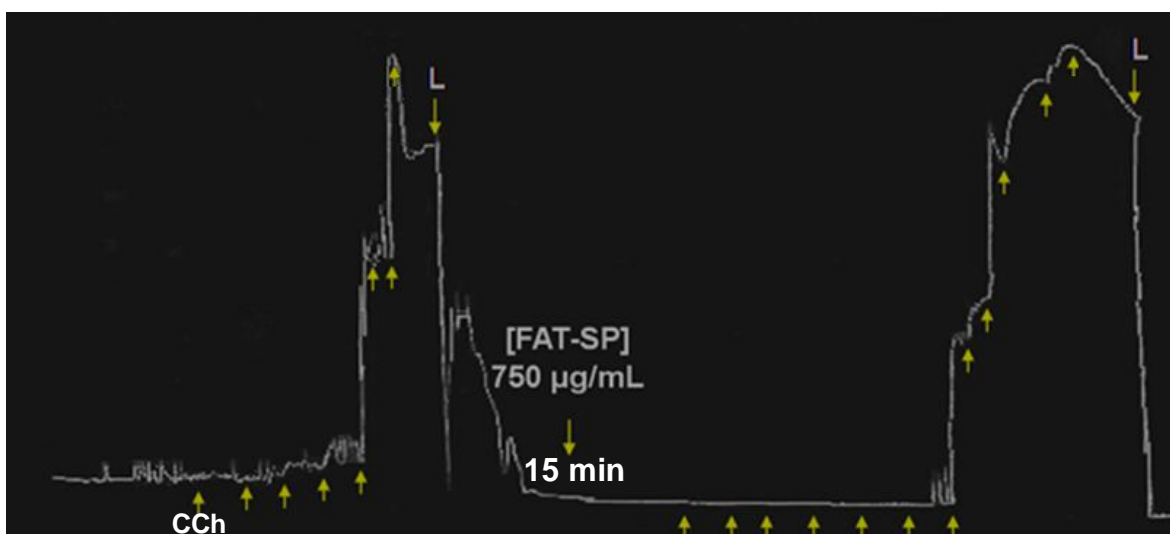


Figura 4 – Registro original representativo das curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na ausência (A) e na presença (B) de 750 $\mu\text{g/mL}$ da FAT-SP. As setas representam as concentrações cumulativas (10^{-9} – 3×10^{-4} M) em incrementos de três do CCh. L = lavagem

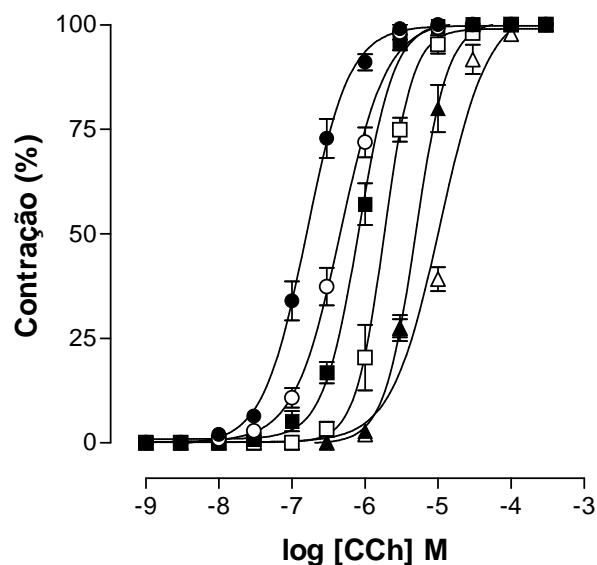


Gráfico 7 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh na ausência (●) e na presença da FAT-SP: 27 (○); 81 (■); 243 (□); 500 (▲) e 750 µg/mL (△), em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente.

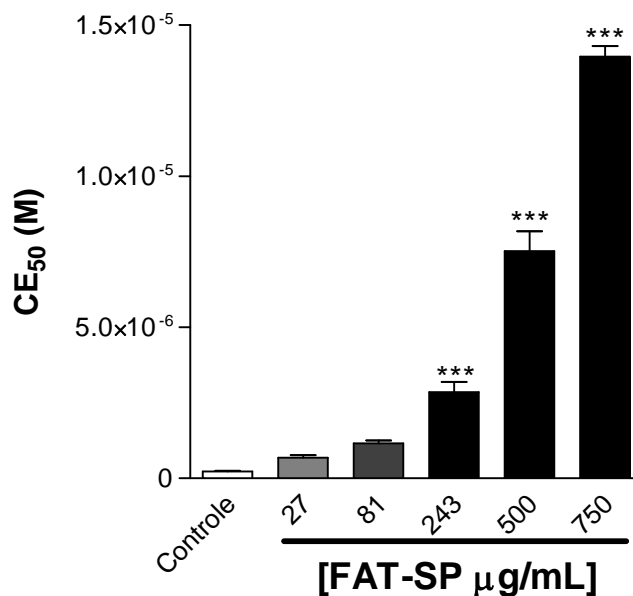


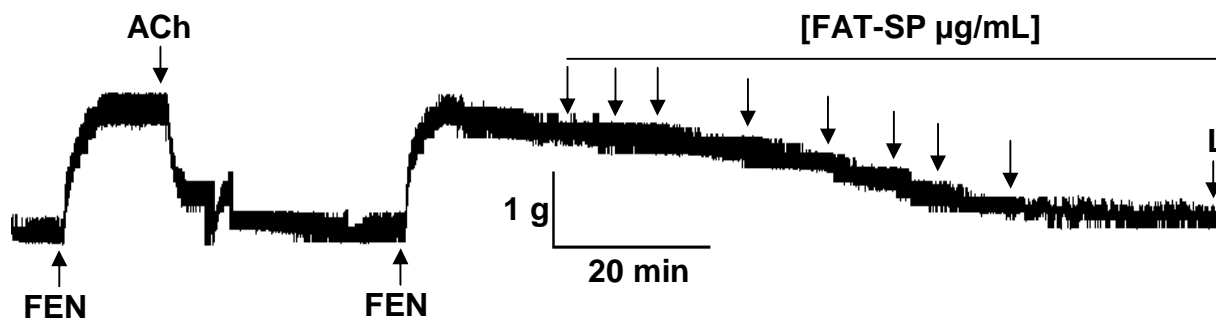
Gráfico 8 – Valores de CE_{50} do CCh na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações da FAT-SP. As colunas e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs. FAT-SP).

4.4 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP em anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional

4.4.1 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de atropina, indometacina ou L-NAME

O relaxamento promovido pela FAT-SP ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina, na presença de endotélio funcional, não foi atenuado na presença de indometacina um bloqueador da ciclooxigenase ($CE_{50} = 90,7 \pm 13,2 \mu\text{g/mL}$) ou de atropina, um antagonista dos receptores muscarínicos ($CE_{50} = 93,3 \pm 10,0 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 9A). Porém, foi atenuado com redução do E_{max} , na presença de L-NAME, um bloqueador da sintase do NO ($CE_{50} = 147,0 \pm 22,1 \mu\text{g/mL}$) (Figura 5 e Gráfico 9B). O tempo médio para que a FAT-SP alcançasse o seu E_{max} na presença do L-NAME foi de $92,3 \pm 10,4 \text{ min}$, não diferindo do tempo médio de relaxamento do controle ($74,4 \pm 7,4 \text{ min}$).

A



B

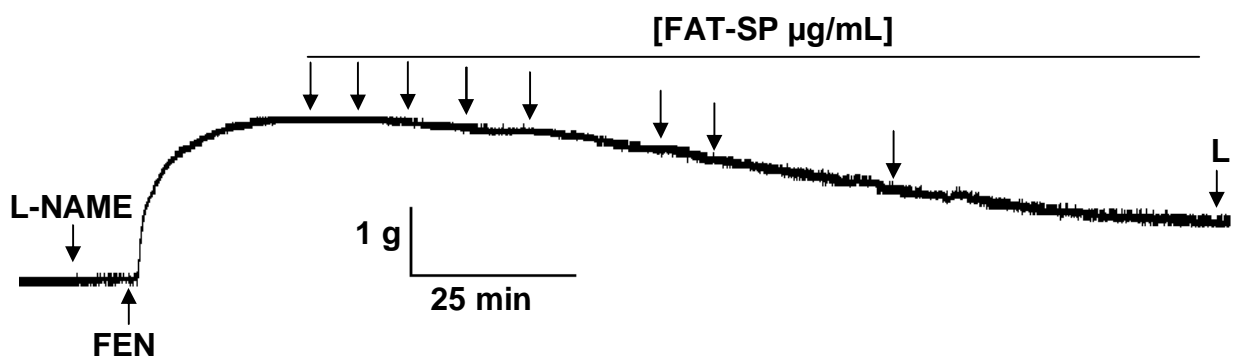


Figura 5 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (A) e na presença de L-NAME (10^{-5} M) (B). As setas representam as concentrações da FAT-SP em incrementos de três (1 - 750 µg/mL). FEN = fenilefrina e L = lavagem.

