



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA EMENDÖRFER

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SELECIONADOS SOBRE A
MUSCULATURA LISA DO TRATO GASTRINTESTINAL**

ITAJAÍ - 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SELECIONADOS
SOBRE A MUSCULATURA LISA DO TRATO
GASTRINTESTINAL**

Dissertação submetida à
Universidade do Vale do Itajaí
como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

FERNANDA EMENDÖRFER

Itajaí, dezembro de 2005.

**EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SELECIONADOS
SOBRE A MUSCULATURA LISA DO TRATO
GASTRINTESTINAL**
FERNANDA EMENDÖRFER

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacologia de Produtos Naturais, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Valdir Cechinel-Filho, Doutor
Orientador

Alcília Helena de Azevedo Maia, Doutora
Co-Orientador

Professora Tania Mari Bellé Bresolin, Doutora
Coordenador do PMCF

Banca Examinadora:

Valdir Cechinel-Filho, Doutor- Presidente

Alcília Helena de Azevedo Maia, Doutora

Daniela Cabrini, Doutora

Márcia Maria de Souza, Doutora

Dedico esse trabalho a todos aqueles que fizeram do meu o seu objetivo, a todos os que escreveram essa dissertação de muitas mãos. Pai, mãe, irmã, Muca muito obrigado por vocês terem ajudado a transformar minha loucura em realidade.

AGRADECIMENTOS

De nada adianta trilharmos caminhos, vencermos desafios, se não pudermos dividir o gosto da vitória com todos os amigos que estiveram presente durante nossa caminhada.

Amigos conselheiros, amigos sinceros, amigos de todas as horas, apoiando-nos, incentivando-nos e acolhendo-nos, em momentos que, com certeza, nem sempre foram fáceis e agradáveis.

Muitos desafios tiveram que ser cumpridos e sem a ajuda de muitos eles nunca poderiam ter sido atingidos.

Pai, Mãe pelo incentivo e apoio incondicional. Por sempre acreditarem em mim e simplesmente por estarem presentes. Pai você será sempre meu porto seguro, meu exemplo de garra e coragem. Mãe você será meu símbolo de amor incondicional, de força. Amo vocês dois.

Irmã por você existir e ser exatamente do jeito que você é. Por estar sempre comigo. Você é meu orgulho de mulher, de profissional, de farmacêutica. Aprendo todos os dias a ser alguém melhor por saber que posso sempre contar com você. Parceira das intermináveis sextas-feiras dentro do laboratório a busca de curvas perfeitas. Amo você, irmã.

Muca amigo verdadeiro, o irmão que eu nunca tive. Muito obrigado por me ajudar tanto e por ficar sempre do meu lado.

Biba, orientadora, amiga, conselheira. Você me ensinou a ser uma profissional melhor, me ensinou que o caminho da perfeição nem sempre é fácil, porém se faz necessário. Aceitou o desafio de me orientar e me deu de presente o privilégio da sua amizade. Minha eterna gratidão e admiração.

Professor Cechinel, agradeço o senhor pela paciência, dedicação, amizade, conselhos. Por ter sido o primeiro na UNIVALI a acreditar no meu trabalho e no meu potencial.

Rosélia agradeço a atenção a todos meus e-mails, meus telefonemas. Com certeza, você fez muito mais do que a sua obrigação sempre.

Amiga Tathy, minha irmã do coração, muito obrigado por me dar a oportunidade de ser sua amiga. Nossa amizade começou nas salas de aula do Mestrado, e nossos objetivos de vida em comum tornaram-na especial, única, mágica. Amiga que o tempo nunca me fará esquecer.

Professora Márcia pelos conselhos, pela ajuda, pelas brincadeiras, pela amizade dentro do laboratório durante nossos experimentos intermináveis e nem sempre bem sucedidos.

Agradeço a coordenação do Mestrado em Ciências Farmacêuticas e aos demais professores por terem acreditado no meu trabalho e sempre respeitado minhas limitações.

Amiga Fernanda, sem sua ajuda e, principalmente, sem sua amizade meus experimentos não seriam possíveis. Obrigado pelas várias sextas-feiras de sol que você esteve ao meu lado dentro do laboratório.

A todos os meus amigos de mestrado, principalmente aos que dividiram mais de perto o caminho percorrido: Dani, Cris, Cláudia, Marina, Márcia, Patrícia, Vânia, Jordana.

Andréia do laboratório de Farmacologia, Cleberson e a Silvia, pela paciência em ensinar o que eu não sabia. Vanderléia do biotério da UNIVALI por toda a atenção.

Aos meus amigos distantes mais que foram os que me mostraram o caminho: Professora Maria Suely, Ligia, Samuel, Elisandra. Amigos que nem o tempo e nem a distância me deixam esquecer.

Ao Dr. Mário, por me permitir o milagre da visão. Por ser mais que um médico, por toda a paciência durante esse longo e difícil caminho.

A Deus, por me conceder a possibilidade de uma nova chance, e por me carregar no colo todas as vezes que eu pensei em desistir.

Obrigado a todos que eu mencionei e a outros que não estejam descritos acima, mas que de alguma forma contribuíram para minha vitória.

Fernanda Emendörfer

EFEITO DE EXTRATOS VEGETAIS SELECIONADOS SOBRE A MUSCULATURA LISA DO TRATO GASTRINTESTINAL

Fernanda Emendörfer

Dezembro/ 2005

Orientador: Valdir Cechinel-Filho, Doutor.

Co-Orientadora: Alcíbia Helena de Azevedo Maia, Doutora.

Área de Concentração: Farmacologia de Produtos Naturais.

Palavras-chave: acetilcolina, íleo isolado de cobaia, plantas medicinais.

Número de Páginas: 64.

O presente estudo avaliou o efeito farmacológico relaxante de diferentes extratos metanólicos, frações e uma substância pura obtidos de algumas plantas medicinais brasileiras em preparações de íleo isolado de cobaia e duodeno isolado de rato. Cobaias de ambos os sexos (300-350g) e ratos Wistar machos (250-300g) foram sacrificados e as tiras de íleo e de duodeno, foram montadas, respectivamente, para registro de contrações isotônicas em 5 mL de solução de Tyrode aerada a 37°C. Após 30-45 minutos de equilíbrio, foram construídas curvas concentração-efeito contráteis à acetilcolina (1 nM-100 uM) na ausência ou na presença de concentrações crescentes dos extratos metanólicos de *Rubus imperialis*, *Maytenus robusta*, *Epidendrum mosenii*, *Ipomoea pes-caprae*, *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* (0,1-2,0 mg/mL), das frações hexano, acetato de etila, diclorometano e butanólica (0,1-2,0 mg/mL), obtidas a partir do extrato bruto das folhas de *Cynara scolymus*, e da cinaropicrina (0,01-0,2 mg/mL), sesquiterpeno isolado da fração diclorometano desta planta. Entre as diferentes plantas, a *C. brasiliense* e a *C. scolymus* apresentaram melhor perfil de inibição, antagonizando de maneira não-competitiva e concentração-dependente as contrações induzidas pela acetilcolina. Devido a grande aplicabilidade atual da *C. scolymus* pela medicina popular para o tratamento de problemas gastrintestinais, partiu-se para a análise farmacológica das frações obtidas a partir do seu extrato bruto, buscando identificar os princípios ativos. Os resultados indicaram que a fração diclorometano foi a que causou o mesmo antagonismo do tipo não-competitivo e concentração-dependente do extrato bruto metanólico. Esse mesmo perfil de antagonismo foi observado também com a cinaropicrina com valor de $CI_{50} = 65\mu\text{g/mL}$. Os relevantes resultados confirmam e justificam o uso popular desta planta contra problemas gastrintestinais, atuando como colerética, sugerindo a cinaropicrina como um dos principais princípios ativos da *C. scolymus*. No entanto, estudos complementares são necessários para elucidar o mecanismo de ação dessa atividade farmacológica.

EFFECT OF SOME EXTRACTS ON SMOOTH MUSCLE OF GASTRINTESTINAL TRACT.

Fernanda Emendörfer

December/ 2005.

Advisor: Valdir Cechinel-Filho, Dr.

Co-Advisor: Alcíbia Helena de Azevedo Maia, Dr.

Area of Concentration: Pharmacology of natural products.

Keywords: acetylcholine, guinea-pig ileum, medicinal plants.

Number of Pages: 64.

The current study evaluated the possible antispasmodic activity of methanolic extracts, fractions and an active component from Brazilian medicinal plants on isolated guinea-pig ileum and rat duodenum preparations. Guinea-pigs of both sexes (300-350 g) and Male Wistar rats (250-300g) were sacrificed and the ileum and the duodenum muscle strips, respectively, were set up for recording the isotonic contractions in 5mL jacketed organ baths containing Tyrode solution at 37°C, continuously bubbled with air under 1g of load. After an initial equilibration period of about 30-45 minutes, cumulative concentration-effect curves for acetylcholine (1 nM to 100 μ M) in the absence or presence of methanolic extract of *Rubus imperialis*, *Maytenus robusta*, *Epidendrum mosenii*, *Ipomoea pes-caprae*, *Calophyllum brasiliense* and *C. scolymus* (0.10–2.0 mg/ml), of hexane, ethyl acetate, dichloromethane and butanolic fractions (0.10-2.0 mg/mL), obtained from the crude extract of *C. scolymus* leaves and cynaropicrin (0.01-0.2 mg/mL), a sesquiterpene isolated from dichloromethane fraction. Of the six medicinal plants evaluated, only *C. brasiliense* and *C. scolymus* exhibited significant inhibitory activity for the contractile response elicited by acetylcholine in a noncompetitive and concentration-dependent manner. The *C. scolymus* was studied in more detail because the promising results. Thus, the dichloromethane fraction showed the same noncompetitive and concentration-dependent manner antagonism obtained with the crude methanolic extract. This same antagonism was shown by cynaropicrin, with IC₅₀ values of 65 μ g/mL. These results confirm and justify the popular use of this plant for the treatment of gastrointestinal disorders, and that cynaropicrin is the main active principle of *C. scolymus*. However, additional studies are required to elucidate the mechanism of action.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 Objetivo Geral.....	03
2.2 Objetivos Específicos.....	03
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
3.1. Importância da utilização de plantas medicinais.....	04
3.2. Plantas estudadas.....	07
3.2.1 <i>Rubus imperialis</i>	07
3.2.2 <i>Maytenus robusta</i>	08
3.2.3 <i>Epidendrum mosenii</i>	09
3.2.4 <i>Ipomoea pes-caprae</i>	10
3.2.5 <i>Calophyllum brasiliense</i>	11
3.2.6 <i>Cynara scolymus</i>	13
3.3 Contração do músculo liso.....	14
4 METODOLOGIA.....	20
4.1 Animais.....	20
4.2 Material Botânico e preparação dos extratos, frações semi-purificadas e composto puro.....	20
4.3 Montagem das preparações de musculatura lisa <i>in vitro</i>	22
4.3.1 Íleo de cobaia.....	22
4.3.2 Duodeno de rato.....	22
4.4 Procedimento Experimental das preparações de musculatura lisa, íleo de cobaia e duodeno de rato, <i>in vitro</i>	23
4.5 Trânsito Gastrintestinal.....	23
4.6 Drogas.....	24

4.7 Análise Estatística...	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 <i>Screening</i> Farmacológico dos Extratos Brutos em íleo isolado de cobaia.....	25
5.2 Análise Farmacológica dos Extrado Brutos de <i>Calophyllum brasiliense</i> e <i>Cynara scolymus</i> em duodeno de rato.....	36
5.3 Análise farmacológica das frações Acetato de etila, Diclorometano, Hexano e Butanólica da <i>Cynara scolymus</i> em íleo isolado de cobaia.....	41
5.4 Análise farmacológica da cinaropicrina, composto isolado da fração Diclorometano da <i>Cynara scolymus</i> em íleo isolado de cobaia.....	47
5.5 Atividade da <i>Cynara scolymus</i> sobre o Trato Gastrintestinal.....	52
6. CONCLUSÕES.....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8. ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- <i>Rubus imperialis</i> Chum. Schl. (Rosaceae).....	08
FIGURA 2- <i>Maytenus robusta</i> Reiss (Celastraceae).....	..09
FIGURA 3- <i>Epidendrum mosenii</i> Rchb. F. (Orchidaceae).....	..10
FIGURA 4- <i>Ipomoea pes-caprae</i> (L.) R. Br. (Convolvulaceae).....	..11
FIGURA 5- <i>Calophyllum brasiliense</i> Camb. (Guttiferae).....	..12
FIGURA 6- <i>Cynara scolymus</i> Linné (Asteraceae/Compositae).....	14
FIGURA 7 –Síntese da acetilcolina.....	15
FIGURA 8 –Receptores nicotínico e muscarínico.....	16
FIGURA 9 – Eventos celulares observado na contração da musculatura lisa.....	19
FIGURA 10 -Esquema geral de partição e separação dos principais metabólicos secundários presentes em plantas.....	21
FIGURA 11 -Diagrama esquemático do procedimento experimental das preparações de musculatura lisa, íleo de cobaia e duodeno de rato, <i>in vitro</i>	23
FIGURA 12 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de <i>Rubus imperialis</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	27
FIGURA 13 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de <i>Maytenus robusta</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P.M. de seis experimentos	28
FIGURA 14 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico do caule de <i>Epidendrum mosenii</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	29
FIGURA 15 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de <i>Ipomoea pes caprae</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.....	30

FIGURA 16A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico de raízes de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	34
FIGURA 16B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico de raízes de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	34
FIGURA 17A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	35
FIGURA 17B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	35
FIGURA 18A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das raízes de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	38
FIGURA 18B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das raízes de <i>Calophyllum brasiliense</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	38
FIGURA 19A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	39
FIGURA 19B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.....	39

FIGURA 20 - Influência de diferentes concentrações da fração hexano de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de nove experimentos.....	42
FIGURA 21 - Influência de diferentes concentrações da fração butanólica de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de nove experimentos.....	43
FIGURA 22A - Influência de diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.....	45
FIGURA 22B - Inibição máxima de diferentes concentrações da fração acetato de etila de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.....	45
FIGURA 23A - Influência de diferentes concentrações da fração diclorometano de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de oito experimentos.....	46
FIGURA 23B - Inibição máxima de diferentes concentrações da fração diclorometano de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de oito experimentos.....	46
FIGURA 24 – Estrutura molecular do composto cinaropicrina.....	47
FIGURA 25A - Influência de diferentes concentrações de cinaropicrina de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.....	50
FIGURA 25B - Inibição máxima de diferentes concentrações de cinaropicrina de <i>Cynara scolymus</i> sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de óleo isolado de cabaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.....	50
FIGURA 26 - Esquema geral do possível mecanismo de ação da cinaropicrina, lactona sesquiterpênica, isolada a partir da fração diclorometano obtida do extrato bruto metanólico de <i>Cynara scolymus</i> sobre a musculatura lisa <i>in vitro</i>	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de <i>Rubus imperialis</i> . Os valores são a média ± E.P.M de seis experimentos.....	27
TABELA 2 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de <i>Maytenus robusta</i> . Os valores são a média ± E.P.M de seis experimentos.....	28
TABELA 3 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto do caule de <i>Epidendrum mosenii</i> . Os valores são a média ± E.P.M de seis experimentos.....	29
TABELA 4 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na presença e na ausência de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de <i>Ipomoea pes caprae</i> . Os valores são a média ± E.P.M de seis experimentos.....	30
TABELA 5 - Comparação dos valores de CI ₅₀ dos extratos brutos metanólicos de <i>Calophyllum brasiliense</i> e <i>Cynara scolymus</i> na presença de acetilcolina em íleo isolado de cobaia e duodeno isolado de rato com dados da literatura para outras plantas medicinais.....	40
TABELA 6 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações da fração hexano de <i>Cynara scolymus</i> . Os valores são a média ± E.P.M de nove experimentos.....	42
TABELA 7 - Valores de CE ₅₀ e valores de E _{máx} da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações da fração butanólica de <i>Cynara scolymus</i> . Os valores são a média ± E.P.M de nove experimentos.....	43
TABELA 8 - Efeito do extrato bruto obtido das folhas de <i>Cynara scolymus</i> no trânsito gastrointestinal de camundongos para cada um dos grupos existentes. Valores são a média ± E.P.M de sete experimentos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina;
AChE: acetilcolinesterase;
AcCoA: acetil coenzima-A;
cAMP: adenosina monofosfato cíclico;
ATP: adenosina trifosfato;
Ca²⁺: cálcio;
CaCl₂. 2H₂O: cloreto de cálcio dihidratado;
CAM: complexo cálcio calmodulina;
CAT: colina acetiltransferase;
CE₅₀: concentração do agonista que possuir 50% do efeito máximo em experimentos individuais;
CI50: concentração do extrato que produz 50% de inibição em relação aos grupos controle;
cm: centímetros;
DAG: diacilglicerol;
DMSO: dimetilsulfóxido;
E_{máx}:efeito máximo;
E.P.M: erro padrão da média;
g: gramas;
GTP: guanosina trifosfato;
IP₃: inositol trifosfato;
K⁺: potássio;
KCl: cloreto de potássio;
Kg: kilogramas;
L: lavagem;
M1: receptores muscarínicos do tipo M1;
M2: receptores muscarínicos do tipo M2;
M3: receptores muscarínicos do tipo M3;
M4: receptores muscarínicos do tipo M4;
M5: receptores muscarínicos do tipo M5;
MeOH: metanol;
min: minutos;

mL: mililitros;
mg: miligramas;
MgCl₂.6H₂O: cloreto de magnésio hexahidratado;
MLCK: enzima quinase da miosina de cadeia leve;
nM: nano molar;
Na⁺: sódio;
NaCl: cloreto de sódio;
NaHCO₃: bicarbonato de sódio;
NaH₂PO₄: dihidrogênio fosfato de sódio;
P: fósforo;
pD₂: antilogarítimo de CE₅₀;
PIP₂: fosfatidil-inositol-4,5- bifosfato
PLC: fosfolipase C;
PKC: proteína quinase C
RS: retículo sarcoplasmático;
uM: micro molar.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas como fonte medicamentosa por todas as formações culturais conhecidas no planeta. No Brasil, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes representaram um papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES et al., 1998; PHILLIPSON, 2001).

Nos últimos anos, observou-se um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (RATES, 2001). Esse avanço é consequência de um crescimento do mercado dos medicamentos derivados de plantas devido, principalmente, a crise econômica, ao alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica e farmacêutica, bem como uma tendência generalizada dos consumidores em utilizar preferencialmente produtos de origem natural (SCHENKEL et al., 1985; SIMÕES et al., 1998).

Visando contribuir com a pesquisa envolvendo plantas medicinais da flora brasileira e especificamente regional, nosso grupo de pesquisa realizou a preparação de extratos vegetais de algumas espécies para o procedimento de análise química inicial. A partir desses extratos procedeu-se o isolamento, caracterização e identificação dos compostos majoritários presentes nesses extratos. Diante disso foram selecionadas seis, dessas plantas estudadas anteriormente, para complementaridade de estudos farmacológicos, com direcionamento da pesquisa para modelos que envolvessem testes *in vitro* com musculatura lisa de animais. Das plantas selecionadas temos:

A *Rubus imperialis*, conhecida como amora-branca, amora-do-mato e amora-brava, utilizada pela população em tratamentos para o diabetes, a qual apresenta atividade hipoglicemiante, antibacteriana e anti alergênica (NIERO et al., 1999).

A *Maytenus robusta*, uma espécie do gênero da espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), que por apresentar fitoquímica semelhante a planta usada tradicionalmente (espinheira santa), pode ser usada na medicina popular no tratamento de úlceras (NIERO et al., 2001).

A *Epidendrum mosenii*, conhecida popularmente como orquídea-da-praia, utilizada na medicina popular contra processos infecciosos dolorosos (FERREIRA et al., 2000).

A *Ipomoea pes-caprae*, pertencente à família das *Convolvulaceae*, conhecida popularmente como batateira da praia (KROGH et al., 1999).

A *Calophyllum brasiliense*, popularmente denominada guarandi ou guanandi, utilizada em processos inflamatórios dolorosos e em úlceras (SILVA et al., 2001).

A *Cynara scolymus*, conhecida vulgarmente como alcachofra, planta pertencente à família *Compositae*, utilizada popularmente no tratamento da hepatite, hiperlipidemia e pelos seus efeitos coleréticos (SHIMODA et al., 2003).

