

FABRÍCIO DE MELO GARCIA

**MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE
PRODUTOS OBTIDOS DE *Solanum asperum* RICH.
(SOLANACEAE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

“PROF. DELBY FERNANDES DE MEDEIROS”

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**João Pessoa – PB
2007**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FABRÍCIO DE MELO GARCIA

**MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE
PRODUTOS OBTIDOS DE *Solanum asperum* RICH.
(SOLANACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

João Pessoa – PB

2007

G216, Garcia, Fabrício de Melo.
Monitoração da atividade espasmolítica de produtos obtidos de *Solanum asperum* RICH (*Solanaceae*) / Fabrício de Melo Garcia. – João Pessoa, 2007.
81p.: il.
Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva
Dissertação (mestrado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Solanum asperum*.
3. Atividade espasmolítica.

UFPB/BC

CDU: 547.9 (043)

FABRÍCIO DE MELO GARCIA

**MONITORAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE
PRODUTOS OBTIDOS DE *Solanum asperum* RICH.
(SOLANACEAE)**

Aprovado em 28 / 08 / 2007

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva –
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora**

**Prof. Dr Antônio Pedro de Araújo Filho
Universidade Federal da Paraíba
Examinador externo**

**Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba
Examinador interno**

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Francisco Garcia de Oliveira e Maria de Fátima de melo Garcia, pelo incentivo e pelo incansável apoio nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós, Luís de Albuquerque Melo e Maria da Costa Melo por contribuírem para a formação do meu caráter e por todo o apoio moral e presença marcantes em minha vida.

Aos meus irmãos, Fernanda
Cristina de Melo Garcia e
Fábio de Melo Garcia
pelo companheirismo.

Aos meus tios, Marcelino
da Costa Melo e Dolores
Diniz por estarem sempre
presentes nos momentos
mais complicados da
minha vida

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a capacidade e o privilégio de realizar esse trabalho.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, que me mostrou de maneira simples e honesta que a melhor forma de liderar é dando o exemplo. O fato de ter participado do seu grupo de pesquisa já é motivo de muito orgulho.

À Fabiana de Andrade Cavalcante pelo exemplo de competência e por toda a disponibilidade para ajudar sempre.

À Rosimeire Ferreira dos Santos pela atenção e pelo empenho em me ajudar de maneira muito solidária.

À Dra. Tania Maria Sarmento da Silva e sua equipe, pela parceria firmada para o desenvolvimento deste trabalho, cedendo os produtos vegetais, e pelas dúvidas que surgiram e foram esclarecidas no decorrer do mesmo.

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

Aos amigos (a)s Pós-Graduandos, Joelmir, Kiriaki, Daniele, Marcos, Julianeli, Rita, Hilzeth, Cibério, Fábio e Vicente pelo convívio e por tudo o que aprendi com cada um deles.

À Luciano que sempre foi solidário e por todos os ensinamentos estatísticos com o programa Graphpad Prisma[®].

Aos alunos de Iniciação Científica, que estão ou estiveram no Laboratório, Sílvia, Kelly, Juliana, Ítalo e Rafael pela ajuda na bancada e amizade.

Aos técnicos José Crispim Duarte, Luís Cordeiro da Silva e Adriano Cordeiro pela capacidade e prazer com que realizam os seus trabalhos, que diretamente contribuíram para o bom desempenho deste.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo compromisso e apoio.

Aos professores deste Programa, que, cada um ao seu modo, foi capaz de contribuir para a minha formação.

À Profa. Dra. Temilce Simões de Assis pelas valiosas contribuições e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

À secretária Tânia Maria Alves de Araújo, por sua competência à frente da secretaria deste programa. Por todos os momentos de descontração que me proporcionou e por nossa amizade.

Aos colegas (a)s pós-graduandos da turma de 2004, Walter, Karla, Kellyanne, Hermann, Fernando, Naiara, Alethéia, Caliandra, Harlan, Islânia, Ana Carolina, Wilian, Isabela, Kristerson, Rubens, Marcelo, José Jailto e Fabrícia, por todo o tempo em que nos reunimos para estudar, discutir e aprender juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

RESUMO

RESUMO

Monitorização da Atividade
Espasmolítica de Produtos Obtidos de
Solanum asperum Rich.
(SOLANACEAE) Garcia, F. M. (2007)

Solanum asperum Rich. (Solanaceae) apresenta-se como um arbusto ereto, conhecida popularmente como “jussara” ou “coça-coça” (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999). Estudos anteriores realizados com o extrato metanólico bruto (SAs-MeOH) e com a fase acetato de etila (SAs-AcOEt), obtidos das partes aéreas de *S. asperum*, demonstraram que apenas a fase SAs-AcOEt apresentou efeito espasmolítico em íleo e traquéia isolados de cobaia (COSTA, 2006). Decidiu-se dar continuidade a monitoração da atividade espasmolítica do extrato SAs-MeOH, das fases SAs-AcOEt e hexano-etérea (SAs-HEX), bem como do flavonóide (SA-740), obtidos de *S. asperum*, em diferentes tipos de músculo liso. Os parâmetros avaliados foram a potência (CI_{50} ou CE_{50}) e a eficácia (E_{max}) relativas. Nenhuma das drogas testadas apresentou efeito relaxante em aorta de rato. Em útero de rata a fase SAs-AcOEt inibiu as contrações fásicas induzidas por carbacol ou por ocitocina. ($CI_{50}=262,4 \pm 15,5$ e $249,5 \pm 24,4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) bem como relaxou o útero pré-contraído por KCl (E_{max} em torno de 51 %) efeitos estes não observados com o SAs-MeOH, SAs-HEX e SA-740 sugerindo que o (s) princípio (s) ativo (s) com atividade tocolítica está (ão) presente (s) apenas na fase SAs-AcOEt. Em íleo de cobaia, diferente do flavonóide SA-740, a fase SAs-HEX inibiu as contrações fásicas induzidas por carbacol ou histamina ($CI_{50} = 540,3 \pm 57,1$ e $251,5 \pm 47,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), sendo mais potente frente às contrações induzidas por histamina. Como Costa (2006) demonstrou que SAS-MeOH não apresentou efeito inibitório e SAs-AcOEt foi mais potente ($CI_{50} = 275,8 \pm 32,6 \mu\text{g/mL}$) frente ao carbacol, sugere-se que os constituintes químicos responsáveis por este efeito podem não ser os mesmos e que o flavonóide SA-740 não explica o resultado obtido com a fase SAs-AcOEt. Já quando se avaliou os efeitos destes produtos sobre as contrações tônicas do íleo pré-contraído por KCl, carbacol ou histamina, observou-se que o extrato SAs-MeOH ($CE_{50}=8,7 \pm 0,9$; $126,4 \pm 10,2$ e $180,2 \pm 26,7 \mu\text{g/mL}$), as fases SAs-HEX ($CE_{50}=25,6 \pm 8,9$; $106,8 \pm 11,1$; $78,5 \pm 16,6 \mu\text{g/mL}$) e SAs-AcOEt ($CE_{50}=12,6 \pm 3,1$; $95,1 \pm 10,7$ e $69,1 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$), assim como o flavonóide SA-740 ($E_{max} < 55 \%$) induziram relaxamento. Como a contração tônica no íleo é mantida pelo Ca^{2+} externo foi investigado se o efeito relaxante da fase SAs-AcOEt seria pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} e observou-se que a mesma inibiu as contrações induzidas por $CaCl_2$, sugerindo bloqueio dos canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v). Esta hipótese foi confirmada pela observação de que SAs-AcOEt ($CE_{50}=26,5 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) relaxou o íleo pré-contraído com S(-)-Bay K8644, um agonista dos $Ca_v - L$ (Ca_v do tipo L). O fato do CsCl, bloqueador não seletivo de canais de K^+ , não alterar as curvas de relaxamento da fase SAs-AcOEt indica que estes canais não estão envolvidos no efeito de SAs-AcOEt. Assim, conclui-se que SA-740 não é o principal responsável pelo efeito espasmolítico do extrato e fases de *S. asperum*, e este efeito é mais significativo em íleo isolado de cobaia, e que a fase SAs-AcOEt induz relaxamento provavelmente por bloquear o influxo de Ca^{2+} através dos $Ca_v - L$.

Palavras-chave: *Solanum asperum*, atividade espasmolítica, $Ca_v - L$

ABSTRACT

ABSTRACT

Solanum asperum Richard is a herbaceous species, it known as “jussara” or “coça-coça” (AGRA, 1999). Previous studies carrying out with methanolic extract (SAs-MeOH) and ethyl acetate phase (SAs-AcOEt) from aerial parts of that species showed non-selective spasmolytic activity on trachea and guinea-pig ileum (COSTA, 2006). Continuing the monitoration of the spasmolytic activity *S. asperum*, we decided to investigate if the methanolic extract, ethyl acetate and hexane:eter phases (SAs-HEX), flavonoid isolated from *Solanum asperum* Rich. (SA-740), exhibited this activity in rat uterus, rat aorta and guinea-pig ileum. The observed parameters had been potency (EC_{50} and IC_{50}) and efficacy (E_{max}) relative. None of the tested drugs presented spasmolytic effect in rat aorta. SAs-AcOEt inhibited the phasic contractions induced by CCh ($IC_{50}=262.4 \pm 15.5 \mu\text{g/mL}$) or oxytocin ($IC_{50}=249.5 \pm 24.4 \mu\text{g/mL}$) in rat uterus and it relaxed uterus pre-contracted by KCl (E_{max} about 51 %), however SAs-MeOH, SAs-HEX and SA-740, did not present any effect. This reveals that active substances with tocolytic activity may be only in the SAs-AcOEt phase. In guinea-pig ileum the SAs-HEX phase inhibited the phasic contractions induced by CCh or histamine ($IC_{50}=540.3 \pm 57.1$ and $251.5 \pm 47.9 \mu\text{g/mL}$, respectively), showing a higher relaxant potency on histamine, however the flavonoid SA-740 did not present any effect. Whereas Costa (2006) it demonstrated that SAs-MeOH did not present inhibit effect, however SAs-AcOEt ($IC_{50}=275.8 \pm 32.6 \mu\text{g/mL}$) showed a higher relaxant potency on CCh, one suggests that the responsible chemical constituent for this effect can not be the same ones. SA-740 is not the responsible one for inhibit activity in guinea-pig ileum. SAs-MeOH ($EC_{50}=8.7 \pm 0.9$; 126.4 ± 10.2 e $180.2 \pm 26.7 \mu\text{g/mL}$), SAs-HEX ($EC_{50}=25.6 \pm 8.9$; 106.8 ± 11.1 ; $78.5 \pm 16.6 \mu\text{g/mL}$), SAs-AcOEt ($EC_{50}=12,6 \pm 3,1$; $95,1 \pm 10,7$ e $69,1 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$) and SA-740 ($E_{max} < 55 \%$), they had presented spasmolytic effect. Since the tonic contractions in guinea-pig ileum are the result of calcium influx via Ca_v , was investigated if the relaxant effect of SAs-AcOEt could be by blockade of Ca^{2+} influx in depolarizing medium without Ca^{2+} . SAs-AcOEt phase inhibited the contractions induced by $CaCl_2$, suggesting that SAs-AcOEt should be acting by blockade of Ca_v . This hypothesis was confirmed by the observation that SAs-AcOEt ($EC_{50}=26.5 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$) relaxed the guinea-pig ileum pre-contracted by S(-)-Bay K8644, an agonist of the $Ca_v - L$. We also investigate which mechanism should be involved in the relaxant effect of SAs-AcOEt. CsCl, a non-specific K^+ channel blocker, did not affect the concentration-response curve of SAs-AcOEt, suggesting that the relaxant effect of SAs-AcOEt is not via the opening of K^+ channels. Thus, we concluded that (1) SA-740 is not main responsible for the spasmolytic effect of the extract and phases of *S. asperum*, and this effect is more significant on guinea-pig ileum, (2) SAs-AcOEt induces relaxing by inhibiting the Ca^{2+} influx through $Ca_v - L$.

Keywords: *Solanum asperum*. $Ca_v - L$. Spasmolytic action.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografia de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae).....5
- Figura 2.** Estrutura química do flavonóide glicosilado 3-O-[β-D-glicopiranosil-(1→6)-α-L-ramnopiranosil]-7-O-α-L-ramnopiranosilkanferol isolado da fase SAS-AcOEt.....7
- Figura 3.** Registro original controle das contrações induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia.....35
- Figura 4.** Registro original do efeito do flavonóide glicosilado SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A) e 10⁻⁶ M de carbacol (B), e de histamina (C) em íleo isolado de cobaia.....36
- Figura 5.** Registro original do efeito do extrato SAS-MeOH sobre as concentrações tônicas induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia37
- Figura 6.** Registro original do efeito da fase SAS-HEX sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia39
- Figura 7.** Registro original do efeito de SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia41
- Figura 8.** Registro original das contrações tônicas induzidas por 3 x 10⁻⁷ M de S(-)-Bay K8644 na ausência (A) e na presença da fase SAS-AcOEt (B) em íleo isolado de cobaia.46
- Figura 9.** Registro original do efeito de SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻⁶ M de carbacol (CCh) na ausência (A) ou na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução de Krebs.....	16
Tabela 2. Composição da solução de Locke-Ringer.....	16
Tabela 3. Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin, (1994).....	17
Tabela 4. Solução de Krebs Modificado despolarizante nominalmente sem Ca^{2+}	17
Tabela 5. Valores de CI_{50} do extrato SAS-MeOH, das fases SAS-AcOEt, SAS-HEX e do flavonóide SA-740 frente às contrações induzidas por carbacol ou por histamina em óleo isolado de cobaia.....	33
Tabela 6. Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato SAs-MeOH e das fases (SAS-AcOEt, SAS-HEX) em óleo de cobaia pré-contraído com KCl, carbacol histamina.....	43

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Processo para obtenção do extrato bruto, suas fases e flavonóides, a partir das partes aéreas de <i>Solanum asperum</i> Rich. (De acordo com NASCIMENTO, 2006).....	6
---	---

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito da fase SAS-AcOEt frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (A) ou por 10^{-5} M de carbacol (B) em útero isolado de rata.....29
- Gráfico 2.** Efeito da fase SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (#) em útero isolado de rata.....30
- Gráfico 3.** Efeito da fase SAS-HEX frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (A) ou por histamina (B) em íleo isolado de cobaia32
- Gráfico 4.** Efeito do extrato SAS-MeOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#), 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou de histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia38
- Gráfico 5.** Efeito da fase SAS-HEX sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#), 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou por histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia40
- Gráfico 6.** Efeito de SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#) , 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou por histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia42
- Gráfico 7.** Efeito da fase SAS-AcOEt frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio. Controle (\blacksquare), SAS-AcOEt [$\mu\text{g/mL}$]: 81 (Δ), 243 (\blacklozenge); 500 (\circ) e 750 (\bullet)45
- Gráfico 8.** Efeito da fase SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-BAY K8644 em íleo isolado de cobaia (n = 4).....47
- Gráfico 9.** Efeito da fase SAS-AcOEt sobre a fase tônica das contrações induzidas por 10^{-6} M de carbacol na ausência (Δ) e na presença de 5 mM de CsCl (\blacksquare), em íleo isolado de cobaia50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]_i	concentração intracelular do íon cálcio
CaM	calmodulina
[Ca²⁺]₄-CaM]	complexo cálcio – calmodulina
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
Ca_v – L	canais de cálcio operados por voltagem do tipo L
Ca_v	canais de cálcio operados por voltagem (De acordo com The IUPHAR Ion Channel Compendium, 2002)
CE₅₀	concentração de uma droga que produz 50 % de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma droga que inibe 50 % da resposta máxima de um agonista
CPI-17	proteína inibidora de cinase-17
E_{max}	efeito máximo
G_{12/13}	proteína G ₁₂ e 13
Gα_q	subunidade alfa da proteína G _q
GC	ciclase de guanilil
GDP	difosfato de guanosina
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
InsP₃	trifosfato de inositol
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
NO	óxido nítrico

PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PLC	fosfolipase C
PLD	fosfolipase D
PKG	proteína cinase G
RS	retículo sarcoplasmático
RhoA	pequena proteína ligante de GTP
ROK	cinase associada à pequena proteína ligante de GTP
S(-)-Bay K8644	1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2'-(trifluorometil)fenil]3-piridinacarboxílico ácido metil éster
SAs-MeOH Richard	extrato metanólico bruto obtido de <i>Solanum asperum</i>
SAs-AcOEt	fase acetato de etila obtido a partir do extrato metanólico bruto de <i>Solanum asperum</i> Richard
SAs-HEX	fase hexano:etérea obtida a partir do extrato bruto metanólico de <i>Solanum asperum</i> Richard
SA-740	flavonóide glicosilado 3-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosilkanferol isolado da fase SAs-AcOEt.
SAf-MeOH	extrato metanólico bruto dos frutos de <i>Solanum asperum</i> Rich.

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELA.....	XIV
LISTA DE ESQUEMA.....	XV
LISTA DE GRÁFICOS.....	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 GERAL.....	12
2.2 ESPECÍFICO.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 MATERIAL.....	14
3.1.1 Material Botânico.....	14
3.1.2 Animais.....	14
3.1.3 Drogas e Reagentes.....	15
3.1.4 Soluções nutritivas.....	15
3.1.5 Aparelhos.....	17
3.2 MÉTODOS.....	19
3.2.1 Preparação do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740.....	19

3.2.2	Investigação do efeito espasmolítico em aorta isolada de rato.....	19
3.2.2.1	Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina..	19
3.2.3	Investigação do efeito espasmolítico em útero isolado de Rata.....	20
3.2.3.1	Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol.....	20
3.2.3.2	Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl.....	21
3.2.4	Investigação do Efeito Espasmolítico em Íleo Isolado de Cobaia.....	22
3.2.4.1	Efeito da fase SAs-HEX e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina.....	22
3.2.4.2	Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina.....	23
3.2.5	Caracterização do Mecanismo de Ação Espasmolítica da Fase SAs-AcOEt em Íleo Isolado de Cobaia.....	23
3.2.5.1	Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio.....	23
3.2.5.2	Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644.....	24
3.2.5.3	Avaliação da Participação dos Canais de K⁺ no Efeito Espasmolítico Produzido por SAs-AcOEt.....	24
3.2.5.3.1	Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, na ausência e na presença de cloreto de cézio (CsCl).....	24
3.2.6	Análise estatística.....	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Investigação do efeito espasmolítico em aorta isolada de rato.....	27

4.1.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina..	27
4.2 Investigação do Efeito Espasmolítico em Útero Isolado de Rata.....	27
4.2.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou ocitocina.....	27
4.2.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl.....	28
4.3 Investigação do efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia.....	31
4.3.1 Efeito da fase SAs-HEX e do flavonóide glicosilado SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina.....	31
4.3.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre às contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina.....	34
4.4 Caracterização do mecanismo de ação espasmolítica da fase SAS-AcOEt em íleo isolado de cobaia.....	44
4.4.1 Efeito da fase SAS-AcOEt sobre as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem cálcio.....	44
4.4.2 Efeito da fase SAS-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644.....	46
4.4.3 Avaliação da participação dos canais de K^+ no efeito espasmolítico produzido por SAS-AcOEt.....	48
4.4.3.1 Efeito da fase SAS-AcOEt sobre as contrações induzidas por carbacol, na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl).....	48
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÕES.....	63

7 PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	67

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A busca pela cura dos males do corpo e da alma é algo que o homem procura incessantemente, através dos tempos, talvez pela necessidade óbvia de prolongar e melhorar a qualidade de vida. As crenças religiosas muitas vezes interferem nesta procura, assim como a cultura e as tradições populares que constantemente servem como objeto de estudo para descoberta de novas terapêuticas, como o uso das plantas como remédio ou na preparação de medicamentos.