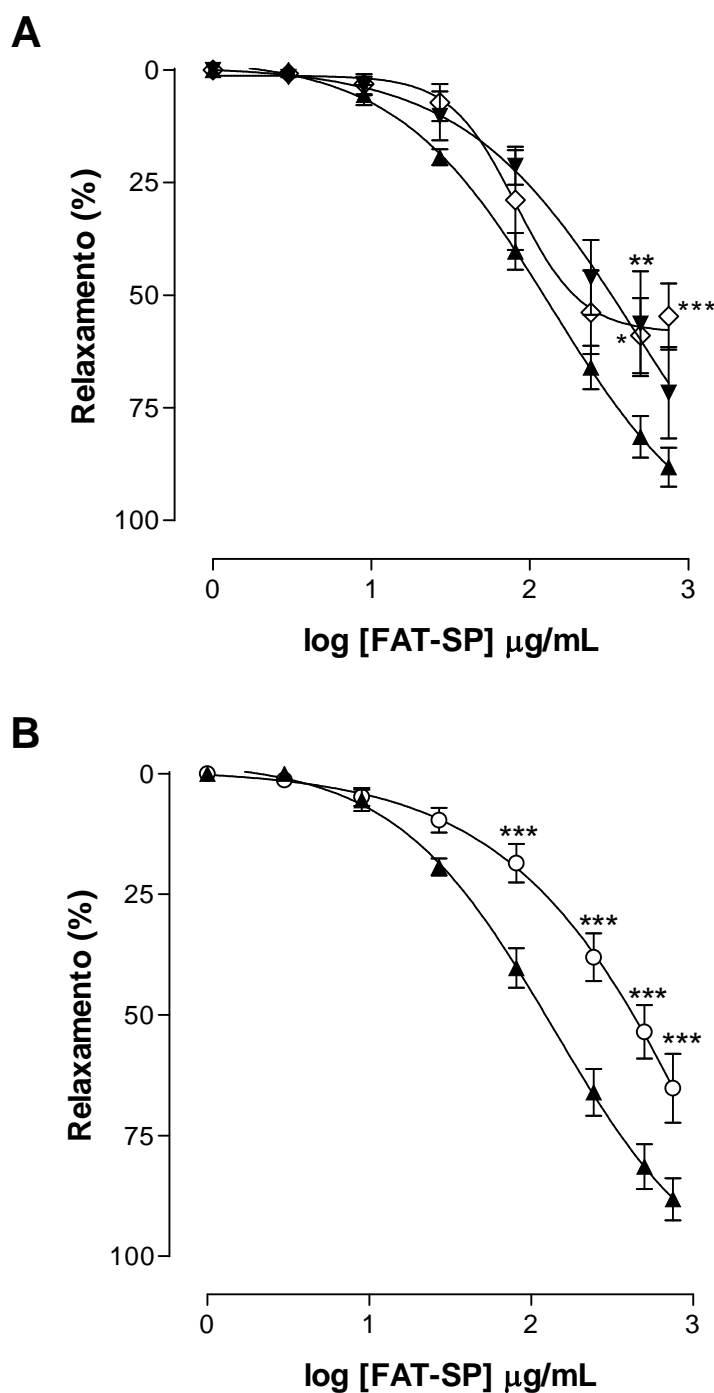


Gráfico 9 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta isolado de rato com endotélio funcional ($n = 5$) na ausência (\blacktriangle) e na presença de atropina (10^{-6} M) (\blacktriangledown) ou indometacina (10^{-5} M) (\diamond) em (A) e de L-NAME (10^{-5} M) (\circ) em (B). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs atropina, indometacina e L-NAME).

4.4.2 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença da hidroxocobalamina

Na presença do sequestrador de NO radicalar (hidroxocobalamina), o relaxamento promovido pela FAT-SP em anéis de aorta de rato pré-contraídos com fenilefrina na presença de endotélio funcional ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$) foi atenuado e com redução do E_{max} ($CE_{50} = 294,9 \pm 20,4 \mu\text{g/mL}$) (Figura 6 e Gráfico 10). Analisando os valores de CE_{50} observa-se que a potência da FAT-SP foi reduzida cerca de 4 vezes com a presença do sequestrador. O tempo médio de relaxamento foi de $100,9 \pm 7,8$ min diferente estatisticamente do tempo médio na ausência do sequestrador ($74,4 \pm 7,4$ min).

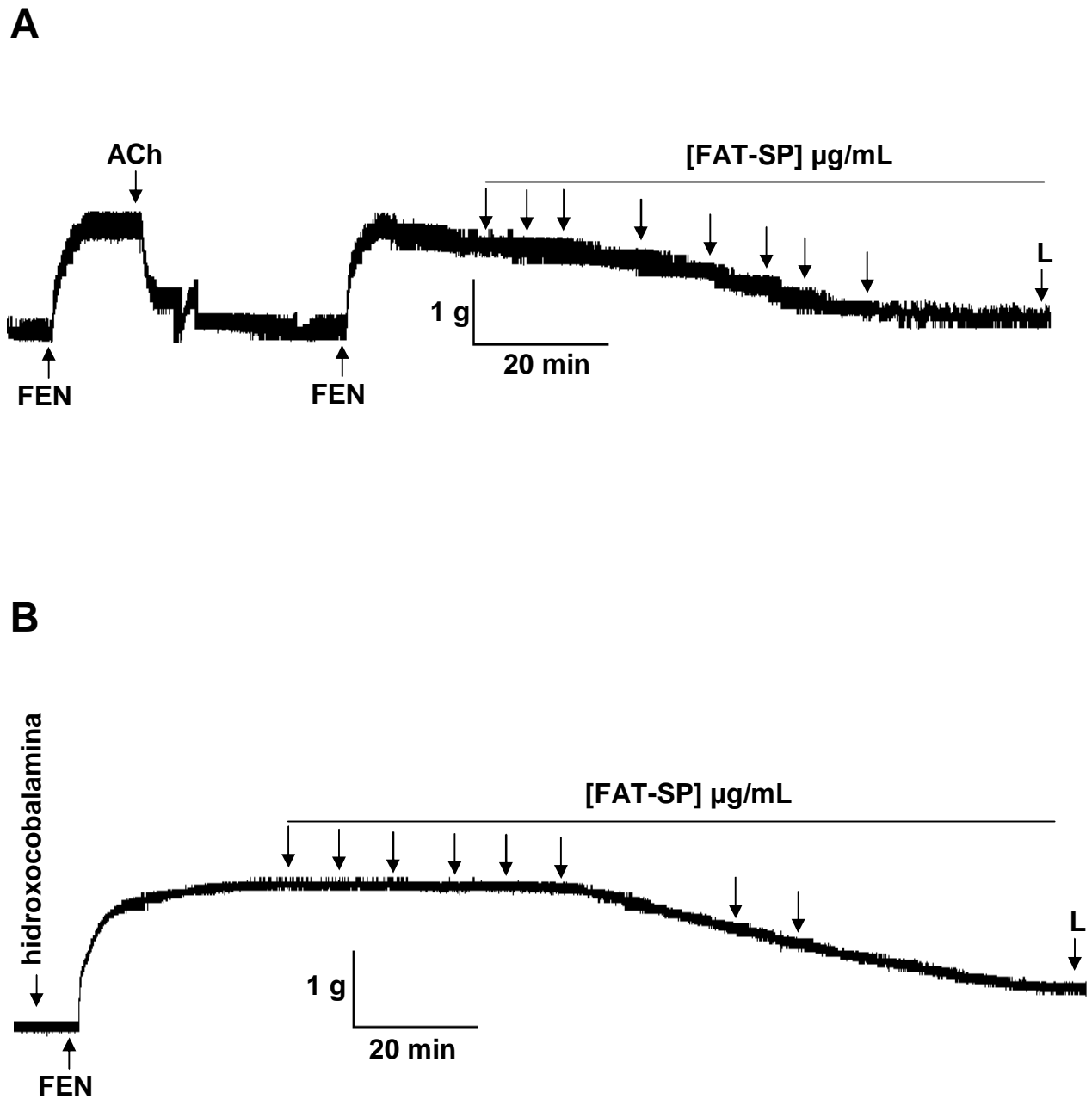


Figura 6 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (**A**) e na presença de hidroxocobalamina ($3 \times 10^{-5} \text{ M}$) (**B**). As setas representam as concentrações da FAT-SP em incrementos de três ($1 - 750 \mu\text{g/mL}$). FEN = fenilefrina e L = lavagem.