Com base nessa necessidade de descoberta e pesquisa de novos compostos de origem natural, procedeu-se a estudos farmacológicos dessas plantas selecionadas, com direcionamento da pesquisa para modelos que envolvam testes *in vitro* com musculatura lisa de animais, principalmente testes com íleo isolado de cobaias. Convém ressaltar que esta preparação é bastante sensível às drogas colinérgicas, histaminérgicas e peptídeos biologicamente ativos, possibilitando avaliar os efeitos destes extratos sobre o trato gastrointestinal (PATON & ZAR, 1968; ARRAGIE, METZNER & BEKEMEIER, 1983).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito farmacológico de diferentes extratos vegetais de plantas medicinais pré-selecionadas através de ensaios *vitro* sobre a atividade contrátil da acetilcolina em musculatura lisa.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, o(s) extrato(s) bruto(s) de planta(s) que sugira(m) uma significativa atividade inibidora frente à resposta contrátil induzida pela acetilcolina em íleo isolado de cobaia;
- Verificar o efeito do(s) extrato(s) bruto(s) acima selecionado(s) sobre a contração induzida pela acetilcolina em outra preparação de músculo liso *in vitro*, o duodeno de rato;
- Avaliar os possíveis efeitos causados pelo extrato bruto da planta selecionada sobre a motilidade do trato gastrointestinal utilizando como modelo farmacológico experimental o trânsito gastrointestinal em camundongos *in vivo*;
- Analisar algumas frações e o composto isolado da planta selecionada através do *screening*, frente às respostas contráteis induzidas pela acetilcolina em íleo de cobaia *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Importância da utilização de plantas medicinais

Desde os primórdios, os vegetais fazem parte da vida do homem como fonte de alimentos, de matéria-prima para vestuário, habitações, restauradores de saúde, etc (CALIXTO, 2000). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam as sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, pertencente à época da XVIII dinastia, que descrevia o tratamento de mais de 100 doenças baseado na utilização de um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Neste campo de pesquisa envolvendo produtos naturais, destacaram-se alguns filósofos da civilização grega, como Hipócrates e Teofrasto, sendo esse último responsável pelo registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, que tem como princípio ativo a morfina, analgésico opióide empregado até os dias de hoje (PINTO et al., 2002).

Apesar da existência de registros muito antigos que relatavam à ampla utilização dos vegetais como alternativa terapêutica, todo esse conhecimento era baseado somente no empirismo, ou seja, no conhecimento prático do emprego dos vegetais como medicamentos. Somente no início do século passado esses recursos passaram a serem estudados com os instrumentos científicos da época e os princípios ativos começaram a ser identificados e utilizados pela medicina tradicional (SIMÕES et al., 2001; PHILLIPSON, 2001).

O entusiasmo em relação ao uso de plantas medicinais e seus extratos na assistência à saúde poder ser entendido pela sua aceitabilidade, derivada da inserção cultural e pela atual disponibilidade desses recursos, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos, que na grande maioria são dependentes de matéria-prima e tecnologias externas (SCHENKEL et al., 1985; SIMÕES et al., 1986).

Nos últimos anos, há um interesse crescente e renovado no uso de terapias complementares e produtos naturais, especialmente os vegetais, como recurso terapêutico, relacionado a vários fatores, entre eles: a decepção com os resultados obtidos em tratamento com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de que amplas camadas da população mundial não tem acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

O grande incremento do uso de plantas medicinais no final do século passado leva à necessidade de se desenvolverem métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico das espécies vegetais, o que tem proporcionado um interesse pelo estudo das características das drogas delas originadas, incluindo sua morfologia, composição química, propriedades farmacológicas e controle de qualidade, especialmente quando se trata de plantas brasileiras (SIMÕES et al., 2001, KONG et al., 2003).

A pesquisa científica baseada no estudo de produtos vegetais obtidos a partir dos conhecimentos dos grupos indígenas locais foram responsáveis pela descoberta de muitos dos fármacos utilizados na atualidade, como aspirina, digoxina, morfina, quinina, vincristina, fisostigmina, pilocarpina e reserpina (COX & HEINRICH, 2001; SIMÕES et al., 2001; BUTLER, 2004). Essas pesquisas etnobotânicas também podem ser utilizadas como fontes de produtos naturais biologicamente ativos que se tornaram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (OLIVEIRA & BRAGA, 2003). Vale ressaltar o fato de que, a inter-relação entre a contribuição da medicina popular com dados encontrados em literatura sugere uma maior probabilidade de isolar plantas com atividades biológicas comprovadas, do que quando se parte de triagem aleatória (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Em algumas áreas, especialmente de países de clima tropical, como o Brasil, que possui uma flora que representa mais de 20% das espécies conhecidas do mundo, a abundância das plantas oferece acesso a diversos produtos utilizados através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças (MORAES et al., 2003). Esse fato contribui de maneira significativa para a redução da importação de fármacos, incremento do desenvolvimento econômico do país dependente da pesquisa de desenvolvimento de novos fármacos, alternativa terapêutica de baixo custo diante de uma população de baixa renda e boa aceitação ao tratamento baseado na credência de menores efeitos colaterais (TOMLINSON & AKERELE, 1993; FERREIRA, 1998; WHO, 1999).

Apesar da enorme diversidade molecular presente nos compostos químicos isolados a partir dos vegetais, o que muitas vezes impossibilita que essas estruturas sejam reproduzidas sinteticamente, somente 15 a 17% dos espécimes de plantas já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (COX & HEINRICH, 2001).

Nos últimos anos o interesse no campo da pesquisa envolvendo produtos naturais visando ao desenvolvimento de novos medicamentos tem crescido acentuadamente em todo o mundo (CALIXTO, 2000). Um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos a partir de matérias-primas extraídas de plantas medicinais para obtenção de

novos compostos com propriedades terapêuticas tem sido favorecido pelo desenvolvimento de novas técnicas espectrofotométricas, que permitem a elucidação muito mais rápida das estruturas moleculares destes constituintes naturais (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Apesar da sua importância, poucos produtos fitoterápicos foram suficientemente estudados do ponto de vista clínico e toxicológico, de forma a confirmar a sua eficácia e segurança, como exigido para os demais medicamentos (MORAES et al., 2003).

O uso de produtos naturais pelas indústrias farmacêuticas está direcionado, principalmente, para a seleção de moléculas líderes ou protótipos para o desenho de novos medicamentos fitoterápicos (SIMÕES et al., 2001). Os componentes químicos isolados de produtos naturais vegetais podem ser utilizados de forma direta, com o aproveitamento de sua estrutura na mesma forma encontrada, ou como ponto de partida para a síntese de análogos mais específicos e otimizados (KINGHORN, 2002). No entanto, nem sempre um único composto químico isolado de um vegetal pode ser responsabilizado pela ação biológica caracterizada, existem casos onde somente o sinergismo de duas ou mais substâncias presentes no extrato bruto são capazes de desenvolver o efeito desejado. Nesses casos, o uso do extrato da planta se torna mais viável farmacologicamente que o uso do composto químico isolado (GILBERT & ALVES, 2003).

Para impedir que os fitoterápicos, devido a sua grande popularidade, sejam utilizados indiscriminadamente pela população, é necessário que uma política de orientação profissional adequada seja desenvolvida e praticada pelos profissionais da área, principalmente devido ao fato de que apesar de serem produtos de origem natural podem conter compostos capazes de desencadear toxicidade (CALIXTO & KARAM, 1996; KINGHORN, 2002). Apesar da dificuldade em relacionar os efeitos tóxicos com uma substância ativa em fitoterápicos, devido a uma complexidade dos componentes existentes no extrato vegetal, deve-se ressaltar a importância de uma avaliação bem conduzida (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Efeitos antagonistas de metabólitos secundários obtidos de plantas medicinais tradicionais a atividades contrátil de vários mediadores químicos são largamente investigados em modelos de teste *in vitro* para elucidação da atividade do extrato da planta testada. Na literatura, inúmeras pesquisas envolvendo extratos de plantas em diferentes concentrações, são testados em íleos de cobaias, úteros de ratas, traquéias, em comparação a atividade apresentada por mediadores químicos, tais como acetilcolina, bradicinina e histamina (SCHLEMPER et al., 1996; DAR & CHANNA, 1999; ORISADIPE et al., 2001; MELZIG et al., 2001; LIS-BALCHIN et al., 2002; WEIMANN et al., 2002; MECKES et al., 2002).

3.2 Plantas estudadas

3.2.1 *Rubus imperialis*

A espécie *Rubus imperialis* Chum. Schl., conhecida como amora-branca, amora-brava ou amora do mato, é pertencente à família Rosaceae, distribuiu-se abundantemente por todo sul do Brasil, ocorrendo também espontaneamente na Mata Atlântica (Figura 1) (CIRILO, 1993). A planta constitui-se de ramos longos, angulosos e com acúleos, que se estendem de 4 a 5m sustentando-se em outros vegetais. Possui folhas compostas, palmadas e denteadas. Suas flores apresentam pétalas de cor branca, florescendo de outubro a novembro, e seus frutos são compostos por inúmeras drupas (SILVA et al., 1999).

O gênero *Rubus* sp. consiste em muitas espécies que são popularmente utilizadas para o tratamento de diferentes doenças, especialmente o diabetes (ALONSO, CADAVID & CALLEJA, 1980; ZONTA & RUEDIGER, 1996). Estudos químicos e farmacológicos confirmaram em algumas espécies de *Rubus* sp. atividade hipoglicemiante, antibacteriana e antialérgica (SWANSTON-FLATT et al., 1990) sendo que, para *Rubus idaeus* observou-se a atividade relaxante em preparações de óleo isolado de cobaia (ROJAS-VERA, PATEL & DACKER, 2002).

No caso da espécie *Rubus imperialis*, experimentos comprovaram atividade antinociceptiva para a fração acetato de etila e para o composto niga-ichigoside F1, um triterpeno glicosídeo isolado e identificado nessa planta (NIERO et al., 1999). Estudos recentes indicaram que o mecanismo de ação analgésica desta substância parece não envolver o sistema opióide, mas sugere estar relacionado com os sistemas dopaminérgico, colinérgico e glutamatérgico (ARDENGHI, 2003).



FIGURA 1-*Rubus imperialis* Chum. Schl. (Rosaceae).

Fonte: arquivos do NIQFAR

3.2.2 *Maytenus robusta*

Pertencente à família Celastraceae, a espécie *Maytenus robusta* Reiss é encontrada abundantemente no Sul do Brasil (Figura 2). Possui triterpenos e compostos fenólicos semelhantes a *Maytenus ilicifolia*, conhecida popularmente como “Espinheira-santa”, a qual é freqüentemente utilizada na medicina popular no tratamento da úlcera, substituindo fármacos sintéticos, e pode ser empregada ainda em processos inflamatórios e dolorosos (NIERO et al., 2001; JORGE et al., 2004).



FIGURA 2-*Maytenus robusta* Reiss (Celastraceae).

Fonte: arquivos do NIQFAR

3.2.3 *Epidendrum mosenii*

A *Epidendrum mosenii* Rchb. F. é uma planta da família Orchidaceae, que possui 735 gêneros e 17.000 espécies, além de muitos híbridos (Figura 3) (FERREIRA, et al., 2000). Conhecida popularmente como “Orquídea-da-praia” ou “Sumaré-da-praia”, possui arbustos de característica baixa de até 90 cm, com flores amarelas e vermelhas na mesma inflorescência, sendo inclusive utilizada como planta ornamental (KLEIN, 1978; SCHULTZ, 1968).

É encontrada em toda costa brasileira, distribuindo-se no litoral catarinense, no baixo e médio Vale do Itajaí. Na medicina popular é muitas vezes empregada para o tratamento de processos infecciosos e dolorosos (FLORIANI, et al., 1998). O extrato metanólico apresenta atividade antinociceptiva comprovada em experimentos com camundongos, alguns deles sendo mais potente do que alguns fármacos usados na clínica, tais como diclofenaco, aspirina, acetaminofeno, dipirona e morfina (FERREIRA, et al., 2000).

Recentemente foi determinado o perfil fitoquímico em relação á variação sazonal desta planta, verificando-se que o caule, coletado no mês de fevereiro, apresenta o melhor perfil em relação às substâncias ativas (ROSA et al., 2005)



FIGURA 3-*Epidendrum mosenii* Rchb. F. (Orchidaceae)

Fonte: arquivos do NIQFAR

3.2.4 *Ipomoea pes-caprae*

A *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. é uma planta pertencente à família Convolvulaceae, amplamente distribuída nos países tropicais e subtropicais (Figura 4). Conhecida no Brasil como “Salsa-da-praia”, “Batateira-da-praia” ou “Pé-de-cabra”, é utilizada na medicina popular de muitos países no tratamento de uma variedade de doenças, incluindo inflamações, problemas gastrintestinais, gonorréia e processos dolorosos (KROGH et al.,1999; SOUZA et al., 2000).

Além disso, estudos científicos com *Ipomoea pes-caprae* possibilitam o seu uso no tratamento da dermatite causada por venenos de celenterados conhecidos popularmente como “Água-viva” (PONGPRAYOON et al., 1989). Foi comprovada a atividade antiespasmódica do extrato da *Ipomoea pes-caprae* em musculatura lisa via antagonismo do tipo não-

competitivo, dependente da presença de beta-damascenona e e-fitol, sendo dois isoprenóides isolados da planta (PONGPRAYOON et al., 1992).



FIGURA 4-*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae).
Fonte: http://www.barbadine.com/pages/ipomoea_pes-caprae_lien.htm

3.2.5 *Calophyllum brasiliense*

A espécie *Calophyllum brasiliense* Camb. é uma planta pertencente à família Guttiferae, conhecida popularmente como “Guanandi”, “Guarandi”, “Olandi” ou “Jacareúba”, sendo amplamente utilizada na medicina popular contra inúmeras enfermidades, incluindo inflamações, dores, úlceras e processos infecciosos (Figura 5) (SILVA et al., 1999).

Pode ser encontrada na região amazônica até o norte de Santa Catarina, atingindo de 20 a 30m de altura, com folhas glabras, coriáceas, perenifólia, sendo uma planta característica das florestas pluviais (LORENZI, 1998).

Apresenta uma grande quantidade de moléculas bioativas, dentre elas cumarinas, xantonas, esteróides, triterpenos e bioflavonóides. A utilização da planta pela medicina

tradicional em processos inflamatórios dolorosos e em úlceras foi sugerida através de ensaios farmacológicos (SILVA et al., 2001).

Existem muitos estudos recentes que comprovaram cientificamente diversas propriedades farmacológicas para *Calophyllum brasiliense*, tais como inibição significativa na replicação viral, inibindo a enzima transcriptase reversa do HIV-1 (HUERTA-REYES et al., 2004), propriedades antimicrobianas contra bactérias gram positivas (PRETTO et al., 2004), atividade anti-secretora, anti-ulcerativa e citoprotetora, podendo ser usada em afecções do trato gastrointestinal (SARTORI et al., 1999), propriedades antinociceptivas das frações e da friedelina e 1,5-dihidroxyxantone, dois compostos isolados da fração clorofórmio mais potentes que o ácido acetilsalicílico e o acetaminofeno (ISAIAS et al., 2004).

Ainda, as cumarinas isoladas de *Calophyllum brasiliense* foram caracterizadas como agentes quimioterápicos naturais contra o câncer, sendo inclusive pesquisadas sobre o antígeno do vírus Epstein-Barr (ITO et al., 2003), o composto denominado GUT-70, uma cumarina tricíclica, isolada das hastes de *Calophyllum brasiliense* mostrou significativa inibição sobre o crescimento de células leucêmicas, sem causar inibição da proliferação dos leucócitos e nem dos hepatócitos normais (KIMURA et al., 2005), e atividade contra células humanas da linhagem tumoral *in vitro* (REYES-CHILPA et al., 2004).



FIGURA 5-*Calophyllum brasiliense* Camb. (Guttiferae).

Fonte: <http://www1.plala.or.jp/maui/others/calophyllum1a.htm>

3.2.6 *Cynara scolymus*

Cynara scolymus Linné, pertencente à família Asteraceae/Compositae, originária das regiões mediterrâneas, é considerada uma planta perene, própria dos climas quentes, com floração no verão exibida pelas colorações azuis ou violáceas (Figura 6) (BALBACH, 1991; FLORIANI, 2001).

Encontra-se difundida por todo o mundo visto que suas brácteas frescas são consumidas com finalidade alimentícia (SIMÕES et al., 2001), conhecida popularmente como alcachofra, sendo utilizada na medicina popular e na produção de fitoterápicos devido as suas propriedades coleréticas, diuréticas e hipocolesterolêmica (FLORIANI, 2001).

A *Cynara scolymus* possui relatos de atividades antifúngicas (ZHU et al., 2005) e antimicrobianas, com destaque para a atividade da fração n-butanol e de compostos tais como cinarina, ácido clorogênico e cinarosídeo (ZHU et al., 2004).

Os extratos das folhas aumentaram a expressão da enzima óxido nítrico sintetase em linhagens de células derivadas do cordão umbilical humano, sugerindo proteção contra doenças cardiovasculares, uma vez que o óxido nítrico produzido pela enzima previne a trombose e a aterosclerose (LI et al., 2004).

As folhas da planta são eficazes no tratamento de pacientes com dispepsia funcional. Pesquisa realizada por Holtmann e colaboradores (2003) demonstrou melhora significativa nos sintomas e na qualidade de vida desses pacientes em comparação com o grupo placebo (HOLTMANN et al., 2003).

A planta possui propriedade antioxidante, comparável a atividade da vitamina C e da vitamina E, e ainda é eficaz na inibição da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade *in vitro* (JIMENES-ESCRIG et al., 2003). É considerada antioxidante natural sendo inclusive utilizada como ingrediente funcional de alimentos (SCHUTZ et al., 2004). Os extratos aquoso e etanólico, ainda atuam, contra o stress oxidativo induzido pelos mediadores inflamatórios (ZAPOLSKA-DOWAR et al., 2002).

A *Cynara scolymus* também atua como colerética (GEBHARDT, 2002; SAENZ et al., 2002), hepatoprotetora (GEBHARDT, 2002), anti-lipidêmica (WEGENER, 2002; SHIMODA et al., 2003), citoprotetora (ADZET et al., 1987), diurética (NOLDIN et al., 2003) e inibidora da biossíntese do colesterol (GEBHARDT, 1998).

Dentre os componentes químicos presentes nessa planta encontra-se a cinarina, ácido cafeico, ácido clorogênico e luteolina, responsáveis por inibir o estresse oxidativo de leucócitos humanos (SHIMODA et al., 2003).



FIGURA 6-*Cynara scolymus* Linné (Asteraceae/Compositae).

Fonte: <http://www.kirka.co.yu/kirkapharma/lekovitobilje/uvod.htm>

3.3 Contração do músculo liso

O mecanismo de contração característico das células da musculatura lisa está organizado em três seqüências de eventos regulatórios. A primeira seqüência inclui a ligação de substâncias endógenas, tais como neurotransmissores ou hormônios, nos seus receptores específicos. Essa ligação ativa vários tipos de proteínas do tipo guanosina trifosfato (GTP), que estão acoplados a diferentes canais de íons e/ou enzimas (fosfolipase C, adenilato ciclase) e agem modulando suas atividades (KARAKI et al., 1997).

A acetilcolina (ACh) sintetizada a partir de colina e acetil coenzima-A (AcCoA) através da ação da colina acetiltransferase (CAT), no sistema nervoso periférico é um neurotransmissor responsável pela contração da musculatura lisa (Figura 7).

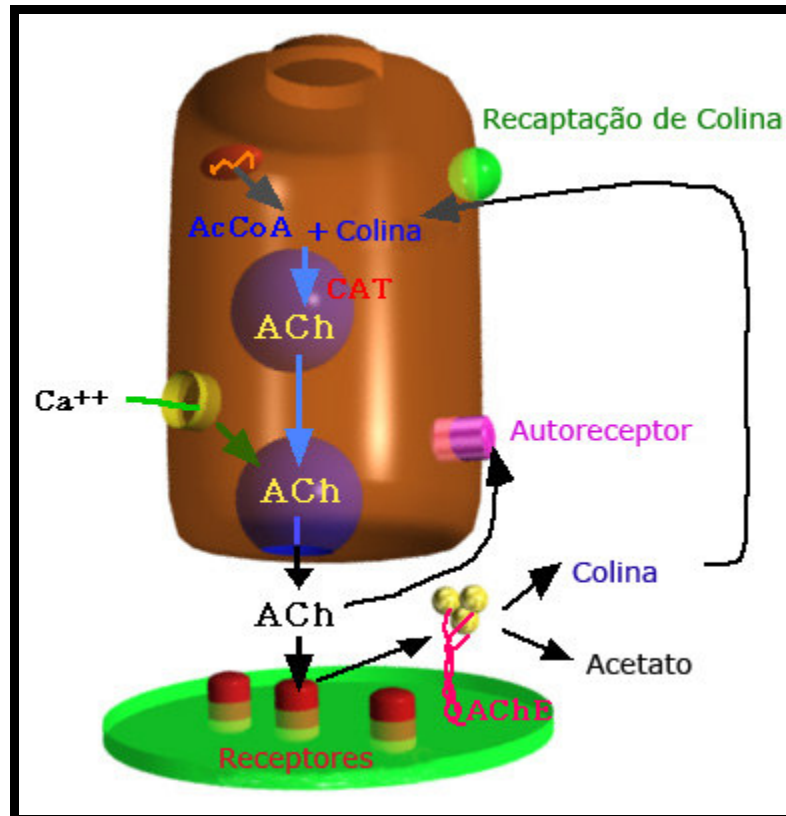


FIGURA 7–Síntese da acetilcolina. (ACh: acetilcolina, AcCoA: acetil coenzima-A, CAT: colina acetiltransferase; Ca: cálcio, AChE: acetilcolinesterase)

Fonte: <http://pharma1.med.osaka-u.ac.jp/textbook/Cholinergic/Cholinergic.html>

A acetilcolina atua através da ativação de receptores nicotínicos ionotrópicos e de receptores muscarínicos metabotrópicos (Figura 8). Os receptores nicotínicos encontram-se ligados diretamente a um canal iônico e medeiam uma transmissão sináptica excitatória rápida na junção neuromuscular, gânglios autônomos e em vários sítios do Sistema Nervoso Central. Os receptores muscarínicos são do tipo acoplados à proteína G, podendo atuar através da ativação da fosfolipase C (portanto, a formação de inositol trifosfato e diacilglicerol como segundos mensageiros), da inibição da adenilato-ciclase, da ativação dos canais de potássio ou inibição dos canais de cálcio. A ativação desses receptores é responsável por diferentes efeitos celulares como secreção, contração do músculo liso visceral e relaxamento vascular (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998).