No Brasil o uso de plantas com o intuito terapêutico ocorre há muito tempo com os povos indígenas. Os primeiros colonizadores ao entrarem em contato com os índios aos poucos foram incorporando alguns aspectos da cultura indígena e entre eles o uso de plantas medicinais com finalidade terapêutica. Os jesuítas que foram os primeiros boticários do Brasil tiveram que valer-se do uso de plantas nativas da região, pois a chegada de mantimentos demorava em muitos casos meses e a cultura indígena através do conhecimento de plantas dos pajés influenciou os jesuítas na elaboração de novas formulações. A sociedade atual herdou esses costumes e nos dias de hoje as plantas são objeto de estudo para obtenção de novas fontes para aquisição de princípios ativos, que poderão ser utilizados na produção de medicamentos inovadores, ou como ferramentas farmacológicas ([HTTP://www.ufpe.br/farmacia/história1.htm](http://www.ufpe.br/farmacia/história1.htm)).

Um dos mais importantes fatores para o sucesso no descobrimento de um fármaco novo é a diversidade química dos compostos a serem selecionados, cujas fontes podem ser: compostos sintéticos, produtos naturais ou química combinatória. Entre estas possibilidades, os produtos naturais são considerados uma das maiores fontes de diversidade química (TREVISAN; MACEDO, 2003). Diversas instituições de pesquisas no exterior e no Brasil investem de forma relevante em estudos com plantas medicinais, tendo em vista a descoberta de substâncias com atividades biológicas. A flora nacional possui uma grande diversidade de espécies com propriedades farmacológicas em

potencial, como: tintoriais, odoríferas, estimulantes, alucinogênicas (GOTTLIEB; MORS, 1978).

Na flora do Nordeste Brasileiro estão presentes várias famílias, entre elas, a Solanaceae A. L. Jussieu que compreende 92 gêneros e aproximadamente 2300 espécies (HUNZIKER, 2001) que possuem tanto importância econômica por serem utilizadas na alimentação humana, por exemplo, a batatinha (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.), como também são fonte de drogas de interesse farmacológico, por exemplo, a atropina (*Atropa belladonna* L.), a nicotina (*Nicotiana tabacum* L.) entre outras (AGRA, 2000).

O gênero *Solanum* L., pertencente à família Solanaceae, é um dos mais amplos do reino vegetal com cerca de 1250 espécies (NEE, 2001) habitando regiões tropicais e subtropicais do mundo, e tendo a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (AGRA, 1999). Neste gênero há uma grande ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos (SILVA et al., 2003), bem como uma diversidade de saponinas esteroidais e glicoalcalóides de importância na resistência natural destas plantas contra muitas prag (FERREIRA et al., 1996). Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos aos alcalóides esteroidais (EVANS; SOMANABANDHU, 1980), como a solamargina, que possui potente atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000), solacongestidina, que apresenta significativa atividade antifúngica (KUSANO et al., 1987), etiolina, capsimina, a capsicastrina e a naringenina com efeito citotóxico pronunciado *in vitro* contra a linhagem de células cancerígenas humanas PLC/PRF/5 e KB (ATTA-UR-RAHMAN ; IQBAL, 1998).

Algumas espécies de *Solanum* como: *Solanum paniculatum* L., *Solanum melongena* L., *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult. e *Solanum sisymbriifolium* Lam. são relatadas por induzirem hipotensão em ratos (ALMEIDA et al., 1985; RIBEIRO et al., 2001; SHUM; CHIU, 1991; RIBEIRO, 2001; IBARROLA et al., 2000), outras espécies como *Solanum nigrum* L. que

apresenta ação depressora sobre o sistema nervoso central (PEREZ et al., 1998), *Solanum torvum* Sw. possui atividade antimicrobiana (CHAH; MUKO; OBOEGBULEM, 2000), e *Solanum aculeastrum* Dunal apresenta atividade moluscicida (WANYONYI et al., 2002). Além dessas atividades, outras espécies também apresentam efeito espasmolítico, como exemplo, *Solanum paniculatum*, *Solanum stipulaceum*, *Solanum indicum* L., *Solanum torvum* Sw., *Solanum melongena* L., *Solanum dulcamara* L., *Solanum agrarium* Sendtner, *Solanum paraibanum* Agra, *Solanum jabrense* Agra & Nee e *Solanum paludosum* Moric, *Solanum asterophorum* Mart. *Solanum megalonix* Sendtner (BOYD, 1928; BHAKUNI et al., 1969; ATAÍDE, 1982; ABRAHAM et al., 1986; SHUM; CHIU, 1991; SANTOS et al., 2003; SANTOS et al. 2006 OLIVEIRA et al., 2001; CAVALCANTE, 2001; CLAUDINO, 2003; SILVA, 2003; SILVA et al., 2005; SANTOS, 2006; OLIVEIRA et al., 2006a, OLIVEIRA et al., 2006b).

Solanum asperum Richard (Figura 1) pertencente ao subgênero *brevantherum* (AGRA, 1991), apresenta-se como um arbusto ereto, sendo encontrado ao longo da costa, do norte ao sul da América do Sul, é conhecida popularmente como “jussara” ou “coça-coça” (AGRA; 1999; BHATTACHARYYA, 1984) e o decocto das folhas é utilizado em erupções cutâneas e ferimentos da pele (COE; ANDERSON, 1996).

O estudo fitoquímico mostrou a presença de solasodina (BHATTACHARYYA, 1984) nos frutos e solaparnaína (BHATTACHARYYA, 1985) nas bagas verdes, e dos flavonóides glicosilados 3-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol (SA-740) (Esquema 1 e Figura 2) e o tilirosídeo (NASCIMENTO, 2006) nas partes aéreas. O flavonóide SA-740 foi isolado anteriormente das espécies *Lens esculenta* (EINEGOUMY et al., 1987) e *Bauhinia forficata* (PIZZOLATTI et al., 2003), até então sem nenhuma atividade biológica relatada.

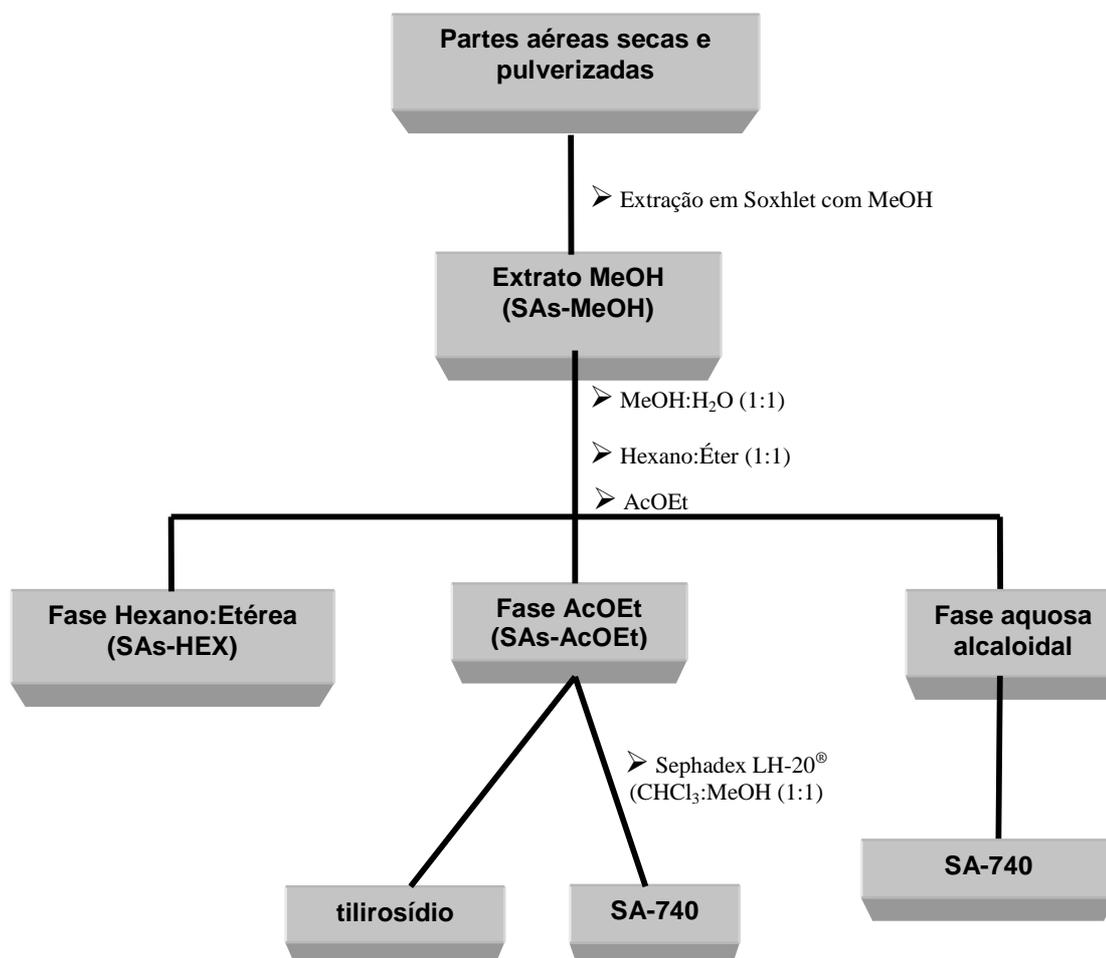
As partes aéreas de *Solanum asperum* foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C por uma semana. As partes aéreas secas e pulverizadas de *S. asperum* (1.178 g) foram extraídas exaustivamente em Soxhlet com 6 L de MeOH. A solução extrativa foi concentrada em evaporador

rotatório, fornecendo o extrato MeOH (77,0 g). O Extrato MeOH (74,0 g) foi suspenso em H₂O e em seguida particionado com solução de Hexano:Éter (1:1) e depois com AcOEt obtendo-se as fases Hexano:Etérea (11,0 g) e AcOEt (4,4 g), sendo que o flavonóide glicosilado SA-740 foi obtido a partir das fases aquosa alcaloidal e AcOEt (SAs-AcOEt) (Esquema 1) (NASCIMENTO, 2006).



Figura 1. Fotografia das partes aéreas de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae).

Esquema 1 Processo para obtenção do extrato bruto, suas fases e flavonóides, a partir das partes aéreas de *Solanum asperum* Rich. (De acordo com NASCIMENTO, 2006)



A atividade moluscicida foi relatada para o extrato dos frutos e das suas raízes (SILVA et al., 2005). Em estudos realizados para a seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para o tratamento da doença de Alzheimer, observou-se que o extrato bruto das folhas de *Solanum asperum* apresentou 60 % de inibição da a enzima acetilcolinesterase em ensaios na microplaca numa concentração de 1,4 mg/mL (TREVISAN; MACEDO, 2003). Foi demonstrado que o extrato metanólico bruto (SAs-MeOH) bem como sua fase

acetato de etila (SAs-AcOEt), obtidos das partes aéreas de *Solanum asperum* Rich, que apenas a fase SAs-AcOEt tem atividade espasmolítica em íleo e traquéia isolados de cobaia (COSTA, 2006). Já o extrato metanólico bruto dos frutos de *Solanum asperum*, mostraram atividade espasmolítica em íleo de cobaia e útero isolado de rata (CORREIA, 2007).

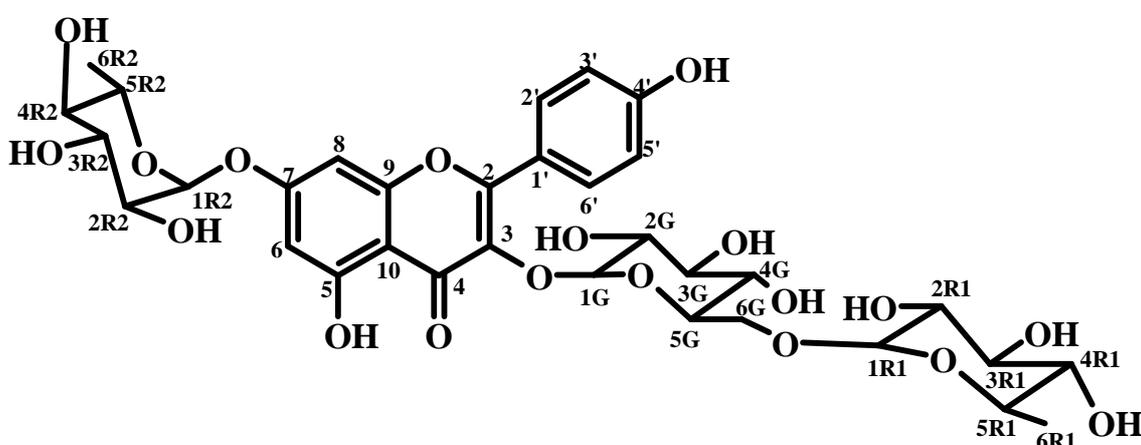


Figura 2. Estrutura química do flavonóide glicosilado 3-O-[[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil]kanferol isolado da fase SAs-AcOEt.

Os flavonóides são compostos polifenólicos que estão presentes na natureza e são representados por 10 classes estruturais: antocianina, leucoantocianina, flavonol, flavona, glicoflavonóide, biflavonóide, chalcona, aurona, flavanona e isoflavona (HARBORNE, 1976; 1994).

Os flavonóides têm mostrado várias atividades biológicas, dentre elas podemos destacar: anticâncer (WANG et al., 2005; LI et al., 2005; VAN ERK et al., 2005; AKBAS; TIMUR; OZBEN, 2004); inibitória da DNA topoisomerase II- α humana (SILVA et al., 2002); antibacteriana (CUSHNIE; LAMB, 2005, MARTINI; KATERERE; ELOFF, 2004; FUKAI et al., 2002); antioxidante (BLASA et al., 2006; MEYER; HEINONEN; FRANKEL, 1997);

antiinflamatória (KIM et al, 2004; LI et al., 2005; AHMED et al., 2005; WEI et al., 2005); antiperistáltica (GHARZOULI; HOLZER, 2004), antiparasitária (TALEB-CONTINI et al., 2004); hipoglicemiante (PEREZ et al., 2000); neuroprotetora (ROTH; SCHAFFNER; HERTEL, 1999; GUPTA; SINGH; SHARMA, 2003), anti-hipertensiva (COSENTINO; VOLPE, 2002; VILLAR et al., 2002), contráctil (JIMENEZ et al., 1999; LEE; MEISSNER; KIM, 2002), relaxante (KO, et al., 1999; KO et al., 2003; ROJAS et al., 1996; SILVA, 2005; LIMA et al. 2005; SANTOS, 2006).

A importância de investigar produtos naturais que possuem atividade biológica em músculo liso reside no fato, de que, substâncias com atividade espasmolítica poderão vir a ter aplicação na terapêutica de vários tipos de doenças como vasoespasmos cerebrais, diarreia, asma, hipertensão arterial, espasmos intestinais e uterinos e alguns outros processos fisiopatológicos que também envolvem os mecanismos de contração e relaxamento. A regulação destes mecanismos é mediada pela mobilização de íons cálcio, que pode ter uma origem extracelular, onde o cálcio atravessa a membrana citoplasmática para o citoplasma através de canais iônicos da própria membrana, e outra intracelular onde o cálcio será proveniente dos estoques intracelulares, principalmente do retículo sarcoplasmático (RS) que liberam o íon para o citosol (PAN; MA, 2003; GORDIENKO; ZHOLOS, 2004; KOTLIKOFF, 2003; RATZ et al., 2005).

Na busca por substâncias que interferem no metabolismo do Ca^{2+} , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997). O espasmo, que é uma contração muscular, é comum neste tipo de músculo, e este efeito pode ser revertido quando se impede alguma etapa do processo contráctil. O mecanismo de contração é predominantemente resultante de um aumento de cálcio intracelular que pode ser de origem externa, através de mudança de potencial de membrana e/ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de canais de cálcio tipo L (CASTEELS; SUZUKI, 1980; NEILD; KOTE CHA, 1987; NELSON et al., 1988). O cálcio de origem

intracelular é resultante da ativação de receptores específicos na membrana do RS envolvendo um aumento dos níveis de 1,4,5-trisfosfato de inositol (InsP_3) formado pela interação agonista/receptor e ativação da fosfolipase C (PLC); por liberação do cálcio pelo próprio cálcio através do receptor de rianodina (sensível à cafeína), presente na membrana do RS; e por um aumento da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) mediado por um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reverso (BLAUSTEIN, 1989).

O Ca^{2+} em quantidades elevadas no meio intracelular liga-se a uma proteína específica calmodulina (CaM) formando o complexo $[\text{Ca}^{2+}_4\text{-CaM}]$ que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo $[\text{Ca}^{2+}_4\text{-CaM-MLCK}]$ fosforila a cadeia leve da miosina (MLC20), esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclização das pontes entre os filamentos de actina e miosina ocorrendo um deslizamento entre estes, com conseqüente desenvolvimento da contração (ALLEN; WALSH, 1994).

O mecanismo eletromecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana, que pode ocorrer em função da liberação do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico - NO), que ativa diretamente uma ciclase de guanilil (GC) solúvel ou, no caso dos agonistas que induzem relaxamento, a ligação aos seus receptores ativa diretamente uma ciclase de guanilil ou de adenilil, resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina (GMP_c) e monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), respectivamente. O aumento na $[\text{GMP}_c]$ ativa a proteína cinase G (PKG), enquanto que o aumento na $[\text{AMP}_c]$ ativa tanto uma proteína cinase dependente de AMP_c (PKA) como a PKG, que resultam na ativação de canais de K^+ (REMBOLD, 1996). Além disso, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por drogas que abrem canais de K^+ (por exemplo, cromacalina, levocromacalina e nicorandil) e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de K^+ da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ($\text{Ca}_V\text{-L}$), diminuindo, portanto, a $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a fosforilação da miosina e a contração (REMBOLD, 1996).

O equilíbrio entre a MLCK e a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) age como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integram a contração no músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005; RATZ et al., 2005). A MLCP consiste em 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 KDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da pequena proteína ligante de GTP (RhoA), dependente de $G_{12/13}$. A RhoA-GTP estimula a sua cinase associada (ROK) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997). A ativação desta cinase pode resultar da ativação, dependente de G_q , da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bifosfato de inositol (PIP_2). A ROK e a PKC agem isolada ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000; RATZ et al., 2005). Embora a ROK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização do cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos Thr696 e Thr853 da MYPT1 humana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROK pode também fosforilar o resíduo Thr38 da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a MLCP por mais de 1000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Estudos farmacológicos recentes realizados no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. "Delby Fernandes de Medeiros" (LTF) com *Solanum asperum* Rich., demonstraram que a fase acetato de etila (SAs-AcOEt) apresentou atividade espasmolítica, em íleo e traquéia isolados de cobaia, tendo em vista todas essas premissas e levando em consideração a importância desses estudos que se interrelacionam com alguns dos dados científicos já apresentados, decidiu-se dar continuidade a monitoração da atividade espasmolítica do extrato SAs-MeOH, das fases SAs-HEX e SAs-AcOEt, bem como do flavonóide glicosilado SA-740 derivado da fase metanólica aquosa e da fase SAs-AcOEt.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para o estudo farmacológico da família Solanaceae, em especial da espécie *Solanum asperum* Richard, utilizando como parâmetro a medida de força de contração e o relaxamento de musculatura lisa, com a finalidade ulterior de contribuir com descoberta de drogas potencialmente terapêuticas ou que atuem como ferramentas farmacológicas.

2.2 Específicos

Monitorar o efeito espasmolítico de SAs-MeOH, SAs-AcOEt, SAs-HEX e SA-740, obtidos a partir das partes aéreas de *Solanum asperum* Rich., em útero isolado de rata, aorta isolada de rato e íleo isolado de cobaia, bem como investigar o mecanismo de ação espasmolítica da droga que apresentar uma maior potência na triagem farmacológica preliminar.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Material Botânico

As partes aéreas da planta foram coletadas no Jardim Botânico Benjamim Maranhão – João Pessoa – PB – Brasil, em 26 de outubro de 2005. A exsicata da espécie (Agra, M. F. et al. 6487) está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da Universidade Federal da Paraíba.

3.1.2 Animais

Eram utilizadas ratas virgens e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200 – 300 g e 250 - 350 g, respectivamente e cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos pesando entre 350 – 500 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Purina) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (22 ± 1 °C) controladas e constantes. Todos os experimentos eram realizados no período de 08:00 às 20:00 horas.