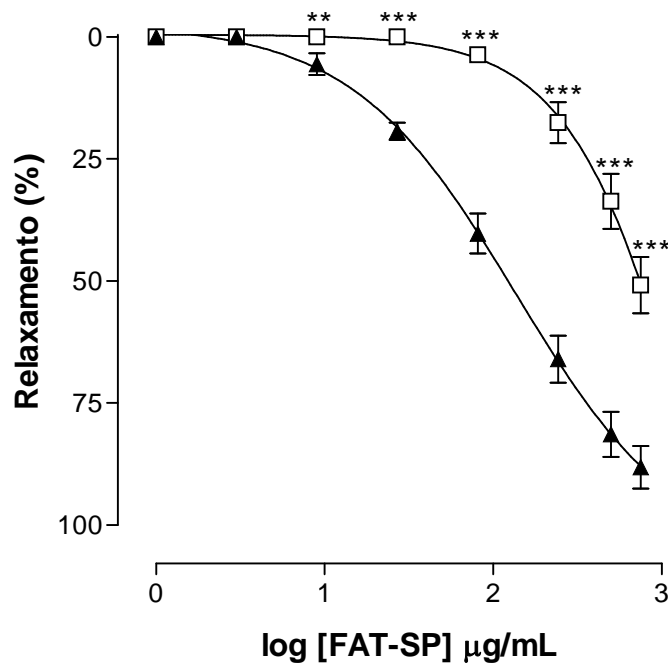


Gráfico 10 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato com endotélio funcional na ausência (▲) e na presença de hidroxocobalamina (3×10^{-5} M) (□) ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs hidroxocobalamina).

4.4.3 Efeito da FAT-SP na ausência e na presença de ODQ

O relaxamento induzido pela FAT-SP em anéis de aorta de rato pré-contráídos com fenilefrina, na presença de endotélio funcional ($CE_{50} = 75,4 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$), foi atenuado e com redução do E_{max} na presença de ODQ, um inibidor seletivo da ciclase de guanilil solúvel ($CE_{50} = 228,2 \pm 30,9 \mu\text{g/mL}$) (Figura 7 e Gráfico 11). Analisando os valores de CE_{50} observa-se que a potência da FAT-SP foi reduzida cerca de 3 vezes com a presença do inibidor. O tempo médio de relaxamento foi de $116,5 \pm 11,3$ min diferente estatisticamente do tempo médio na ausência do bloqueador ($74,4 \pm 7,4$ min).

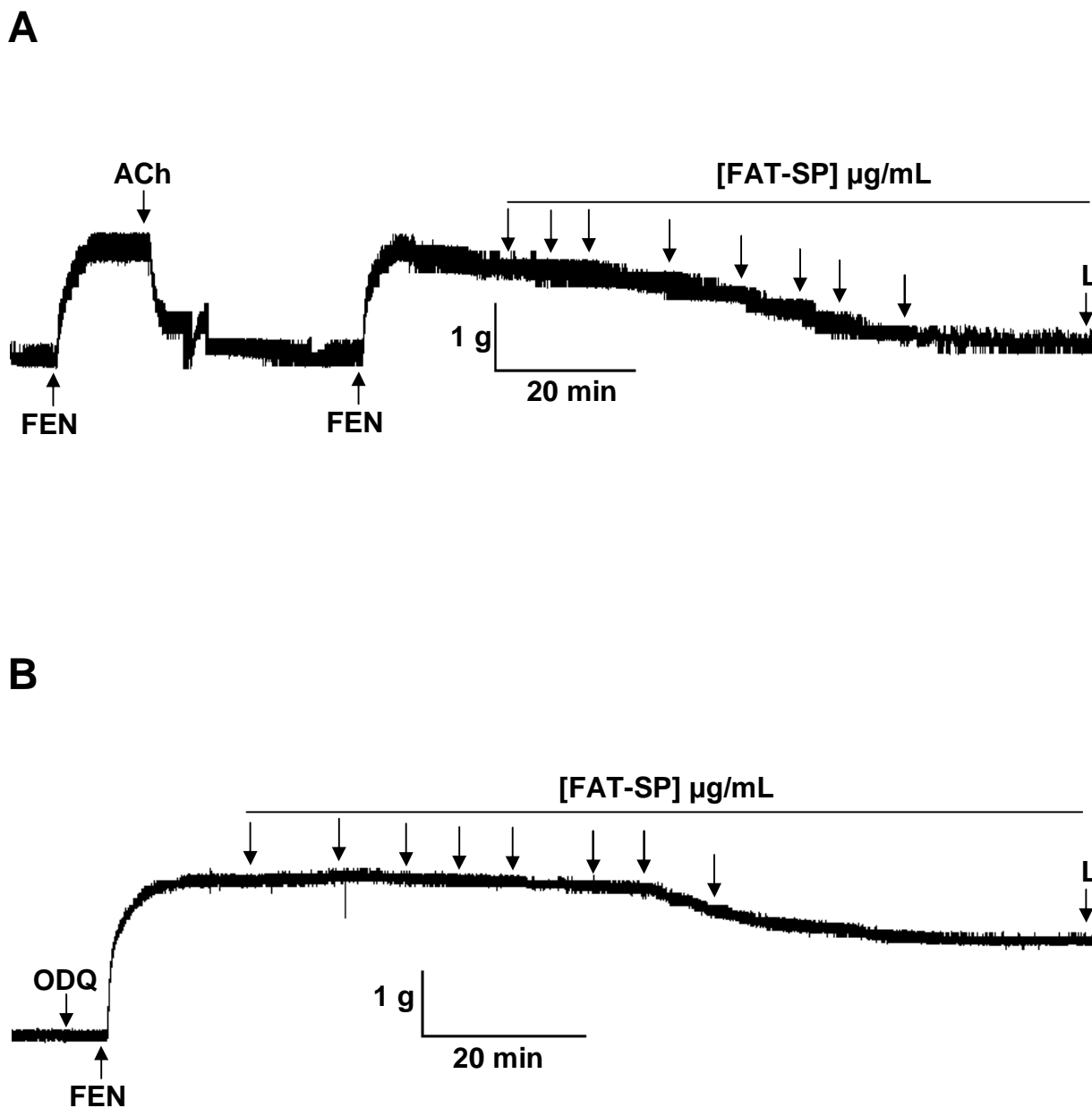


Figura 7 – Registros originais representativos do efeito relaxante da FAT-SP na ausência (**A**) e na presença (**B**) de ODQ. As setas representam as concentrações da FAT-SP em incrementos de três (1 - 750 $\mu\text{g/mL}$). FEN = fenilefrina e L = lavagem.

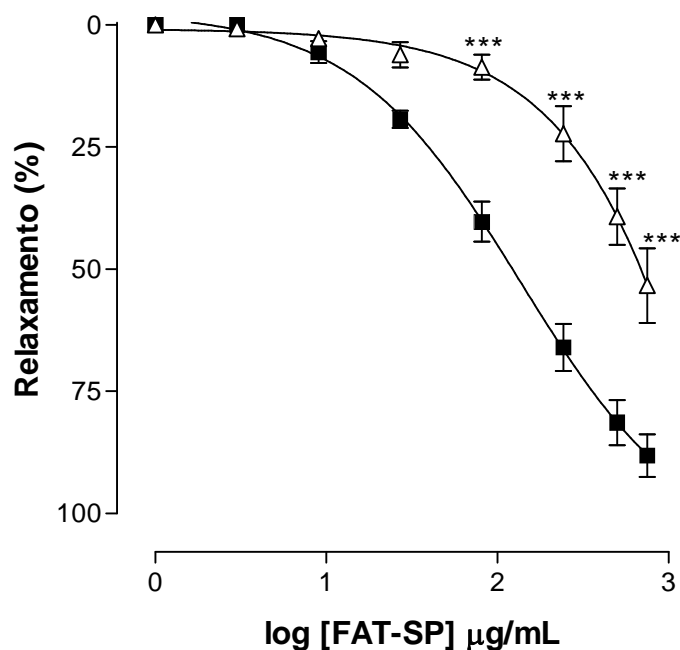


Gráfico 11 – Efeito relaxante da FAT-SP sobre os anéis de aorta de rato ($n = 5$) com endotélio funcional na ausência (▲) e na presença de ODQ (10^{-5} M) (Δ). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o erro padrão da média, respectivamente. ANOVA “two way” seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle vs ODQ).

Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados os efeitos citotóxico em eritrócitos de rato e espasmolítico sobre os músculos lisos (uterino, respiratório, intestinal e vascular) da fração de alcalóides totais obtida da casca da raiz de *S. paludosum* Moric. (FAT-SP). Demonstra-se, pela primeira vez, que a FAT-SP apresenta efeito espasmolítico não seletivo, sendo mais potente em íleo isolado de cobaia e aorta isolada de rato, sem apresentar hemólise em eritrócitos de ratos até a concentração de 500 µg/mL.