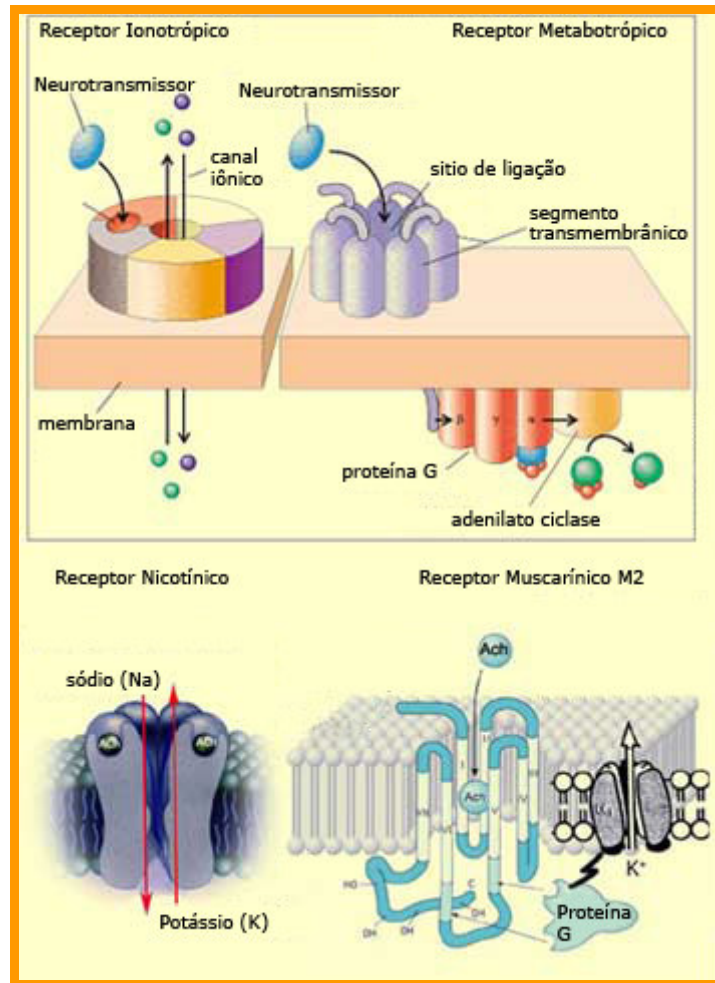


FIGURA 8–Receptores nicotínico e muscarínico.

Fonte:http://www.lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_06/i_06_m/i_06_m_mou/i_06_m_mou.htm1

O receptor muscarínico está organizado na forma de uma estrutura com 7 proteínas transmembranas em hélices. Quando ativado, desencadeia um processo de transdução e amplificação, cujo resultado final resulta de uma ativação em cascata de sistemas enzimáticos (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998).

Até o momento foi comprovada a existência, de 5 subtipos diferentes de receptores muscarínicos M₁, M₂, M₃, M₄ e M₅, localizados em diferentes locais do organismo onde desempenham funções específicas. Os tipos M₁, M₃ e M₅ estão seletivamente ligados à família G_q da proteína G, e os tipos M₂ e M₄ ligados à proteína G da classe G_i (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998; WESS, 1996). Ultimamente, ocorre um interesse particular crescente no estudo dessa classificação devido ao potencial terapêutico em condições patofisiológicas como Alzheimer, Parkinson, analgesia, desordens na motilidade gastrointestinal e nas funções cardíacas e hepáticas (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998; EGLÉN et al., 1999; FELDER et al., 2000).

O subtipo M_3 é o principal responsável pela contração do íleo de cobaia e pela contração de outras preparações de músculo liso (EGLIN et al., 1996), isso porque experimentos *in vitro* com a utilização de diferentes tipos de músculo liso isolado mostraram que a inativação dos receptores M_3 reduziu significativamente a atividade dos seus agonistas seletivos (CAULFIELD, 1993; EGLIN et al., 1996; MATSUI et al., 2000; STENGEL et al., 2002; MATSUI et al., 2002). Porém essa inativação é variável conforme o tipo de tecido envolvido, indicando que deve existir mais de um subtipo envolvido na contração da musculatura lisa, provavelmente o subtipo M_2 (MATSUI et al., 2002), envolvidos em antagonizar o efeito relaxante dos agentes que elevam o nível de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) (THOMAS et al., 1993; EGLIN et al., 1994). É importante salientar que os receptores M_2 também estimulam a abertura dos canais de cálcio que despolarizam a célula (BOLTON & ZHOLOS, 1997).

Há sugestões ainda de que os receptores M_3 do músculo liso de diferentes tecidos possam ser heterogêneos, pois em alguns tecidos como traquéia, íleo e urinário respondem de maneira diferente na presença do mesmo agonista (EGLIN et al., 1996). Além disso, podemos ressaltar o caso do duodeno de rato onde a contração da musculatura lisa ocorre devido à estimulação do receptor do tipo M_1 (CAULFIELD & BIRDSALL, 1998).

Em contrapartida, a presença de receptores M_3 não parece ser essencial para o desempenho das funções gastrintestinais normais em camundongos, uma vez que experimentos conduzidos com linhagens de animais com deficiência de desse subtipo de receptor não mostraram complicações gastrintestinais aparentes (MATSUI et al., 2000; YAMADA et al., 2001; WESS, 2003).

A segunda seqüência de eventos envolvida no mecanismo de contração característico das células da musculatura lisa inclui mudanças nas concentrações de cálcio, que pode ser resultado de influxo de cálcio do meio extracelular e/ou pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares, no retículo sarcoplasmático através da ativação dos receptores da rianodina (SOMLYO & SOMLYO, 1994; KARAKI et al., 1997; LAPORTE et al., 2004). Esse mecanismo inclui canais de cálcio voltagem-dependente do tipo L, canais de cálcio não-seletivos, liberação de cálcio no citosol e a bomba de sódio e cálcio (KARAKI et al., 1997; JANSSEN, 2002). Tem sido observado que o influxo de cálcio é o maior responsável pelos aumentos nos níveis intracelulares desse íon (KARAKI et al., 1997).

O cátion cálcio age como segundo mensageiro em muitos tipos de células e regula numerosas funções celulares, incluindo movimentos, secreção e morte celular. Durante a contração do músculo liso o cálcio é o principal mensageiro intracelular excitatório da

membrana. A sua concentração é dependente de um mecanismo de transporte de íons localizada na membrana plasmática e da regulação dos estoques do retículo sarcoplasmático (VAN BREEMEN & SAIDA, 1989; LAPORTE et al., 2004). Concentrações anormais de cálcio no músculo liso resultam em várias doenças incluindo hipertensão, convulsão e asma. Por isso, é importante identificar essas mudanças para entender a regulação do músculo liso pelo cálcio e para desenvolver fármacos que possam regular contrações anormais do músculo liso (KARAKI, 2004).

A terceira seqüência inclui mudanças na atividade da quinase da miosina de cadeia leve, essa enzima é ativada pelo complexo cálcio-calmodulina e é responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina. A miosina fosforilada pode então interagir com a actina e promover a contração celular (Figura 9) (KARAKI et al., 1997).

A contração do músculo liso é induzida por uma interação dependente de adenosina trifosfato (ATP) entre a actina e a miosina, que é regulada pelo íon cálcio (EBASHI et al., 1966), tendo a calmodulina como seu sítio de ação (KOHAMA et al., 1996). O complexo formado entre o cálcio- calmodulina ativa a enzima quinase da miosina de cadeia leve, que é responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina, o que possibilita a sua interação com a actina. Sendo assim, a contração do músculo liso é o produto de uma interação entre a actina e a miosina, dependente da atividade da quinase de cadeia leve da miosina e da fosfatase de cadeia leve da miosina (JANSSEN, 2002).

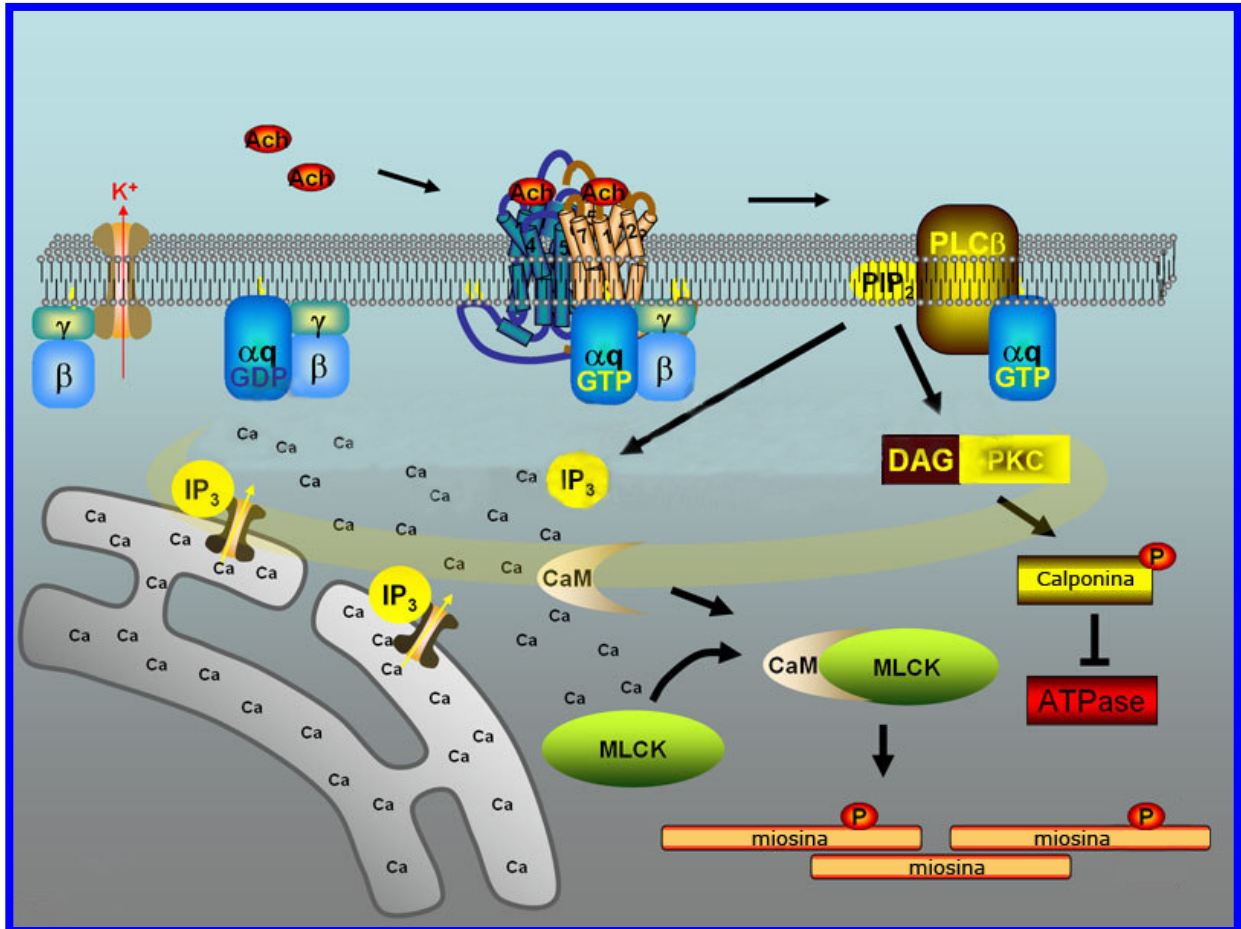


FIGURA 9 – Eventos celulares observados na contração da musculatura lisa. (ACh: acetilcolina, GTP: guanosina trifosfato, PLC: fosfolipase C; PIP2: fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato; IP3: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol; Ca: cálcio, MLCK: enzima quinase da miosina de cadeia leve, CaM: complexo cálcio calmodulina, PKC: proteína quinase C, P: fósforo, K: potássio, ATP: adenosina trifosfato).

Fonte: <http://viscience.com/scienceslides.php>

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizadas cobaias Hartley (300-400g) de ambos os sexos, ratos Wistar machos (250-350g) e camundongos Swiss machos (25-35g), criados no Biotério Central da UNIVALI, onde permaneceram alojados em gaiolas plásticas, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e ração fornecidas *ad libitum*. Num período de 48 horas antes do início da realização dos experimentos, os animais foram transferidos do biotério central para o laboratório e alojados em local destinado aos ensaios pré-clínicos, e a partir de 24 horas antes do início da administração dos extratos vegetais estes ficaram em jejum de sólidos. Os procedimentos da pesquisa envolvendo animais seguiram os princípios internacionais orientados para a pesquisa biomédica e foram aprovados pelo Comitê de Ética desta Instituição.

4.2 Material Botânico e preparação dos extratos, frações semi-purificadas e composto puro

Foram utilizados os extratos vegetais de: *Rubus imperialis*, *Maytenus robusta*, *Epidendrum mosenii*, *Ipomoea pes caprae*, *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus*, obtidos pelos pesquisadores da área de Fitoquímica do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da UNIVALI.

Rubus imperialis Chum. Schl. (Rosaceae), partes aéreas coletadas em Florianópolis, em junho de 1997 (V.C. Filho 012).

Maytenus robusta Reiss (Celastraceae), partes aéreas coletadas no Parque Ecológico do Morro do Baú, em Ilhota, em outubro de 1997 (V.C. Filho 016).

Epidendrum mosenii Rchb. F. (Orchidaceae), caule coletado na praia Brava em Itajaí, em novembro de 1996 (V.C. Filho 003).

Ipomoea pes caprae (L.) R. Br. (Convolvulaceae), parte aéreas coletadas da Praia de Esplanada (Jaguaruna), sul de Santa Catarina, em fevereiro de 1997 (V.C. Filho 009).

Calophyllum brasiliense Cambess (Clusiaceae), raízes coletadas nos jardins da UFSC, Florianópolis, em dezembro de 1998 (V.C. Filho 007).

Cynara scolymus Linné (Compositae) folhas oriundas da “Central de Plantas” localizada em Curitiba, coletadas em fevereiro de 2000.

Os extratos brutos foram produzidos através de maceração das plantas estudadas com metanol em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 10 dias. Procedeu-se a eliminação do solvente por evaporação em pressão reduzida. A partir do extrato bruto metanólico realizou-se a partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) para obtenção das frações semi-purificadas (Figura 10) (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

O composto puro cinaropicrina foi isolado a partir da fração diclorometano da *Cynara scolymus* com a utilização de técnicas cromatográficas (NOLDIN et al., 2003).

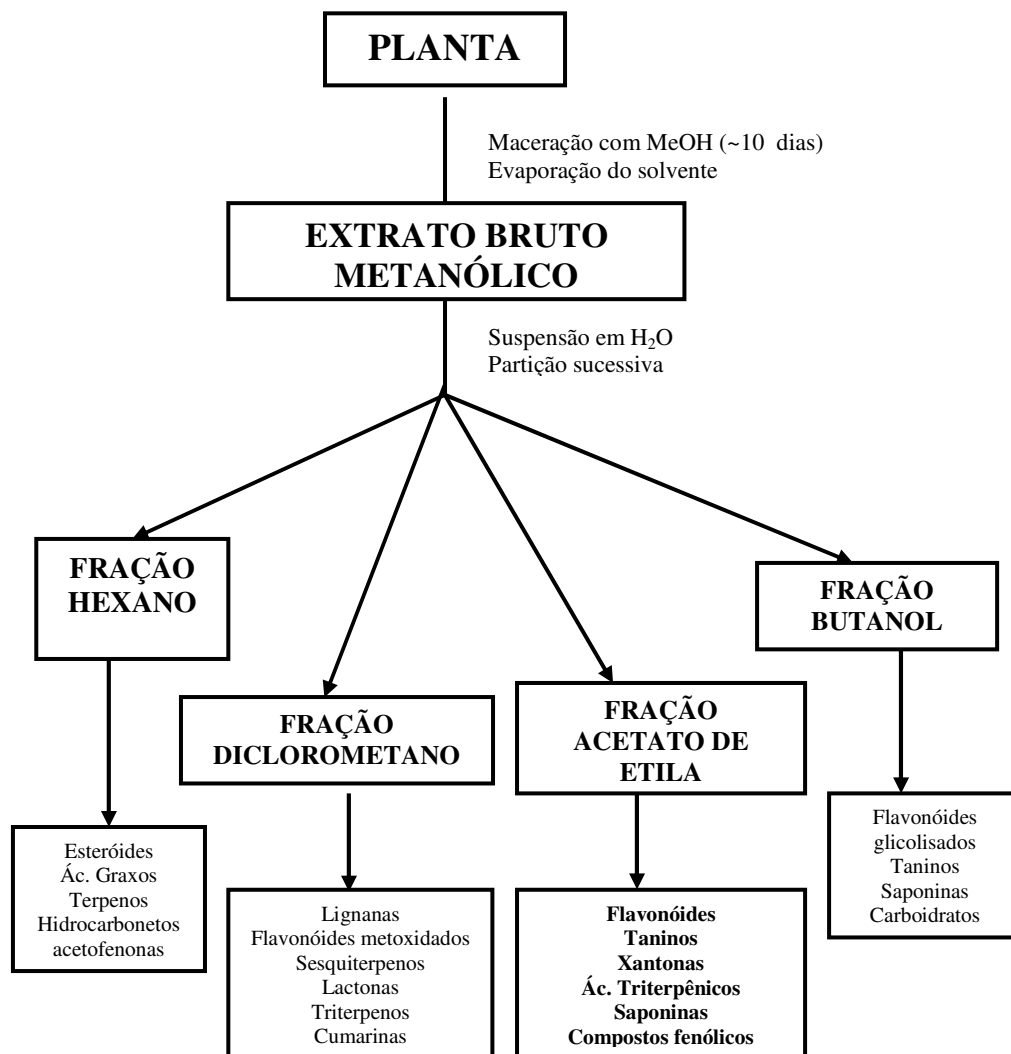


FIGURA 10-Esquema geral de partição e separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

4.3 Montagem das preparações de musculatura lisa *in vitro*

4.3.1 Íleo de cobaia

Cobaias de ambos os sexos foram eutanasiadas com pancada na cabeça e deslocamento cervical. Após a exposição do conteúdo abdominal, tiras do íleo de 10 a 20 cm de comprimentos foram obtidas da porção situada 10 a 30 cm próximo da junção ileocecal. Com auxílio de uma pipeta de 10 mL, lavou-se a luz do segmento com 10 a 20 mL de solução fisiológica de Tyrode aquecida, e retirou-se os excessos de tecido adiposo mesentérico. O segmento de íleo foi então dividido em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento. As preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 mL de solução nutritiva de Tyrode, mantidas a 37°C, através de banho circulante. A solução de Tyrode apresenta a seguinte composição (mM): NaCl 136,7; KCl 2,7; CaCl₂. 2H₂O 1,8; MgCl₂.6H₂O 1,0; NaHCO₃ 11,9; NaH₂PO₄ 0,4 e glicose 5,5. As contrações isotônicas foram registradas em quimógrafo sob carga basal de 1,0 g e amplificação de 6 vezes. As preparações permaneceram em equilíbrio por pelo menos 30 minutos antes da adição de drogas ou extratos, e a solução nutritiva foi renovada a cada 15 minutos (GÁLVEZ et al., 1996; MELZIG et al., 2001).

4.3.2 Duodeno de rato

Os animais foram eutanasiados com pancada na cabeça seguido de deslocamento cervical, e após exposição da cavidade abdominal o duodeno foi retirado da porção situada a 10 cm da junção gastro duodenal. Com auxílio de uma pipeta de 10 mL, a luz do duodeno foi lavada exaustivamente com solução de Tyrode aquecida, e os excessos de tecido adiposo mesentérico foram eliminados. O duodeno foi então dividido em fragmentos de 2 cm, e as preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 mL de solução de Tyrode, mantidas a 37°C através de banho circulante. As contrações isotônicas foram registradas em quimógrafo sob carga basal de 1,0 g e amplificação de 6 vezes (SCHLEMPER et al., 1996).

4.4 Procedimento Experimental das preparações de musculatura lisa, íleo de cobaia e duodeno de rato, *in vitro*

Decorrido o tempo de equilíbrio, foram construídas curvas concentração–efeito cumulativas a acetilcolina, para as duas preparações, na ausência ou na presença de extratos vegetais, das frações obtidas a partir do extrato bruto metanólico (0,1-2,0 mg/mL) e do composto puro (0,01-0,2 mg/mL). Os resultados foram expressos como porcentagem da resposta máxima de cada agonista, sendo que 100% equivale à curva concentração–efeito controle (Figura 11).