Todos os animais eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA/LTF), certidão nº 0506/05.

3.1.3 Drogas e Reagentes

O cloridrato de carbamilcolina (CCh), cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio hexaidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), fosfato diácido de sódio (NaH_2PO_4) e sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos da Merck (Brasil) ou Vetec (Brasil).

O cloreto de céσιο (CsCl), cremofor, histamina e o ácido 1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2'-(trifluormetil)fenil]3-piridinacarboxílico metil éster (S-(-) Bay K8644), dietilestilbestrol e ocitocina foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

A mistura carbogênica (95 % de O_2 e 5 % de CO_2) foi obtida da White Martins (Brasil).

O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foi obtido da Vetec (Brasil).

O extrato bruto SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX, bem como, o flavonóide glicosilado foram gentilmente cedidos pela colaboradora do Setor de Fitoquímica do LTF/UFPB, Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva.

3.1.4 Soluções nutritivas

Eram utilizadas soluções nutritivas ($\text{pH} = 7,4$), todas aeradas com mistura carbogênica e mantidas a $32\text{ }^\circ\text{C}$ para útero de rata e $37\text{ }^\circ\text{C}$ para íleo de cobaia e aorta de rato, cujas composições estão descritas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1. Composição da solução de Krebs.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	118,0
KCl	4,5
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,7
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,5
NaHCO_3	25,0
Glicose	11,0

Tabela 2. Composição da solução de Locke-Ringer (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000).

Substância	Concentração (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,2
MgCl_2	2,1
NaHCO_3	5,9
Glicose	5,5

Tabela 3. Composição da solução de Krebs modificado por Sun; Benishin, (1994).

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

Tabela 4. Solução de Krebs Modificado despolarizante nominalmente sem Ca²⁺.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	51,7
KCl	70,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,3
NaHCO ₃	25,0
Glicose	11,0

3.1.5 Aparelhos

As contrações isométricas foram registradas através de transdutores de força modelo FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M (ambos da World Precision Instruments, EUA) que, por sua vez, estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital (BioData, Brasil)

instalada em um computador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 (BioData, Brasil). As contrações isotônicas foram registradas por meio de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil).

A temperatura das cubas foi controlada por uma bomba termostática modelo Polystat 12002 (Cole-Palmer, EUA).

Para aferição do pH das soluções nutritivas foi utilizado um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

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

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação das soluções do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740

O extrato bruto SAs-MeOH e suas fases SAs-AcOEt e SAs-HEX foram solubilizados em cremofor (3 %) e diluídos em água destilada (pH 7,4) para obtenção da solução estoque (10 mg/mL), já o flavonóide glicosilado foi solubilizado em cremofor (3 %) e diluído em água destilada para obtenção da solução estoque de 10^{-2} M. A concentração de cremofor não ultrapassou 0,01 %, concentração esta desprovida de quaisquer efeitos sobre os órgãos testados. Essas soluções eram estocadas em um “freezer” a 0 °C e no momento da realização dos protocolos experimentais eram diluídas de acordo com a exigência dos mesmos.

3.2.2 Investigação do Efeito Espasmolítico em Aorta Isolada de Rato

3.2.2.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina

Os ratos eram sacrificados por concussão cerebral e exsanguinados. Os anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conectivo e gordura a partir da aorta torácica. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável em cubas de vidro (6 mL) contendo solução de Krebs Normal (Tabela 1) a 37 °C. As preparações eram estabilizadas por um período de uma hora, durante o qual eram mantidas sob uma tensão de repouso de 1 grama. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização eram induzidas duas contrações com fenilefrina (3×10^{-7} M) de magnitude similares, e durante o componente tônico, 12 a 15 minutos da segunda resposta, era adicionado 10^{-6} M de acetilcolina á todas as preparações para verificar a integridade do endotélio funcional (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). o endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentarem relaxamento igual ou superior a 50 % (AJAY; GILANI; MUSTAFA, 2003). Quando o relaxamento era inferior a 10 %, os anéis eram considerados sem endotélio funcional. Após a lavagem, esperava-se 30 minutos, e durante o componente tônico de uma terceira resposta ao agonista, o extrato ou suas fases eram adicionados, de maneira cumulativa á cuba, em preparações diferentes.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por fenilefrina. Os valores da concentração das drogas-teste que produziram 50 % do efeito máximo (CE_{50}) foram obtidos por regressão não-linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o extrato ou fase em anéis com ou sem endotélio funcional.

3.2.3 Investigação do Efeito Espasmolítico em Útero Isolado de Rata

3.2.3.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol

As ratas eram tratadas 24 horas antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, as ratas eram sacrificadas por deslocamento cervical. Após abertura da cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke-Ringer (Tabela 1) a 32 °C. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (6 mL).

Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 minutos. Após o período de estabilização duas curvas de concentração-resposta simples e de amplitudes similares para 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou para 10^{-6} M de carbacol foram obtidas, em preparações diferentes, consideradas como controle e registradas com auxílio de alavancas isotônicas de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de quimógrafos. Em seguida as drogas teste foram incubadas por 15 minutos em preparações e concentrações diferentes e, ainda na sua presença, foi induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas testados.

A inibição da resposta contrátil sub-máxima induzida por ocitocina ou por carbacol foi avaliada por comparação das respostas controle (100 %) e após a adição das drogas teste à cuba. O valor da concentração das drogas teste que inibe 50 % da resposta máxima de um agonista (CI_{50}) foi obtido por regressão não-linear, a partir dos valores individuais de inibição de cada concentração de droga teste utilizada.

3.2.3.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl

O útero era montado como descrito no item 3.2.3.1. Após o período de estabilização de 40 minutos, foram obtidas duas curvas concentração-resposta simples com 60 mM de KCl de amplitudes similares e registradas com auxílio de alavancas isotônicas de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de quimógrafos. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, as drogas teste eram adicionadas cumulativamente à cuba, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo agente contrátil. Os valores de CE_{50} (concentração de uma substância capaz de produzir 50 % de seu efeito máximo) foram obtidos por

regressão não-linear das curvas concentrações-resposta das drogas teste, em cada experimento.

3.2.4 Investigação do Efeito Espasmolítico em Íleo Isolado de Cobaia

3.2.4.1 Efeito da fase SAs-HEX e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina

O animal era mantido em jejum por 18 horas (dando-lhe somente água nesse período) e sacrificado por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento, retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs Modificado (Tabela 2) a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro de 6 mL e deixados em repouso por 30 minutos sob tensão de 1 grama, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Após o período de estabilização, duas contrações isotônicas fásicas de amplitudes similares eram obtidas com 10^{-6} M de carbacol ou de histamina, com intervalos de 15 minutos, e a concentração sub-máxima que produz cerca de 80 % da resposta máxima eram registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. Em seguida, na ausência do agonista, a fase SAs-HEX ou o SA-740 eram incubados em várias concentrações por 15 minutos, em preparações diferentes. Após esse período, ainda na presença das drogas teste, uma terceira contração com o agonista utilizado anteriormente era obtida. A inibição da resposta contrátil sub-máxima para o carbacol ou para a histamina foi avaliada por comparação das respostas antes (100 %) e após a adição de SAs-HEX ou de SA-740 à cuba. Os valores de CI_{50} da fase SAs-HEX e de SA-740 foram calculados por regressão não-linear a partir dos valores individuais de inibição de cada concentração para cada produto testado.

3.2.4.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina

O íleo era montado como descrito no item 3.2.3.1. Após o período de estabilização, duas contrações com 40 mM de KCl, 10^{-6} M de carbacol ou de histamina sub-máximas similares, eram registradas através de transdutores isométricos acoplados a um amplificador conectado a um sistema de aquisição digital. Durante a fase tônica sustentada (8 – 10 minutos) da segunda resposta, SAs-MeOH, SAs-AcOEt, SAs-HEX e o flavonóide glicosilado SA-740 eram adicionados de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. Os valores de CE_{50} , para SAs-MeOH, SAs-AcOEt, SAs-HEX e SA-740 foram obtidos como descrito anteriormente.

3.2.5 Caracterização do Mecanismo de Ação Espasmolítica da Fase SAs-AcOEt em Íleo Isolado de Cobaia

3.2.5.1 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

O íleo era montado como descrito no item 3.2.3.1. O tecido permaneceu em repouso por 30 minutos com a solução de Krebs Modificado. Passado este tempo, trocava-se a solução anterior pela de Krebs Modificado despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} (Tabela 3), permanecendo por 45 minutos. Eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas ao $CaCl_2$, e após estas respostas, a fase SAs-AcOEt era incubada em várias concentrações por 15 minutos, em preparações diferentes, na ausência de

CaCl₂, e após este período uma terceira curva cumulativa ao CaCl₂ era obtida ainda na presença da fase SAs-AcOEt. Os resultados foram avaliados comparando-se os valores de CI₅₀ e de efeito máximo (E_{max}) obtidos a partir da curva controle com CaCl₂, na ausência e na presença da fase SAs-AcOEt.

3.2.5.2 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644

O íleo era montado como descrito no item 3.2.3.1. Após o período de estabilização, duas contrações sub-máximas similares eram obtidas para o derivado diidropiridínico S(-)-BAY K8644 (3×10^{-7} M), agonista seletivo dos Ca_v-L (SCHRAMM et al., 1983a, b; GODFRAIND; MILLER; WIBO, 1986; CONTE-CAMERINO et al., 1987). Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, a fase SAs-AcOEt era adicionada de maneira cumulativa, em preparações diferentes. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida por S(-)-Bay K8644. Os valores de CE₅₀ foram obtidos como descrito anteriormente.

3.2.5.3 Avaliação da Participação dos Canais de K⁺ no Efeito Espasmolítico Produzido por SAs-AcOEt

3.2.5.3.1 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl)

O método utilizado foi uma modificação previamente descrita por Silva (1997). As contrações tônicas ao carbacol eram obtidas como descrito no item 3.2.3.2. Em seguida, a preparação era incubada por 5 minutos com 5 mM de CsCl, um bloqueador inespecífico de canais de K⁺ (LATORRE et al., 1989), e ainda na sua presença, uma nova contração com carbacol era obtida. Em seguida a fase SAs-AcOEt era adicionada sobre a fase tônica da contração de

maneira cumulativa e em preparações diferentes. A CE_{50} foi calculada comparando-se as respostas antes (controle) e após a adição do bloqueador à cuba. A potência e a eficácia relaxante de SAs-AcOEt foram avaliadas comparando-se os valores de CE_{50} e E_{max} na ausência e na presença de CsCl.

3.2.6 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student, onde os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Os valores de CE_{50} (concentração capaz de produzir 50 % do efeito máximo de uma droga) e de CI_{50} (concentração de uma droga capaz de inibir 50 % da resposta máxima de um agonista) (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não-linear. Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 4.03 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Investigação do Efeito Espasmolítico em Aorta Isolada de Rato

4.1.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina

O extrato SAs-MeOH, as fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) até a concentração de 500 µg/mL, assim como o flavonóide SA-740 até a concentração de 3×10^{-4} M (n = 3), não apresentaram efeito espasmolítico significativo sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina na presença ou na ausência de endotélio funcional (dados não mostrados).

4.2 Investigação do Efeito Espasmolítico em Útero Isolado de Rata

4.2.1 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou ocitocina

O extrato bruto SAs-MeOH, a fase SAs-HEX e o flavonóide SA – 740 não apresentaram efeito inibitório significativo frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol (dados não mostrados) (n = 3). Já a fase SAs-AcOEt (9 – 750 µg/mL, n = 5) antagonizou significativamente e de maneira dependente de concentração e equipotente as contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou por 10^{-5} M de carbacol ($CI_{50} = 262,4 \pm 15,5$ e $249,5 \pm 24,4$ µg/mL) (Gráfico 1).

A responsividade do órgão ao carbacol ou á ocitocina foi revertida em cerca de 55 minutos da retirada da fase SAs-AcOEt da cuba.

4.2.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por KCl

O extrato SAs-MeOH e a fase SAs-HEX, até a concentração de 500 µg/mL (n = 3), não apresentaram efeito relaxante significativo quando o íleo era pré contraído com 60 mM de KCl (dados não mostrados). Já a fase SAs-AcOEt (1 - 500 µg/mL), relaxou significativamente (n = 3) e de maneira dependente de concentração o íleo pré contraído por 60mM de KCl, no entanto, o efeito relaxante máximo (E_{max}) foi de $51,8 \pm 5,7$ % (Gráfico 2).

A responsividade do órgão ao KCl foi revertida em cerca de 55 minutos após a retirada da fase SAs-AcOEt da cuba.

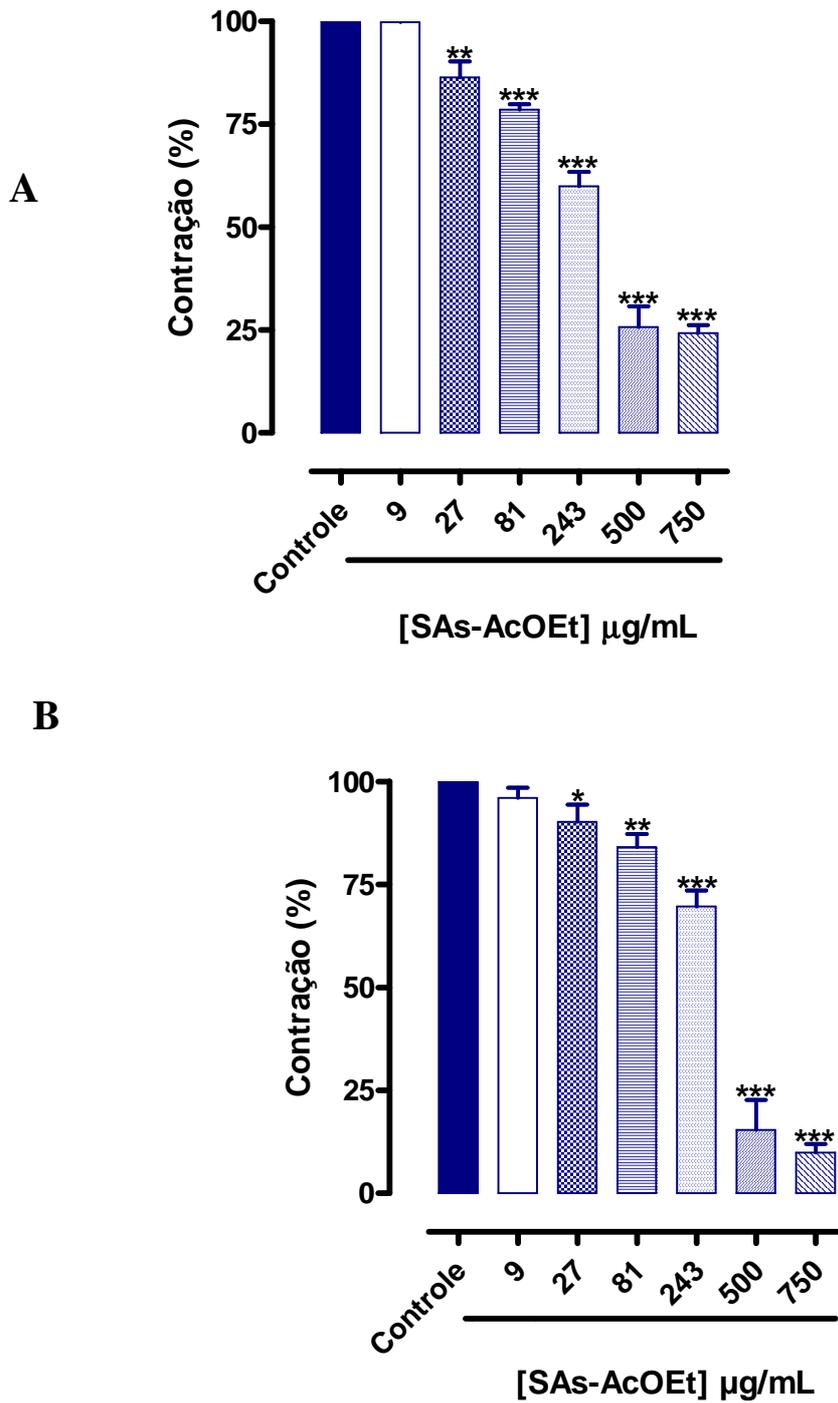


Gráfico 1. Efeito da fase SAs-AcOEt frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**A**) ou por 10^{-5} M de carbacol (**B**) em útero isolado de rata ($n = 5$). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste “t” de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ (controle vs. SAs-AcOEt).

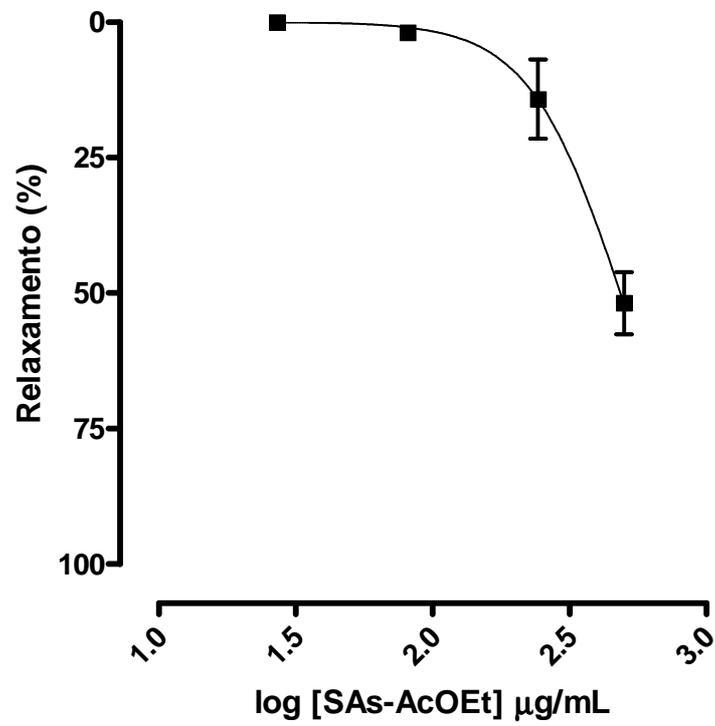


Gráfico 2. Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (#) em útero isolado de rata (n = 3). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m. respectivamente.

4.3 Investigação do Efeito Espasmolítico em Íleo Isolado de Cobaia

4.3.1 Efeito da fase SAs-HEX e do flavonóide glicosilado SA-740 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina

O flavonóide glicosilado SA-740, até a concentração de 3×10^{-4} M, não mostrou efeito inibitório significativo frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina (dados não mostrados). Diferentemente a fase SAs-HEX (27 -750 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) (Gráfico 3 e Tabela 5), antagonizou significativamente e de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol e de histamina ($CI_{50} = 540,3 \pm 57,1$ e $251,5 \pm 47,9$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

A responsividade do órgão aos agonistas testados foi revertida em cerca de 55 minutos após a retirada da fase SAs-HEX da cuba.