Baseado no fato de que vários estudos apontam os glicoalcalóides como compostos que podem causar toxicidade em humanos (MORRIS; LEE, 1984), bem como muitos serem citotóxicos, como por exemplo, solamargina de *Solanum incanum* Chinese que possui atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e em fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000), avaliou-se inicialmente o efeito citotóxico da FAT-SP nas concentrações de 81, 243 e 500 µg/mL em eritrócitos de ratos. Esse estudo preliminar permitiu uma escolha segura nas concentrações utilizadas nos protocolos experimentais realizados com o objetivo de investigar o possível efeito espasmolítico.

O eritrócito ou glóbulo vermelho sanguíneo contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991). Por essa razão, é esperado que a sua membrana tenha uma alta vulnerabilidade a reações envolvendo radicais livres e seja muito suscetível a hemólise (BRANDÃO et al., 2005). Os eritrócitos fornecem um modelo simples para estudar efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; EISELE et al., 2006).

Como o eritrócito é muito suscetível a hemólise, a ausência de atividade hemolítica apresentada pela FAT-SP (Gráfico 1) é um indício de que o efeito espasmolítico investigado não é consequência de uma lise das células do tecido isolado, e além disso, provavelmente apresente pouca ou nenhuma toxicidade quando da necessidade da realização de testes *in vivo*.

Em estudos anteriores realizados no LTF/UFPB foi demonstrado que os extratos, fases e flavonoídes isolados das partes aéreas de *S. paludosum* apresentaram atividade espasmolítica não seletiva em músculos lisos de útero isolado de rata, aorta isolado de rato, traquéia e íleo isolados de cobaia (SILVA et al., 2002; DUARTE et al., 2003; SILVA, 2005; SANTOS, 2006). Além disso, foi realizado um estudo com o extrato etanólico e sua fase aquosa obtidos das cascas das raízes de *S. paludosum* por Ataíde (1982) o qual observou ação antimuscarínica em jejuno isolado de rato e hipotensora em ratos. Com o intuito de contribuir com o estudo farmacológico de *S. paludosum*, e principalmente aprofundar os estudos realizados com a casca da raiz desta espécie, decidiu-se avaliar a atividade espasmolítica da FAT-SP em outros tipos de músculos lisos.

Através da triagem farmacológica preliminar pode-se avaliar a faixa e a predominância do efeito de produtos de plantas ou derivado destes. Esta triagem foi realizada em músculos lisos uma vez que estes estão presentes em vários órgãos ociosos dos sistemas do corpo de animais ou humanos controlando vários processos fisiológicos (WEBB, 2003), tais como peristaltismo intestinal, tônus basal das artérias e da traquéia, trabalho de parto ou pós-parto entre outras, cujas desregulações estão implicadas em doenças como disenteria, cólicas intestinais, hipertensão, asma, parto pré-maturo, cólicas uterinas. Além disso, são preparações de fácil manipulação e se pode avaliar na íntegra a presença ou ausência do efeito espasmolítico.

Estima-se que a incidência de abortamento situa-se em torno de 16 a 30% das gestações reconhecidas. O abortamento é definido como a ocorrência de sangramento vaginal na primeira metade da gestação acompanhado ou não de cólicas abdominais (WATANABE et al., 2002). A hiperatividade uterina antes do tempo pré-dispõe as grávidas ao trabalho de parto prematuro. Contrações uterinas inadequadas podem impedir o trabalho de parto e aumentar a incidência de emergências das cesarianas e hemorragias pós-parto, com perigo potencial para a mãe e para o feto (WRAY, 1993). As contrações uterinas fortes e regulares são essenciais para a iniciação do trabalho de parto bem como, manutenção e eventual expulsão do feto e da placenta durante o nascimento.

Com a finalidade de investigar um possível efeito espasmolítico da FAT-SP em útero isolado de rata, avaliou-se o seu efeito frente às contrações uterinas induzidas por ocitocina ou CCh, onde foi observado que a FAT-SP inibiu seletivamente as contrações induzidas por CCh, quando comparado com a contração induzida por ocitocina (Gráfico 2). Resultado semelhante foi obtido por Silva et al., (2002) com o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *S. paludosum*.

Um dos mais importantes tipos celulares envolvidos em patologias das vias aéreas são as células musculares lisas. Uma característica importante destas células é sua habilidade em alterar seu fenótipo em resposta a diferentes estímulos (HIRST; TWORT; LEE, 2000). Este tipo de célula está implicado no desenvolvimento da asma. A asma é uma doença clínica complexa caracterizada pela obstrução das vias aéreas, inflamação e hiper-responsividade a uma variedade de estímulos farmacológicos como a histamina e metacolina, bem como a estímulos físicos como exercícios (HARGREAVE et al., 1981; BHARADWAJ; AGRAWAL, 2004).

Com o intuito de se investigar uma possível atividade relaxante da FAT-SP sobre a musculatura das vias aéreas, investigou-se seus efeitos sobre a traquéia isolada de cobaia. A FAT-SP apresentou efeito espasmolítico tanto na presença como na ausência de epitélio funcional, sendo mais potente na ausência do mesmo (Gráfico 3), sugerindo assim que de alguma forma a presença do epitélio dificulta o efeito relaxante promovido pela FAT-SP. Resultado diferente foi obtido por Duarte et al., (2003) com a fase acetato de etila obtido das partes aéreas de *S. paludosum*, que relaxou a traquéia de cobaia tanto na presença como na ausência de epitélio funcional de maneira equipotente quando realizou o mesmo protocolo experimental.

A diarreia é um problema de saúde frequente (FARTHING, 2000), e ainda é uma das principais ameaças à saúde em populações pobres de países tropicais e subtropicais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que 3-5 bilhões de casos ocorrem anualmente (1 bilhão de crianças menores de 5 anos) e cerca de 5 milhões de mortes ocorrem devido a diarreia anualmente (2,5 milhões de crianças menores de 5 anos) (HEINRICH et al., 2005; ESTRADA-SOTO et al., 2007).

Alguns agentes antidiarréicos são conhecidos por apresentar efeito antiespasmódico (HAJHASHEMI et al., 2000), como por exemplo, difenoxilato (Lomotil[®]) e loperamida (Imosec[®]), entretanto podem causar depressão do Sistema Nervoso Central (RYU et al., 2004). Sem contar com os antiespasmódicos ou espasmolíticos clássicos como o extrato fluido de beladona (Elixir Paregórico[®]), tintura de ópio, atropina, escopolamina (Buscopan[®]), papaverina, diciclomina (Bentyl[®]), dentre outros que também apresentam efeitos centrais (BROWN; TAYLOR, 2006).

Diante disso, decidimos investigar um possível efeito espasmolítico da FAT-SP em íleo isolado de cobaia. A FAT-SP apresentou efeito espasmolítico mais potente quando o órgão foi contraído com CCh em relação a contração induzida por histamina (Gráfico 4). Resultado diferente foi obtido quando este mesmo protocolo experimental foi realizado com extratos e flavonóides isolados das partes aéreas de *Solanum paludosum* que apresentaram efeito espasmolítico equipotente frente aos mesmos agonistas testados (DUARTE et al., 2003; SANTOS et al., 2006).

A hipertensão é considerada um dos principais agravos à saúde no Brasil, sendo responsável pela maioria das mortes. Suas complicações, tais como doenças cérebro-vascular, arterial coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica elevam os custos dos serviços assistencialistas (BLOCH; RODRIGUES; FISZMAN, 2006).

A pressão arterial é definida como o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total. A resistência ao fluxo sanguíneo na circulação é regulado principalmente pelo tônus vascular (SANTOS et al., 2007), que portanto irá regular a pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo. O tônus vascular, por sua vez, é regulado por hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea, além dos canais iônicos (JACKSON, 2000). Tendo-se em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento de hipertensão arterial, busca-se novas drogas que sejam potentes, eficazes e com menos efeitos colaterais ou que sirvam como

ferramenta farmacológica para o entendimento do processo fisiopatológico das doenças cardiovasculares.

Com base nessas premissas, foi-se investigar se a FAT-SP estaria alterando o tônus vascular e se relaxaria a aorta isolada de rato no estado pré-contráido. A presença da FAT-SP não alterou o tônus basal da aorta de rato, entretanto induziu relaxamento tanto na presença como na ausência de endotélio funcional, sendo 3 vezes mais potente na presença de endotélio funcional (Gráfico 5), sugerindo a participação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), mas também um outro mecanismo independente de endotélio. Resultado semelhante foi obtido por Silva (2005) com a fase acetato de etila obtida das partes aéreas de *S. paludosum*, mas não por outros tipos de extratos e flavonóides isolados das mesmas partes.