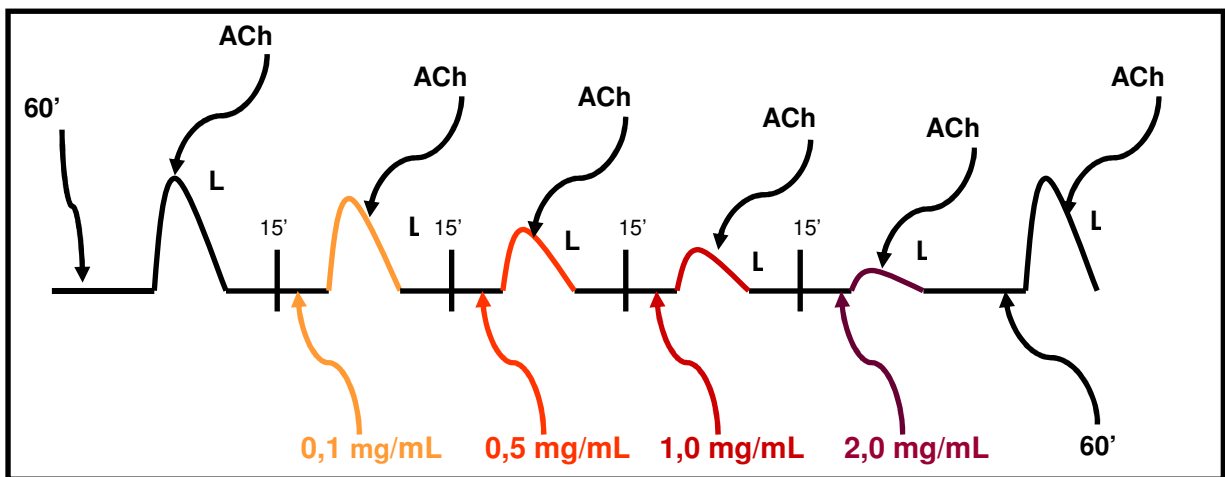


FIGURA 11-Diagrama esquemático do procedimento experimental das preparações de musculatura lisa, íleo de cobaia e duodeno de rato, *in vitro*. (L: lavagem, ACh: acetilcolina)

4.5 Trânsito Gastrintestinal

Camundongos suíços machos foram divididos em 13 grupos de 7 animais onde foram testadas diferentes doses de extrato bruto de *Cynara scolymus* (250 mg/Kg e 500 mg/Kg) e diferentes tempos de tratamento (30 a 180 minutos). Como drogas de referência foram utilizadas a atropina, um antagonista muscarínico não seletivo e a ioimbina, um antagonista α_2 adrenérgico, que atuam inibindo e aumentando, respectivamente, a motilidade do trato gastrintestinal. A salina foi utilizada para verificar a influência do veículo durante a realização do experimento.

Decorrido o tempo de tratamento específico para cada um dos grupos, realizou-se a administração de uma suspensão de 10% de carvão ativo em 5% de goma arábica por via oral (0,2 mL/Kg). Após um período de 30 minutos da administração da suspensão, cada animal foi sacrificado por deslocamento cervical, submetido a uma laparotomia e a distância percorrida pelo carvão no intestino delgado, bem como, o comprimento total do intestino, desde o esfíncter pilórico até a junção ileocecal, foi medida em centímetros. O trânsito gastrointestinal foi expresso como a percentagem do intestino delgado percorrido pelo carvão (CHAUDHURI et al., 2000; QARAWI et al., 2003).

4.6 Drogas

A acetilcolina foi obtida da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA), diluída em solução de soro fisiológico (10^{-2} M a 10^{-8} M) a partir da solução estoque (10^{-1} M), imediatamente antes do uso. Os sais Glicose, NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 (Merck KGA, Darmstadt, Germany).

Os extratos vegetais e as frações semi-purificadas foram diluídos em uma solução de 10% de etanol em água destilada para uma concentração final de 100 mg/mL. O composto puro foi diluído em solução 10% de DMSO em água destilada para uma concentração final de 10mg/mL. Com a intenção de corrigir possíveis efeitos que poderiam ser provocados por ação isolada do veículo utilizado na diluição dos extratos, realizou-se o controle paralelo do veículo durante a realização dos experimentos.

4.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, exceto as CE_{50} (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) em experimentos individuais), as CI_{50} (concentração do extrato que produz 50% de inibição em relação aos grupos controle) e pD2 (antilogaritmo de CE_{50}), que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança a 95% (Fleming et al., 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste “t” de student para amostras relacionadas ou não, ou através da análise de variância seguido pelo teste de Dunnett, quando apropriado. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Screening Farmacológico dos Extratos Brutos em íleo isolado de cobaia

O efeito farmacológico das plantas estudadas sobre a resposta contrátil induzida pela acetilcolina em íleo de cobaia está demonstrado nas Figuras 12 a 17. Em todos os experimentos foram realizados o controle paralelo com o veículo usado para diluição dos extratos, sendo que não ocorreram interferências que pudessem comprometer os resultados obtidos com as preparações. Em relação aos extratos, estes não interferiram na tensão basal das preparações, indicando que nas concentrações utilizadas não apresentam efeito agonista, com restauração da resposta contrátil da acetilcolina após sucessivas lavagens (resultados não apresentados).

A incubação das preparações com concentrações crescentes dos extratos brutos metanólicos de *Rubus imperialis*, *Maytenus robusta*, *Epidendrum mosenii* e *Ipomoea pes caprae* (0,1-2,0 mg/mL) durante 15 minutos não causou diferença significativa nas respostas obtidas entre as diferentes concentrações de extratos (Figuras 12 a 15). Os resultados demonstram que essas plantas medicinais não foram capazes de causar uma inibição de 50% em relação ao grupo controle, mesmo na presença das concentrações mais elevadas dos extratos. Os resultados de CE_{50} e da $E_{m\acute{a}x}$ não apresentaram diferença significativa para a resposta obtida para as diferentes concentrações dos extratos testados (Tabela 1 a 4).

Apesar desses resultados sugerirem que essas plantas não apresentam uma atividade antiespasmódica, outros fatores devem também ser considerados para que possamos descartar essa possibilidade de maneira conclusiva. Um deles seria o fato dos compostos presentes nos extratos brutos testados atuarem como espasmolíticos sobre outros órgãos e/ou outros mediadores químicos diferentes dos utilizados em nossos experimentos. Entretanto, até o presente momento, não há registros na literatura demonstrando essa atividade farmacológica.

Para descartar a possibilidade da presença de uma possível atividade antiespasmódica nas quatro plantas acima citadas deve-se ainda considerar potências e atividades farmacológicas diferentes entre as diversas espécies de um mesmo gênero. Nessa condição, há o exemplo da atividade antiespasmódica demonstrada pela *Ipomoea imperati* em íleo isolado de cobaia onde foram empregadas concentrações muito maiores (1,0-10 mg/mL) (PAULA et al., 2003) que as testadas nos experimentos com *Ipomoea pes caprae* e a atividade

contracturante para *Ipomoea carnea* em preparações de óleo isolado de cobaia (HORE et al., 2000). Nesse contexto, cabe também ressaltar a atividade relaxante da *Rubus idaeus* em óleo isolado de cobaia (ROJAS-VERA, PATEL & DANCKE, 2002), e da *Maytenus ilicifolia* em corpo cavernoso isolado de cobaia (HNATYSZYN et al., 2003).

Ainda sobre essas mesmas quatro plantas, outras ações farmacológicas são encontradas na literatura que fundamentam o seu emprego pela medicina popular, o que justifica a importância da continuidade da pesquisa envolvendo esses extratos em experimentos farmacológicos que comprovem essas atividades. Algumas propriedades farmacológicas já foram elucidadas, tais como as atividades citotóxica e antibacteriana da *Maytenus robusta* (NIERO et al., 2001), atividades hipoglicemiante, antibacteriana e antialérgica do gênero *Rubus* sp (NIERO et al., 1999; KANEGUSUKU et al., 2002), atividade antinociceptiva em camundongos do extrato metanólico e alguns triterpenos e esteróides obtidos de *Epidendrum mosenii* (FERREIRA et al., 2000), e atividade antinociceptiva (SOUZA et al., 2000), atividade inibidora da agregação plaquetária e como estimulante para a liberação de serotonina do extrato metanólico de *Ipomoea pes-caprae* (ROGERS et al., 2000).

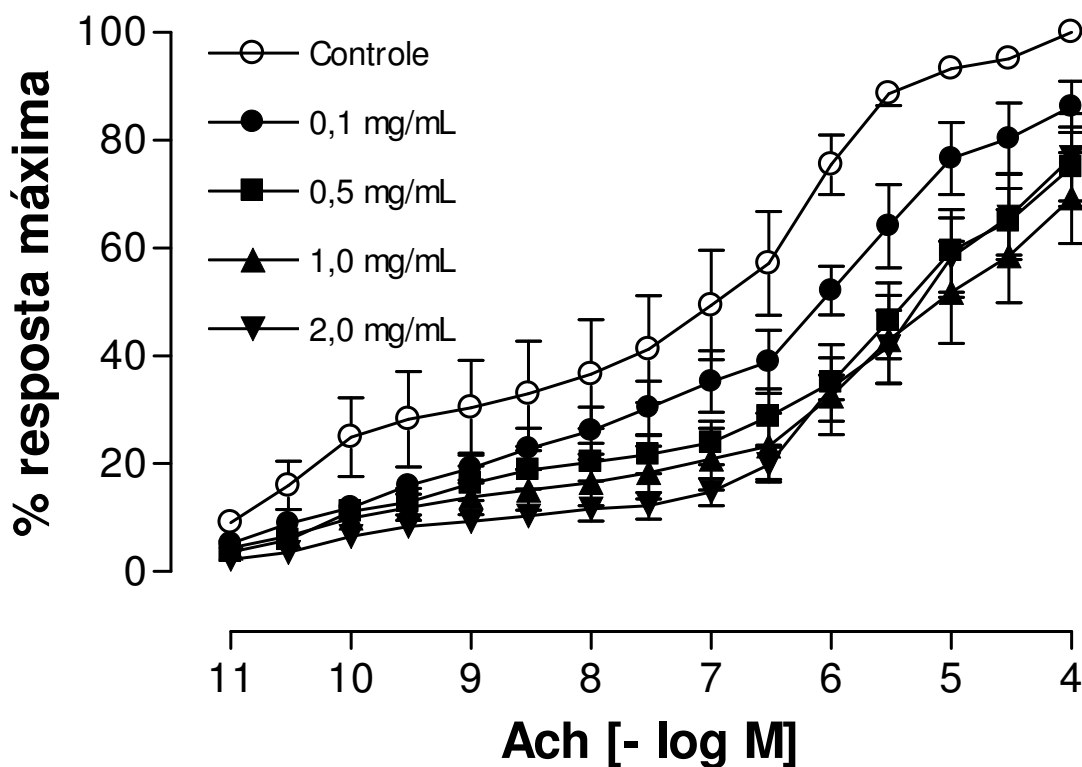


FIGURA 12 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de *Rubus imperialis* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

TABELA 1 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de *Rubus imperialis*. Os valores são a média \pm E.P.M de seis experimentos.

Droga	CE_{50} (uM)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,018 (0,01-3,08)	100	7,09
ACh + 0,1mg/mL	0,16 (0,02-1,04)	86,23 \pm 5	6,79
ACh + 0,5mg/mL	0,24 (0,07-0,82)	75,07 \pm 7	6,62
ACh + 1mg/mL	0,18 (0,04-0,90)	72,43 \pm 8	6,74
ACh + 2mg/mL	1,68 (0,07-37,9)	79,48 \pm 6	5,78

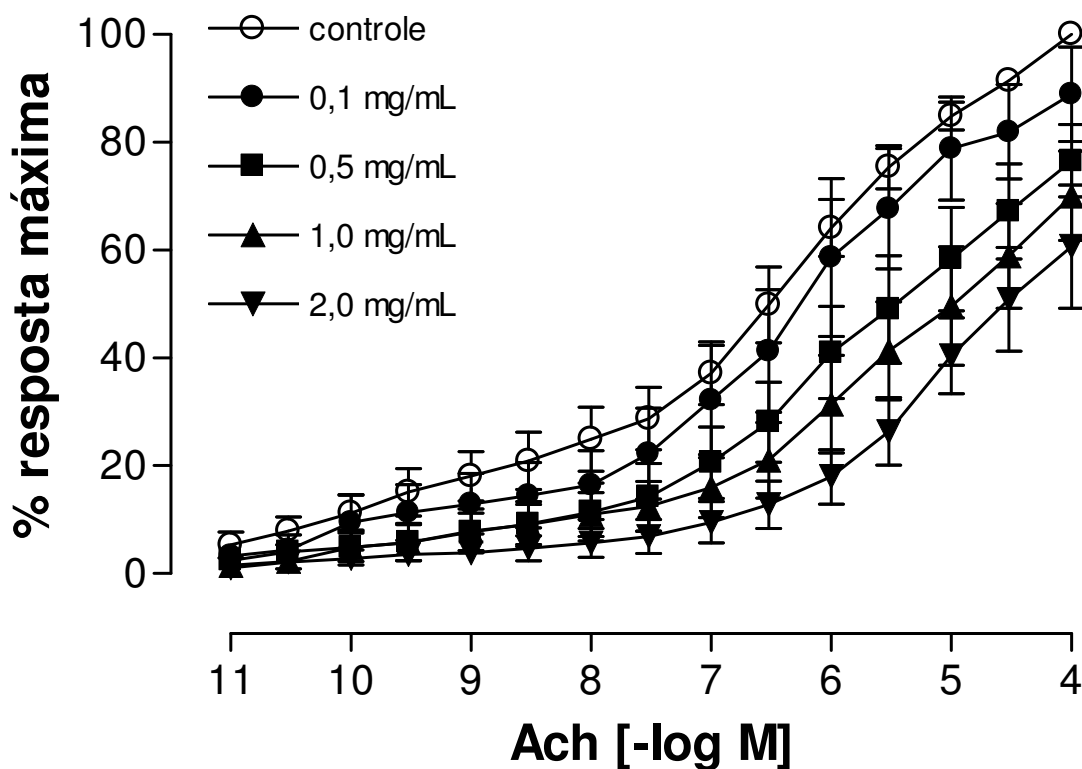


FIGURA 13 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de *Maytenus robusta* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

TABELA 2 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de *Maytenus robusta*. Os valores são a média \pm E.P.M de seis experimentos.

Droga	CE_{50} (uM)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,10 (0,02-0,51)	100	6,98
ACh + 0,1 mg/mL	1,42 (0,091-22,1)	$88,9 \pm 9$	6,85
ACh + 0,5 mg/mL	0,45 (0,03-7,51)	$76,53 \pm 8$	6,35
ACh + 1,0 mg/mL	0,90 (0,09-8,77)	$70,8 \pm 8$	6,05
ACh + 2,0 mg/mL	2,64 (0,85-8,16)	$60,66 \pm 11$	5,58

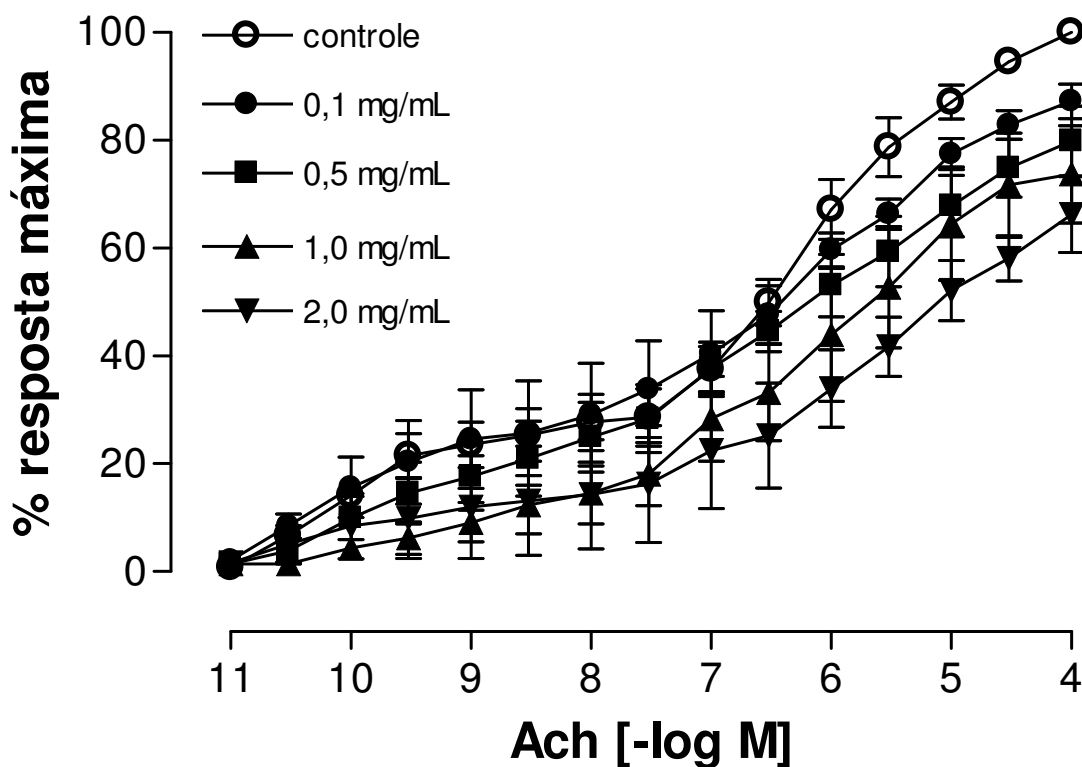


FIGURA 14 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico do caule de *Epidendrum mosenii* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

TABELA 3 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato bruto do caule de *Epidendrum mosenii*. Os valores são a média \pm E.P.M de seis experimentos.

Droga	CE_{50} (uM)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,08 (0,03-0,20)	100	7,11
ACh + 0,1 mg/mL	0,05 (0,004-0,47)	$87,24 \pm 1$	7,35
ACh + 0,5 mg/mL	0,07 (0,04-0,14)	$79,83 \pm 7$	7,15
ACh + 1,0 mg/mL	0,26 (0,005-13,5)	$73,71 \pm 9$	6,59
ACh + 2,0 mg/mL	0,25 (0,008-7,70)	$66,21 \pm 7$	6,61

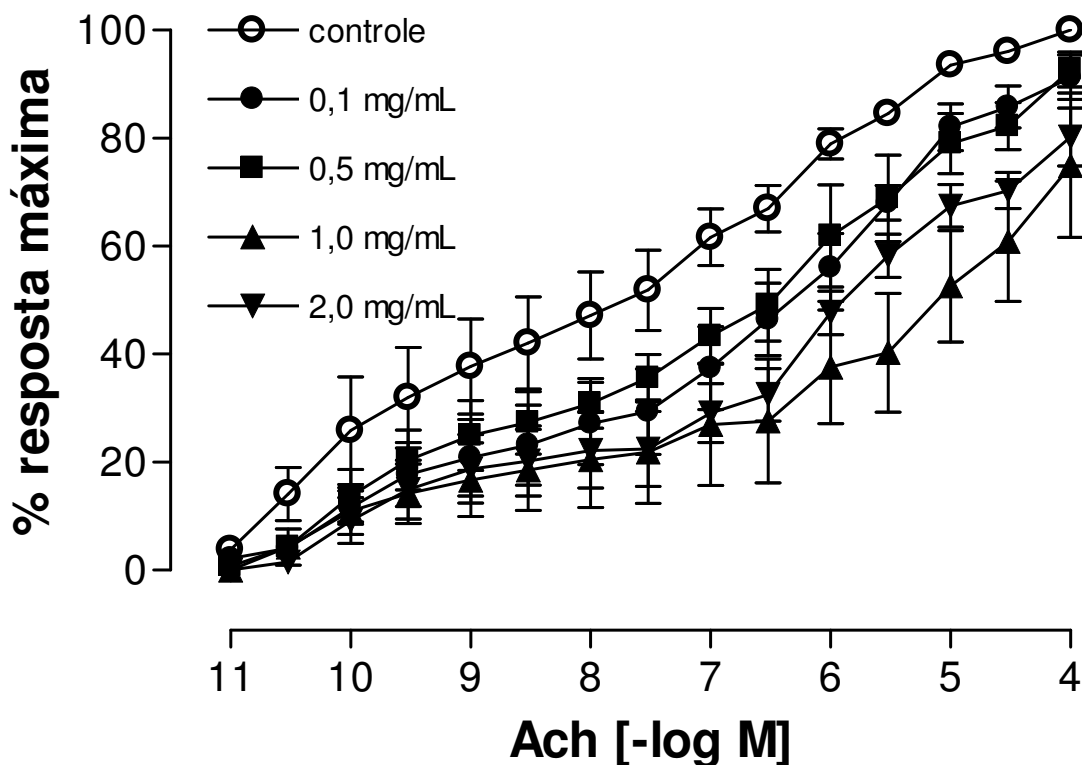


FIGURA 15 - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das partes aéreas de *Ipomoea pes caprae* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.

TABELA 4 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na presença e na ausência de diferentes concentrações do extrato bruto das partes aéreas de *Ipomoea pes caprae*. Os valores são a média \pm E.P.M de seis experimentos.

Droga	CE_{50} (μ M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,001 (0,0006-0,138)	100	8,03
ACh + 0,1 mg/mL	0,078 (0,018-0,337)	91,29 \pm 4	7,11
ACh + 0,5mg/mL	0,06 (0,003-1,17)	92,72 \pm 3	7,20
ACh + 1,0 mg/mL	0,34 (0,006-17,3)	74,98 \pm 13	6,47
ACh + 2,0 mg/mL	0,11 (0,03-0,45)	80,24 \pm 5	6,94

Em contraste aos resultados obtidos com as quatro plantas medicinais anteriores, os extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* apresentaram um antagonismo do tipo não-competitivo e dependente da concentração, frente à ação contrátil da acetilcolina, visto que proporcionaram um acentuado deslocamento para direita da curva concentração-efeito com uma inibição da resposta máxima superior a 50%, provocado pela ação independente do agonista (Figuras 16 e 17), com valores de CI_{50} (com limite de confiança de 95%) de 1,47 (0,64-3,42) e 0,85 (0,54-1,36) mg/mL, respectivamente. A inibição do efeito máximo causada pelos extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* na concentração de 2,0 mg/mL foi de 65% e 89%, respectivamente (Figuras 16B e 17B).