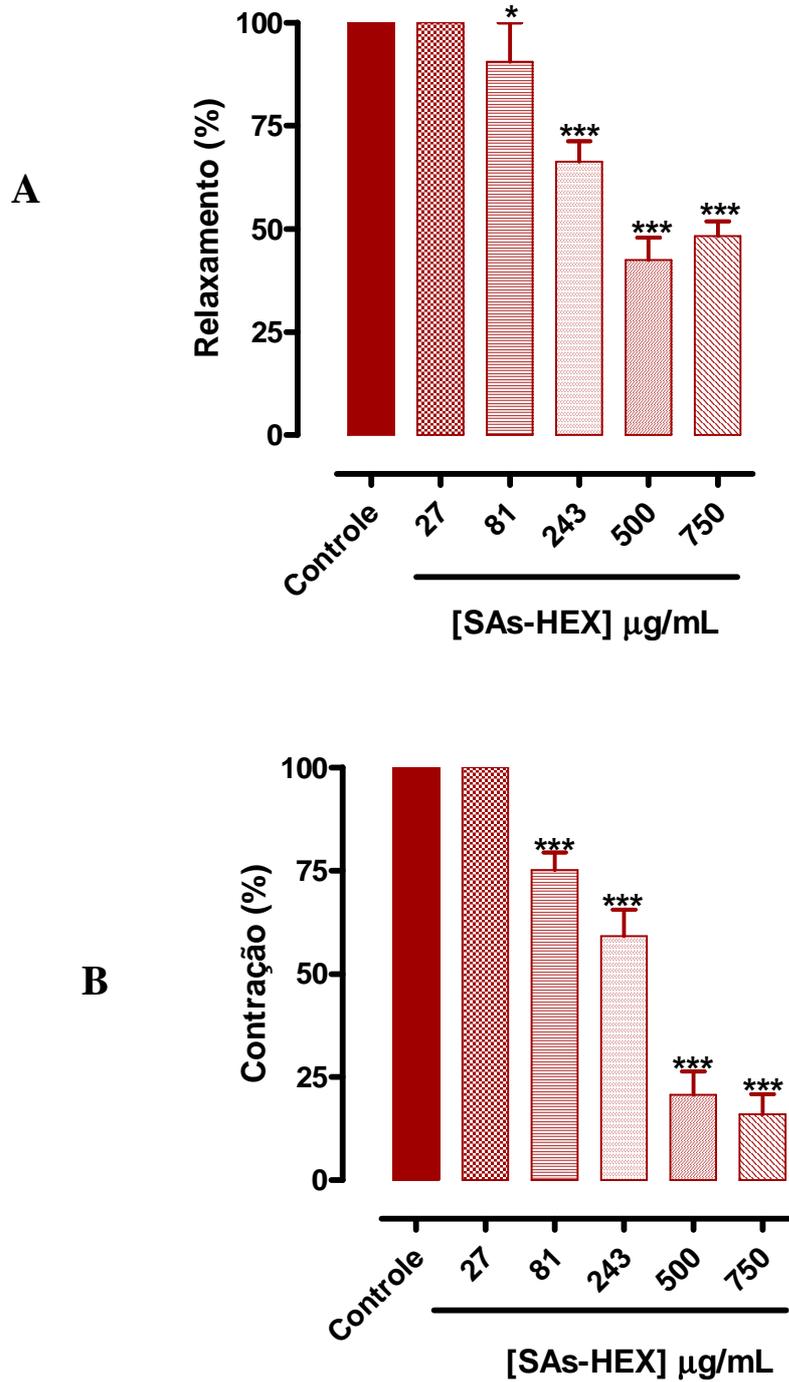


Gráfico 3. Efeito da fase SAs-HEX frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (**A**) ou por histamina (**B**) em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente. Teste “t” de Student, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ (controle vs. SAs-HEX).

Tabela 5. Valores de CI_{50} para o extrato SAs-MeOH e das fases SAs-AcOEt, SAs-HEX e do flavonóide SA-740 frente as contrações induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia ($n = 5$).

Drogas teste	CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ (extrato ou fases); M (flavonóide)	
	Carbacol	Histamina
SAs-MeOH	SE	SE (COSTA, 2006)
SAs-HEX	540,3 \pm 57,1	251,5 \pm 47,9 # *
SAs-AcOEt	275,8 \pm 32,6 # *	424,1 \pm 7,8 (COSTA, 2006)
SA-740	SE	SE

(carbacol vs. histamina); SE (sem efeito); * (SAs-HEX vs. SAs-AcOEt)

4.3.2 Efeito do extrato SAs-MeOH, das fases (SAs-AcOEt e SAs-HEX) e do flavonóide SA-740 sobre às contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina

As contrações tônicas induzidas por KCl se mantiveram sustentadas por mais de 200 minutos, já as contrações tônicas induzidas por carbacol ou por histamina se mantiveram sustentadas por mais de 120 minutos (Figura 3). O flavonóide glicosilado SA-740 apresentou efeito espasmolítico significativo apenas na concentração de 10^{-4} M, no entanto, esse efeito não ultrapassou 55 % sobre a contração do íleo pré-contraído com KCl, CCh ou por histamina ($E_{max} = 25,7 \pm 3,3$; $52,2 \pm 5,0$ e $53,0 \pm 1,5$ %, respectivamente) (Figura 4). Tanto SAs-MeOH (Figura 5) como as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX (Figura 6 e 7) ($0,001 - 500 \mu\text{g/mL}$) relaxaram significativamente e de forma dependente de concentração o íleo pré-contraído com 40 mM de KCl, 10^{-6} M de CCh ou de histamina (Gráficos 4, 5 e 6). Os valores de CE_{50} do extrato SAs-MeOH foram de $8,7 \pm 0,9$; $126,4 \pm 10,2$ e $180,2 \pm 26,7 \mu\text{g/mL}$, já da fase SAs-AcOEt foram de $12,6 \pm 3,1$; $95,1 \pm 10,7$ e $69,1 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$ e da fase SAsHEX foram de $25,6 \pm 8,9$; $106,8 \pm 11,1$; $78,5 \pm 16,6 \mu\text{g/mL}$, quando o íleo era pré-contraído com KCl, CCh e histamina, respectivamente (Tabela 6). Os tempos médios de relaxamento não ultrapassaram 170 minutos para SAs-MeOH e SAs-AcOEt e 195 minutos para SAs-HEX, sobre as contrações tônicas induzidas pelo KCl. Já nas contrações tônicas induzidas por CCh e histamina os tempos médios de relaxamento para SAs-MeOH não ultrapassaram 117 minutos e 75 minutos para SAs-AcOEt e SAs-HEX, respectivamente.

A responsividade do órgão aos agentes contrateis testados foi revertida após cerca de 1 hora e 10 minutos da retirada das drogas teste da cuba.

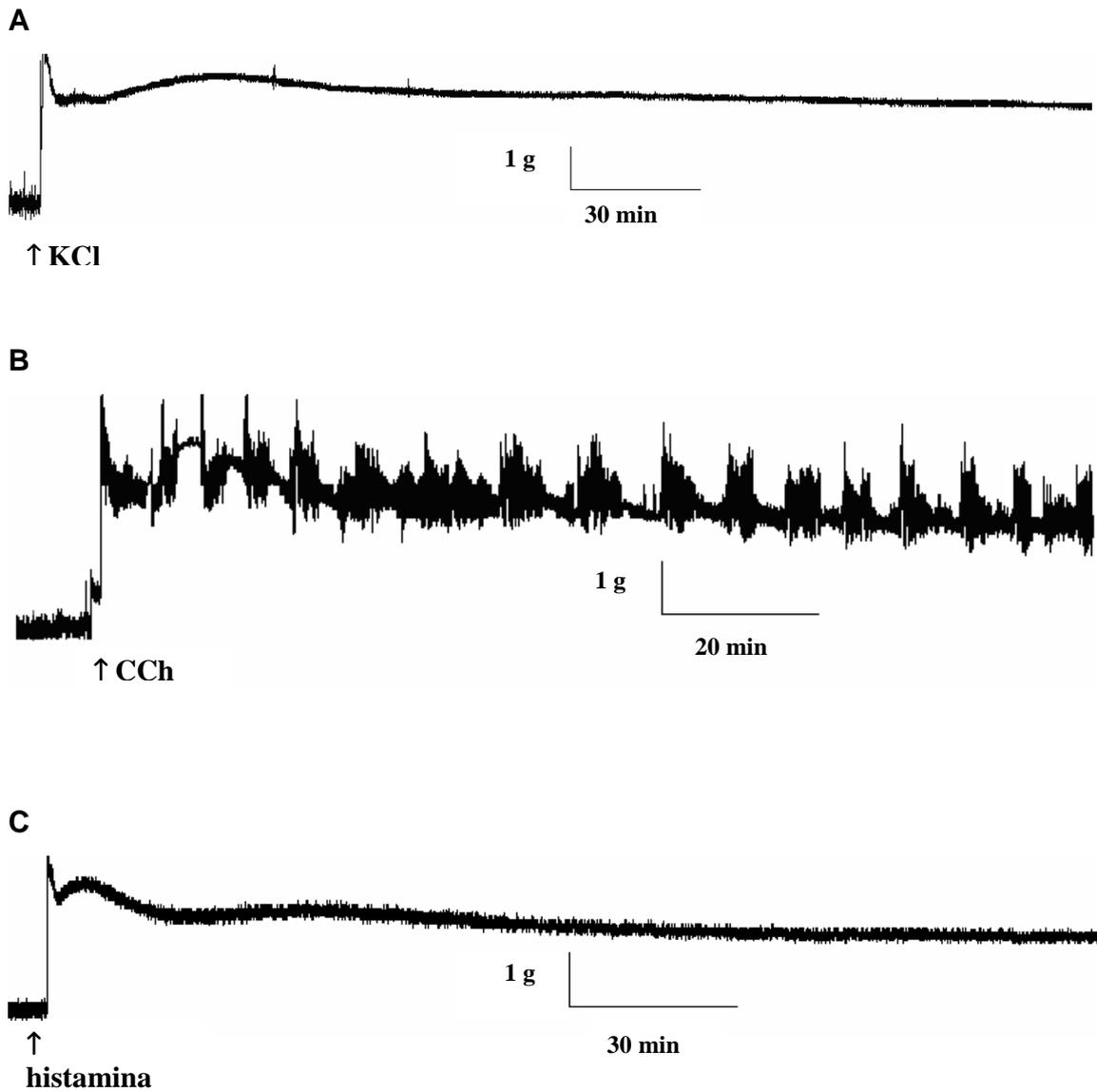


Figura 3. Registro original controle das contrações induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia.

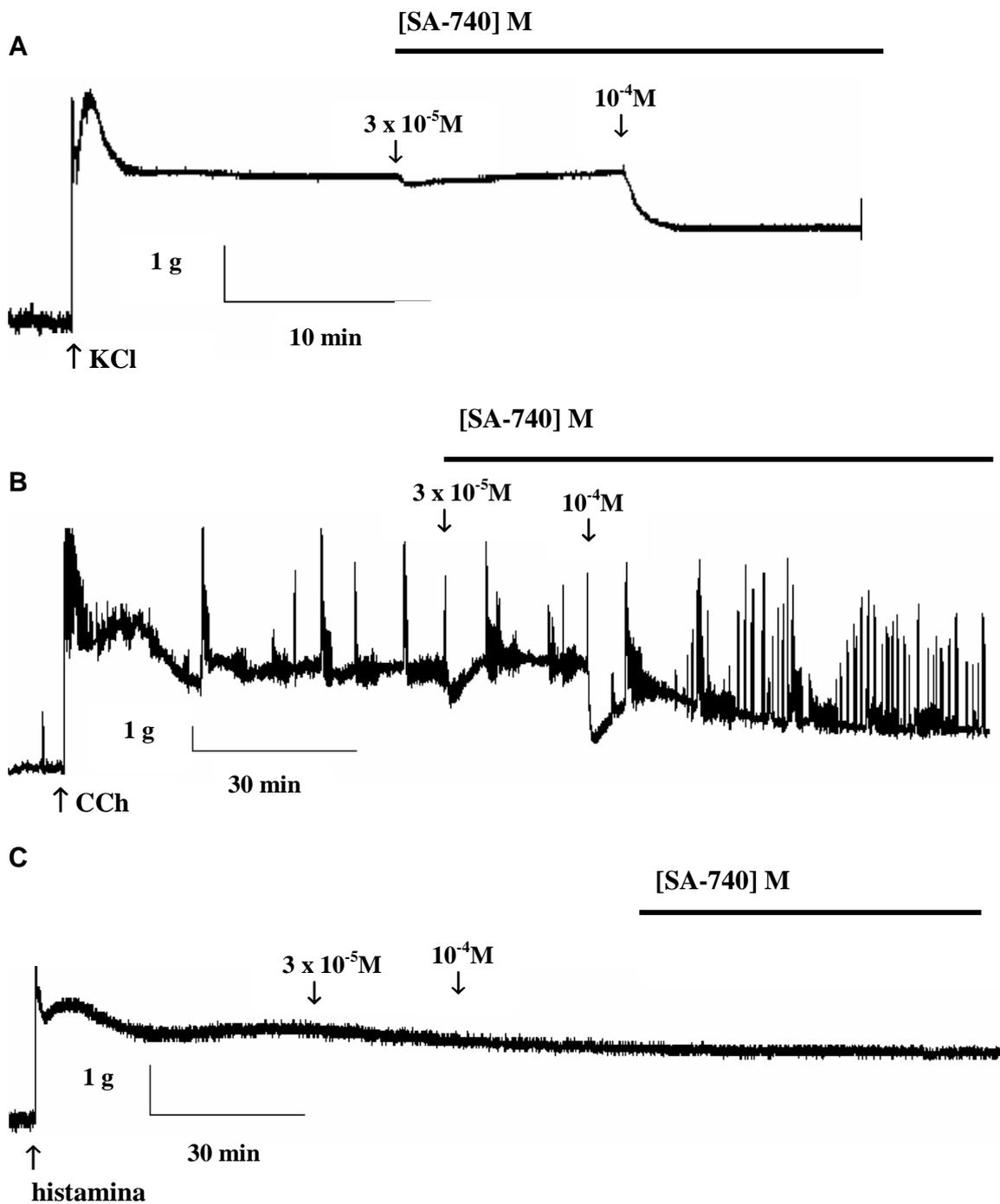


Figura 4. Registro original do efeito do flavonóide glicosilado SA-740 sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**) e 10^{-6} M de carbacol (**B**), e de histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia.

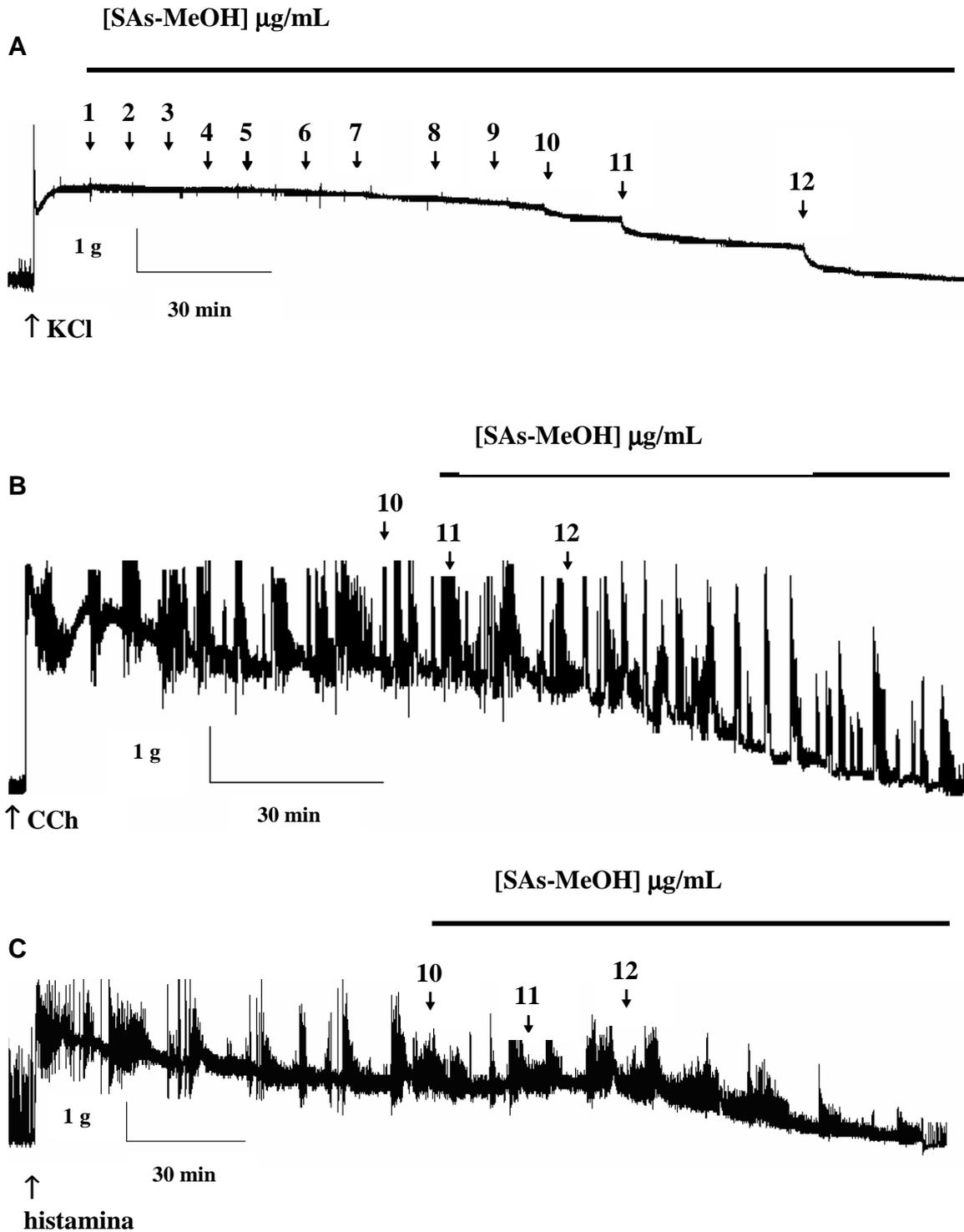


Figura 5. Registro original do efeito do extrato SAS-MeOH sobre as concentrações tônicas induzidas por KCl (**A**); carbacol (CCh) (**B**) e histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia . SAS-MeOH [$\mu\text{g/mL}$]: 0,001 (1); 0,003 (2); 0,01 (3); 0,03 (4); 0,1 (5); 0,3 (6); 1 (7); 3 (8); 9 (9); 27 (10); 81 (11) e 243 (12).

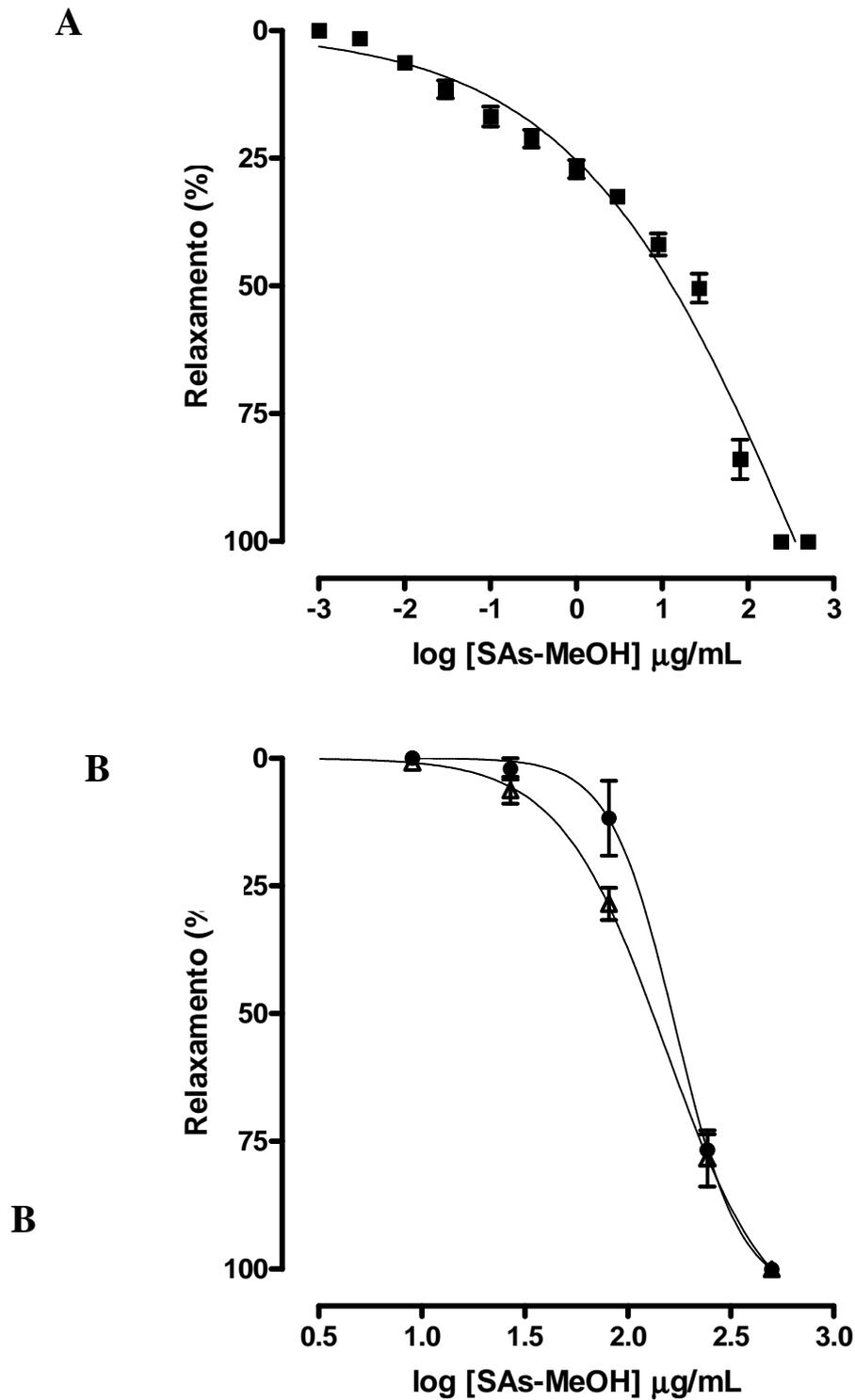


Gráfico 4. Efeito do extrato SAs-MeOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#) (A), 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou de histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia (B) (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m. respectivamente.