Analisando os parâmetros de potência da triagem farmacológica preliminar, constata-se que a FAT-SP foi mais potente em íleo de cobaia e em aorta de rato. Assim, decidiu-se investigar o mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP nestes órgãos.

O espasmo é caracterizado por uma contração muscular e no músculo liso essa contração ocorre após a elevação da concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em virtude da abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) presentes na membrana plasmática ou devido a sua liberação do retículo sarcoplasmático (RS) controlada por mensageiros secundários, por exemplo o IP_3 e o Ca^{2+} . A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_i$ para disparar uma resposta contrátil no músculo liso está relacionada com dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: (1) acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança de potencial de membrana (V_m) e (2) acoplamento fármaco-mecânico quando a contração induzida por um agonista é sempre maior que a observada só com a mudança de V_m (REMBOLD, 1996).

A contração no músculo liso em resposta a vários agentes é frequentemente composta por duas fases: um componente fásico, rápido e não sustentado, seguido por um componente tônico, lento e sustentado (para revisão ver VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979).

O componente fásico é devido em parte ao Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e o componente tônico é devido principalmente ao Ca^{2+} oriundo do meio extracelular que entra na célula através dos Ca_v ou, independente deste, pela via de sensibilização ao Ca^{2+} (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996; WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A probabilidade de abertura dos Ca_v é favorecida por uma despolarização de membrana por estímulo mediado por acoplamento fármaco e eletromecânico (REMBOLD, 1996).

Para verificar se a FAT-SP promoveria relaxamento do íleo pré-contraído, o que seria sugestivo, em nível funcional, de bloqueio de influxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática, avaliou-se seus efeitos sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por 40 mM de KCl (acoplamento eletromecânico) e por 10^{-6} M de carbacol ou de histamina, que agem por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) (BOLTON et al., 1981) em íleo isolado de cobaia. E o observado foi que a FAT-SP não foi eficaz ($E_{\text{max}} = 28,6 \pm 2,8\%$) em relaxar o íleo pré-contraído com KCl, entretanto relaxou de maneira dependente de concentração o íleo pré-contraído com CCh ou histamina, sendo mais potente para CCh (Gráfico 6).

Diante do fato da FAT-SP não produzir relaxamento do íleo pré-contraído com KCl e aliado ao fato de que o principal mecanismo pelo qual o KCl induz contração é a abertura dos Ca_v via despolarização de membrana, descarta-se a hipótese de bloqueio dos Ca_v . Por outro lado, a FAT-SP foi mais potente contra CCh tanto frente as contrações fásicas (Gráfico 5) quanto às tônicas (Gráfico 6) em comparação à histamina.

Tomados em conjunto estes dados, levantou-se a hipótese de que a FAT-SP pudesse estar agindo mais seletivamente nos receptores muscarínicos para produzir este efeito espasmolítico. Para confirmar esta hipótese avaliou-se o efeito da FAT-SP frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh. E o observado foi que a FAT-SP antagonizou o efeito do CCh, deslocando a curva concentração-resposta cumulativa ao CCh para direita, de maneira paralela e sem alterar o E_{max} (Figura 4; Gráfico 7), o que é característico, em nível funcional, de

antagonismo competitivo dos receptores muscarínicos. Este resultado difere dos obtidos por Duarte et al., (2003) e Santos et al., (2006), mas são semelhantes aos obtidos por Ataíde (1982). Os primeiros autores testaram extratos e flavonóides isolados das partes aéreas de *S. paludosum* em íleo isolado de cobaia e mostraram que o mecanismo provalvemente envolve a participação dos Ca_v ou do NO. E o último autor testou o extrato etanólico e sua fase aquosa obtidos da casca da raiz de *S. paludosum* que apresentaram ação antimuscarínica em jejuno de rato.

Os antagonistas competitivos naturais dos receptores muscarínicos utilizados na terapêutica, como a atropina e a escopolamina, atuam de maneira não seletiva, apresentando vários efeitos colaterais. As contrações intestinais são reguladas principalmente pela ativação dos receptores muscarínicos e a desregulação do peristaltismo causa problemas como diarreia e cólicas, portanto é de extrema importância a busca de novas substâncias ou complexo de substâncias que venham a diminuir estes problemas (BROWN; TAYLOR, 2006).

Dando prosseguimento a investigação do mecanismo de ação espasmolítica da FAT-SP, passamos a avaliá-lo em aorta de rato. O endotélio dos vasos tem um papel fundamental no controle do tônus vascular e da pressão arterial. As células endoteliais liberam substâncias vasodilatadoras em resposta a uma variedade de estímulos fisiológicos, como à bradicinina, à acetilcolina, à histamina, à substância P, ao estresse por cisalhamento e ao estiramento pulsátil (VANHEEL; VAN DE VOORDE, 2000). Dentre estes fatores relaxantes derivados do endotélio estão bem identificados, o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) e a PGI_2 (DUSTING; MONCADA; VANE, 1977).

Como o efeito vasorelaxante da FAT-SP em anéis de aorta isolada de rato foi dependente de endotélio funcional realizou-se contrações com fenilefrina na presença e na ausência dos bloqueadores indometacina, inibidor não seletivo da ciclooxigenase (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 1996), atropina, antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos (JAISWAL et al., 1991) e L-NAME, análogo da L-arginina não hidrolizável pela sintase do NO endotelial (eNOS) (REES et al., 1990).

Observou-se que na presença da indometacina ou da atropina, não houve atenuação do efeito vasorelaxante da FAT-SP de maneira significativa (Gráfico

9A), sugerindo que não há a participação da prostaciclina (PGI_2) oriunda da ciclooxigenase no mecanismo de ação espasmolítica da fração e que a fração não está interagindo com os receptores muscarínicos endoteliais para aumentar a $[Ca^{+2}]_i$ e subsequentemente ativar a eNOS e promover o vasorelaxamento. No entanto observou-se que o efeito vasorelaxante da FAT-SP foi atenuado na presença de L-NAME (Gráfico 9B), mas não abolido, indicando assim a participação da eNOS no efeito vasorelaxante da FAT-SP.

No relaxamento promovido pela acetilcolina em artéria carótida de coelho, foi mostrado que a aplicação de 3×10^{-5} M de L-NAME, uma concentração considerada geralmente suficiente para inibir a eNOS, diminuiu mas não aboliu a liberação de NO (COHEN et al., 1997). Os inibidores da eNOS têm grande importância na pesquisa dos prováveis efeitos do NO nos tecidos, uma vez que a substituição do substrato habitual (L-arginina) pelos análogos irá inibir a produção de NO e seus efeitos subsequentes (FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

O fato do vasorelaxamento não ter sido abolido na presença de L-NAME suscita a idéia de que há a participação de outras vias de ativação da eNOS, como a ativação dos receptores de bradicinina, ou outras fontes de liberação do NO como o citocromo P450 (SCHOTT et al., 1994) e produção não-enzimática a partir da redução química de nitrito (WEITZBERG; LUNDBERG, 1998)

A sintase do NO (NOS) é a enzima responsável pela oxidação da L-arginina à L-citrulina com formação de NO. A reação se processa em duas etapas: a primeira envolve a hidroxilação do nitrogênio guanetídico terminal da L-arginina, formando N^G -hidroxi-L-arginina (NOH-L-Arg; a nomenclatura N^G significa que o grupo hidroxila está ligado ao nitrogênio do grupo guanidina) e na segunda etapa da reação a NOH-L-Arg é metabolizada formando L-citrulina e NO (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). Ambos os passos requerem oxigênio molecular (O_2) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-substratos, além de tetraidrobiopterina (BH_4), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferro-protoporfirina IX (heme) como cofatores (STUEHR; GRIFFITH, 1992).

A família da NOS é constituída de três isoenzimas distintas: as isoformas endoteliais (eNOS ou NOS-III) e neuronais (nNOS ou NOS-I), ambas

constitutivas e dependentes do complexo Ca^{2+} -calmodulina ($\text{Ca}^{+2}_4\text{-CaM}$) e uma isoforma induzível (iNOS ou NOS-II). Estas três isoenzimas apresentam grande homologia estrutural, podendo ser divididas em dois domínios: um redutor, na parte C-terminal, e outro oxidante, na parte N-terminal. No domínio redutor estão os sítios de ligação para o NADPH e os cofatores FAD e FMN, os quais transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o BH_4 e o substrato L-arginina (BARRETO; CORREIA; MUSCARÁ, 2005). A ligação do complexo $\text{Ca}^{+2}_4\text{-CaM}$ entre os domínios redutor e oxidante favorece o alinhamento entre eles, o que permite a transferência de elétrons das flavinas para o grupo heme (ABU-SOUD; STUEHR, 1993).