É bastante comum em estudos que visam avaliar a atividade antiespasmódica de plantas medicinais e compostos isolados a utilização do mediador acetilcolina e/ou do modelo de preparações *in vitro* com íleo isolado de cobaia como ferramentas farmacológicas. Alguns desses estudos como os conduzidos com: *Marrubium vulgare* (SCHLEMPER et al., 1996), *Bacopa monniera* (DAR & CHANNA, 1999), *Entandrophragma angolense* (ORISADIPE et al., 2001), *Droserae herba* (MELZIG et al., 2001), *Jasminum grandiflorum* (LIS-BALCHIN et al., 2002), *Baccharis conferta* (WEIMANN et al., 2002), *Brickellia paniculata* (MECKES et al., 2002), apresentaram resultados que podem ser comparados aos obtidos durante nossos experimentos.

A acetilcolina, agonista muscarínico, induz a contração na maioria das preparações de musculatura lisa gastrointestinal através da ativação de receptores colinérgicos muscarínicos principalmente do tipo M_3 . A presença desses receptores foi caracterizada não somente através de estudos funcionais, mas também por métodos bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular (EHLERT et al., 1999; WESS, 2003).

Com base no perfil farmacológico observado nesses resultados aliado aos dados da literatura referentes ao mecanismo de ação da acetilcolina na contração muscular lisa gastrointestinal, sugere-se que os extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* estão atuando como antagonistas da acetilcolina sem interferir diretamente com o sítio de ligação do agonista no receptor muscarínico.

Tais evidências permitem ainda sugerir que se trata de um antagonismo do tipo não-competitivo, com bloqueio em algum ponto da cadeia de eventos e inibição de modo não-específico da contração de íleo isolado de cobaia induzida pela acetilcolina. Provavelmente, esses extratos estejam inibindo a ação do agonista através de interferências nos níveis de cálcio no citosol, uma vez que a contração muscular é regulada principalmente por mudanças nos níveis de cálcio no meio intracelular (KARAKI, 2004).

Vários estudos envolvendo a pesquisa de compostos espasmolíticos isolados a partir plantas medicinais têm demonstrado a participação do íon cálcio na inibição da contração induzida pela acetilcolina em íleo isolado de cobaia. A hispidulina, por exemplo, uma flavona isolada da *Inula viscosa*, atua interferindo principalmente na ligação do cálcio nos receptores e/ou na liberação de cálcio dos estoques intracelulares, mas, em menor probabilidade, pode também atuar interferindo com o influxo de cálcio através da membrana celular (ABDALLA et al., 1988). Compostos isolados do extrato de *Dodonaea viscosa* agem interferindo nos níveis intracelulares de cálcio na célula muscular lisa (ROJAS et al., 1996). A quercetina, um flavonóide, isolado das folhas de *Psidium guajava* produz relaxamento da musculatura lisa intestinal previamente contraída pela despolarização com solução de cloreto de potássio e inibe a contração induzida por diferentes concentrações de cálcio, com deslocamento da curva concentração-efeito para direita, demonstrando claramente uma ação antagonista de cálcio (MORALES et al., 1994). O cirsiolol, uma flavona isolada de *Achillea fragrantissima*, inibe o influxo de cálcio, porém estimula a liberação de cálcio dos estoques intracelulares (MUSTAFA et al., 1992). O extrato aquoso obtido a partir das folhas de *Pavetta crassipes* inibe as contrações atuando como bloqueador dos canais de cálcio (AMOS et al., 1998).

Na literatura, até o momento, não existem relatos de uma possível atividade antiespasmódica ou de um efeito inibidor da contração celular da musculatura lisa para os extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus*. No entanto, várias outras atividades farmacológicas importantes já foram pesquisadas e encontram-se registradas. Para *Calophyllum brasiliense* são relatadas atividades analgésica (SILVA et al., 2001), quimioterápica obtida através das cumarinas isoladas a partir dos extratos (ITO et al., 2003), antissecretora, antiulcerativa e citoprotetora (SARTORI et al., 1999), antinociceptiva (ISAIAS et al., 2004), antimicrobiana (PRETTO et al., 2004), inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do HIV-1 (HUERTA-REYES et al., 2004), inibição das células humanas da linhagem tumoral *in vitro* (REYES-CHILPA et al., 2004) e inibição do crescimento de células leucêmicas (KIMURA et al., 2005).

A *Cynara scolymus* possui relatos de atividades antimicrobiana (ZHU et al., 2004), antioxidante (JIMENES-ESCRIG et al., 2003), colerética (GEBHARDT, 2002; SAENZ et al., 2002), hepatoprotetora (GEBHARDT, 2002), antioxidantes naturais e ingredientes funcionais de alimentos (SCHUTZ et al., 2004). Possui propriedades citoprotetoras (ADZET et al., 1987) e diuréticas (NOLDIN et al., 2003), inibição do stress oxidativo (ZALPOLSKA-DOWAR, 2002) e da biossíntese do colesterol (GEBHARDT, 1998), e a ativação da

enzima NO sintetase (LI et al., 2004). Pode ser utilizada no tratamento de pacientes com dispepsia funcional (HOLTMANN et al., 2003) e na hiperlipidemia (WEGENER, 2002; SHIMODA et al., 2003).

É importante que sejam verificadas mudanças na concentração de cálcio no meio intracelular para entender a regulação do músculo liso pelo cálcio e ajudar o desenvolvimento de drogas que possam regular a contração do músculo liso patológico, considerando que, alterações na contração da musculatura lisa podem resultar em diversas patologias, incluindo hipertensão, convulsão e asma (KARAKI, 2004), justificando assim a importância da continuidade desse estudo com *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus*.

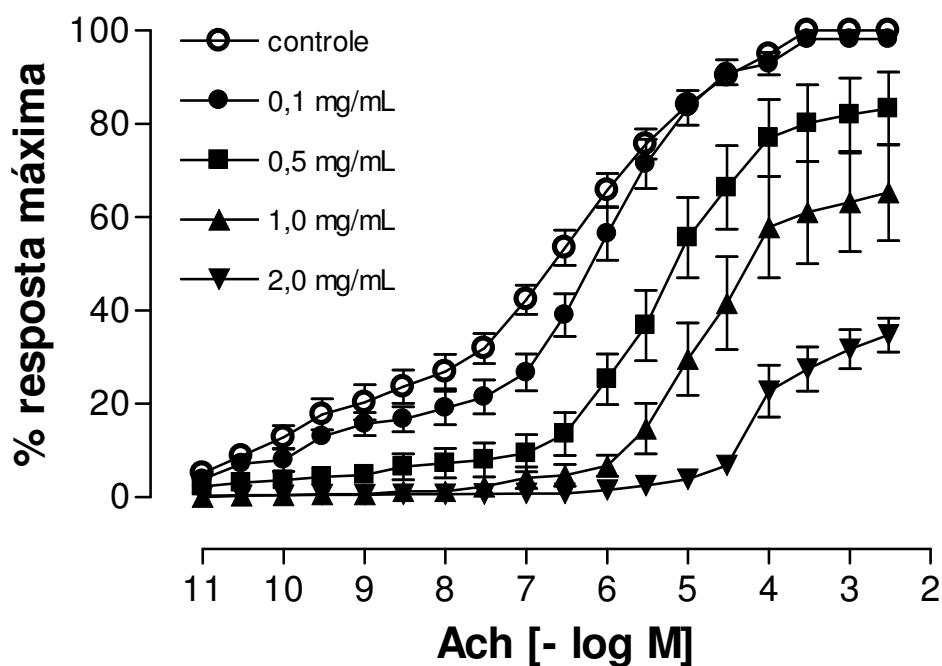


FIGURA 16A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico de raízes de *Calophyllum brasiliense* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

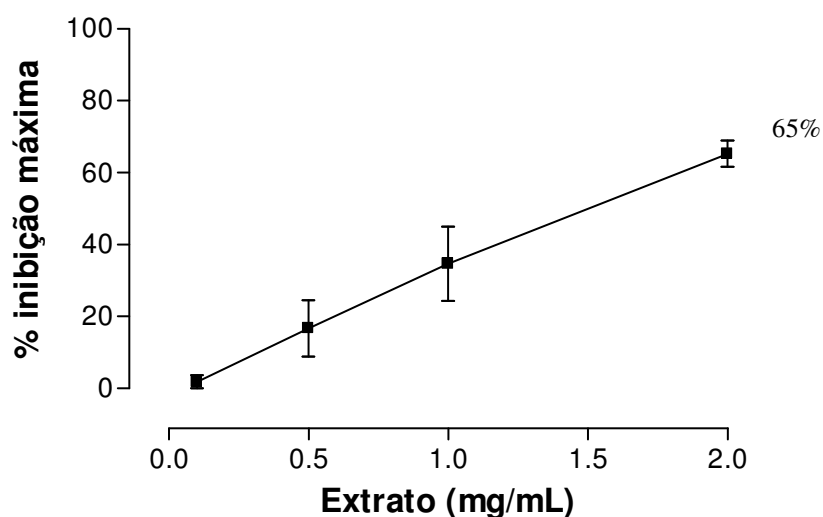


FIGURA 16B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico de raízes de *Calophyllum brasiliense* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

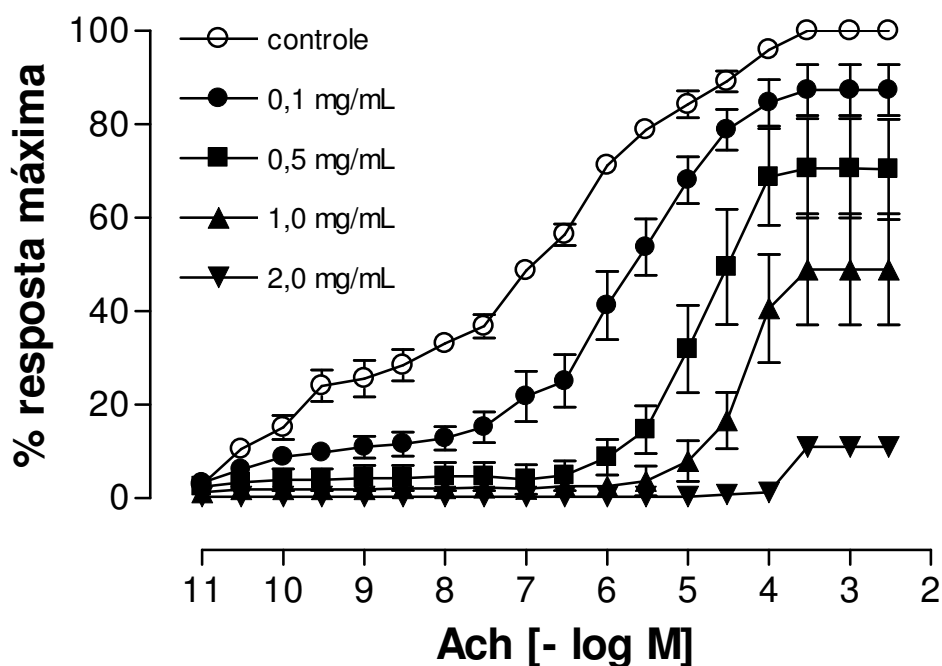


FIGURA 17A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

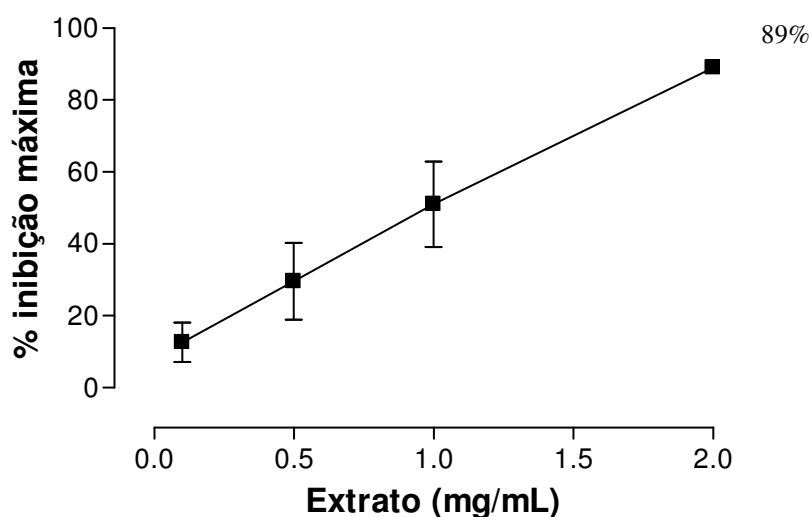


FIGURA 17B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

5.2 Análise Farmacológica dos Extratos Brutos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* em duodeno de rato

A análise farmacológica inicial desse estudo permitiu identificar a presença de uma atividade inibidora frente à ação contrátil da acetilcolina em íleo isolado de cobaia em somente duas das seis plantas testadas, *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus*. Em continuidade a esses estudos, o efeito desses dois extratos brutos metanólicos foi avaliado em outra preparação de músculo liso não-vascular, o duodeno de rato.

A possibilidade da existência de alguma especificidade entre os extratos testados e os tecidos empregados, direcionou a realização de experimentos com duas preparações musculares diferentes e com o mesmo neurotransmissor, a acetilcolina. Além disso, tem sido obtida uma boa reprodutibilidade dos resultados com experimentos utilizando duodeno isolado de rato em quimógrafo (SCHLEMPER et al., 1996; KARAMENDERES et al., 2003).

A incubação de concentrações crescentes de extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* (0,1-2,0 mg/mL) em duodeno de rato também inibiu significativamente a resposta contrátil da acetilcolina de maneira não-competitiva e concentração-dependente, com valores de CI_{50} (com limite de confiança de 95%) de 0,18 (0,15-0,24) e 0,19 (0,02-1,51) mg/mL, respectivamente (Figuras 18 e 19). Os valores de CI_{50} obtidos em duodeno de rato para extratos *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* foram bem inferiores aos obtidos anteriormente nas preparações com íleo isolado de cobaia, provavelmente devido a uma maior sensibilidade do duodeno aos extratos utilizados (Tabela 5). Em análise aos resultados obtidos com *Psidium guajava*, caracterizou-se também essa diferença de sensibilidade entre preparações envolvendo íleo e aorta isolados de cobaia que apresentaram respostas diferenciadas para o mesmo composto (MORALES et al., 1994).

O antagonismo provocado pelos extratos brutos metanólicos de *Calophyllum brasiliense* e de *Cynara scolymus* proporcionou um deslocamento da curva concentração-efeito para direita, com diminuição do efeito máximo do agonista, sugerindo, mais uma vez, um antagonismo do tipo não-competitivo. A inibição do efeito máximo causada pelos extratos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* na concentração de 2,0 mg/mL frente à ação contrátil da acetilcolina em duodeno de cobaia foi de 100% e 97%, respectivamente (Figuras 18B e 19B), superiores também aquelas observadas em íleo isolado de cobaia, 65% e 89%, respectivamente.

Achados na literatura têm demonstrado que diferentes plantas medicinais apresentam também um perfil de antagonismo não-competitivo e concentração-dependente frente à ação contrátil de acetilcolina em preparações isoladas de duodeno de rato. Entre estas plantas pode-se citar o extrato de *Achilla nobilis* (KARAMENDERES et al., 2003), *Cistus populifolius* (SANCHEZ et al., 1995), *Ageratum conyzoides* (SILVA et al., 2000) e *Marrubium vulgare* (SCHLEMPER et al., 1996). Ainda, encontramos relatos de algumas plantas com valores de CI_{50} bem próximos aos obtidos para *Cynara scolymus*, inclusive uma dessas onde a diferença de resposta para os extratos utilizados entre a preparação de íleo isolado de cobaia e duodeno de rato também foi caracterizada (Tabela 5).

Com esses experimentos foi constatado a presença de um antagonismo do tipo não-competitivo concentração-dependente reversível e aparentemente sem especificidade tecidual, visto que foi caracterizado nas duas preparações de musculatura lisa testadas, o íleo isolado de cobaia e duodeno isolado de rato tanto para o extrato de *Calophyllum brasiliense* como para o extrato de *Cynara scolymus*. Apesar dos resultados promissores obtidos para os extratos brutos das duas plantas estudadas, a *Cynara scolymus* (alcachofra) foi escolhida para a continuidade do estudo devido à facilidade de obtenção da planta e a sua grande utilização pela medicina popular nos dias atuais como medicamento para o tratamento de problemas digestivos, no controle na hipertensão arterial, problemas de colesterol, anemia, diarreia, febres, úlceras e desordens hepáticas.

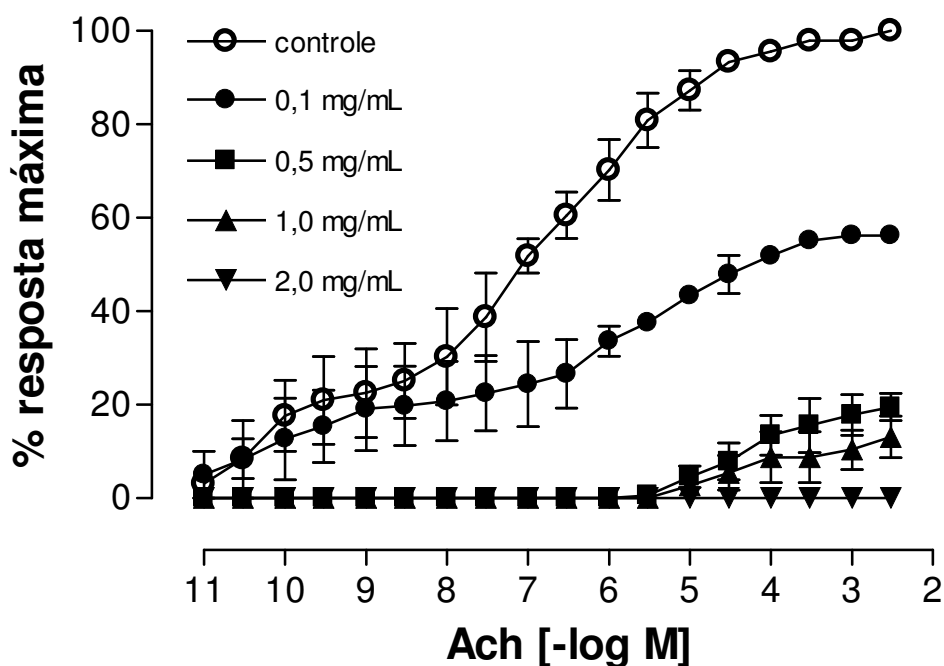


FIGURA 18A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das raízes de *Calophyllum brasiliense* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

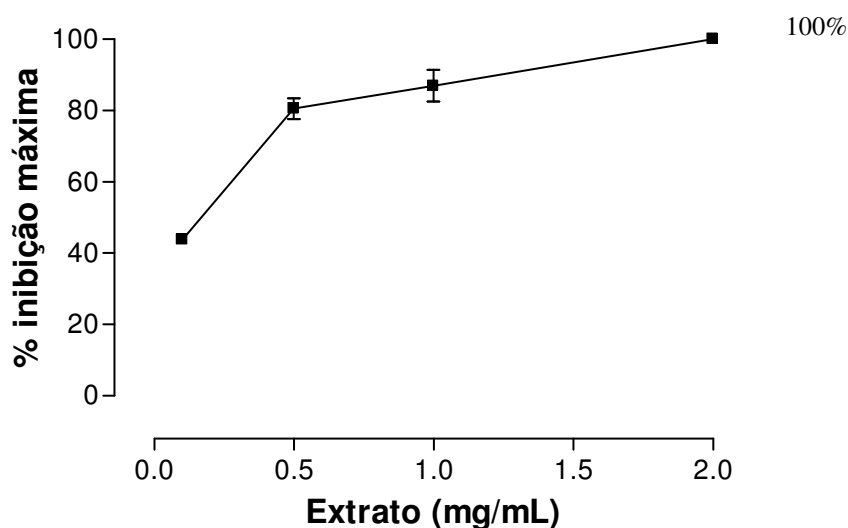


FIGURA 18B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das raízes de *Calophyllum brasiliense* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

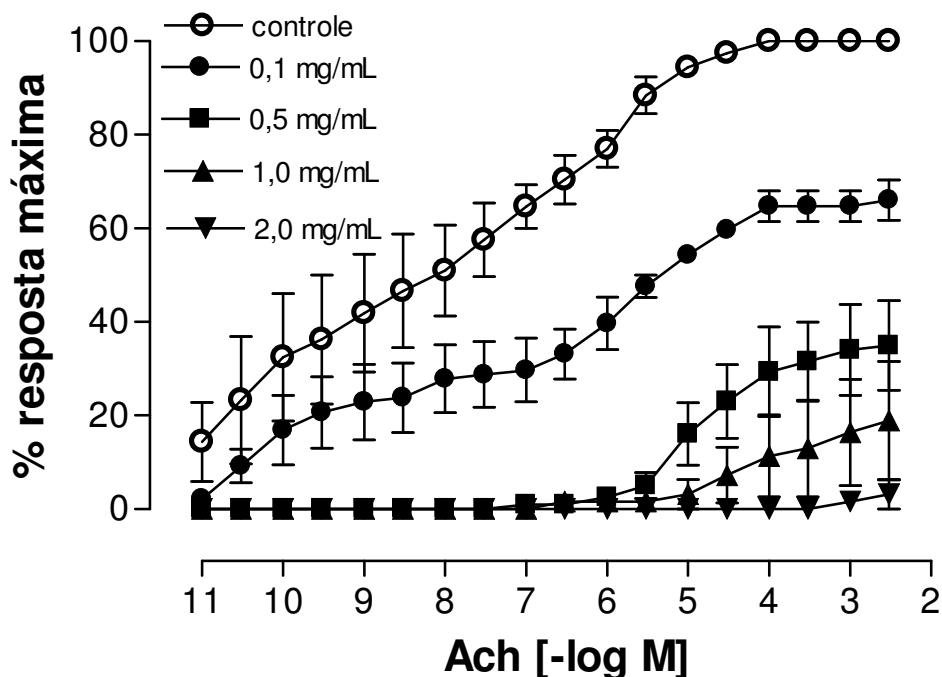


FIGURA 19A - Influência de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

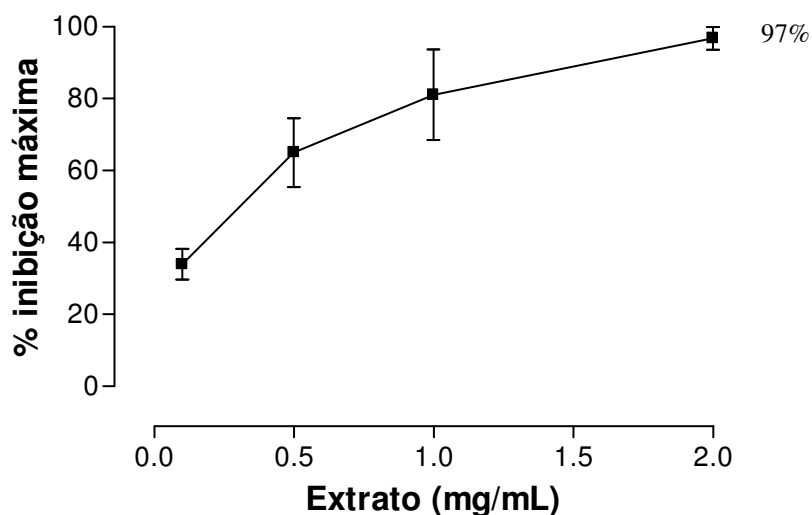


FIGURA 19B - Inibição máxima de diferentes concentrações do extrato bruto metanólico das folhas de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de duodeno isolado de rato. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de seis experimentos.