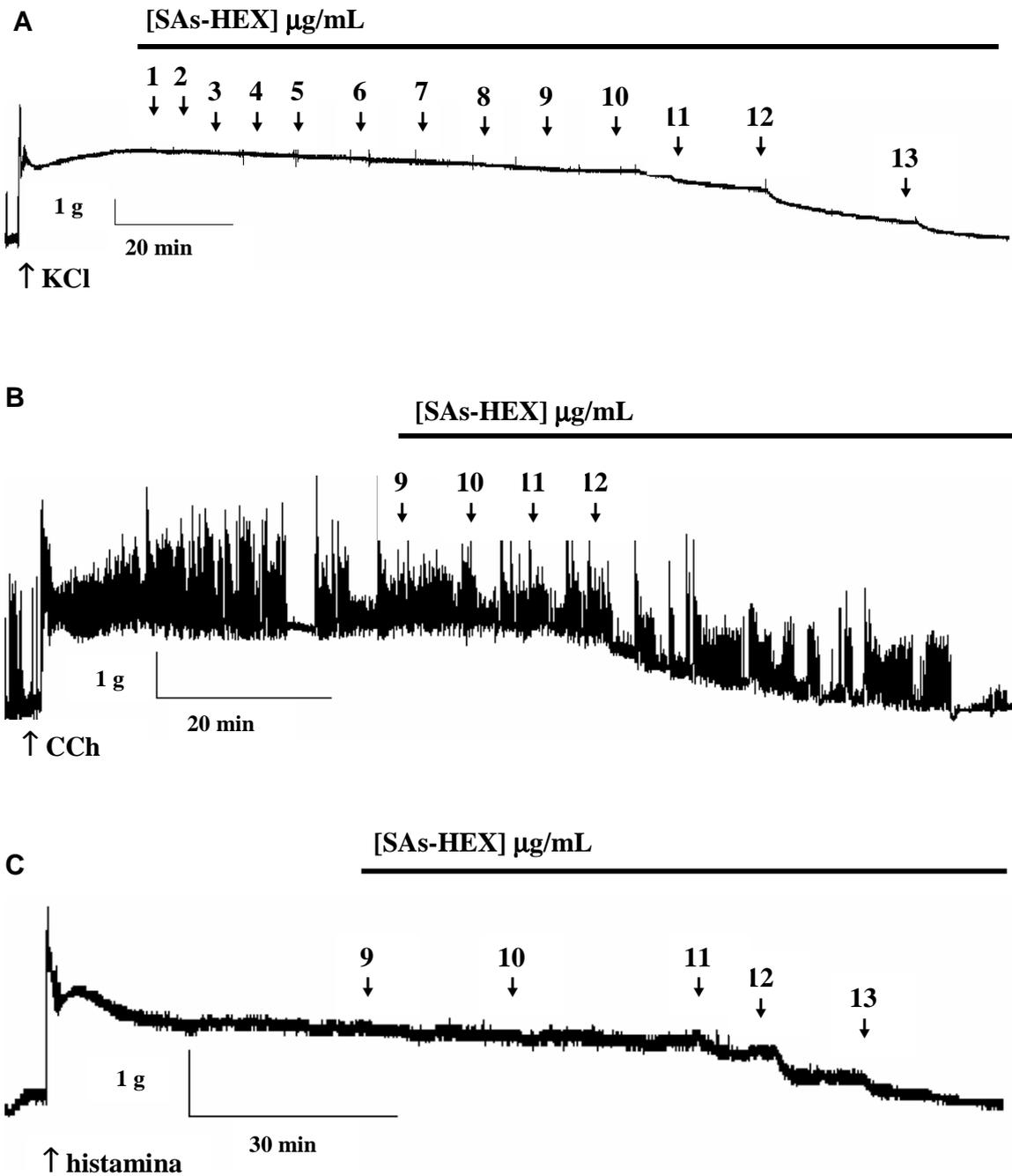


Figura 6. Registro original do efeito da fase SAs-HEX sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A); carbacol (CCh) (B) e histamina (C) em íleo isolado de cobaia . SAs-HEX [$\mu\text{g/mL}$]: 0,001 (1); 0,003 (2); 0,01 (3); 0,03 (4); 0,1 (5); 0,3 (6); 1 (7); 3 (8); 9 (9); 27 (10); 81 (11); 243 (12) e 500 (13).

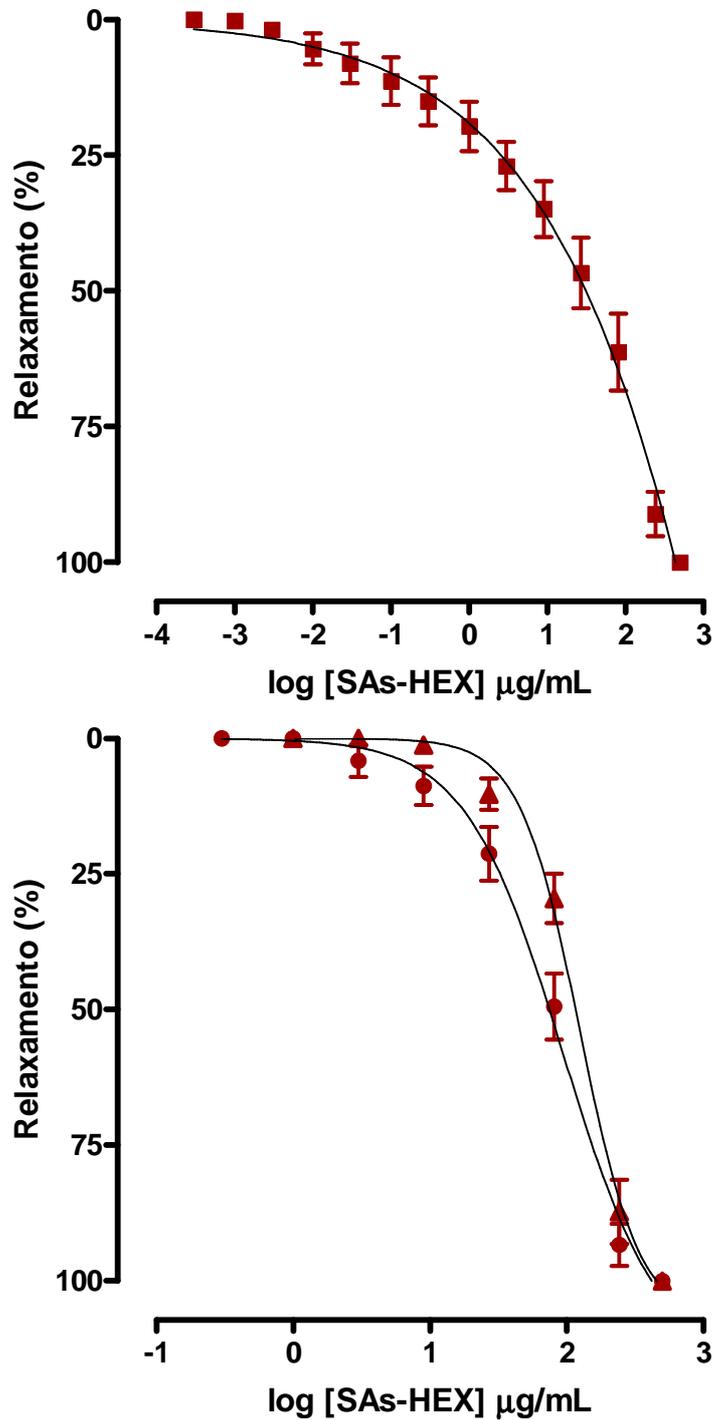


Gráfico 5. Efeito da fase SAS-HEX sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#), 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou por histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e barras verticais representam a média e o e.p.m. respectivamente.

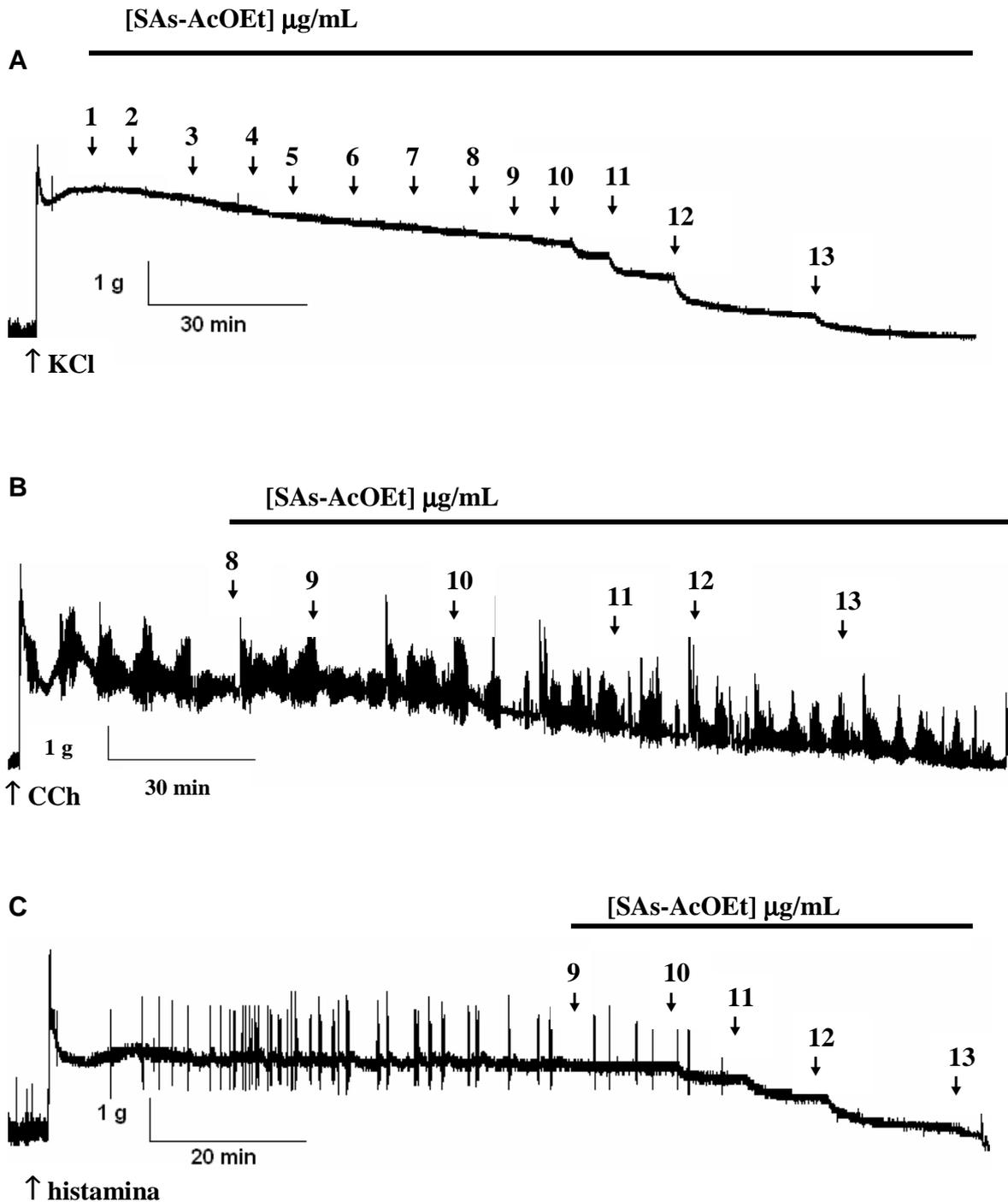


Figura 7. Registro original do efeito de SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (**A**); carbacol (CCh) (**B**) e histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia . SAs-AcOEt [$\mu\text{g/mL}$]: 0,001 (**1**); 0,003 (**2**); 0,01 (**3**); 0,03 (**4**); 0,1 (**5**); 0,3 (**6**); 1 (**7**); 3 (**8**); 9 (**9**); 27 (**10**); 81 (**11**); 243 (**12**) e 500 (**13**).

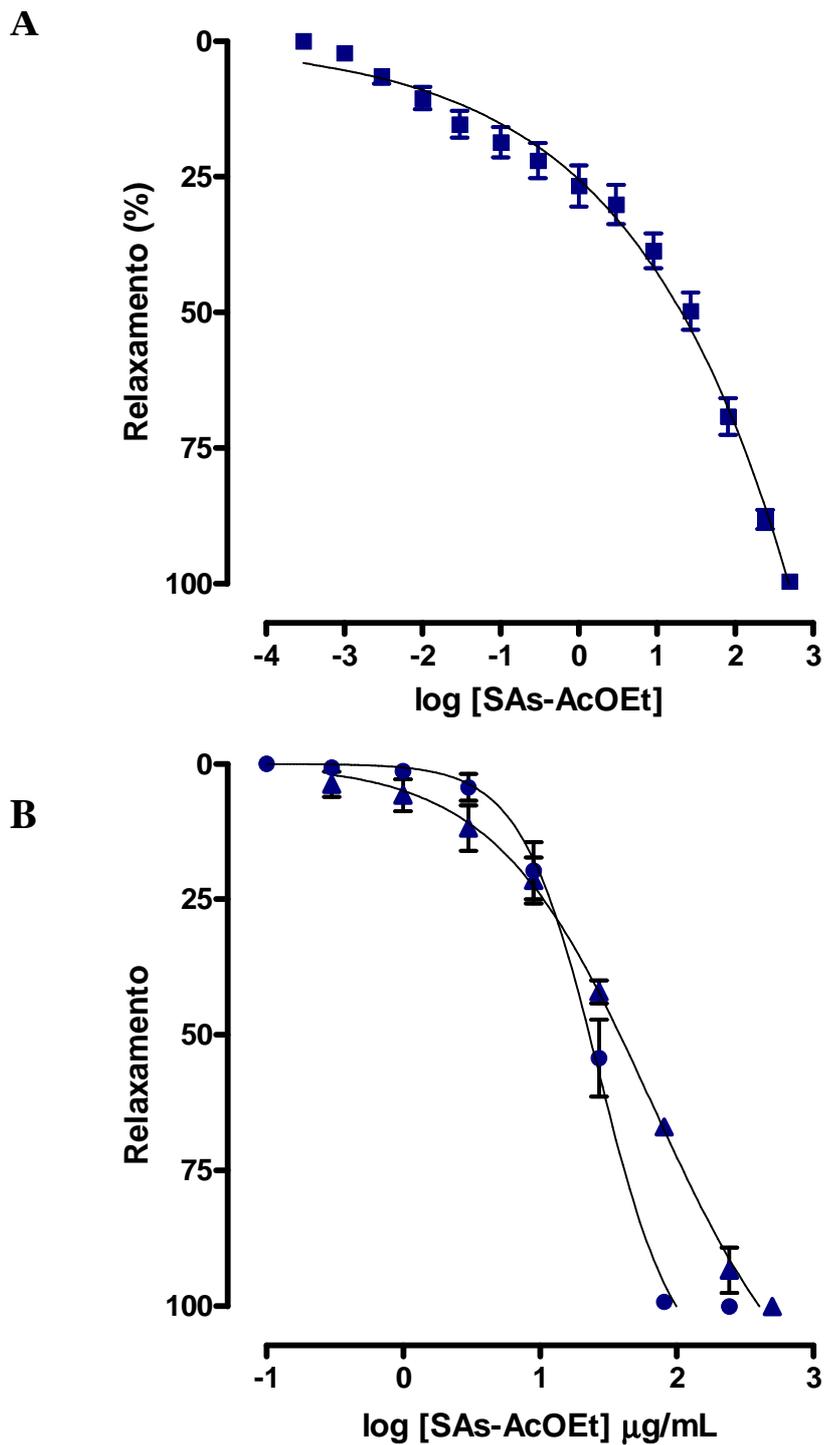


Gráfico 6. Efeito de SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (#), 10^{-6} M de carbacol (Δ) ou por histamina (\bullet) em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m. respectivamente.

Tabela 6. Valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de SAs-MeOH e das fases (SAs-AcOEt, SAs-HEX) em íleo de cobaia pré-contraído com KCl, carbacol e histamina.

Drogas teste Extrato e fases	Agentes Contráteis CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	KCl	Carbacol	Histamina
SAs-MeOH	$8,7 \pm 0,9^c$	$126,4 \pm 10,2^c$	$180,2 \pm 26,7^{a, b, c}$
SAs-HEX	$25,6 \pm 8,9^c$	$106,8 \pm 11,1^c$	$74,0 \pm 13,6^{b, c}$
SAs-AcOEt	$12,6 \pm 3,1^c$	$95,1 \pm 10,7^c$	$69,1 \pm 10,2^{a, c}$

Teste "t" de Student, $p < 0,05$: ^a(SAs-MeOH vs. SAs-AcOEt);

^b(SAs-MeOH vs SAs-HEX) ; ^c (agonistas vs. KCl)

4.4 Caracterização do Mecanismo de Ação Espasmolítica da fase SAs-AcOEt em Íleo Isolado de Cobaia

4.4.1 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio

A fase SAs-AcOEt inibiu, de maneira dependente de concentração, as contrações induzidas por CaCl₂ (n = 5) em meio despolarizante e nominalmente sem cálcio. As curvas cumulativas ao CaCl₂ foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do E_{max}. (Gráfico 7). Os valores de CE₅₀ do CaCl₂ passaram de $7,7 \pm 1,7 \times 10^{-4}$ (controle) para $1,9 \pm 0,4 \times 10^{-3}$; $3,9 \pm 0,8 \times 10^{-3}$; $8,9 \pm 1,4 \times 10^{-3}$ e $2,1 \pm 0,3 \times 10^{-2}$ M, na presença das concentrações 81, 243,500 e 750 µg/mL, respectivamente. Enquanto que os valores de E_{max} do CaCl₂ foram $76,8 \pm 5,0$; $53,4 \pm 6,7$; $26,6 \pm 6,2$ e $7,0 \pm 1,2$ % na presença de 81, 243, 500 e 750 µg/mL de SAs-AcOEt, respectivamente.

A responsividade do órgão ao CaCl₂ foi revertida após 60 minutos da retirada da fase SAs-AcOEt da cuba.