O NO se apresenta em três variedades de espécies químicas: a forma radicalar (NO^\bullet), íons nitroxyl (NO^-) e nitrosonium (NO^+) (BONAVENTURA et al, 2007; WANSTALL et al. 2001). Segundo Feelisch e cols. (1994), a forma de NO derivada do endotélio funcional predominante é a radicalar. Portanto, foi utilizado um sequestrador do NO radicalar, a hidroxocobalamina, para investigar a participação do NO no relaxamento produzido pela FAT-SP em aorta isolada de rato. A hidroxocobalamina apresenta uma cobalamina oxidada (Cbl(III)) em sua estrutura que inativa o NO após formar o complexo Cbl(III)NO, impedindo assim a atuação do NO no relaxamento do músculo liso vascular. Como o efeito relaxante promovido pela FAT-SP foi atenuado na presença de hidroxocobalamina (Gráfico 10), verifica-se que o efeito espasmolítico da FAT-SP envolve a participação do NO.

O NO formado pode promover efeito vasorelaxante através da ativação da ciclase de guanilil (GC) solúvel, com conseqüente aumento na concentração intracelular do GMPc (LOHSE et al., 1998), ou através da ativação direta de canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; PLANE et al., 1996; MISTRY; GARLAND, 1998; HOMER; WANSTALL, 2000). Diante disso, investigou-se o efeito relaxante da FAT-SP na presença de ODQ, um bloqueador seletivo da GC solúvel (GARTHWAITE et al., 1995). Como o relaxante promovido pela FAT-SP foi atenuado (Gráfico 11), sugere-se que há o envolvimento da via GC-GMPc no efeito relaxante da FAT-SP.

O aumento na $[\text{GMP}_c]$ por sua vez ativa a proteína cinase G (PKG). De acordo com a literatura, a PKG fosforila substratos protéicos, levando à abertura de

canais de K^+ , bloqueio de canais de Ca^{2+} (Ca_v), ativação de bombas (Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática e membrana do retículo sarcoplasmático) (HOFMANN; AMMENDOLA; SCHLOSSMANN, 2000; LINCOLN; KOMALAVILAS, 2000) e ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} na membrana plasmática e membrana do retículo sarcoplasmático (BLAUSTEIN, 1989), gerando com isso a diminuição da $[(Ca^{2+})_i]$ levando ao relaxamento do músculo. Além disso, a PKG fosforila a MLCK impedindo sua ativação pelo complexo Ca^{2+}_4 -CaM (VAN RIPER; MCDANIEL; REMBOLD, 1997).

Com os dados aqui apresentados pode-se afirmar que os objetivos propostos foram alcançados, uma vez que se presta uma grande contribuição à farmacologia do gênero *Solanum*, através da demonstração pela primeira vez que a FAT-SP não possui metabólitos com potencial citotóxico e exerce efeito espasmolítico em íleo de cobaia, provavelmente por antagonismo competitivo aos receptores muscarínicos, e em aorta de rato, por envolver a via NO/GC.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

No estudo da investigação dos efeitos citotóxico em eritrócitos de ratos e espasmolítico em músculos lisos da fração de alcalóides totais (FAT-SP) pode-se concluir que a FAT-SP:

- ✓ Não apresenta atividade hemolítica em eritrócitos de rato;
- ✓ Apresenta atividade espasmolítica não seletiva em útero de rata, aorta de rato, traquéia e íleo de cobaia sendo mais potente em íleo de cobaia e aorta de rato;
- ✓ Em íleo de cobaia o efeito espasmolítico parece ser devido ao antagonismo dos receptores muscarínicos em nível funcional;
- ✓ Em aorta de rato o efeito espasmolítico envolve a participação da via NO/GC em nível funcional;
- ✓ Estes resultados são inéditos no âmbito dos estudos toxicológico e farmacológico da espécie *Solanum paludosum* Moric.

Perspectivas

7 PERSPECTIVAS

➤ Em nível funcional

✓ Aorta de rato

1. Avaliar o efeito relaxante da FAT-SP na dependência de concentração do L-NAME
2. Verificar a reversibilidade do efeito relaxante da FAT-SP na presença de L-arginina
3. Medir os níveis teciduais de GMPc em anéis de aorta de rato na ausência e na presença da FAT-SP
4. Investigar a participação da proteína cinase dependente de nucleotídeos cíclicos de guanina (PKG) no relaxamento produzido pela FAT-SP

✓ Íleo de cobaia

1. Investigar o subtipo de receptor muscarínico envolvido no antagonismo competitivo apresentado pela FAT-SP
2. Investigar a participação da via não-adrenérgica, não-colinérgica (NANC) no relaxamento promovido pela FAT-SP
3. Investigar a participação dos canais de potássio no relaxamento produzido pela FAT-SP

➤ Em nível molecular

1. Verificar se a FAT-SP interfere com a $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia
2. Avaliar se a FAT-SP interfere com as correntes de K^+ através da técnica de “patch clamp” em miócitos de íleo de cobaia
3. Verificar se a FAT-SP aumenta a concentração citosólica de NO ($[NO]_c$) nas células endoteliais da aorta de rato

Referências

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**. v. 45, p. 757 - 786, 1989.

ABRAHAM, Z.; BHAKUNI, S. D.; GARG, H. S.; GOEL, A. K.; MEHROTRA, B. N.; PATNAIK, G. K. Screening of Indian plants for biological activity. Part XII. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 24, p. 48 - 68, 1986.

ABU-SOUD, H. M.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10769-10772, 1993.

AGRA, M. F. Revisão taxonômica de *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child (Solanaceae). **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2000.

AGRA, M.F.; BHATTACHARYYA, J.. Ethnomedicinal and phytochemical investigation on the *Solanum* species in the Northeast of Brazil. In: NEE, M.; SYMON, D.E.; LESTER, R.N.; JESSOP, J.P. (Editors). **Solanaceae IV**, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 341-343, 1999.

AGRA, M. F. Sinopse taxonômica de *Solanum* Sect. *Erythrotrichum* (Solanaceae). In: VIII Congresso Latinoamericano y II Colombiano de Botánica, 2004, Bogotá. **Anais**. p. 192-211, 2004.

AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603-612, 2003.

ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; BARRETO LINS, C. F.; MELLO, A. C.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. The presence of acetylcholine in fruits of *Solanum melongena* L. **Rev. Inst. Univ. Fed. Pernambuco, Recife** 22 ½, 1985.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.

ARCHER, L. S.; GRAGASIN, F. S.; WU, X.; WANG, S.; McMURTRY, S.; KIM, D. H.; PLATONOV, M.; KOSHAL, A.; HASHIMOTO, K.; CAMPBELL, W. B.; FALCK, J. R.; MICHELAKIS, E. D. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary Artery Is 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BK_{Ca} Channels. **American Heart Association**, v. 107, p. 769-776, 2003.

ATAÍDE, J. R. Atividade farmacológica dos extratos da jurubeba roxa, *Solanum paludosum* Moric. João Pessoa. **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1982.

BALICK, M. J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, **J. Nat. Prod.**, 60 (4), p. 428–429, 1997.

BARBOSA-FILHO, J.M. ; AGRA, M. F. ; OLIVEIRA, R. A. G. ; PAULO, M. Q.; TROLING, G. ; CUNHA, E. V. L. ; ATAIDE, J. R. ; BHATTACHARYYA, J. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil - a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, BRASIL**, v. 86, p. 189-191, 1991.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais e bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BARRETO, L. B.; CORREIA, C. R.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potencias usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J. Estudo farmacobotânico de folhas de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 651-653, 2007.

BASÍLIO, I. J. L. D. Estudo farmacobotânico de órgãos vegetativos e fitoquímico dos alcalóides da casca de raízes de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado)**. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. Uiversidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. Indian **J. Biol.**,v. 7, p. 250 - 262, 1969.

BHARADWAJ, A.; AGRAWAL, D. K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or close reality? **Int. Immunopharmacol.**, v. 4, p. 495–511, 2004.

BHATTACHARYYA, J. Isolation of solasodine from the fruits of *Solanum asperum* and *Solanum paludosum*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 6, p. 1059-1060, 1984.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Curr. Top. Membr. Trans.**, p. 289 - 330, 1989.

BLOCH, K. V.; RODRIGUES, C. S.; FISZMAN, R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. **Rer. Bras. Hipertens.**, v.13, n. 2, p. 134-143, 2006.

BOLOTINA, V., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BONAVENTURA, D.; LIMA, R. G.; VERCESI, J. A.; SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 215–222, 2007.

BOYD, L. J. Pharmacology of the homeopathic drugs. **J. Amer. Inst. Homeopathy**, v. 21, p. 209, 1928.

BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug Chem. Toxicol.**, v. 28, p. 397–407, 2005.

BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRAA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOSD, A. C. P.; MONTE-MÓRE, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141–148, 2008.

BRODERICK, K. E.; SINGH, V.; ZHUANG, S; KAMBO, A.; CHEN, J. C.; SHARMA, V. S.; PILZ, R. B.; BOSS, G. R. Nitric oxide scavenging by the cobalamin precursor cobinamid. **The Journal of Biological Chemistry** 11: 8678-8685, 2005.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: BRONTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (Org.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11. ed. USA: Mc Graw Hill, 2006. cap. 7, p. 183-200.

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P. F.; HARDER, D. R. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. **American Heart Association**, v. 78, p. 415-423, 1996.

CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 99, p. 1115 - 1122. 2002.

CARVALHO, L.A.F.; COSTA, L.H.P.D.; DUARTE, A.C. 1996. Diversidade taxonômica das solanáceas que ocorrem no sudeste brasileiro - listagem dos táxons. **Revista Brasileira de Geografia** 58 (1): 95-110.

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). 2001. **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

CHAH, K. F.; MUKO, K. N.; OBOEGBULEM, S. I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 187-189, 2000.

CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: preclinical and clinical studies. **Asia Pac. J. Pharmacol.** v. 9, p. 113-118, 1994.

CHATAING, B.; CONCEPCION, J.L.; DE CRISTANCHO, N.B.; USUBILLAGA, A.. Estudio clinico de la efectividad de extractos alcaloides obtenidos de los frutos *Solanum americanum* Miller soberel *Herpes simplex*, *Herpes zoster*, and *Herpes genitalis*. **Rev. Facul. Farm.** v. 32, p. 18-25, 1999.

CLAUDINO, F. S. Atividade espasmolítica de extratos obtidos de *Solanum jabrense* Agra e Nee (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

COHEN, R. A.; PLANE, F.; NAJIBI, S.; HUK, I.; MALINSKI, T.; GARLAND, C. J.; Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; v. 94, p. 4193–4198, 1997

Correia, Ana Carolina Carvalho. **Efeito comparativo entre os extratos obtidos das partes aéreas e dos frutos de *Solanum asperum* rich. (solanaceae) em músculo liso**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmacia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

Costa, Vicente Carlos de Oliveira. **Investigação da Atividade Espasmolítica de *Solanum asperum* Rich. e *Solanum paludosum* Moric.: um estudo comparativo**. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DE JALON, P. G., BAYO, J. B.; DE JALON, M. G. **Farmacoterap. Actual**. v. 2, p. 313, 1945.

DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; NEGRETE, R.; SALINAS, P.; RIVAS, P.; CASSELS, B.K.; SAN FELICIANO, A. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 118-122, 1998.

DUARTE, M. C.; SILVA, J. L. V.; CAVALCANTE, F. A.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A. Papel dos canais de Ca^{2+} e K^{+} na ação relaxante da fase acetato

de etila de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2003, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2003.

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

EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 237-258, 1990.

EISELE, K.; LANG, P. A.; KEMPE, D. S.; KLARL, B. A.; NIEMOLLER, O.; WIEDER, T.; HUBER, S. M.; DURANTON, C.; LANG, F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 210, p. 116–122, 2006.

ESTRADA-SOTO, S.; RODRÍGUEZ-AVILEZ A.; CASTAÑEDA-ÁVILA, C., CASTILLO-ESPAÑA, P.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, L.; AGUIRRE-CRESPO, F. Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. **J. Ethnopharmacol.**, v.114, p. 364–370, 2007.

EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. **J. Biol. Chemistry**. v. 272, n. 25, p. 15579 - 15582, 1997.

FARTHING, M. J. Diarrhoea: a significant worldwide problem. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 14, p. 65–69, 2000.

FEELISCH, M., TE POEL, M., ZAMORA, R., DEUSSEN, A., & MONCADA, S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. **Nature**, 368, 62 ± 65, 1994.

FERREIRA, F.; SOULÉ, S.; VAZQUES, A.; MOYNA, P.; KENNE, L. Steroid saponins from *Solanum laxum*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1409-1416, 1996.

FILHO, R. F. E. ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46 n. 3, p. 265-271, 2000.

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

GARCIA, F. M. Monitoração da Atividade Espasmolítica de Produtos obtidos de *Soalnum asperum* Rich. (Solanaceae). **Dissertação (Mestrado)** – Laboratório de Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Philadelphia, Saunders, p. 1156-1179, 1995.

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective-inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Molecular Pharmacology**, v. 48, n. 02, p. 184-188, 1995.

HAJHASHEMI, V.; SADRAEI, H.; GHANNADI, A. R.; MOHSENI, M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 187–192, 2000.

HARGREAVE, F. E.; RYAN, G.; THOMSON, N. C.; O'BYRNE, P. M.; LATIME, K. Bronchial responsiveness to histamine or methacholine in asthma: measurement and clinical significance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 68, p. 347–355, 1981.

HEINRICH, M.; HENEKA, B.; ANKLI, A.; RIMPLER, H.; STICHER, O.; KOSTIZA, T. Spasmolytic and antidiarrhoeal properties of the Yucatec Mayan medicinal plant *Casimiroa tetrameria*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 1081–1085, 2005.

HIRST, S. J.; TWORT, C. H.; LEE, T. H. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 23, p. 335–344, 2000.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinase. **J. Cell. Sci.**, v. 113, p. 1671–1676, 2000.

HOMER, K.L., WANSTALL, J.C. Cyclic GMP-independent relaxation of rat pulmonary artery by spermine NONOate, a diazeniumdiolate nitric oxide donor. **Br. J. Pharmacol.** v. 131, p. 673–682, 2000.

HONDA, K; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **Gen. Pharmac.** v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689 – 1633, 1998.

HSU, S. H.; TSAI, T. R.; LIN, C.N.; YEN, M. H.; KUO, K. W. Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, v. 299 (1), p. 1-5, 1996.

HUNZIKER, A. T. (2001) Genera solanacearum: The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. A. R. **Gantner Verlag, Königstein** -Germany. 500p.

IBARROLA, D. A.; HELLIÓN-IBARROLA, M. C.; MONTALBETTI, Y.; HEINICHEN, O.; ALVARENGA, N.; FIGUEREDO, A.; FERRO, E. A. Isolation of hypotensive compounds from *Solanum sisymbriifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 2000.

JADHAV, S.J.; LUTZ, S.E.; MAZZA, G.; SALUNKHE, D.K.. Potato Glycoalkaloids: chemical, analytical, and biochemical perspectives. **ACS Symposium Series**, v. 662, p. 94-114, 1997.

JAISWAL, N.; LAMBRECHT, G.; MUTSCHLER, E.; TACKER, R.; MALIK, K. U. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 258, n. 3, p. 842 - 850, 1991.

JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**. n. 35, p. 173 -178, 2000.

JENKINSON, D. H.; BARNARD, E. A.; HOYER, D.; HUMPHREY, P. P. A.; LEFF, P.; SHANKLEY, N. P. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. IX. Recommendations on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**., v. 47, n. 2, p. 255-266, 1995.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.-I.; HARADA, K.-I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.-J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 254 – 248, 1996.

KOMORI, S.; ITAKAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol act on common Ca²⁺ stores to release Ca²⁺ in guinea-pig ileal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, n. 2-3, p.173-180, 1995.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca²⁺-release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KUHN, R.; LOEW, I.; TRISCHMAN, H. Degradation of tomatidine to tigogenin lactone. **Chem. Ber.** v. 85 p. 416-424, 1952.

KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C. ; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine. **Biochemistry Pharmacology**, v. 60, (12), p. 1865-1873, 2000.

KUPCHAN, S.M.; BARBOUTIS, S.J.; KNOX, J.R.; LAU, C.A. β -solamarine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. **Science**, v. 150, p. 1827-1828, 1965.

LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine A treated rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 68–73, 2006.

LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P. Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Nitric Oxide, edited by Ignarro L. **J. New York: Academic**, p. 401–4425, 2000.

LOHSE, M.J., FORSTERMANN, U., SCHMITT, H.H.H.W. Pharmacology of NO: cGMP signal transduction. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* v. 358, p. 111–112, 1998.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68 p. 2015–2022, 2007.

MEDHORA, M.; NARAYANAN, J.; HARDER, D.; MAIER, K. G. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: recent approaches to assay the role of the epoxyeicosatrienoic acids. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 369-375, 2001.

MENTZ, L.A.; OLIVEIRA, P.L. *Solanum* (Solanaceae) na Região Sul do Brasil. **Pesquisas (Botânica)**, v. 54, p. 5-327, 2004.

MISTRY, D.K., GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel (BK_{Ca}) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.** v. 124, p. 1131–1140, 1998.