TABELA 5 - Comparação dos valores de CI_{50} (concentração do extrato que produz 50% de inibição em relação aos grupos controle) dos extratos brutos metanólicos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* na presença de acetilcolina em íleo isolado de cobaia e duodeno isolado de rato com dados da literatura para outras plantas medicinais.

Plantas	Órgãos	
	CI_{50} (mg/mL) Íleo	CI_{50} (mg/mL) Duodeno
<i>Calophyllum brasiliense</i>	1,47 (0,64-3,42)	0,18 (0,15-0,24)
<i>Cynara scolymus</i>	0,85 (0,54-1,36)	0,19 (0,02-1,51)
<i>Marrubium vulgare</i> ¹	0,80 (0,52-0,89)	0,08 (0,06-0,11)
<i>Bacopa monniera</i> ²	0,285 ± 56	
<i>Rhazya stricta</i> (liofilizada) ³	0,87 ± 0,14	
<i>Rhazya stricta</i> (butanol) ³	0,45 ± 0,03	
<i>Fagonia indica</i> ³	1,14 ± 11	

¹ SCHLEMPER et al., 1996, ² DAR & CHANNA, 1999, ³ TANIRA et al., 1996

5.3 Análise farmacológica das frações Acetato de etila, Diclorometano, Hexano e Butanólica da *Cynara scolymus* em óleo isolado de cobaia.

Na seqüência do estudo, as frações obtidas a partir do extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus* através de uma partição com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetado de etila e butanol, foram avaliadas frente à resposta contrátil de acetilcolina em óleo isolado de cobaia.

A exemplo dos experimentos realizados durante a avaliação farmacológica do extrato bruto, nos ensaios com as frações também foi feito o controle paralelo com o veículo utilizado para as diluições, sendo que igualmente não ocorreram sinais de interferências que pudessem comprometer os resultados obtidos com as preparações (resultados não apresentados).

As frações hexano e butanólica produziram uma inibição da resposta da acetilcolina com deslocamento para direita da curva e conseqüente aumento da CE_{50} . Por outro lado, mesmo na concentração mais elevada de cada fração, não foi observada uma inibição de 50% do efeito máximo em relação ao grupo controle e nem uma redução significativa dos efeitos máximos entre as diferentes concentrações utilizadas de cada fração (Figuras 20 e 21, Tabelas 6 e 7).

Estudos químicos realizados anteriormente em nossos laboratórios evidenciaram, a partir dessas duas frações, a presença de lupeol, na fração hexano, e de ácido clorogênico, escolimosídeo e, frações de cinarina na fração butanólica (NOLDIN et al., 2003), entretanto, nenhuma dessas duas frações apresentou uma atividade antiespasmódica que estimulasse nesse momento a realização de testes com algum desses compostos isolados. Dados na literatura mostram, que o lupeol, um triterpeno pentacíclico que ocorre em muitas plantas, principalmente na família Compositae, apresenta várias outras atividades farmacológicas dentre elas, citotoxicidade (MORIATY et al., 1998; NOLDIN et al., 2003), antioxidante (SHIRWAIKAR et al., 2004), nefro-protetora (MALINI et al., 1995), diurética (NOLDIN et al., 2003) e quimioprotetora contra toxicidade cutânea (SALEEM et al., 2001; SULTANA et al., 2003). Da mesma forma, a cinarina também possui relatos de várias atividades farmacológicas, tais como antimicrobiana (ZHU et al., 2004), antioxidante (PEREZ-GARCIA et al., 2000; CERVELLATI et al., 2002), colerética e hepatoprotetora (SPERONI et al., 2003). Convém ressaltar que esses dados validam cientificamente alguns dos usos populares atuais da alcachofra e caracterizam os compostos químicos lupeol e a cinarina, respectivamente, como os responsáveis pelas importantes atividades diurética e hepatoprotetora desta planta.

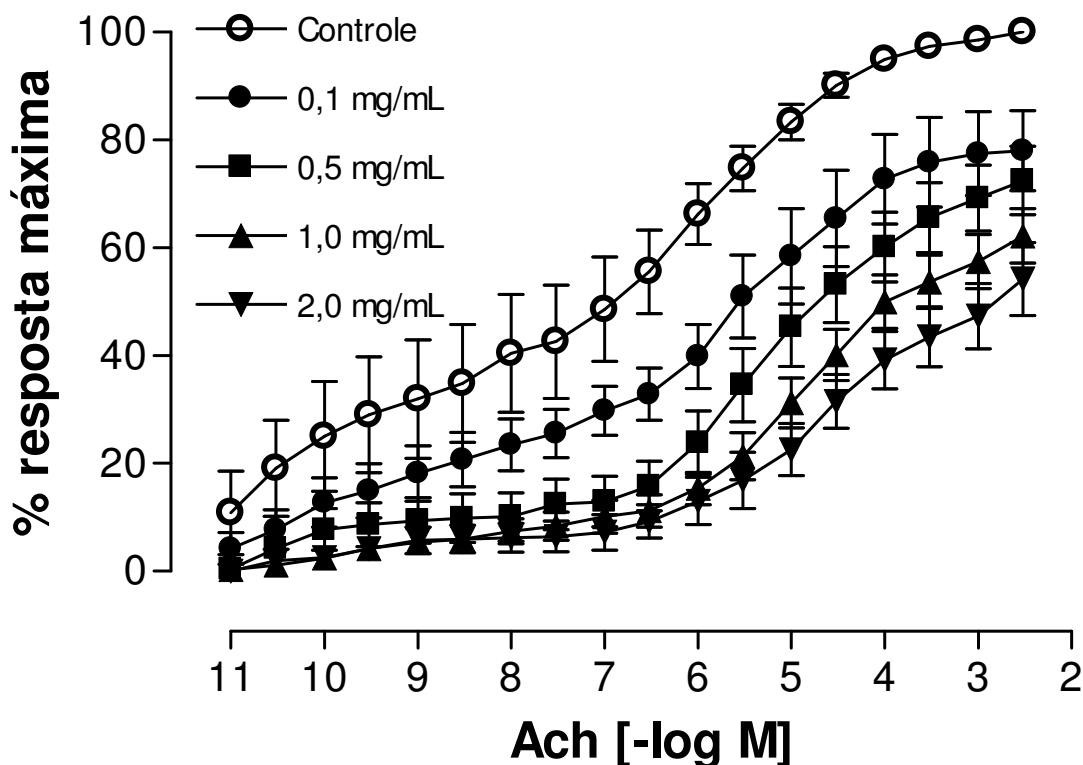


FIGURA 20 - Influência de diferentes concentrações da fração hexano de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de nove experimentos.

TABELA 6 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações da fração hexano de *Cynara scolymus*. Os valores são a média \pm E.P.M de nove experimentos.

Droga	CE_{50} (10^{-7} M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,0159 (0,000005-42,8)	100	8,80
ACh + 0,1 mg/mL	1,60 (0,145-17,5)	78,01	6,80
ACh + 0,5 mg/mL	14,7 (11,8-92,7)	72,49	5,83
ACh + 1,0 mg/mL	33,1 (11,8-92,7)	62,20	5,48
ACh + 2,0 mg/mL	90,8 (11,0-749)	54,19	5,04

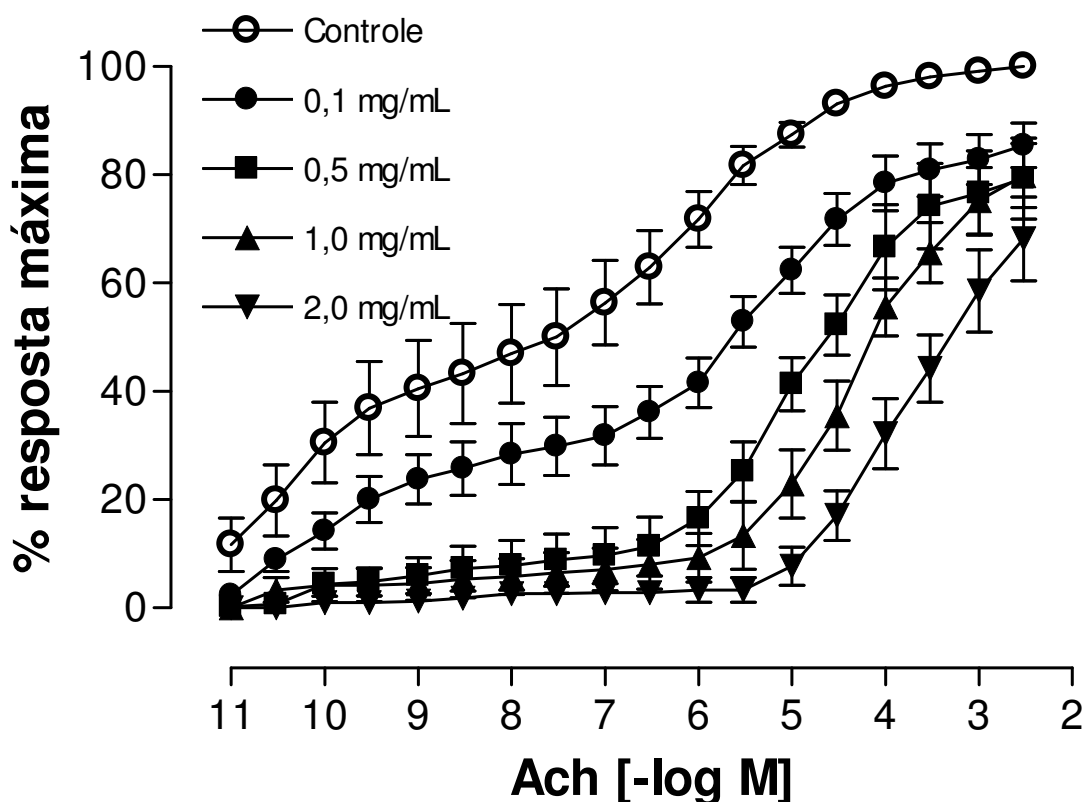


FIGURA 21 - Influência de diferentes concentrações da fração butanólica de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de nove experimentos.

TABELA 7 - Valores de CE_{50} , valores de $E_{m\acute{a}x}$ e de pD_2 da acetilcolina na ausência e na presença de diferentes concentrações da fração butanólica de *Cynara scolymus*. Os valores são a média \pm E.P.M de nove experimentos.

Droga	CE_{50} (10^{-7} M)	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
ACh	0,0338 (0,000849-1,34)	100	8,47
ACh + 0,1 mg/mL	1,01 (0,159-6,45)	85,46	6,99
ACh + 0,5 mg/mL	22,3 (4,91-101)	79,29	5,65
ACh + 1,0 mg/mL	174 (34,3-879)	79,84	4,76
ACh + 2,0 mg/mL	3590 (650-19900)	68,16	3,44

Como ocorrido anteriormente com o extrato bruto de *Cynara scolymus* e diferentemente do observado com as frações hexano e butanólica da planta, as frações acetato de etila e diclorometano causaram deslocamento à direita da curva concentração-efeito a acetilcolina associado à progressiva inibição da resposta máxima em preparações de íleo isolado de cobaia (Figuras 22 e 23) e os valores de CI_{50} (com limite de confiança de 95%) foram de 1,22 (0,96-1,56) mg/mL para a fração acetato de etila e de 0,93 (0,65-1,35) mg/mL para a fração diclorometano. A inibição do efeito máximo causada pelas frações acetato de etila e diclorometano foi de 71% e 87%, respectivamente (Figuras 22B e 23B).

Na fração acetato de etila foi caracterizada a presença de cinarosídeo, ácido cafeico e principalmente de luteolina, um flavonóide que possui diversas propriedades farmacológicas tais como aumento da atividade da enzima NO sintetase (LI et al., 2004), estimulante da secreção da bile (GEBHARDT, 2001), inibição do stress oxidativo em leucócitos humanos (PEREZ-GARCIA et al., 2000), inibição da síntese do colesterol hepático (GEBHARDT, 1998), atividade antimicrobiana (ZHU et al., 2004), atividade anti-tumoral em hepatócitos (CHANG et al., 2005), citotóxico em cultura de células humanas normais (MATSUO et al., 2005), indução de apoptose em células de carcinoma de pulmão (LEUNG et al., 2005), inibição das contrações induzidas por acetilcolina, histamina, noradrenalina e cloreto de bário em diferentes preparações de músculo liso (SIMÕES et al., 1988). Tais evidências sugerem que a atividade antiespasmódica verificada em nossos experimentos com a fração acetato de etila provavelmente se deve à presença do flavonóide luteolina. Convém ressaltar que esse composto parece não apresentar especificidade tecidual e nem especificidade somente sobre a ação da acetilcolina.

Para a fração diclorometano, obtida a partir do extrato bruto de *Cynara scolymus* com o maior rendimento dentre as quatro frações isoladas, foi caracterizado o mesmo antagonismo do tipo não-competitivo de maneira concentração-dependente do obtido durante a análise farmacológica do extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus*, inclusive com valores de CI_{50} de 0,93 (mg/mL) semelhantes aos obtidos anteriormente com o extrato bruto em íleo de cobaia e duodeno de rato de 0,85 e 1,47 (mg/mL), respectivamente.

Considerando que a fração diclorometano foi a que apresentou o melhor perfil de inibição da resposta contrátil da acetilcolina dentre as quatro frações estudadas, a etapa seguinte foi avaliar neste mesmo modelo experimental um composto puro isolado a partir dessa fração, a cinaropicrina, uma lactona sesquiterpênica.

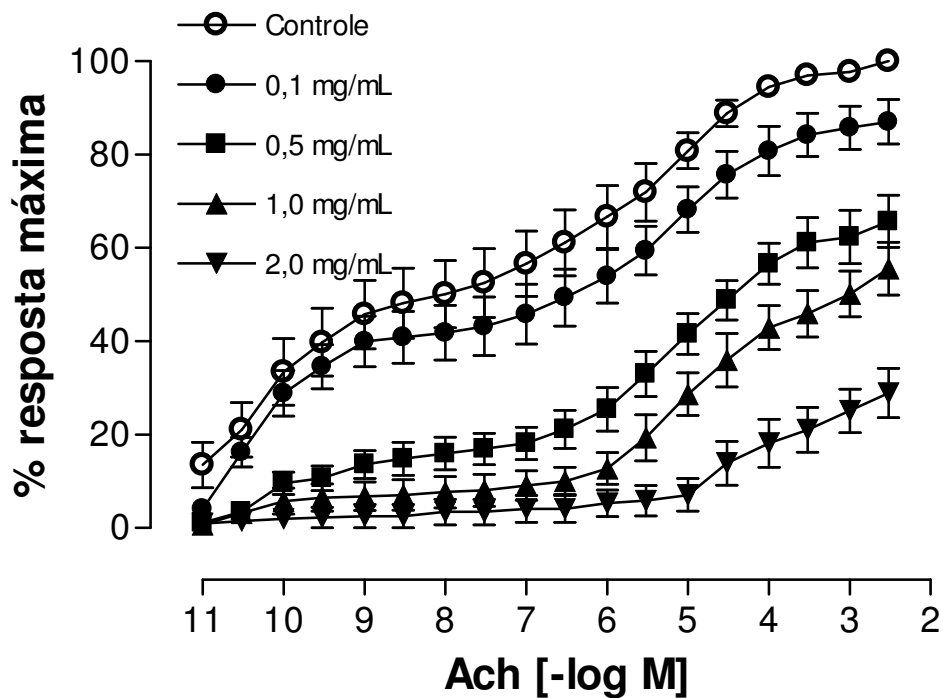


FIGURA 22A - Influência de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.

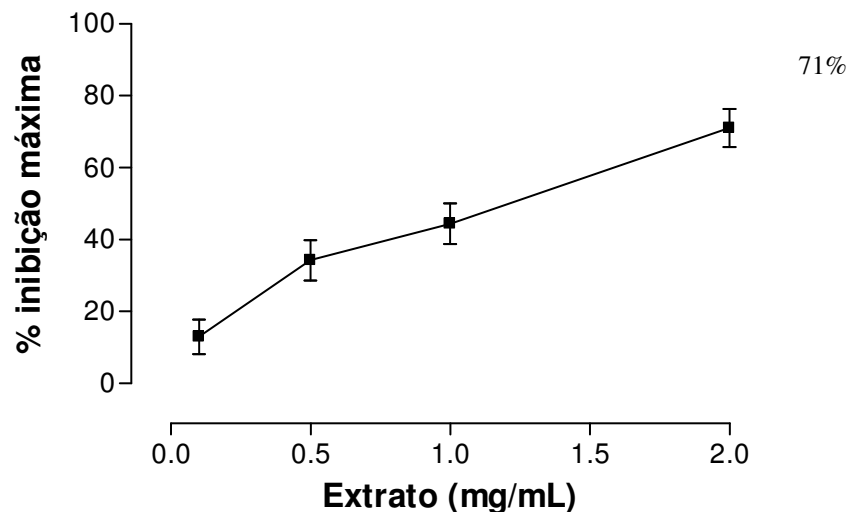


FIGURA 22B - Inibição máxima de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.

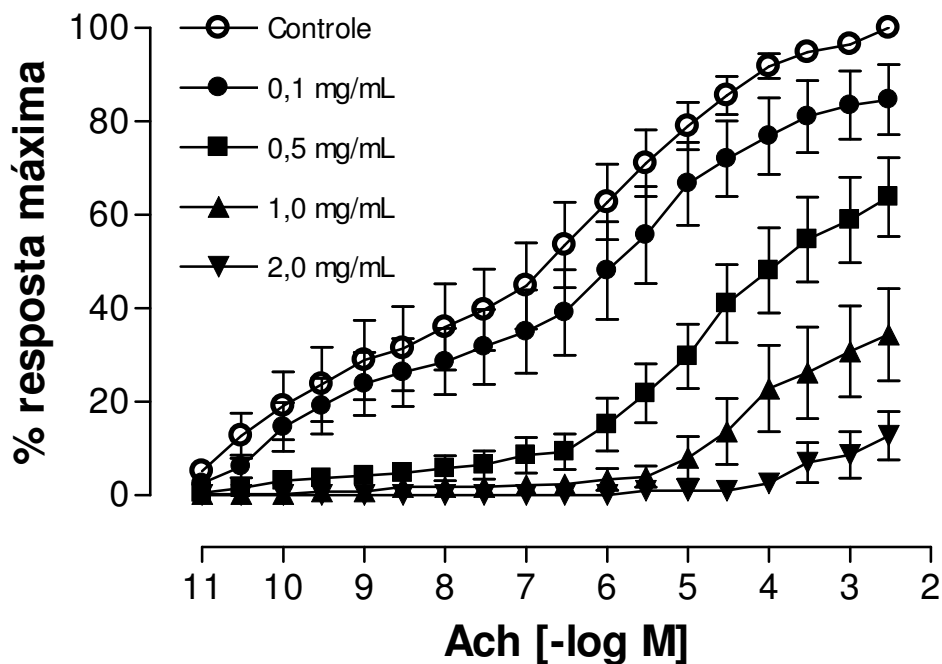


FIGURA 23A - Influência de diferentes concentrações da fração diclorometano de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de oito experimentos.

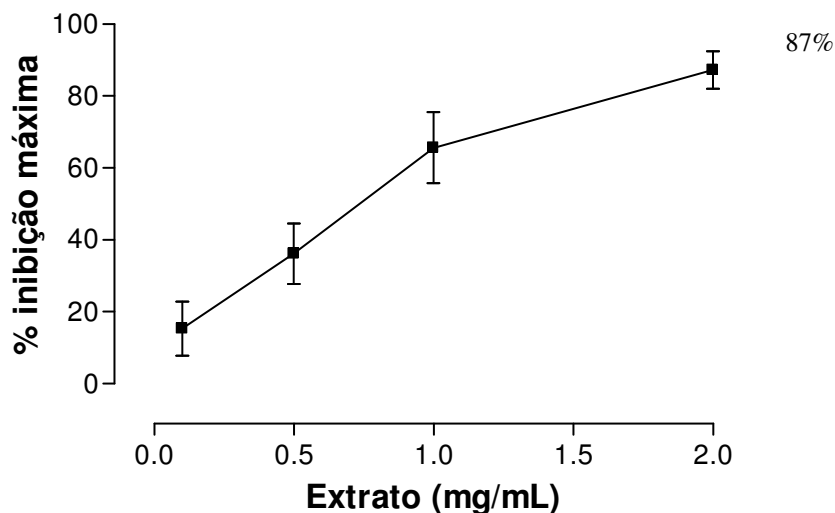


FIGURA 23B - Inibição máxima de diferentes concentrações da fração diclorometano de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de íleo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de oito experimentos.

5.4 Análise farmacológica da cinaropicrina, composto isolado da fração diclorometano da *Cynara scolymus* em óleo isolado de cobaia.

Com o objetivo de determinar o composto químico responsável pela atividade farmacológica observada com o extrato metanólico de *Cynara scolymus* em óleo isolado de cobaia (CI₅₀ 0,85 mg/mL) e em duodeno de rato (CI₅₀ 1,47 mg/mL) e devido ao mesmo perfil de antagonismo não-competitivo e concentração-dependente observado para as preparações com a fração diclorometano (CI₅₀ 0,93 mg/mL), foi procedida análise farmacológica frente à ação contrátil da acetilcolina em óleo isolado de cobaia do composto químico majoritário da fração diclorometano: a cinaropicrina (Figura 24).

Os resultados obtidos com a cinaropicrina mostraram o mesmo perfil de antagonismo observado com o extrato bruto metanólico e com a fração diclorometano da *Cynara scolymus*. O composto isolado testado causou uma inibição do efeito contrátil da resposta obtida pela acetilcolina em óleo de cobaia de maneira não-competitiva e concentração-dependente, com valores de CI₅₀ (com 95% limite de confiança, mg/mL) de 0,065 (0,049-0,086) (Figura 25). Os resultados ainda caracterizam um claro deslocamento da curva concentração-efeito para a direita com uma diminuição da resposta máxima superior a 50%. A cinaropicrina também não interferiu na tensão basal das preparações, como observado anteriormente em experimentos com o extrato bruto e com as frações, o que indica que nas concentrações utilizadas a cinaropicrina não apresentam efeito agonista, com restauração da resposta contrátil da acetilcolina após sucessivas lavagens (resultados não apresentados).

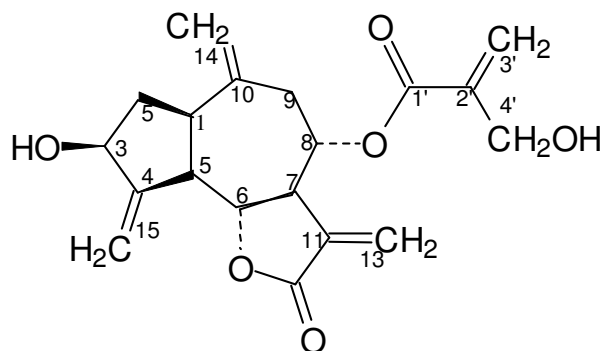


FIGURA 24 – Estrutura molecular do composto cinaropicrina.

A cinaropicrina, isolada da fração diclorometano da *Cynara scolymus* em estudos conduzidos pela UNIVALI (NOLDIN et al., 2003), é uma lactona sesquiterpênica encontrada em várias outras plantas inclusive em espécimes da família Compositae. O composto apresenta outras propriedades farmacológicas já descritas na literatura, tais como inibição da contração mediada por acetilcolina em artéria aorta torácica de coelhos (HAY et al., 1994), inibição do fator de necrose tumoral e do NO (CHO et al., 1998; CHO et al., 2001), inibição da proliferação de leucócitos de linhagens de células cancerígenas (CHO et al., 2004) atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antifúngicas (SHIMODA et al., 2003; NOLDIN et al., 2003); atividade tripanocida (SCHINOR et al., 2004); propriedades citotóxicas contra células de melanoma maligno humano (MUHAMMAD et al., 2003). A atividade farmacológica da cinaropicrina verificada também em artéria aorta torácica de coelhos frente à ação da acetilcolina sugere que a atividade farmacológica inibidora da ação contrátil da acetilcolina verificada em nossos experimentos com íleo isolado de cobaia, provavelmente, não seja tecido-específica.

Durante os experimentos foi obtido para a cinaropicrina o valor de CI_{50} de 65 ug/mL com uma porcentagem de inibição frente a ação contrátil da acetilcolina de 97% (Figura 25B). Isto sugere que nosso composto possa ser considerado equipotente a papaverina, composto ativo isolado da *Papaver somniferum*, que é um potente agente antiespasmódico natural usado pela indústria farmacêutica para a manufatura de drogas comerciais e que possui valor de CI_{50} de 30ug/mL e uma inibição de 82% (BOEGGE et al., 1996; PAULA et al., 2003).

Embora a proposta deste estudo não visou elucidar o mecanismo de ação responsável pela atividade antiespasmódica apresentada pela *Cynara scolymus*, os achados até o momento sugerem o envolvimento de um antagonismo do tipo não-competitivo e descartam a possibilidade desse composto estar inibindo a contração muscular através de uma ação direta sobre os receptores do tipo muscarínicos. Pela análise dos resultados, caracteriza-se o antagonismo do tipo não-competitivo através da presença de um claro deslocamento da curva concentração-efeito para a direita com uma diminuição da resposta máxima superior a 50%. Agindo desde modo, a cinaropicrina, composto ativo isolado a partir do extrato da *Cynara scolymus*, provavelmente esteja atuando inibindo a contração da musculatura lisa devido a uma alteração na concentração de cálcio do meio intracelular, impedindo a entrada do cálcio do meio extracelular via canais de cálcio voltagem-dependente e/ou impedindo a sua liberação dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático.

A diminuição nos níveis intracelulares do íon cálcio no meio intracelular impede o processo de contração celular, porque bloqueia a formação do complexo cálcio-calmodulina que desencadeia a contração muscular através da fosforilação dos filamentos de actina, responsáveis em formar o complexo com a miosina (Figura 26).

Neste contexto, ressaltamos ainda a importância de experimentos complementares para avaliar a participação do íon cálcio no mecanismo envolvido nessa ação farmacológica.

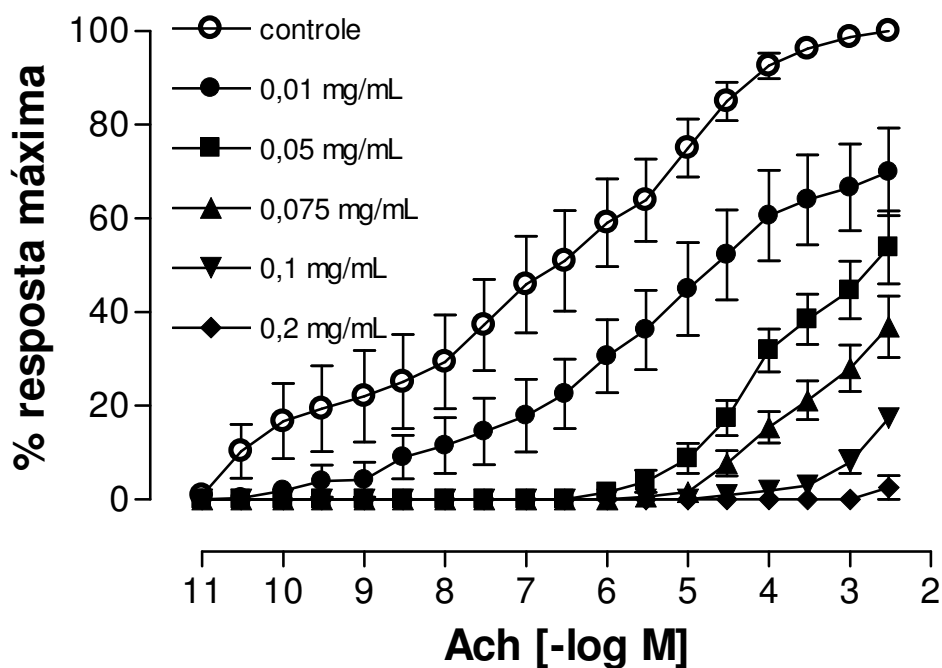


FIGURA 25A - Influência de diferentes concentrações de cinaropictina de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de fêo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.

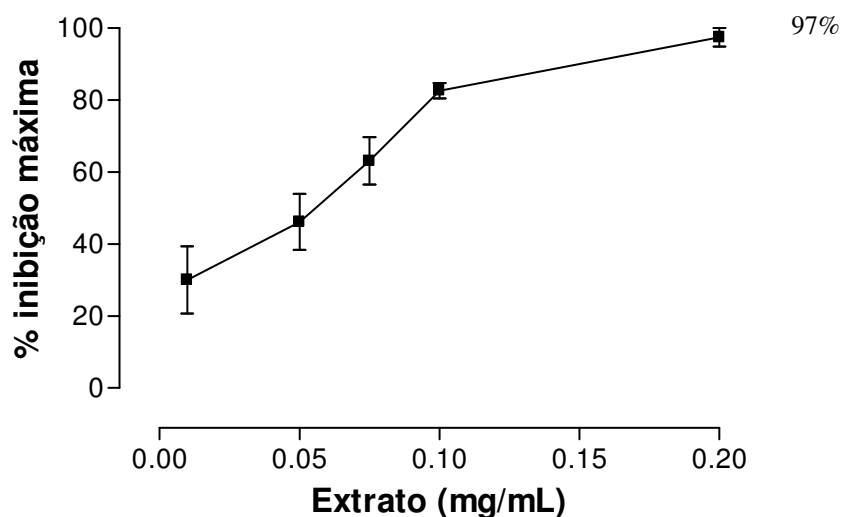


FIGURA 25B - Inibição máxima de diferentes concentrações de cinaropictina de *Cynara scolymus* sobre os efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina em tiras de fêo isolado de cobaia. Cada ponto representa a média \pm E. P. M. de sete experimentos.

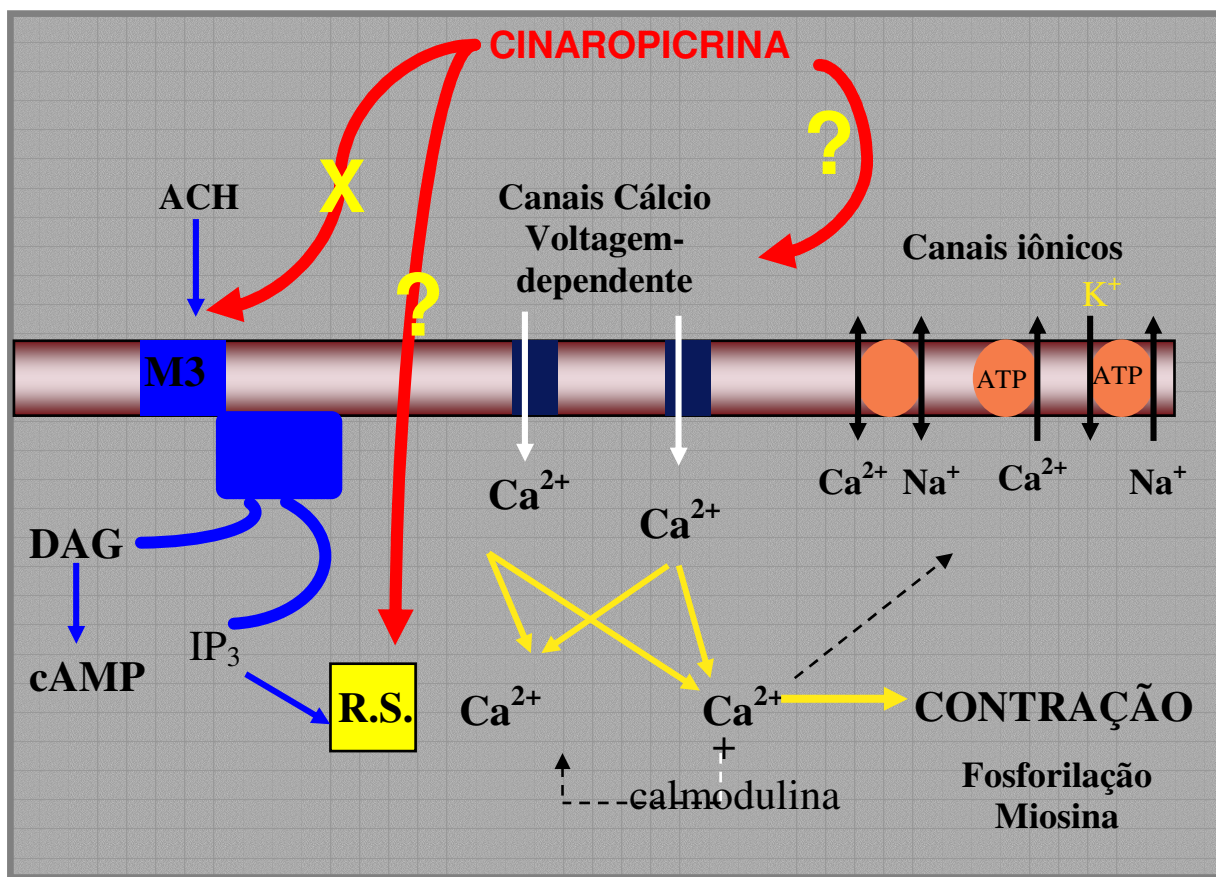


FIGURA 26 - Esquema geral do possível mecanismo de ação da cinaropícrina, lactona sesquiterpênica, isolada a partir da fração diclorometano obtida do extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus* sobre a musculatura lisa *in vitro*. (ACH: acetilcolina, DAG: diacilglicerol, cAMP: adenosina monofosfato cíclico, IP₃: inositol trifosfato, RS: retículo sarcoplasmático, Ca²⁺: cálcio, Na⁺: sódio, ATP: adenosina trifosfato, K⁺: potássio; M3: receptores muscarínicos do tipo M3).

5.5 Atividade da *Cynara scolymus* sobre o Trato Gastrointestinal

A alcachofra, *Cynara scolymus*, é amplamente utilizada pela medicina popular para o tratamento de inúmeras doenças, incluindo: hepatites, hiperlipidemia, obesidade e devido suas propriedades digestivas e diuréticas. Vários testes de triagem pré-clínicos e clínicos já confirmaram o potencial terapêutico dessa planta, principalmente no tratamento de disfunções hepato-biliares (GEBHARDT, 2002) e como colerética e colagoga (SHIMODA et al., 2003; LOPEZ-MOLINA et al., 2003; SAENZ et al., 2002).

Estudos anteriores conduzidos nessa Instituição demonstraram uma atividade citotóxica e diurética da alcachofra cultivada no Brasil (NOLDIN et al., 2003). Esses resultados, somados aos apresentados, incentivaram a continuidade da pesquisa com a finalidade de avaliar outras propriedades farmacológicas da planta. Assim, foram conduzidos experimentos utilizando camundongos *in vivo* para verificar a atividade da planta sobre a motilidade do trânsito gastrointestinal (CHAUDHURI et al., 2000; YU et al., 2000; NWAFOR et al., 2001).

A análise dos resultados obtidos (Tabela 8) permite evidenciar que o extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus* causa um aumento concentração-dependente da motilidade do trato gastrointestinal com efeito máximo entre 30-45 minutos após o tratamento.

Os resultados da ação do extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus* sobre a motilidade do trato gastrointestinal são preliminares e, portanto, não são conclusivos. Novos experimentos complementares devem ser conduzidos com o intuito de elucidar os resultados obtidos nesta triagem, bem como para avaliar o possível mecanismo de ação envolvido nessa atividade farmacológica.

TABELA 8 - Efeito do extrato bruto obtido das folhas de *Cynara scolymus* no trânsito gastrointestinal de camundongos para cada um dos grupos existentes. Valores são a média \pm E.P.M de sete experimentos.

GRUPO	DROGA	DOSE	TRATAMENTO (min)	TRÂNSITO (% \pm EPM)	VARIAÇÃO (%)
1	Salina	20mL/Kg vo	30	65,98 \pm 5,04	—
2	Atropina	16mg/Kg	30	50,38 \pm 5,48*	-15,60
3	Iombina	2mg/kg ip	30	82,23 \pm 3,86*	16,25
4	Extrato Vegetal	250mg/Kg vo	30	80,62 \pm 7,27	14,64
5	Extrato Vegetal	250mg/Kg vo	45	82,80 \pm 4,08*	16,22
6	Extrato Vegetal	250mg/Kg vo	60	58,91 \pm 3,93	-7,07
7	Extrato Vegetal	250mg/Kg vo	90	53,15 \pm 3,32*	-12,83
8	Extrato Vegetal	250mg/Kg vo	180	54,88 \pm 2,86	-11,11
9	Extrato Vegetal	500mg/Kg vo	30	91,00 \pm 3,23*	25,02
10	Extrato Vegetal	500mg/Kg vo	45	87,86 \pm 4,09*	21,88
11	Extrato Vegetal	500mg/Kg vo	60	75,01 \pm 3,65	9,03
12	Extrato Vegetal	500mg/Kg vo	90	55,29 \pm 6,41	-10,69
13	Extrato Vegetal	500mg/Kg vo	180	58,37 \pm 3,16	-7,61

Cada valor representa a média \pm E.P.M de 7 animais. * Significativamente diferente quando comparado com o controle do veículo ($p < 0,05$).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- Os extratos brutos metanólicos de *Rubus imperialis*, *Maytenus robusta*, *Epidendrum mosenii* e *Ipomoea pes caprae* não causaram uma inibição superior a 40% em relação ao grupo controle em preparações de íleo isolado de cobaia, sem diferença significativa entre as diferentes concentrações de extratos;
- Os extratos brutos de *Calophyllum brasiliense* e *Cynara scolymus* apresentaram um antagonismo do tipo não-competitivo e concentração-dependente frente à ação contrátil da acetilcolina em preparações de íleo isolado de cobaia e de duodeno isolado de rato;
- As frações hexano e butanólica de *Cynara scolymus*, quando avaliadas em preparações de íleo isolado de cobaia, não apresentaram uma inibição de 50% em relação ao efeito máximo causado pela acetilcolina;
- As frações acetato de etila e diclorometano de *Cynara scolymus* foram os mais promissores causando um deslocamento da curva à direita com inibição da resposta máxima superior a 50% para em preparações de íleo isolado de cobaia na presença de acetilcolina. Observou-se ainda que a fração diclorometano apresentou o mesmo perfil de antagonismo do extrato bruto;
- A cinaropicrina, sesquiterpeno isolado da fração diclorometano de *Cynara scolymus*, mostrou o mesmo perfil de antagonismo observado com o extrato bruto metanólico e com a fração diclorometano da *Cynara scolymus*, com resultados similares aos observados para a papaverina;
- O extrato bruto metanólico de *Cynara scolymus* causa um aumento concentração-dependente da motilidade do trato gastrointestinal com efeito máximo entre 30-45 minutos após o tratamento.

Deste modo, a inibição das contrações induzidas pela acetilcolina com a *Cynara scolymus* ocorrem provavelmente devido à presença de cinaropicrina, sesquiterpeno isolado a partir da fração diclorometano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, S.; ABU-ZARGA, M.; AFIFI, F.; AL-KHALIL, S.; SANBRIS. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. **General Pharmacology**, v. 19, n. 4, p. 559-563, 1988.
- ADZET, T.; CAMARASA, J.; LAGUNA, J.C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 612-617, 1987.
- ALONSO, R.; CADAVID, I.; CALLEJA, J.M. A preliminary study of hypoglycemic activity of *Rubus fruticosus*. **Planta Medica**, v. 46, n. Suppl, p. 102-106, 1980.
- AMOS, S.; OKWUASABA, F.K.; GAMANIEL, K.; AKAH, P.; WAMBEBE, C. Inhibition effects of the aqueous extract of *Paveta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 209-213, 1998.
- ARDENGLI, J. V. **Avaliação da ação antinociceptiva de dois triterpenos de origem natural: niga-ichigosideo f1 e filiceno - estudo do mecanismo de ação**. 2003. 61 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.
- ARRAGIE, M; METZNER, J.; BEKEMEIER, H. Antiespasmotic effects of *Hagenia abyssnica*. **Planta Medica**, v.47, n. 4,p. 240-241, 1983.
- BOEGGE, S.C.; KESPER, S.; VERSPOHL, E.J.; NAHARTEDT, A. Redution of Ach-induced contraction of rat isolated ileum by coptisine, (+)- caffeoylmalic acid, *Chelidonium majus*, and *Corydalis lutea* extracts. **Planta Medica**, v. 62, n. 2, p. 173-174, 1996.
- BALBACH, A. **As hortaliças na medicina doméstica**. 26 ed. São Paulo: Edel, 1991.
- BOLTON, T.B.; ZHOLOS, A.V. Activation of M₂ muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channels modulated by M₃ muscarinic receptors. **Life Sciences**, v.60, p. 1121-1128, 1997.
- BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CALIXTO, J.B., KARAM, E. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca. **Ciência Hoje**, v. 21, n. 123, p. 26-30, 1996.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptor: characterization, coupling and function. **Pharmacology Therapeutics**, v. 58, p.319-379, 1993.
- CAULFIELD, M.P.; BIRDSALL, N.J.M. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v.50, n.2, p. 279-290, 1998.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.
- CERVELLATI, R.; RENZULLI, C.; GUERRA, M.C.; SPERONI, E. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the Briggs-Rauscher reaction method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7504-7509, 2002.

CHANG, J.; HSU, Y.; KUO, P.; KUO, Y.; CHIANG L.; LIN, C. Increase of Bax/Bcl-X (L) ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. **Life Sciences**, v.76, n. 16, p. 1883-1893, 2005.

CHAUDHURI, L.; BASU, S.; SETH, P.; CHAUDHURI, T.; BESRA, S.E.; VEDASIROMONI, J.R.; GANGULY, B.K. Prokinetic effect of black tea on gastrointestinal motility. **Elsevier science.**, v. 66, p. 847-854, 2000.

CHO, J.Y.; PARK, J.; YOO, E.S.; BAIK, K.U.; JUNG, J.H.; LEE, J.; PARK, M.H. Inhibition effect of sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophage-like cells. **Planta Medica**, v. 64, n. 7, p. 594-597, 1998.

CHO, J.Y.; PARK, J.; KIM, P.S.; YOO, E.S.; BAIK, K.U.; PARK, M.H. Savin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor-alpha production and T cell proliferation. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 167-171, 2001.

CHO, J.Y.; KIM, A.R.; JUNG, J.H.; CHUN, T.; RHEE, M.H.; YOO, E.S. Cytotoxic and pro-apoptotic activities of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, on the viability of leukocyte cancer cell lines. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 492, n.2-3, p. 85-94, 2004.

COX, P.A.; HEINRICH, M. Ethnobotanical Drug Discovery: uncertainty or promise?. **Pharmaceutical News**, v. 8, n. 3, p. 55-59, 2001.

CIRILO, V. K. **Manual de plantas medicinais**. 44. ed. Francisco Beltrão: Assessoria, 1993.

DAR, A.; CHANNA, S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 167-174, 1999.

EBASHI, S.; IWAKURA, H.; NAKAJIMA, H.; NAKAMURA, R.; OOI, T. **Biochemical Journal**, v. 345, p. 201-211, 1966.

EGLIN, R.M.; REDDY, H.; WATSON, N.; CHALLISS, R.A.J. Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.15, p. 114-119, 1994.

EGLIN, R.M.; WATSON, N. Selective muscarinic receptor agonists and antagonists. **Pharmacology Toxicology**, v. 78, p. 59-78, 1996.

EGLIN, R.M.; CHOPPIN, A.; DILLON, M.P.; HEGDE, S. Muscarinic receptor ligands and their therapeutical potential. **Current Opinion Chemical Biology**, v. 3, p. 426-432, 1999.

EHLERT, F.J.; SAWYER, G.W.; ESQUEDA, E.E. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. **Life Sciences**, v. 64, n. 6-7, p. 387-394, 1999.

FELDER, C.C.; BYMASTER, F.P.; WARD, J.; DELAPP, N. Therapeutical opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4333-4353, 2000.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, J.; FLORIANI, A.E.O.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). **Life Sciences**, v. 66, n.9, p. 791-802, 2000.

FLEMING, P.R.; MILNE, M.D.; MORGAN, D.G.; MORRIS, M. A statistical analysis of amino acid sequence in protein chains. **International Journal of Bio-Medical Computing**, v. 3, n. 2, p. 91-100, 1972.

FLORIANI, A E.O.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; DELLE-MONACHE, R.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Analgesic compounds from *Epidendrum mosenii* stems. **Pharmazie**, v. 53, p. 426-427, 1998.

- FLORIANI, V. **Análise fitoquímica e biológica das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra)**. Monografia (Graduação em Farmácia) Centro de Educação de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2001.
- GÁLVEZ, J.; DUARTE, J.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 66-69, 1996.
- GEBHARDT, R. Inhibitor of cholesterol biosynthesis in primary culture rat hepatocytes by artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 286, n. 3, p. 1122-1128, 1998.
- GEBHARDT, R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. **Medical Science Monitor**, v.7, n. suppl 1, p. 316-320, 2001.
- GEBHARDT, R. Prevention of tauro lithocholate-induced hepatic bile canicular distortions by HPLC-characterized extracts of artichoke (*Cynara scolymus*) leaves. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 776-779, 2002.
- GILBERT, B.; ALVES, L.F. Synergy in Plant Medicines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 13-20, 2003.
- HAY, A.J.; HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K.; HOULT, J.R. Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive alpha-methylenebutyrolactone functions. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, n. 1, p. 9-12, 1994.
- HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; GARCIA J.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.D. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. **Phytomedicine**, v. 10, n. 8, p. 669-674, 2003.
- HORE, S.K.; OTTALWAR, R.; KOLEY, K.M.; PATHAK, A.K. Possible involvement of cholinergic and adrenergic mechanisms in changing contractility of guinea-pig ileum by *Ipomoea carnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 253-259, 2000.
- HOLTMANN, G.; ADAM, B.; HAAG, S.; COLLET, W.; GRUNEWALD, E.; WINDECK, T. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 18, n. 11-12, p. 1099-1105, 2003.
- HUERTA-REYES, M.; BASUALDO MDEL, C.; LOZADA, L.; JIMENES-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 2004.
- ISAIAS, D.E.; NIERO, R.; NOLDIN, V.F.; CAMPOS-BUZZI, F.; YUNE, R.A.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V. Pharmacological and phytochemical investigations of different parts of *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae). **Pharmazie**, v. 59, n. 11, p. 879-881, 2004.
- ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MISHINA, Y. CECHINEL FILHO, V.; ENJO, F.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense* 2. structure of three new coumarins and câncer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 3, p. 368-371, 2003.
- JANSSEN, L.J. Ionic mechanisms and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma?. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, p. 11161-11178, 2002.
- JIMENES-ESCRIG, A.; DRAGSTED, L.O.; DANESHVAR, B.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5540-5545, 2003.
- JORGE, R.M.; LEITE, J.P.; OLIVEIRA, A.B.; TAGLIATI, C.A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

- KANEGUSUKU, M.; BENASSI, J.C.; PEDROZA, R.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V.; MAIA, A.A.; SOUZA, M.M.; DELLE-MONACHE, F.; NIERO, R. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 57c, p. 272-276, 2002.
- KARAMENDERES, C.; APAYDIN, S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *Sipylea* (O. Schwarz) Bassler on rat isolated duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 175-179, 2003.
- KARAKI, H., OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v.49, n.2, p. 158-211, 1997.
- KARAKI, H. Historical techniques: cytosolic Ca^{2+} and contraction in smooth muscle. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 388-393, 2004.
- KIMURA, S.; ITO, C.; JYOKO, N.; SEGAWA, H.; KURODA, J.; OKADA, M.; ADACHI, S.; NAKAHATA, T.; YUASA, T.; CECHINEL FILHO, V.; FURAKAWA, H.; MAEKAWA, T. Inhibition of leukemic cell growth by a novel anti-cancer drug (GUT-70) from *Calophyllum brasiliense* that acts by induced of apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 113, n. 1, p. 158-165, 2005.
- KINGHORN, D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 3, n. 2, p. 77-79, 2002.
- KLEIN, R.M. **Contribuição ao conhecimento da flora e vegetação do Vale do Itajaí – SC**. Tese (título de doutor) Ciências na área Botânica, Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.
- KOHAMA, K.; YE, L.H.; HAYAKAWA, K.; OKAGAKI, T. Myosin light chain kinase: na action-binding protein that regulates and ATP-dependent interaction with myosin. **TIPS**, v. 17, p. 284-287, 1996.
- KONG, J.M.; GOH, N.K.; CHIA, L.S.; CHIA, T.F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.24, n. 1, p. 7-21, 2003.
- KROGH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A.O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Pharmazie**, v. 54, p. 464-466, 1999.
- LAPORTE, R.; HUI, A.; LAHER, I. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v.56, p. 439-513, 2004.
- LEUNG, H.W.; WU, C.H.; LIN, C.H.; LEE, H.Z.; Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 77-83, 2005.
- LI, H.; XIA, N.; BRAUSCH, I.; YAO, Y.; FORSTERMANN, U. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 310, n. 3, p. 926-932, 2004.
- LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; WAN HANG L. B. Jasmine absolute (*Jasminum grandiflora* L.) and its mode of action on guinea-pig ileum in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 5, p. 437- 439, 2002.
- LOPEZ-MOLINA, D.; HEERING, H.A.; SMULEVICH, G.; TUDELA, J.; THORMELEY, R.N.F.; GARCIA-CANOVAS, F.; RODRIGUES-LOPES, J.N. Purification and characterization of a new cationic peroxidase from fresh flowers of *Cynara scolymus* L. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.94, p. 23-254, 2003.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. v.1, 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998.
- MALINI, M.M.; BASKAR, R.; VARAAKSHMI, P. Effect of lupeol, a pentacyclic triterpene, on urinary enzymes in hyperoxaluric rats. **Japanese Journal of Medical Science Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 211-220, 1995.

- MATSUI, M.; MOTOMURA, D.; KARASAWA, H.; FUJIKAWA, T.; JIANG, J.; KOMIYA, Y.; TAKAHASHI, S.; TAKETO, M.M. Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M₃ subtype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, p. 9579-9584, 2000.
- MATSUI, M.; MOTOMURA, D.; FUJIKAWA, T.; JIANG, J.; TAKAHASHI, S.; MANABE, T.; TAKETO, M.M. Mice lacking M₂ and M₃ muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. **Journal of Neuroscience**, v. 22. p. 10627-10632, 2002.
- MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 2, p. 253-259, 2005.
- MECKES, M.; ROMAN-RAMOS, R.; PEREZ, S.; CALZADA, F.; PONCE-MONTER, H. Effects of a labdane diterpene isolated from *Brickellia paniculata* on intracellular Ca⁺² deposit of guinea-pig ileal longitudinal muscle. **Planta Medica**, v. 68, n. 7, p. 601-604, 2002.
- MELZIG, M.F.; PERTZ, H.H.; KRENN, L. Anti-inflammatory and spasmolytic activity of extracts from *Drosera herba*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 3, p. 225-229, 2001.
- MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; LOTUFO, L.V.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v. 1, p. 30-38, 2003.
- MORALES, M.A.; TOTORIELLO, J.; MECKES, M.; PAZ, D.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guakava* L. **Archives of Medical Research**, v. 25, n. 1, p. 17-21, 1994.
- MORIATY, D.M.; HUANG, J.; YANCEY, C.A.; ZHANG, P.; SETZER, W.N.; LAWTON, R.O.; BATES, R.B.; CALDERA, S. Lupeol is the cytotoxic principle in the leaf extract of *Dendropanax cf. querceti*. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p. 370-372, 1998.
- MUHAMMAD, I.; TAKAMATSU, S.; MOSSA, J.S.; EL-FERALY, F.S.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Centaurothamnus maximus* and *Vicoa pentanema*. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 2, p. 168-173, 2003.
- MUSTAFA, E.H., ABU ZARGA, M.; ABDALLA, S. Effects of cirsiolol, a flavone isolated from *Achillea fragrantissima*, on rat isolated ileum. **General Pharmacology**, v. 23, n. 3; p. 555-560, 1992.
- NWAFOR, P.A.; OKWUASABA, F.K. Effect of methanolic extract of *Cassia nigricans* leaves on rat gastrointestinal tract. **Fitoterapia**, v.72, p. 206-214, 2001.
- NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M.M.; MONTANARI, J.L.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D. Antinociceptive activity of Niga – ichigoside F₁ from *Rubus imperialis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1145-1146, 1999.
- NIERO, R.; MOSER, R.; BUSATO, A.C.B.; YUNES, R.A.; REIS, A.; CECHINEL FILHO, V. A comparative chemical study of *Maytenus ilicifolia* Mart. Reis and *Maytenus robusta* Reiss (*Celastraceae*). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 56c, p. 158-161, 2001.
- NOLDIN, V.F.; DELLE-MONACHE, F.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROZA, R.C.; YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v.26, n. 3, p. 331-334, 2003.
- OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.1, p. 49-58, 2003.
- ORISADIPE, A.; AMOS, S.; ADESOMOJU, A.; BINDA, L.; EMEJE, M.; OKOGUN, J.; WANBEBE, C.; GAMANIEL, K. Spasmolytic activity of methyl angolensate: a triterpenoid isolated from *Entandrophragma angolense*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 4, p. 364-367, 2001.

- PAULA, A.C.; HAYASHI, L.S.; FREITAS, J.C. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb (Convolvulaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.1, p. 195-112, 2003.
- PATON, W.D. & ZAR, M.A. The origin of acetylcholine release from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. **Journal of Physiology**, v. 194, p. 240, 1968.
- PEREZ-GARCIA, F.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. **Free Radical Research**, v. 33., n. 5, p. 661-665, 2000.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n. 1,p. 45-61, 2002.
- PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.
- PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L.; SANDBERG, F.; WASUWAT, S. Inhibitory effect of extract of *Ipomoea pes-caprae* on guinea-pig ileal smooth muscle. **Acta Pharmaceutica Nordica**, v. 1, n. 1, p. 41-44, 1989.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p. 19-21, 1992.
- PRETTO, J.B.; CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; SARTORI, M.R.; ISAIAS, D.E.; CRUZ, A.B. Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/ Guttiferae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 59, n. 9-10, p. 657-662, 2004.
- QARAWI, A.A.; ALI, B.H.; AL-MOUGY, S.A.; MOUSA, H.M. Gastrointestinal transit in mice treated with various extracts of date (*Phoenix dactylifera* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 37-39, 2003.
- RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.
- REYES-CHILPA, R.; ESTRADA-MUNIZ, E.; APAN, T.R.; AMEKRAZ, B.; AUMELAS, A.; JANKOWSKI, C.K.; VAZQUEZ-TORRES, M. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Sciences**, v. 75, p. 1635-1647, 2004.
- ROGERS, K.L.; GRICE, I.D.; GRIFFITHS, L.R. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 355-363, 2000.
- ROJAS, A.; CRUZ, S.; PONCE-MONTER, H.; MATA, R. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. **Planta Medica**, v. 62, n. 2, p. 154-159, 1996.
- ROJAS-VERA, J.; PATEL, A.V.; DACKE, C.G. Relaxant activity of raspberry (*Rubus idaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 7, p. 665-668, 2002.
- ROSA, P. W.; NIERO, R.; MACHADO, M.S.; CECHINEL-FILHO, V. Perfil Fitoquímico e Avaliação Sazonal de *Epidendrum mosenii*. VI Jornada Farmacêutica, UNIVALI, Itajaí-SC, p. 62, 2005.
- SANCHEZ DE ROJAS, V.R.; ORTEGA, T.; VILLAR, A. Inhibitory effects of *Cistus populifolius* on contactile response in isolated rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 59-62, 1995.
- SAENZ RODRIGUES, T.; GARCIA GIMENEZ, D.; de la PUERTA VAZQUEZ, R. Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by na artichoke leaf extrac in rats. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 687-693, 2002.
- SALEEM, M.; ALAM, A.; ARIFIN, S.; SHAH, M.S.; AHMED, B.; SULTANA, S. Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide um murine skin. **Pharmacology Research**, v.43, n. 2, p. 127-134, 2001.

- SARTORI, N.T.; CANEPELLE, D.; SOUSA, P.T. Jr; MARTINS, D.T. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. Bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 2, p. 149-156, 1999.
- SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 65-72, 1985.
- SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; ITO, I.Y.; ALBURQUERQUE, S.; DIAS, D.A. Trypanocidal and antimicrobial activities of *Moquinia kingii*. **Phytomedicine**, v.11, n. 2-3, p. 224-229, 2004.
- SCHLEMPER, V.; RIBAS, A.; NICOLAU, M.; CECHINEL FILHO, V. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract from *Marrubium vulgare* on isolated tissues. **Phytomedicine**, v.3, n. 2, p. 211-216, 1996.
- SCHULTZ, A.R. **Introdução ao estudo da Botânica sistemática**, v.2, 3. ed. Porto Alegre: Globo, 1968.
- SCHUTZ, K.; KAMMERER, D.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, p. 4090-4096, 2004.
- SHIMODA, H.; NINOMIYA, K.; NISHIDA, N.; YOSHINO, T.; MORIKAWA, T.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycoside from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): structure requirement and mode of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 223-228, 2003.
- SHIRWAIKAR, A.; SETY, M.; BOMMU, P. Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch.-Ham stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n. 7, p. 686-690, 2004.
- SILVA, K.L.; PEREIRA, M.A.S.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V. **Estudos químicos e farmacológicos de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae)**. Seminário Integrado de Iniciação Científica 5, 1999, Joaçaba/SC. Caderno de resumo. p.203, 09 – 11/09/1999.
- SILVA, M.J.; CAPAZ, F.R.; VALE, M.R. Effects of the water soluble fraction from leaves of *Ageratum conyzoides* on smooth muscle. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 2, p. 130-132, 2000.
- SILVA, K.L.; SANTOS, A.R.S.; MATTOS, P.E.O.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Thérapie**, v.56, p. 31-434, 2001.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRAGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 1986.
- SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LMA.) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.22, n.3, p. 281-293, 1988.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRAGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 1998.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GRACE, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2001.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v.372, p. 231-236, 1994.
- SOUZA, M.M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

- SPERONI, E. CERVALLATI, R. GOVONI, P.; GUIZZARDI, S. RENZULLI, C.; GUERRA, M.C. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complains. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p.203-211, 2003.
- STENGEL, P.W.; YAMADA, M.; WESS, J.; COHEN, M.L. M₃-receptor knockout mice: muscarinic receptor function in atria, stomach fundus, urinary bladder, and trachea. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, p. r1443-r1449, 2002.
- SULTANA, S.; SALEEM, M.; SHARMA, S.; KHAN, N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, n. 8, p. 827-831, 2003.
- SWANSTON-FLATT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J.; FLATT, P.R. Tradicional plants treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. **Diabetologia**, v. 33, n. 8, p. 462-464, 1990.
- TANIRA, M.O.M.; ALI, B.H.; BASHIR, A.K.; WASFI, I.A.; CHANDRANATH, I.: Evaluation of the relaxant activity of some united arab emirates plants on intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p.545-550, 1996.
- THOMAS, E.A.; BAKER, S.A.; EHLERT, F.J. Functional role for the M₂ muscarinic receptor in smooth muscle of guinea pig ileum. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 102-110, 1993.
- TOMLINSON, T.R.; AKERELE, O. **Medicinal plants: their role in health & biodiversity**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 1993.
- VAN BREEMEN, C. and SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating [Ca²⁺]_i smooth muscle. **Annual Reviews Physiology**, v. 51, p. 315-329, 1989.
- WEGENER, T. The status of herbal antilipemic agents. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 152, n. 15-16, p. 412-417, 2002.
- WEIMANN, C. GORANSSON, U.; PONGPRAYOON-CLAESON, U.; CLAESON, P.; BOHLIN, L.; HEINRICH, R.; HEINRICH, M. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 99-104, 2002.
- WESS, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. **Critical Reviews in Neurobiology**, v. 10, p. 69-99, 1996.
- WESS, J. Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. **Trends in Pharmacology Sciences**, v. 24, n.8, p. 414-420, 2003.
- WHO. **WHO monographs on selected medicinal plants**. v.1. Geneva, World Health Organization, 1999.
- YAMADA, M. et al. Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M₅ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.98, 14096-14101, 2001.
- YU, L.; LIAO, J.; CHEN, C. Anti-diarrheal effect of water extract of *Evodiae fructus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 39-45, 2000.
- ZAPOLSKA-DOWAR, D.; ZALPOSKI-DOWAR, A.; NARUSZEWICZ, M.; SINNICKA, A.; KRANODEBSKA, B.; KOLDZIEJ, B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in culture endothelial cells and monocytes. **Life Sciences**, v. 71, n. 24, p. 2897-2908, 2002.
- ZHU, X.; ZHANG, H.; LO, R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7272-7278, 2004.
- ZHU, X.F.; ZHANG, H.X.; LO, R. Antifungal activity of *Cynara scolymus* L. extracts. **Fitoterapia**, v.76, p. 108-111, 2005.

ZONTA, C.M.; RUEDIGER, R. **Monografia de Estágio, Curso de Farmácia**, Universidade do Vale do Itajaí : Itajaí, SC, Brasil, 1996.

8. ANEXOS

Segue em anexo a produção científica gerada pela Dissertação (resumos e artigos).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)