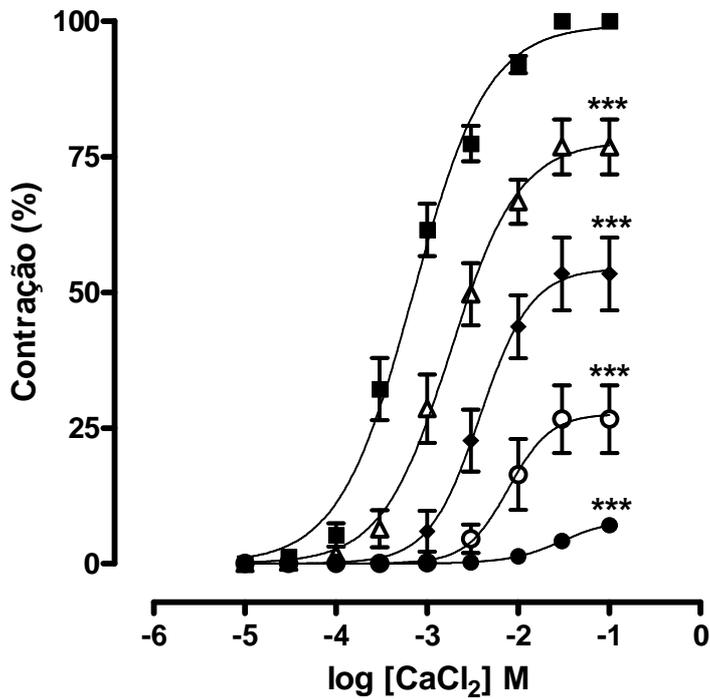


Gráfico 7. Efeito da fase SAs-AcOEt frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio (n = 5). Controle (■), SAs-AcOEt [µg/mL]: 81 (△), 243 (◆); 500 (○) e 750 (●). Teste “t” de student, ****p* < 0,0001 (controle vs. SAs-AcOEt).

4.4.2 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K8644

A fase SAs-AcOEt foi capaz de relaxar, de maneira significativa e dependente de concentração o íleo isolado de cobaia pré-contraído com S(-)-BAY K8644 (n = 4), com um valor de CE_{50} de $26,5 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ e com um tempo médio de relaxamento de 26 minutos (Figura 8 e Gráfico 8).

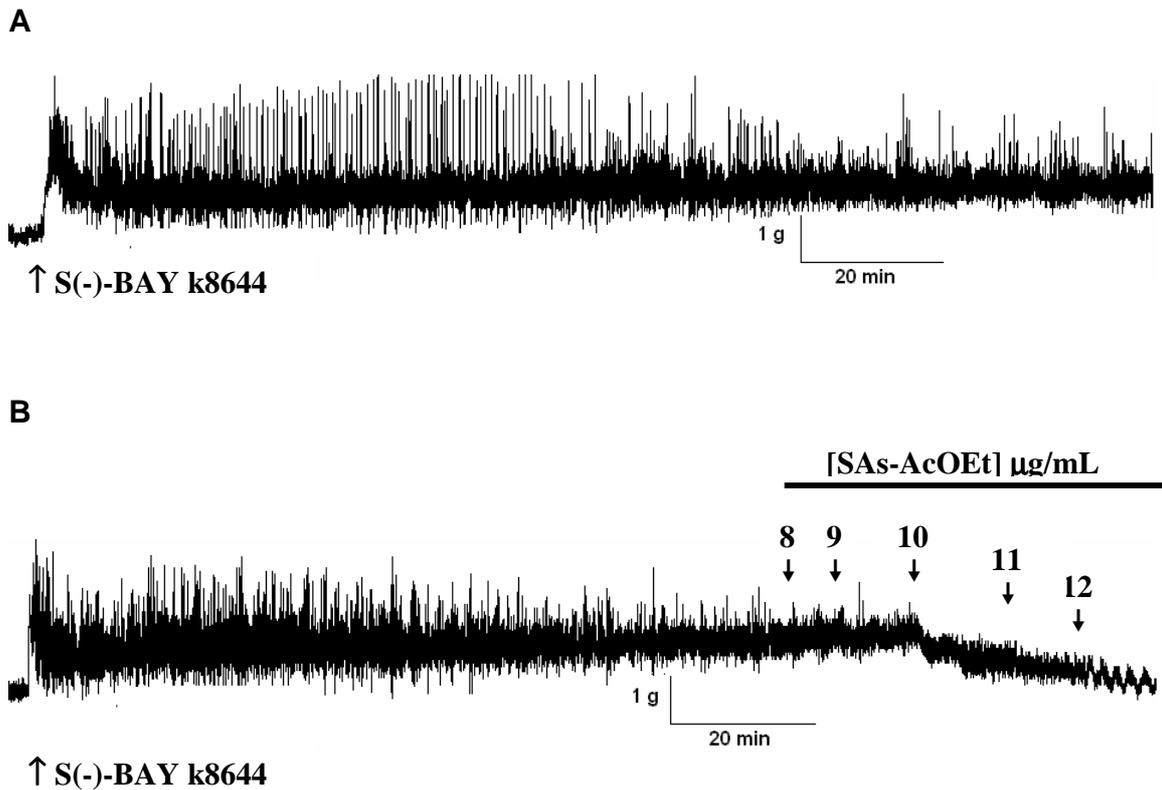


Figura 8. Registro original das contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S(-)-BAY K8644 na ausência (**A**) e na presença da fase SAs-AcOEt (**B**) em íleo isolado de cobaia. SAs-AcOEt [$\mu\text{g/mL}$]: 3 (**8**); 9 (**9**); 27 (**10**); 81 (**11**) e 243 (**12**).

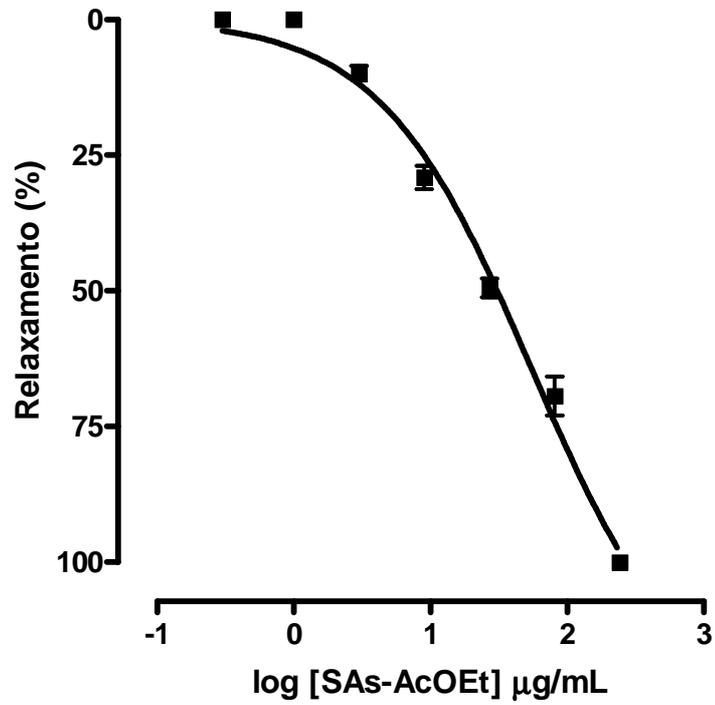


Gráfico 8. Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-BAY K8644 em íleo isolado de cobaia (n = 4). Símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m. respectivamente.

4.4.3 Avaliação da Participação dos Canais de K⁺ no Efeito Espasmolítico Produzido por SAs-AcOEt

4.4.3.1 Efeito da fase SAs-AcOEt sobre as contrações induzidas por carbacol, na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl)

A fase SAs-AcOEt relaxou de maneira dependente de concentração e equipotente, o íleo pré-contraído com carbacol tanto na ausência ($CE_{50} = 95,1 \pm 10,7 \mu\text{g/mL}$) como na presença ($CE_{50} = 88,4 \pm 16,9 \mu\text{g/mL}$) de 5 mM de CsCl (Figura 9 e Gráfico 9).

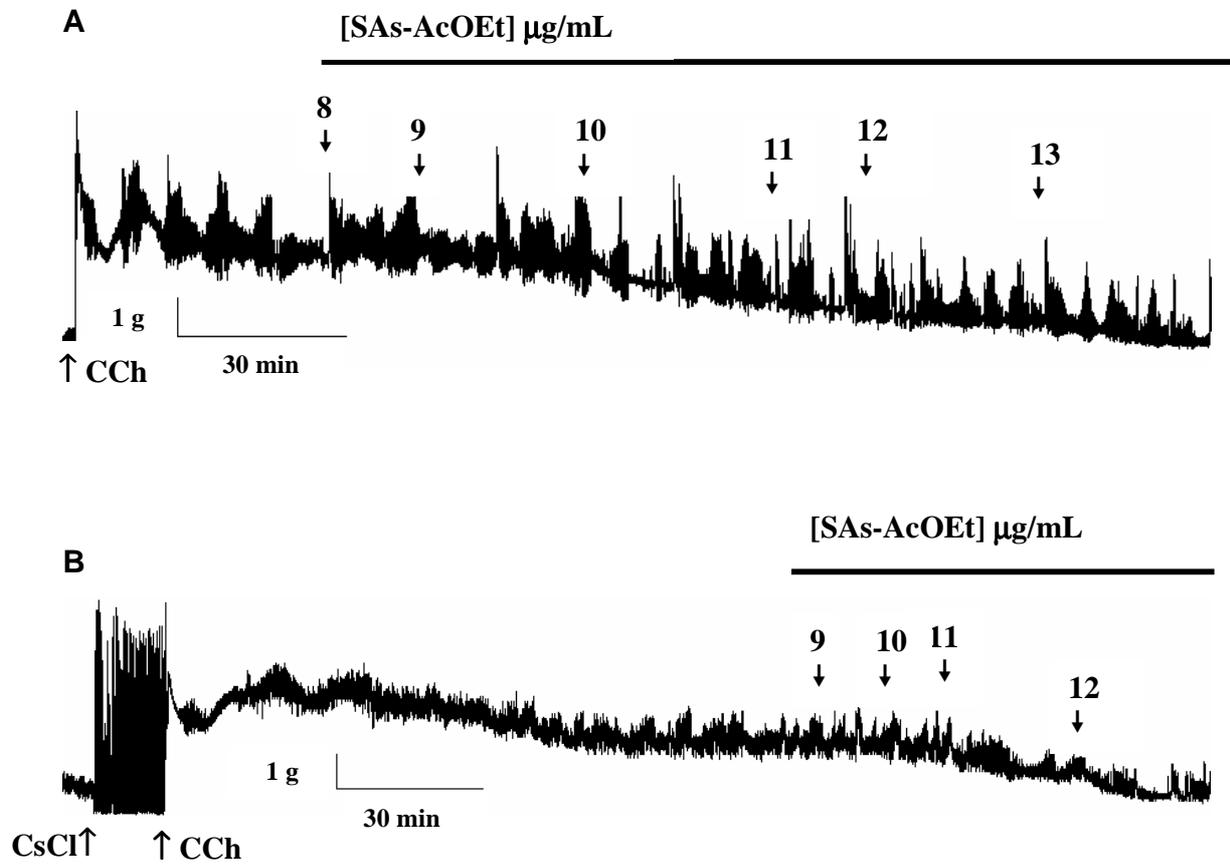


Figura 9. Registro original do efeito de SAs-AcOEt sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-6} M de carbacol (CCh) na ausência (A) ou na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia. SAs-AcOEt [$\mu\text{g/mL}$]: 3 (8); 9 (9); 27 (10); 81 (11); 243 (12) e 500 (13).

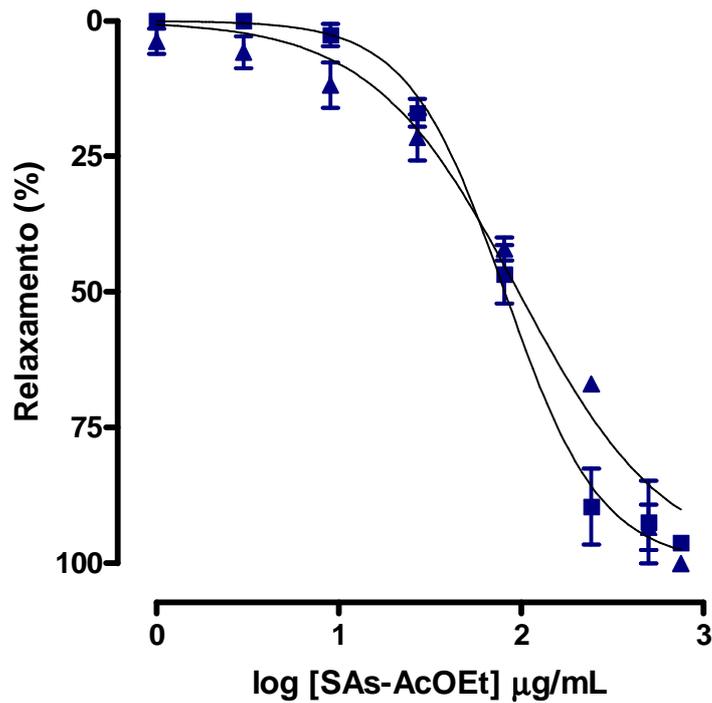


Gráfico 9. Efeito da fase SAs-AcOEt sobre a fase tônica das contrações induzidas por 10^{-6} M de carbacol na ausência (Δ) e na presença de 5 mM de CsCl (\blacksquare), em íleo isolado de cobaia ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A monitoração da atividade espasmolítica do extrato bruto metanólico (SAs-MeOH) obtido das partes aéreas de *Solanum asperum* Rich., das fases acetato de etila (SAs-AcOEt) e hexano:etérea (SAs-HEX), obtidas a partir do referido extrato, bem como do flavonóide glicosilado 3-O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopiranosil-kanferol (SA-740), obtido a partir da fase SAs-AcOEt, mostra que nenhuma dessas drogas apresentam efeito espasmolítico em aorta isolada de rato, entretanto, em útero isolado de rata apenas a fase SAs-AcOEt apresenta efeito espasmolítico, já o mesmo não acontece em íleo isolado de cobaia, onde todas as drogas testadas apresentam um efeito espasmolítico não seletivo. O principal achado deste trabalho foi que mecanismo de ação espasmolítica do extrato SAs-MeOH, das fases SAs-AcOEt e SAs-HEX, parece envolver o bloqueio do influxo de cálcio, e que o efeito induzido pela fase SAs-AcOEt provavelmente envolve o bloqueio de canais de cálcio operados por voltagem do tipo L ($Ca_v - L$).

Os estudos farmacológicos preliminares realizados em aorta isolada de rato, com o extrato SAs-MeOH, e com as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX, obtidas a partir do referido extrato, bem como, com o flavonóide glicosilado SA-740, demonstraram que tanto o extrato como as fases, até uma concentração de 500 μ g/mL, assim como, o flavonóide glicosilado SA-740, até a concentração de 3×10^{-4} M, não apresentaram efeito relaxante sobre a aorta de rato pré-contraída com fenilefrina (dados não mostrados). Estes dados são sugestivos de que as partes aéreas de *Solanum asperum* Rich. não apresentam princípios ativos com atividade vasorelaxante, dados estes que estão de acordo com os resultados obtidos por CORREIA (2007), onde foi demonstrado que o extrato metanólico obtido a partir dos frutos (SAf-MeOH) também não apresenta tal efeito.

Assim como o extrato SAf-MeOH (CORREIA, 2007), os estudos realizados em útero isolado de rata mostraram que o extrato SAs-MeOH e a fase SAs-HEX, até a concentração de 500 μ g/mL, não apresentaram efeito inibitório significativo frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por ocitocina, assim como, o flavonóide

glicosilado SA-740, até a concentração de 3×10^{-4} M. Já a fase SAs-AcOEt foi capaz de inibir de maneira dependente de concentração, as contrações fásicas induzidas por carbacol ou por ocitocina em útero isolado de rata (Gráfico 1). Estes resultados são sugestivos de que os princípio (s) ativo (s) com atividade tocolítica esta (ão) presente (s) apenas na fase SAs-AcOEt, e que o flavonóide glicosilado SA-740 isolado não é o responsável por este efeito. Analisando os valores de CI_{50} da fase SAs-AcOEt, os mesmos não mostraram diferença significativa entre si, o que sugere um efeito espasmolítico não seletivo da fase SAs-AcOEt, frente aos agonistas utilizados.

O extrato SAs-MeOH e a fase SAs-HEX, até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, não apresentaram efeito espasmolítico sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata. Entretanto, a fase SAs-AcOEt apresentou um E_{max} em torno de 51 %, nas mesmas condições experimentais (Gráfico 2). Estes dados são sugestivos de que o (s) agente (s) que promovem a atividade espasmolítica em útero isolado de rata está (ão) mais concentrado (s) ou mais ativo (s) na fase SAs-AcOEt, já que foi a única droga testada que apresentou um efeito espasmolítico frente às contrações fásicas e sobre as contrações tônicas, em útero isolado de rata.

Estudos recentes realizados com o extrato SAs-MeOH e com a fase SAs-AcOEt em íleo e traquéia isolados de cobaia, demonstraram que apenas a fase SAs-AcOEt apresentou efeito espasmolítico nos referidos órgãos (COSTA, 2006). Já na investigação farmacológica preliminar da atividade espasmolítica da fase SAs-HEX, bem como, do flavonóide glicosilado SA-740, em íleo isolado de cobaia, demonstra-se que apenas a fase SAs-HEX é capaz de inibir, de maneira dependente de concentração, as contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina (Gráfico 3). Comparando-se as duas fases observou-se que SAs-AcOEt apresentou uma maior potência frente às contrações induzidas por carbacol, diferentemente da fase SAs-HEX que foi mais potente quando órgão era contraído por histamina, sugerindo que os constituintes químicos, com atividade espasmolítica, presentes na duas fases podem não ser os mesmos, já que apresentaram efeitos diferentes frente aos mesmos agonistas. O flavonóide glicosilado SA-740, até a concentração de 3×10^{-4} M, não apresentou efeito inibitório significativo frente às contrações fásicas em íleo isolado de cobaia (dados não mostrados).

Uma vez que tanto as fases quanto o flavonóide glicosilado foram originados a partir do extrato metanólico bruto (SAs-MeOH), e este foi desprovido de efeito espasmolítico em todos os órgãos testados na triagem preliminar, é sugestivo de que os princípios ativos possam estar na forma de um fitocomplexo inativo no extrato SAs-MeOH, ou que os mesmos possam estar mais diluídos, visto que o metanol por ter uma polaridade muito próxima da água arrasta um quantidade muito maior de constituintes químicos.

O espasmo é caracterizado por uma contração muscular e no músculo liso essa contração ocorre após a elevação da concentração do cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) em virtude da abertura dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana plasmática ou devido a sua liberação do retículo sarcoplasmático (RS) controlada por mensageiros secundários, por exemplo o $InsP_3$ e o Ca^{2+} . A regulação funcional da $[Ca^{2+}]_i$ para disparar uma resposta contrátil no músculo liso está relacionada com dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: (1) acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança de potencial de membrana (V_m) e (2) acoplamento fármaco-mecânico quando a contração induzida por um agonista é sempre maior que a observada só com a mudança de V_m (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil através do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente pelo aumento da concentração externa de K^+ ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando a abertura de canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v) causando influxo de Ca^{2+} no citoplasma e conseqüentemente a contração (REMBOLD, 1996; RATZ et al., 2005).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (a) aumento de $InsP_3$ e diacilglicerol por ligação do agonista com o receptor ativando a proteína $G_{q/11}$ -fosfolipase C (PLC). O $InsP_3$ liga-se a um receptor no RS permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que favorecerá a formação do complexo Ca^{2+}_4 -CaM disparando o início do mecanismo contrátil (GARRET; GRISHAM, 1995); (b) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do canal de Ca^{2+} tipo L por um mecanismo ainda desconhecido não envolvendo mudança no V_m (REMBOLD, 1996).; (c) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina (sensíveis à

caféina) presentes na membrana do RS (KOMORI et al., 1995) e (d) aumento do Ca^{2+} por ativação do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ reverso (BLAUSTEIN, 1989).

A contração no músculo liso em resposta a vários agentes é frequentemente composta por duas fases: um componente fásico rápido seguido por um lento mais sustentado, componente tônico (para revisão ver VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca^{2+} no músculo liso. Em íleo de cobaia, os agonistas muscarínicos produzem esta resposta bifásica, e é sugerido que a contração fásica é causada por liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediados por InsP_3 (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989). Por outro lado, a contração tônica induzida por agonistas muscarínicos em íleo de cobaia é atribuída ao influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V , uma vez que a contração tônica é suprimida pelo bloqueador de Ca_V , verapamil (JIM et al., 1981). A probabilidade de abertura dos Ca_V é favorecida por uma despolarização de membrana por estímulo mediado por acoplamento fármaco e eletromecânico (REMBOLD, 1996).

Tendo em vista que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes em relação aos da fase fásica em íleo isolado (HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996, ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), resolveu-se verificar se o extrato SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX, bem como, o flavonóide glicosilado SA-740 promoveriam o relaxamento do íleo pré-contraído, sendo assim, este resultado sugeriria o bloqueio do influxo de cálcio através da membrana citoplasmática, em nível funcional. Então, resolveu-se avaliar os efeitos das drogas teste sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por 40 mM de KCl (acoplamento eletromecânico) e por 10^{-6} M de carbacol ou de histamina, que agem por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) em íleo isolado de cobaia (BOLTON et al., 1981).

Os resultados observados mostraram que diferentemente do que ocorreu no protocolo anterior, onde o extrato SAs-MeOH, a fase SAs-HEX e o flavonóide glicosilado SA-740 foram ineficazes em antagonizar as contrações fásicas induzidas por carbacol, ou por histamina, o extrato SAs-MeOH, as fases SAs-HEX e SAs-AcOEt, foram capazes de induzir relaxamento, de maneira dependente de concentração

quando o íleo era pré-contraído com KCl, carbacol ou com histamina (Figura 3, 4 e 5; Gráficos 4, 5 e 6). Entretanto, o flavonóide glicosilado SA-740 apresentou efeito relaxante significativo apenas na concentração de 10^{-4} M, sendo que o E_{max} alcançado pelo mesmo não ultrapassou 55 %, enquanto que o extrato e as fases apresentaram um $E_{max} = 100$ % (Figura 3). Analisando os valores de CE_{50} em separado foi observado que o extrato SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX foram equipotentes sobre às contrações tônicas induzidas por KCl ou por carbacol, já quando a contração foi induzida por histamina a CE_{50} do extrato SAs-MeOH foi cerca de 2 vezes maior do que as das fases, os resultados mostraram que o extrato SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAsHEX, foram cerca de 10 a 15 vezes mais potentes quando o órgão foi pré-contraído com KCl (acoplamento eletromecânico) em relação a contração induzida por carbacol ou por histamina (acoplamentos mistos).

Tendo em vista estes resultados e analisando os valores de CI_{50} e CE_{50} é possível afirmar que o extrato SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX apresentaram um efeito relaxante sobre a fase tônica da contração de íleo isolado de cobaia, bem mais significativo, se comparado com o efeito inibitório das contrações fásicas, com uma CE_{50} de 3 a 4 vezes menor. Diferentemente do que ocorreu em útero isolado de rata, onde apenas a fase SAs-AcOEt apresentou um efeito relaxante sobre o órgão pré-contraído, com um E_{max} menor do que o seu efeito inibitório frente às contrações fásicas.

O fato de que o flavonóide glicosilado SA-740 apresentou efeito relaxante sobre a fase tônica da contração de íleo isolado de cobaia, embora este efeito não tenha atingido 100 % de relaxamento, é sugestivo de que o mesmo poderia estar participando, pelo menos em parte, da promoção do efeito espasmolítico do extrato SAs-MeOH e da fase SAs-AcOEt, sobre as contrações tônicas, induzidas por KCl, carbacol ou por histamina.

Levando-se em consideração o fato de que o flavonóide glicosilado SA-740 foi obtido a partir fase SAs-AcOEt e que a mesma apresentou-se equipotente ao extrato SAs-MeOH quando o órgão era pré-contraído por KCl ou por carbacol e ainda mais potente quando as contrações eram induzidas por histamina, em íleo isolado de cobaia. A análise destes dados foi decisiva para dar continuidade na investigação do

mecanismo de ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt sobre a fase tônica da contração em íleo isolado de cobaia. Os dados são sugestivos de que a fase SAs-AcOEt poderia estar agindo bloqueando o influxo de cálcio através dos Ca_v , uma vez que a contração tônica em íleo isolado de cobaia é mantida primordialmente pelo influxo de cálcio na célula através destes canais (JIM et al., 1981).

Com o objetivo de confirmar se a fase SAs-AcOEt estaria bloqueando o influxo de cálcio e assim promovendo sua ação espasmolítica, avaliou-se seus efeitos sobre as curvas cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} e observou-se que a fase SAs-AcOEt bloqueou significativamente, de maneira não competitiva, contrações induzidas por $CaCl_2$, uma vez que a curva de $CaCl_2$ foi desviada para direita de forma não paralela e sem atingir o efeito máximo. Os resultados deste experimento corroboram a hipótese de que a fase SAs-AcOEt interfere com o influxo de cálcio através dos Ca_v , em nível funcional.

Estes resultados suscitaram a dúvida de qual seria o subtipo de Ca_v envolvido nessa ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt. Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem mais expressos no íleo de cobaia são os do tipo L ($Ca_v - L$) (BOLTON, 1979; TOMITA, 1981), mas recentemente referidos como $Ca_v 1.2$ (CATERRAL et al., 2005). No músculo liso arterial e em células musculares em geral, estes canais de Ca^{2+} têm maior atividade em conduzir o Ca^{2+} do meio extracelular para o citoplasma (LIAO et al., 2005).

Com o intuito de verificar se o Ca_v envolvido na ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt seria o $Ca_v - L$, analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado diidropiridínico S(-)-BAY K8644, um agonista seletivo dos $Ca_v - L$ (SCHRAMM et al., 1983a; b; CONTE-CAMERINO, et al., 1987) e foi observado que fase SAs-AcOEt relaxou o íleo pré-contraído por S(-)-BAY K8644 de maneira dependente de concentração (Gráfico 8 e Figura 6), com uma CE_{50} cerca de 3 a 4 vezes menor, do que quando as contrações tônicas foram induzidas por carbacol ou por histamina (Gráfico 6), entretanto, foi menos potente quando comparada com a CE_{50} frente as contrações tônicas induzidas por KCl.

Os dados deste experimento são sugestivos de que os $Ca_v - L$ podem estar envolvidos no mecanismo de ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt, já que a mesma

relaxou mais potentemente o íleo pré-contraído por S(-)-BAY K8644 em comparação com o efeito relaxante sobre a fase tônica das contrações induzidas por carbacol ou por histamina, entretanto foi menos potente se compararmos com o efeito sobre o íleo pré-contraído por KCl, embora a diferença entre os valores de CE_{50} seja pequena, não poderíamos descartar a hipótese de que outros mecanismos estariam envolvidos no mecanismo de ação espasmolítica promovido pela fase SAs-AcOEt.

É digno de nota perceber que os testes farmacológicos preliminares demonstraram que a fase SAs-AcOEt foi significativamente mais potente quando as contrações tônicas eram induzidas por KCl do que quando por carbacol ou por histamina, em íleo isolado de cobaia.

Estudos utilizando tecido muscular liso intacto mostraram que agonistas GPCR podem produzir grandes aumentos na força de contração graças ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$, se comparado com o aumento da força induzida por KCl (BRADLEY; MORGAN, 1987; DEFEO; MORGAN, 1985; GERTHOFER; MURPHEY; GUNST, 1989; HIMPENS; KITAZAWA; SOMLYO, 1990; KARAKI; SATO; OZAKI, 1988; MORGAN; MORGAN, 1984; OZAKI et al., 1989; REMBOLD; MURPHY, 1988; SATO; OZAKI; KARAKI, 1988). O KCl pode induzir uma contração longa e sustentada causada pela despolarização da membrana citoplasmática, resultando no influxo de cálcio através dos Ca_v , ativando assim a MLC cinase dependente de cálcio e conseqüentemente aumentando a fosforilação da MLC (RATZ et al., 2005; GANITKEVICH; ISENBERG, 1991). Já o mecanismo de contração induzido pela ativação dos GPCR ocorre pela ativação da proteína trimérica G (G_q e $G_{12/13}$), levando a geração de múltiplos mensageiros intracelulares, incluindo IP_3 , DAG, RhoA, além da ativação dos canais de cálcio, das proteínas cinases, RhoA cinase (ROK) e da proteína cinase C (PKC), levando a conseqüente ativação da MLC cinase (RATZ et al., 2005; MCFADZEAN; GIBSON, 2002; PFITZER; ARNER, 1998; SANDERS, 2001; SAH et al., 2000; SEASHOLTZ; MAJUNDAR; BROWN, 1999; SOMLYO; SOMLYO, 1998; WETSHURECK; OFFERMANN, 2002).

A ativação do GPCR pode reduzir a atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLC fosfatase) pela fosforilação da subunidade regulatória da MLC fosfatase (MYPT1) e a PKC ativada inibe a proteína inibitória da fosfatase (CPI-17),

isto ocorre pela fosforilação da CPI-17-Thr38 (RATZ et al., 2005; ETO; KITAZAWA; BRAUTIGAN, 2004; ETO et al., 2001; FENG et al., 1999; FUJIHARA et al., 1997; HARTSHORNE; ITO; ERDODI, 1998; LI et al., 1998; LUCIUS et al., 1998). A atividade da MLC fosfatase é também regulada independentemente da CPI-17, pela fosforilação da MYPT1-Thr696 e MYPT1-Thr853, sendo que a fosforilação da MYPT-Thr696 inibe a atividade da MLC fosfatase (FENG et al., 1999; ICHIKAWA; ITO; HARTSHORNE, 1996, RATZ et al., 2005), enquanto que a fosforilação da MYPT1-Thr853 causa a dissociação da MLC fosfatase da miosina, e como consequência inibe a ação da MLC fosfatase sobre o substrato (RATZ et al., 2005; VELASCO, 2002)

Recentes estudos demonstraram que o KCl pode causar sensibilização do cálcio, envolvendo a translocação e ativação da RhoA cinase (RATZ, 2005); entretanto estudos realizados com o KCl mostraram que o mesmo, parece não causar a fosforilação da CPI-17 em contrações tônicas de artéria femoral e contrações fásicas de vasos deferentes de coelho na presença de um bloqueador α -adrenérgico (RATZ, 2005; KITAZAWA et al., 2000; KITAZAWA et al., 2003). Em 1997, foram realizados estudos com um inibidor competitivo do sítio catalítico do ATP, seletivo para a ROK (Y-27632), os resultados mostraram que com uma Cl_{50} variando entre 0,3 e 1 μ M, Y-27632 foi capaz de inibir contrações induzidas por fenilefrina, histamina, acetilcolina, endotelina e U-46619, enquanto que a Cl_{50} frente às contrações induzidas por KCl foi maior que 30 μ M (UCHATA et al., 1997; RATZ, 2005). Estudos em íleo mostraram que o bloqueio da ROK pelo Y-27632 e HA-1077 foi suficiente para abolir o componente tônico da contração, porém o mesmo não aconteceu frente às contrações fásicas, onde as mesmas praticamente não foram inibidas (RATZ, 2005; SWARD et al., 2000).

Todos estes dados são sugestivos de que, tanto o KCl como carbacol e histamina são capazes de ativar a via de sensibilização ao cálcio (como descrito anteriormente), em íleo isolado de cobaia. O mecanismo de ativação do KCl da via de sensibilização ao cálcio parece não estar bem elucidado, entretanto os agonistas dos GPCR (carbacol e histamina) parecem ativar esta via mais fortemente. Tendo em vista todas essas premissas e levando em consideração que a via de sensibilização ao cálcio parece ser fundamental na manutenção do componente tônico da contração em íleo, pode-se sugerir que talvez essas diferenças entre os mecanismos de ativação da

via de sensibilização ao cálcio, entre o KCl e os agonistas utilizados neste trabalho, expliquem o fato da fase SAs-AcOEt ter mostrado um efeito espasmolítico significativamente mais potente sobre o componente tônico das contrações induzidas por KCl em íleo isolado de cobaia, quando comparado com o efeito da mesma sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol ou por histamina.

Levando em conta todas estas premissas, resolveu-se avaliar a participação dos canais de K^+ , já que substâncias ativadoras de canais de K^+ aumentam a condutância ao K^+ levando à hiperpolarização da membrana celular e subsequente relaxamento ou redução da excitabilidade da membrana (POGGLIOLI et al., 1995, DAVIES et al., 1996). Conseqüentemente, ativadores de canais de K^+ relaxam preparações de músculo liso pré-contraído por vários agentes contrácteis (DAVIES et al., 1996). Foi demonstrado que algumas dessas substâncias, como levocromakalin e pinacidil, entre outros, promoveram o relaxamento em preparações de plexo mioentérico longitudinal de íleo de rato, por abertura dos K_{ATP} (DAVIES et al., 1996).

A associação entre o aumento da atividade dos canais de K^+ e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e em diversos canais de K^+ , alguns autores apresentando só evidências funcionais envolvendo a resposta contrátil, como por exemplo para os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES, et al., 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994), para os canais de K^+ de grande condutância ativados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) em músculo longitudinal de íleo de cobaia (VOGALIS, 2000) e em íleo isolado de cobaia (CAVALCANTE, 2001), para os canais de K^+ de pequena condutância ativados por Ca^{2+} (SK_{Ca}) em útero de rata (SILVA et al., 1996), outros associando experimentos funcionais e eletrofisiológicos, como por exemplo, para os canais BK_{Ca} em íleo de cobaia (SILVA et al., 1999; ABOULAFIA; SILVA; NOUAILHETAS, 2002).

Com base nessas premissas, decidiu-se investigar a hipótese de que a fase SAs-AcOEt poderia estar induzindo relaxamento por abrir os canais de K^+ . Para testar essa hipótese, avaliou-se o efeito espasmolítico dos mesmos sobre o íleo pré-contraído por carbacol na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl), um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (LATORRE et al., 1989). A observação de

que o CsCl não mudou a potência relaxante da fase SAs-AcOEt (Figura 7 e Gráfico 9) é sugestivo de que o mecanismo de ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt não envolve a participação da ativação de canais de K^+ . Estes dados corroboram com a hipótese de que o mecanismo de ação espasmolítica da fase SAs-AcOEt ocorre majoritariamente pelo bloqueio do influxo de cálcio através dos $Ca_v - L$.

Levando em conta todos os resultados aqui apresentados, pode-se afirmar que todos os objetivos propostos no decorrer do trabalho foram alcançados, uma vez que foi possível contribuir de maneira significativa com o estudo farmacológico do gênero *Solanum*, já que foi possível aprofundar o estudo na área da farmacologia da espécie *Solanum asperum* Rich., sendo possível elucidar alguns aspectos do mecanismo de ação farmacológica da fase SAs-AcOEt em musculatura lisa, demonstrando pela primeira vez que a fase SAs-AcOEt obtida a partir do extrato SAs-MeOH promove um efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia provavelmente pelo bloqueio do influxo de cálcio através dos $Ca_v - L$, abrindo assim a perspectiva de novos estudos na área da fitoquímica e da farmacologia envolvendo esta espécie.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Na abordagem farmacológica visando investigar a atividade espasmolítica de *Solanum asperum* Rich. (SOLANACEAE), conclui-se que:

- O extrato SAs-MeOH, as fases SAs-AcOEt e SAs-HEX, bem como o flavonóide glicosilado não apresentou quaisquer efeitos em aorta isolada de rato.
- Entre todas as drogas testadas apenas a fase SAs-AcOEt apresentou efeito tocolítico em útero isolado de rata.
- As fases SAs-AcOEt e SAs-HEX apresentaram efeito espasmolítico em íleo isolado de cobaia, sendo este efeito mais significativo sobre o órgão pré-contraído.
- Provavelmente o (s) princípio (s) com atividade relaxante frente às contrações fásicas em íleo isolado de cobaia, e com efeito tocolítico em útero isolado rata está (ao) diluído (s) ou inativado (s) no extrato SAs-MeOH.
- O flavonóide glicosilado SA-740 não é o principal responsável pelo efeito relaxante promovido pelo extrato SAs-MeOH e pela fase SAs-AcOEt em músculo liso.
- O mecanismo de ação pelo qual a fase SAs-AcOEt exerce efeito espasmolítico envolve o bloqueio do influxo de Ca^{2+} , provavelmente através dos Ca_v-L .

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

1. Trabalhar de forma conjunta com os colaboradores da química no sentido de testar outro (s) princípio (s) isolado (s) a partir da fase SAs-AcOEt.
2. Em nível funcional investigar o efeito espasmolítico da fase SAs-HEX e do flavonóide SA-740 em traquéia isolada de cobaia.
3. Investigar a participação da via de sensibilização ao Ca^{2+} no efeito espasmolítico promovido pela fase SAs-AcOEt em íleo isolado de cobaia.
4. Em nível eletrofisiológico, avaliar o efeito da fase SAs-AcOEt sobre as correntes de Ca^{2+} em miócitos de íleo de cobaia.
5. Em nível bioquímico, avaliar o efeito da fase SAs-AcOEt sobre $[Ca^{2+}]_i$ em miócitos de íleo de cobaia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**. v. 45, p. 757 - 786, 1989.
- ABOULAFIA, J.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A. Protein kinase C modulators enhance angiotensin II desensitization of guinea pig ileum via maxi-K⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**. v. 442, p. 29– 36, 2002.
- ABRAHAM, Z.; BHAKUNI, S. D.; GARG, H. S.; GOEL, A. K.; MEHROTRA, B. N.; PATNAIK, G. K. Screening of Indian plants for biological activity. Part XII. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 24, n. 1, p. 48-68, 1986.
- AGRA, M. F. . **O gênero Solanum L. (Solanaceae) na Paraíba, Brasil..** In: 3º Encontro de Linhas de Pesquisas do CCS, 1991, João Pessoa. Resumos, 1991. p. 206.
- AGRA, M. F. A new species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **NOVON**, v. 9, n. 3, p. 292-295, 1999.
- AGRA, M. F. **Revisão Taxonômica de Solanum sect. Erythrotrichum Child (Solanaceae)**. São Paulo, 292p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2000
- AHMED, M. S.; TANBOULY, N. D. E.; ISLAM, W. T.; SLEEM, A. A.; SENOUSY, A. S. E. Antiinflammatory Flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. Flowers growing in Egypt. **Phytotherapy. Research** v. 19, p. 807 - 809, 2005.
- AJAY, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, n. 5, p. 603-612, 2003.
- AKBAS, S. H.; TIMUR, M.; OZBEN, T. The Effect of Quercetin on Topotecan Cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells. **Journal of Surgical Research** v. 125, p. 49 – 55, 2004.
- ALLEN, B. G.; WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 19, n. 9, p. 362-368, 1994.

ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; BARRETO LINS, C. F.; MELLO, A. C.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. The presence of acetylcholine in fruits of *Solanum melongena* L. **Revista Institucional da Universidade Federal de Pernambuco, Recife** 22 ½, 1985.

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

ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 48-58, 1959.

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

ATTA-UR-RAHMAN C.; IQBAL, M. – In: **The alkaloids 50**. San Diego, Academic Press, 1998, p. 102.

BHAKUNI, D. S.; DHAR, M. L.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 7, n. 4, p. 250-262, 1969.

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

BHATTACHARYYA, J. Structure of solaparnaine, a new spirosolane alkaloid from the green berries of *Solanum asperum* Vahl. **Heterocycles**, v. 23, p. 3111-3112, 1985.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants **Food Chemistry**. v. 97. p. 217–222. 2006.

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

BOYD, L. J. Pharmacology of the homeopathic drugs. **Journal of American Institute Homeopathy**, v. 21, p. 209, 1928.

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

BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; LANG, R. J. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology** v. 320, p. 363-379, 1981

BROOKS, S. J. Neuronal Nitric oxide in the gut. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** v. 8. p. 590-603. 1993.

BRADLEY, A. B.; MORGAN, K. G. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. **The Journal of Physiology**, v. 385, p. 297-306, 1995.

BULT, H.; BOECKXCSTAENS, G. E.; PELCKMANS, P. A.; JORDAENS, F. H.; VAN MAERCKE, Y. M.; HERMAN, A. G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. v. 345, p. 346 – 347, 1990.

CASTEELS, R.; SUZUKI, H. The effect of histamine on the smooth muscle cells of the ear of the rabbit. **Pflugers Archives-European Journal Of Physiology**, v. 387, n. 1, p. 17-25, 1980.

CATTERALL, W. A.; REYES, E. P.; SNUTCH, T. P. STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacology Ver.** v. 57, p.411-425, 2005.

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

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

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

COE, F. G.; ANDERSON, G. J. Screening of medicinal plants used by the garifuna of eastern nicaragua for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p.29-50, 1996.

CORREIA, A. C. C. **Efeito comparativo entre os extratos obtidos das partes aéreas e dos frutos de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae) músculo liso.**

2007. Monografia (Graduação Em Farmácia) Escola de Enfermagem e Farmácia, Curso de Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

COSTA, D. A.; SILVA, D. A.; CAVALCANTI, A. C.; MEDEIROS, M. A. A.; LIMA, J. T.; CAVALCANTE, M. S.; SILVA, B. A.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickellii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kampfferol-3-O- β -D-(6''-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. **Química Nova**, vol. 30, pag. 901-903, 2007.

COSTA, V. C. O. **Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum asperum* Rich. e *Solanum paludosum* Moric.: um estudo comparativo.** 2006. Monografia (Graduação Em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

CONSENTINO, F.; VOLPE, M. Antihypertensive effect and end-organ protection of flavonoids: some insights, more questions. **Journal of Hypertension**, v. 20, n. 9, p. 1721-1724, 2002.

CUSHNIE, T. T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26. p. 343-356. 2005.

DANIEL, E. E.; HAUGH, C.; WOSKOWSKA, Z.; CIPRIS, S.; JURY, J.; FOX-THRELKELD, J. E. Role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal polypeptide **American Journal of Physiology Gastrointest Liver Physiol** v. 266, p. G31-G39, 1994.

DAVIES, M. P.; McCURRIE, J. R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**. v. 297, p. 249 - 256, 1996.

DEFEO, T. T.; MORGAN, K. G. Calcium-force relationships as detected with aequorin in two different vascular smooth muscles of ferret. **The Journal of Physiology**, v. 369, p. 269-282, 1985.

CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; LUCA, A.; PERSICHELA, M.; FRANCONIT, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K-8644, on guinea-pig ileum an rat uterine horn. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954-957, 1987.

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

EI-NEGOUMY, S.I.; EI-SAYED, N.H.; MABRY, T.J. **Revista Latinoamericana de química**, v.18, p.88, 1987.

ETO, M.; KITAZAWA, T.; BRAUTIGAN, D. L. Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase -1 by regulatory subunits. **The National Academy of Science of the USA**, v. 101, p. 8888-8893, 2004.

ETO, M.; KITAZAWA, T.; YAZAWA, M.; MUKAI, H.; ONO, Y.; BRAUTIGAN, D. L. Histamine-induced vasoconstriction involves phosphorylation of a specific inhibitor protein for myosin phosphatase by protein kinase C alpha and delta isoforms. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 276, p.29072-29078, 2001.

EVANS, W. C.; SOMANABANDHU, A. Nitrogen-containing non-steroidal secondary metabolites of *Solanum*, *Cyphomandra*, *Lycianthes* and *Margaranthus*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2351-2356, 1980.

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

FENG, J.; ITO, M.; ICHIKAWA, K.; ISAKA, N.; NISHIKAWA, M.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 274, p. 37385-37390, 1999.

FERREIRA, F.; SOULÉ, S.; VASQUEZ, A.; MOYNA, P.; KENNE, L.; Steroid saponins from *Solanum laxum*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1409-1416, 1996.

FURCHGOTT, R. F.; ZADWADKI, J. V. The obligatory role of endothelium cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 286, p. 373-376, 1980.

FUJIHARA, H.; WALKER, L. A.; GONG, M. C.; LEMICHEZ, E.; BOQUET, P.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Inhibition of RhoA translocation and calcium sensitization by in vitro ADP-ribosylation with chimeric toxin DC3B. **Mol. Biol. Cell.**, v. 8, p. 2437-2447, 1997.

FUKAI, T.; MARUMO, A.; KAITOU, K.; KANDA, T.; TERADA, S.; NOMURA, T. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**. v.71. p. 1449–1463. 2002.

GANITKEVITCH, V. Y.; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **Journal of Physiology-London**, v. 435, p. 187-205, 1991.

GARRET, R. H; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular Aspects of Cell Biology**. p. 1156-1179. Philadelphia: Saunders, 1995.

- GERTHOFFER, W. T.; MURPHEY, K. A.; GURNST, S. J. Aequorin luminescence myosin phosphorylation, and active stress in tracheal smooth muscle. **American Journal of Cell. Physiology**, v. 257, p. C1062- C1068, 1989.
- GHARZOULI, K.; HOLZER, P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by flavonoids quecetin, naringenin, apigenin and genistein. **Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 5-14, 2004.
- GODFRAIND, T.; MILLER, R.; WIBO, M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacological Reviews**, v. 38, n. 4, p. 321-416, 1986.
- GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V. Regulation of muscarinic atonic current in myocytes from guinea-pig ileum intracellular Ca^{2+} release: a central role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. **Cell Calcium**. v. 36, p. 367-386, 2004.
- GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. A. Fitoquímica Amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**, v. 34, p. 252, 1978.
- GUPTA, R.; SINGH, M.; SHARMA, A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Pharmacological Research**. v. 48, p. 209 - 215, 2003.
- GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **The Journal of Pharmacy Pharmacology**. v. 46, p. 242 - 251, 1994.
- HARBORNE, J. B. Phytochemical methods. 1^o ed. N. York-USA. Great Britain Ltd. 1976.
- HARBORNE, J. B. The flavonoids (advances in research since 1986). 1^o ed. Chapman and Hall. London- GBR. 1994.
- HARTSHORNE, D. J.; ITO, M.; ERDODI, F. Myosin light chain phosphatase subunit composition, interactions and regulation. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 19, p. 325-341, 1998.
- HIMPENS, B.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. P. Agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. **Pflügers Arch**. v. 417, p. 21-28, 1990.
- HONDA, K; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **Gen. Pharmac.** v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.
- HSU, S. H.; TSAIR R.; LIN, C. N.; YEN, M. H. ; KUO, K. W. Solamargine purified from *Solanum incarium* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I

which may lead to cell apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V. 299, n.1, p. 1-5, 1996.

HUNZIKER, A.T. **The genera of Solanaceae**, A. R.G. Gantner Verlag K. –G., 2001.

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

JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER, L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**. v. 76, p. 67 - 72, 1981.

JIMENEZ, R.; ANDRIAMBELOSON, E.; DUARTE, J.; ANDRIANTSITOHAINA, R., JIMENEZ, J., PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J. Involvement of thromboxane A(2) in the endothelium-dependent contractions induced by myricetin in rat isolated aorta. *British Journal of Pharmacology*, v. 127, n. 7, p. 1539-1544, 1999.

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

KARAKI, H.; SATO, K, OZAKI, H. Different effects of norepinephrine and KCl on the cytosolic Ca^{2+} -tension relationship in vascular smooth muscle of rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.** v. 151, p. 325-328, 1988.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W. ; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of pharmacological sciences**. v. 96, p. 229-245, 2004.

KITAZAWA, T.; ETO, M.; WOODSOME, T. P.; BRAUTIGAN, D. L. Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phospho-protein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. **Journal of Biological Chemistry** v. 275, p. 9897-9900, 2000.

KITAZAWA, Y.; ETO, M.; WOODSOME, T. P.;KHALEQUZZAMAN, M. Phosphorilation of the myosin phosphatase targeting subunit and CPI-17 during Ca^{2+} sensitization in rabbit smooth muscle. **The Journal of Physiology**., v. 546, p. 879-889, 2003.

KO, W. C.; LIU, P. Y.; CHEN, J. L.; LEU, I. J. ; SHI, C. M. Relaxant effects of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. **Planta Médica**, v. 69, n. 12, p. 1086-1090, 2003.

KO, W. C.; KUO, S. W.; SHEU, J. R.; LIN, C. H.; FZENG, S. H.; CHEN, C. M. Relaxant action mechanisms of quercetin 3,3',4',5,7-pentamethyl ether in guinea pig trachea. **New Taipei Journal of Medicine**. v. 2, p. 98-106, 1999.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**. v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KOMORI, S.; ITAKAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol action common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**. v. 277, p. 173 - 180, 1995.

KOTLIKOFF, M. I. Calcium-induced calcium release in smooth muscle: the case for loose coupling. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**. V. 83, p. 171-191, 2003.

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

KUSANO, G.; TAKAHASHI, A.; SUGIYAMA, K.; NOZOE, S. – Antifungal properties of solanum alkaloids. **Chemical Pharmacology Bulletin**. v. 35, n.12, p. 4862-4867, 1987.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LEE, E. H.; MEISNER, G.; KIM, D. H. Effects of quercetin on single Ca^{2+} release channel behavior of skeletal muscle. **Biophysical Journal**, v. 82, n. 3, p. 1266-1277, 2002.

LI, L.; ETO, M.; LEE, M. R.; MORITA, F.; YAZAWA, M.; KITAZAWA, T. Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 508, p. 871-881, 1998.

LI, W., X.; CUI, C. B.; CAI, B.; WANG, H. Y.; YAO, X. S. Flavonoids from *Vitex trifolia* L. inhibit cell cycle progression at G2/M phase and induce apoptosis in mammalian cancer cells. **Journal of Asian Natural Products Research**. v. 7, p. 615 – 626, 2005.

LIAO, P., YONG T. F., LIANG M. C., YUE D. T., SOONG T.W. Splicing for alternative structures of Ca_v1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles. **Cardiovasc Research**. v. 68 p. 197-203, 2005.

LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ASSIS, T. A.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, B. A. Spasmolytic Action of Diploptropin, a Furanoflavan from *Diploptropis ferruginea* Benth., Involves Calcium Blockade in Guinea-Pig Ileum. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen - Mainz**. v.60b, p. 1093 – 1100, 2005.

LUCIUS, C.; ARNER, A.; STEUSLOFF, A.; TROSCHKA, M.; HOFMANN, F.; AKTORIES, K.; PFITZER, G. *Clostridium difficile* toxin B inhibits carbachol-induced force and myosin light chain phosphorylation in guinea pig smooth muscle: role of Rho proteins. **The Journal of Physiology**., v. 506, p. 83-93, 1998.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. the developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93. p. 207-212. 2004.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food chemistry**. v. 61. p. 71-75. 1997.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. **The Journal of Physiology**., v. 351, p. 155-167, 1984.

NASCIMENTO, R. J. B., Estudo de espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE) quimiotaxonomia e ensaios biológicos. 2006. Dissertação de mestrado (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

NEE, M. Solanaceae Systematics the 21ST Century. In: VAN DER BERG, R. G.; BARENDSE, G. W. M.; VAN DER WEERDSEN, C. M. (eds.). **Solanaceae V. Advances in Taxonomy and Utilization**, Nijmegen University Press, p.3-22, 2001.

NEILD, T. O.; KOTE CHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by

norepinephrine, 5-hydroxytryptamine, and potassium. **Circulation Research**, v. 60, n. 5, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T., STANDEN, N. B., WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v 336, p. 3382 -3385, 1988.

NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, n. 55, p. 597–606, 2003

OLIVEIRA, R. C. M.; LIMA, T. J.; RIBEIRO, L. A. A., SILVA, J. L. V.; MONTEIRO, F. S.; ASSIS, T. S.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, B. A. Spasmolytic action of the methanol extract and isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae) leaves in guinea-pig ileum. V.13.03. **Z. naturforsch**, v. 61 c, p. 799-805, 2006a.

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

OLIVEIRA, R. C. M., Efeito antiinflamatório, antinociceptivo e espasmolítico de *Solanum megalonyx* Sendtn. e *Solanum asterophorum* Mart. (SOLANACEAE): UM ESTUDO COMPARATIVO. 2006. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

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

OZAKI, H.; SATO, K.; SAKATA, K.; KARAKI, H. Endothelin dissociates muscle tension from cytosolic Ca^{2+} in vascular smooth muscle of rat carotid artery. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 50, p. 521-524, 1989.

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

PEREZ, R. M.; CERVANTES, H.; ZAVALA, M. A.; SANCHEZ, S. J.; PEREZ, S.; PEREZ, C. Isolation and hypoglycemic activity of 5,7,3'-trihydroxy-3,6,4'-trimethoxyflavone from *Brickellia veronicaefolia*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 25-29, 2000.

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

PFITZER, G.; ARNER, A. Involvement the small GTPases in the regulation of smooth muscle contraction. **Acta Physiologica Scandinavian.**, v. 164, p. 449-456, 1998.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, A.; SZPOGANICZ, B.; DE SOUSA, E.; BRAZ, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v.26, n.4, p.466-469, 2003.

POGGIOLI, R.; BENELLI, A.; ARLETTI, R.; CAVAZZUTI, E.; BERTOLINI, A. K⁺ channel openers delay intestinal transit and have antidiarrheal activity. **European Journal of Pharmacology**. v. 287, p. 207-209, 1995.

RATZ, P. H.; BERG, K. M. ; URBAN, N. H. ; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Physiological Society**. V. 288, p. C769-C783, 2004.

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

REMBOLD, C. M.; MURPHY, R. A. Myoplasmic [Ca²⁺] determines myosin phosphorylation in agonist-stimulated swine arterial smooth muscle. **Circulation Research** v. 63, p. 593-603, 1988.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 67, p. 251–259, 2000.

RIBEIRO, E. A. N. Estudo das ações cardiovasculares da fração aquosa do extrato etanólico do caule de *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult., (SOLANACEAE) em ratos. 2001. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, João Pessoa.

ROJAS, A.; CRUZ, S.; PONCEMONTER, H.; MATA, R. Smooth muscle relaxing compounds from *Dodonaea viscosa*. **Planta Medica**, v. 62, p. 154-159, 1996.

ROTH, A.; SCHAFFNER, W.; HERTEL, C. Phytoestrogen kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) protects PC12 and T47D cells from beta-amyloid-induced toxicity. **Journal of Neuroscience Research**, v. 57, n. 3, p. 399-404, 1999.

SAH, V. P.; SEASHOLTZ, T. M.; SAGI, S. A.; BROWN J. H. The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 459-489, 2000.

SANDERS, K. M. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANTOS, R. F.; SILVA, B. A.; CAVALCANTE, F. A.; CLAUDINO, F. S.; SOUSA, J. P.; MEDEIROS, A. F. D.; ALARCÓN, K. M.; SILVA, T. M. S. Estudo comparativo do efeito espasmolítico entre *Solanum agrarium* Sendtner e *Solanum stipulaceum* Roem & Schult. In: SOUZA, M. F. V. Iniciados. 9 ed. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2003. p. 98-114.

SANTOS, R. F., Ação espasmolítica de retusin, flavonóide isolado de *Solanum paludosum* Moric., e de seu derivado metilado em óleo isolado de cobaia. 2006. Dissertação de mestrado (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

SATO, K.; OZAKI, H.; KARAKI, H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. **Journal of Pharmacology Experimental and Therapy**, v. 246, p. 294-300, 1988.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. **Arzneim. Forsch.**, v. 33., p. 1268-1272, 1983a.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. **Nature**, v. 303., p. 535-537, 1983b.

SEASHOLTZ, T. M.; MAJUMDAR, M.; BROWN, J. H. Rho as mediator of G protein-coupled receptor signaling. **Molecular Pharmacology**, v. 55, p. 949-956, 1999.

SEITZ, S.; WEGENER, J. W.; RUPP, J.; WATANABE, M.; JOST, A.; GERHARD, R.; SHAINBERG, A.; OCHI, R.; NAWRATH, H. Involvement of K⁺ channels in the relaxant effects of YC-1 in vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 382, n. 1, p. 11-18, 1999.

- SHUM, O. L.; CHIU, K. W. Hipotensive action of *Solanum melongena* on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 76-81, 1991.
- SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi-K⁺ channel. **American Journal of Physiology**. v. 277(4), p. C739 - C745, 1999.
- SILVA, J. L. V.; CAVALCANTE, F. A.; CLAUDINO, F. S.; MEDEIROS, M. A. A.; DUARTE, M. C.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A. Monitoração do efeito espasmolítico das fases obtidas do extrato etanólico de *Solanum paludosum* (SOLANACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 10., 2002, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2002. V.13.08.
- SILVA, T. M. S.; BATISTA, M. M.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F. Molluscicidal activity of some Brazilian *Solanum* spp. (Solanaceae) against *Biomphalaria glabrata*. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**. v. 99, n. 4, 2005.
- SILVA, T. M. S.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; AGRA, M. F. Ocorrência de flavonas, flavonóis e seus glicosídeos em espécies do gênero *Solanum* (SOLANACEAE). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517-522, 2003.
- SILVA, J. L. V. **Monitoração da atividade vasorelaxante de extrato, fases e flavonóides obtidos de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE) 2005**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. **Acta Physiologica Scandinavian.**, v. 164, p. 437-448, 1998.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**. v. 83, p. 1325 - 1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of Physiology**. v.522, p. 177-185, 2000.
- STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**. v. 78, p. 931-936, 1994.
- SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K⁺ channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

SWARD, K.; DREJA, K.; SUNSJAR, M.; HELLSTRAND, P.; HARTSHORNE, D. J.; WALSH, M. P. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. **The Journal of physiology**. v.522, p.33-49, 2000.

TALEB-CONTINI, S. H., SALVADOR, M. J.; BALANCO, J. M. F.; ALBUQUERQUE, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsute* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 3, p.; 250-254, 2004.

TOMITA, T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. **Smooth Muscle: An assessment of current knowledge**. p. 127-156, 1981.

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

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO; F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química nova**, vol. 26, n. 3, pág. 301-304, 2003.

UCHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, p. 990-994, 1997.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, SITE Disponível em: ><http://www.ufpe.br/farmacia/historia1.htm>
Acesso em: 14 de julho, 2007.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium – calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 30, n.2, p. 167-208, 1979.

VAN ERK, M. J. ; ROEPMAN, P., VAN DER LENDE, T. R.; STIERUM, R. H., AARTS, J. M. M. J. G.; VAN BLADEREN, P. J.; VAN OMMEN, B. Integrated assessment by multiple gene expression analysis of quercetin bioactivity on anticancer-related mechanisms in colon cancer cells in vitro. **European Journal of Nutrition**. v.44, n.3, p. 143-156. 2005.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**. v. 143, p. 299-330, 1963.

- VELASCO, G.; ARMSTRONG, C. ; MORRICE, N. ; FRAME, S.; COHEN, P. Phosphorilation of the regulatory subunit of smooth muscle protein phosphatase 1M at Thr850 induces its dissociation from myosin. **FEBS Lett.**, v. 527, p. 101-104, 2002.
- VILLAR, I. C.; JIMENEZ, R.; GALISTEO, M.; GARCIA-SAURA, M. F.; ZARZUELO, A.; DUARTE, J. Effects of chronic chrysin treatment in spontaneously hypertensive rats. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 847-850, 2002.
- VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**. v. 20, n. 4, p. 207 - 219, 2000.
- WANG, C. L.; LI, H. Q; MENG, W. D.; QING, F. L. Trifluoromethylation of flavonoids and anti-tumor activity of the trifluoromethylated flavonoid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.15, p. 4456–4458, 2005.
- WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 79-84, 2002.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**. v. 17, p. 289 – 298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances Physiology Education**.v. 27, p.201-206, 2003.
- WEI, B., L., WENG, J. R.; CHIU, P. H.; HUNG, C. F.; WANG, J. P.; LIN, C. N. Antiinflammatory flavonoids from artocarpus heterophyllus and artocarpus communis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**., v.53, p. 3867-3871, 2005.
- WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. Rho/Rho kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. **Journal of Molecular Medicine**., v. 80, p. 629-638, 2002.

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](#)