MORRIS, S. C.; LEE, T. H. The toxicity and teratogenicity of Solanaceae glycoalkaloids, particularly those of the potato (*Solanum tuberosum*): a review. **Food Technology in Australia**, v. 36, p. 118-124, 1984.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization factor and endothelium-dependent relaxations. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1993.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 53, p. S201–S205, 1991.

OLIVEIRA, J. P.; SILVA, B. A.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; CHAVES, M. C. O. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra (SOLANACEAE) e de *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2001, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2001. V.13.03.

OLIVEIRA, R. C. M. ; MONTEIRO, F. S. ; SILVA, J. L. V. ; RIBEIRO, L. A. A. ; SANTOS, R. F. ; DUARTE, J. C. ; AGRA, M. F. ; SILVA, T. M. S. ; ALMEIDA, Fernanda Regina de Castro ; SILVA, B. A. . Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sedtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em óleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 146-151, 2006a.

OLIVEIRA, R. C. M. ; LIMA, J. T. ; RIBEIRO, L. A. A. ; SILVA, J. L. V. ; MONTEIRO, F. S; ASSIS, T. S; AGRA, M. F. ; SILVA, T. M. S. ; ALMEIDA, F. R C; SILVA, B. A. . Spasmolytic Action of the Methanol Extract and Isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae) Leaves in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung**. C, A Journal of Biosciences, Alemanha, v. 61c, p. 799-805, 2006b.

OLMSTEAD, R. G. R.; SPRANGLER, E.; BOHS, L; PALMER, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In Nee M, Symon DE (eds) Solanaceae IV. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 111-138, 1999.

PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**. v. 33, p. 375 - 384, 2003.

PAQUIN, R.; LACHANCE, R. A. Effects of potato glycoalkaloids on the growth of *Corynebacterium sepedonicum*. **Can. J. Microbiol.** v. 10, p. 115-122, 1964.

PEREZ G., R. M.; PEREZ L., J. A.; GARCIA, D. L. M.; SOSSA M., H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 43-48, 1998.

PHARMACOLOGICAL EXPERIMENTS ON ISOLATED PREPARATIONS. By the Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh. Edinburgh and London: **E. & S. Livingstone**, 2 ed., 1970.

PLANE, F., HURRELL, A., JEREMY, J.Y., GARLAND, C.J. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1 evoked relaxation in the rat isolated mesenteric artery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 1557–1562, 1996.

PROKOF'EVA, N. G.; UTKINA, N. K.; CHAIKINA, E. L.; MAKARCHENKO, A. E. Biological activities of marine sesquiterpenoid quinones: structure–activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. **Comp. Biochem. Physiol., Part B:** 139, p. 169–173, 2004.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305-309, 1997.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULZ, R.; HODSON, H. F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 746-752, 1990.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of smooth contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227 - 239, 1996.

RIBEIRO, R.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medical plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 261-269, 1986.

RIBEIRO, E. A. N., BATITUCCI, M. C. P., LIMA, J. A. T., ARAÚJO, I. G. A., MAUAD, H., MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the aqueous fraction of the ethanol extract of the stem of *Solanum stipulaceum* in rats. **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, (Supl. 1), p. 34-35, 2002.

RYU, S-D.; PARK, C-S.; BAEK, H-M.; BAEK, S-H.; HWANG, S-H.; CHUNG, W-G. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 75–80, 2004.

SANTOS, R. F. ; CAVALCANTE, F. A. ; SILVA, J. L. V. ; OLIVEIRA, R. C. M. ; SILVA, T. M. S. ; SILVA, B. A. . Evaluation of spasmolytic action of hexane phase from *Solanum agrarium* Sendt. in rat uterus. In: **XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2004, Águas de Lindóia. programa & Resumos, 2004. v. Único. p. 290.

SANTOS R. F. Ação espasmolítica de retusin, flavonóide isolado de *Solanum paludosum* Moric. e de seu derivado metilado em íleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado)** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa Universidade Federal da Paraíba, 2006.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of Hyptis fruticosa essential oil in rats. **Fitoterapia** 78: 186–191, 2007.

SATO, Y.; KATZ, A.; MOSSETIG, E.. Degradation of solasodine. **J. Am. Chem. Soc.** v. 74, p. 538-539, 1951.

SCHOTT CA, BOGEN CM, VETROVSKY P, BERTON CC, STOCKLETT JC. Exogenous *N* -hydroxy-L-arginine causes nitrite production in vascular smooth muscle cells in the absence of nitric oxide synthase activity. **FEBS Lett**, v. 341; p. 203–207, 1994.

SCHREIBER, K. Steroid alkaloids: The *Solanum* group. In: The alkaloids; chemistry and physiology, Vol. X, **Manske, R. H. F.** (ed.). Academic Press, New York. p. 1-192, 1968.

SILVA, J. L. V. ; SILVA, B. A; CAVALCANTE, F. A.; MACÊDO, L. S. ; DUARTE, J. C.; SILVA, T. M. S. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE): estudo comparativo entre os extratos etanólico e metanólico. In: Maria de Fátima Vanderlei de Souza. (Org.). **Iniciados**. João Pessoa: Editora universitária/UFPB, 2002, v. 8, p. 223-237.

SILVA, T. M. S.; BRAZ-FILHO R.; CARVALHO M. G.; AGRA, M.F. Flavonoids and an alkalamide from *Solanum paludosum* Moric. **Biochemical Systematics and Ecology** v. 30, p. 479–481, 2002.

SILVA, J. L. V. Monitoração da atividade vasorelaxante de produtos obtidos das partes aéreas de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE), **Dissertação (Mestrado)** - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa Universidade Federal da Paraíba, 2005.

SILVA, K. N. Estudo farmacobotânico de três espécies de *Solanum* L. (Solanaceae). E triagem farmacológica da atividade espasmolítica de *Solanum paniculatum* L. **Dissertação (Mestrado)**. – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; AGRA, M. F.; CAMARA, C. A. Isolamento de um glicoalcalóide de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae) com atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata*. In: **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006, Águas de Lindóia. Resumos, v. Único. p. 290.

SILVA, P. C. B. **Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra: um estudo comparativo**. 2007. Monografia (Universidade Federal de Alagoas, Maceió) 2007.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS GERAIS DAS PLANTAS MEDICINAIS. **Infarma**, v.16, nº 13-14, 2005.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J. Physiol.** v.522, p. 177-185, 2000.

SHUM, O. L.; CHIU, K. W. Hypotensive action of *Solanum melongena* on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 76-81, 1991.

SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K^+ channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D. J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts. **J. Cell Biol.** v. 150, p. 797 – 806, 2000.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[Ca^{2+}]_i$ smooth muscle. **Annual Reviews of Physiology**. v. 51, p. 315 - 329, 1989.

VAN RIPER, D.A.; MCDANIEL, N.L.; REMBOLD, C.M. Myosin light chain kinase phosphorylation in nitrovasodilator induced swine carotid artery relaxation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1355, p. 323–330, 1997.

VANHEEL, B.; VAN DE VOORDE, J. EDHF and residual NO: different factors. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 3, p. 370-375, 2000.

VALVERDE, M.; LAVAUD, C.; BOUSTIE, J.; EL BADAQUI, H.; MUGUET, B.; HENRY, M. Solamargine – the main glycoalkaloid from the fruits of *Solanum paludosum*. **Planta Médica**, v. 59, n. 5, p. 483, 1993.

VIEGAS-JÚNIOR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA. **Química Nova**, v. 29, nº. 2, p. 326-337, 2006.

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 79-84, 2002.

WANSTALL, JC, JEFFERY TK, GAMBINO A, LOVREN F, TRIGGLE CR vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion **Br J Pharmacol** 134: 463-472, 2001.

WATANABE, L. C.; BRIZOT, M. L.; PEREIRA, P. P.; MUSTAFÁ, S. A.; TOYAMA, J.; ZUGA, M. Prognóstico de Gestações com Ameaça de Abortamento entre a 6^a e a 13^a Semana que Apresentam Embrião/Feto Vivo ao Exame Ultra-sonográfico. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 5, p. 301-306, 2002.

WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289 – 298, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. N. Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 1998.

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Research**, v.739, p. 104–110, 1996.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

CERTIDÃO

João Pessoa, 22 de abril de 2008

CEPA N°. 0204/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva (Orientadora) – Fábio de Souza Monteiro (Mestrando)

Departamento/Setor: DCF/LTF

Ref.: Projeto de Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS MIORRELAXANTE EM FRÊNICO-DIAFRAGMA ISOLADO DE RATO E ESPASMOLÍTICO EM ÍLEO ISOLADO DE COBAIA DE *Solanum paludosum* Moric.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Atenciosamente,

Prof. Dr. REINALDO NÓBREGA DE ALMEIDA
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB