

**Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Produtos  
Naturais e Sintéticos Bioativos**

**Gleice Rayanne da Silva**

**Atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae) e seu possível mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia**

**João Pessoa-PB  
2020**

**Gleice Rayanne da Silva**

**Atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae) e seu possível mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: **Farmacologia.**

**Orientadora:** Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

**João Pessoa-PB**

**2020**

Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Gleice Rayanne da.

Atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto  
obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides*  
Meisn. (Convolvulaceae) e seu possível mecanismo de  
ação em íleo isolado de cobaia / Gleice Rayanne da  
Silva. - João Pessoa, 2020.

129 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/PPgPNSB.

1. *Evolvulus linarioides*. 2. Atividade espasmolítica.  
3. Canais de cálcio. 4. Mobilização de cálcio. 5. Íleo  
de cobaia. I. Cavalcante, Fabiana de Andrade. II.  
Título.

UFPB/BC

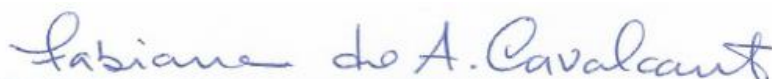
**Gleice Rayanne da Silva**

**Atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae) e seu possível mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: **Farmacologia.**

**Aprovada em 17/02/2020**

**BANCA EXAMINADORA**



**Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante**  
**Orientadora**



**Profa. Dra. Temilce Simões de Assis Cantalice**  
**(Universidade Federal da Paraíba)**  
**Examinadora Externa**



**Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães**  
**(Universidade Federal da Paraíba)**  
**Examinador Interno**

*“Educação não transforma o mundo.  
Educação muda as pessoas.  
Pessoas mudam o mundo”*

*Paulo Freire*

# Dedicatórias

Aos meus pais,  
Mércia Gerlância Alves da Silva e  
Francisco Sueudes Araújo da Silva,  
por todo incentivo e compreensão, por  
não medirem esforços para me  
proporcionar o melhor, por toda  
educação, carinho e amor. A vocês  
todo meu amor e gratidão.

Ao meu irmão,  
Adrian Rodrigo da Silva, por toda  
amizade e companheirismo.

A toda minha família,  
por todo apoio e bons momentos.

# **Agradecimentos**



A Deus, pelo dom da vida, pela saúde e por toda força durante a caminhada. Grata pelas oportunidades e por toda luz, essas, fundamentais para que chegasse até aqui. Que sua misericórdia esteja sempre sobre todos nós!

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiana A. Cavalcante, por todo conhecimento, paciência e sabedoria compartilhadas durante essa jornada. Gratidão pela oportunidade e por todos os momentos, muita força e luz sempre!

À Profa. Dra. Bagnólia A. da Silva, por toda disponibilidade e ajuda na realização desse trabalho, por estar sempre de braços abertos a todos nós. Muito obrigada!

Ao Dr. Vicente Carlos de O. Costa e ao Prof. Dr. Marcelo S. da Silva e sua aluna, Laiane C. O. Pereira, por gentilmente cederem o extrato para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Hemerson I. F. Magalhães e a Profa. Dra. Temilce S. A. Cantalice, professores titulares da banca de defesa de Dissertação; Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras e Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida, suplentes da banca de defesa de Dissertação, por estarem abertos a contribuir na avaliação desse trabalho e por todos os ensinamentos de grande valia nessa etapa.

À mestrande Indyra A. D. Figueiredo, que esteve presente desde o início, obrigada por toda ajuda e parceria. Desejo sucesso e muitas realizações!

Às doutorandas Paula B. Ferreira e Sarah R. D. Ferreira, pela ajuda e amizade, desejo muito sucesso na caminhada!

Aos alunos de iniciação científica Cleyton O. Bezerra, Manoel V. Duvirgens e Thayná M. F. Moura, pessoas que tenho um carinho imenso! Meus companheiros presentes em todas as necessidades. Que toda luz e boas energias os guiem durante a vida. Vocês são pessoas de um coração gigante, obrigada por toda ajuda!

Ao então aluno de iniciação científica Francisco F. Lacerda Júnior e ao doutorando Anderson F. A. Diniz, meus amigos que pude contar em todos os momentos, obrigada por toda ajuda e carinho!

Aos que fizeram parte e aos atuais integrantes da equipe do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Alissa M. O. Martins, Anderson F. A. Diniz, Bárbara C. Barros, Brenna F. O. Claudino, Cleyton O. Bezerra, Eurípedes T. Linhares Neto, Francisco F. Lacerda Júnior, Iana V. S. Oliveira, Iara L. L. Souza, Indyra A. D. Figueiredo, João Pedro Moura, Luís Lucas F. Lima, Manoel V. Duvirgens, Maria Conceição C. Silva, Maria Thaynan L. Carvalho, Paula B. Ferreira,

Petruska P. S. Souza, Rafael L. M. Paiva, Rayane F. Pessoa, Sarah Rebeca D. Ferreira, Thayná M. F. Moura e Thiago L. D. Santos, por toda ajuda, amizade e companheirismo.

A Eurípedes T. Linhares Neto, por toda paciência, companheirismo e carinho durante a jornada. Gratidão por todos os momentos compartilhados, sonhados e realizados.

Aos amigos Welfeberg F. Diniz, Gabriela A. Militão, Jéssica S. Ferreira, Leonardo S. Silva, Nathalia M. X. Diniz, Rayane M. G. Silva, Sabine H. D. Medeiros, Thandy M. Souza, Vitória P. Gama e Yago D. Lisboa, por estarem sempre presentes em todas as conquistas, sempre dispostos a colaborar.

Aos amigos e colegas da minha turma de mestrado 2018.1, em especial Valgricia M. Souza e Marina S. F. Santos, por todos os momentos convividos e etapas ultrapassadas.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na pessoa de seu então coordenador Prof. Dr. Josean F. Tavares e de seu atual coordenador o Prof. Dr. Marcelo S. Silva, e de seu vice-coordenador Prof. Dr. Marcus T. Scotti, por todo esforço destinado ao Programa.

À Caroline L. M. M. Manguiera e Nilmar N. N. Medeiros, secretárias do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, por toda paciência e competência desempenhadas frente ao Programa.

Ao José Crispim Duarte e à Dra. Roberta N. Parentoni, por todo trabalho na condução da Unidade de Produção Animal (UPA) e pela disponibilidade de sempre.

Ao Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pela competência e eficiência na realização do trabalho, sempre disponíveis.

À Mônica R. Silva, pela presença, ajuda e boas energias, sempre trazendo alegria a todos!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por todo apoio financeiro.

À Universidade Federal da Paraíba, por todo conhecimento e formação, pela oportunidade de ter passado pelos melhores professores, e por me dar uma visão bem mais ampla a respeito da vida.

A todos os professores que passaram na minha formação, desde o ensino fundamental até a pós-graduação, reconheço o valor e a imensidão que é o conhecimento, e principalmente que é essa belíssima profissão. Gratidão por tudo! Vocês são maravilhosos e insubstituíveis!

À todas as mulheres que lutaram por nossos direitos e acreditaram no nosso potencial, aquelas que sabem o valor de ser mulher, e que, graças à elas, hoje sou mais uma na ciência.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pelo qual tenho a oportunidade de me tornar mestre, a todos os professores que fazem parte da equipe, assim como todos os funcionários.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal, assim como, na produção dessa Dissertação de Mestrado.

Obrigada!

*Gleice Rayanne da Silva*

**Resumo**

Várias espécies da família Convolvulaceae são utilizadas popularmente para o tratamento de distúrbios do músculo liso, e outras já apresentaram efeito espasmolítico. Entre as espécies dessa família, destaca-se *Evolvulus linarioides* Meisn., uma espécie comumente encontrada nos estados de Bahia, Minas Gerais, Pernambuco e Paraíba. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo investigar a atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas (EL-MeOH<sub>PA</sub>) em aorta e traqueia de rato, útero de rato e íleo de cobaia, além de caracterizar seu mecanismo de ação no órgão que apresentou maior potência relaxante. Todos os procedimentos experimentais funcionais (n = 5) realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (certidão 3059100918). O EL-MeOH<sub>PA</sub> apresentou atividade espasmolítica não seletiva em relação aos órgãos testados, sendo mais potente em traqueia de rato (CE<sub>50</sub> = 139,4 ± 17,4 µg/mL) e íleo de cobaia (CI<sub>50</sub> = 124,8 ± 18,1 µg/mL). Seguindo com o estudo do mecanismo de ação em íleo de cobaia, observou-se que o EL-MeOH<sub>PA</sub> relaxou de maneira equipotente o íleo pré-contraído com 40 mM de KCl (CE<sub>50</sub> = 53,5 ± 5,7 µg/mL) ou com 10<sup>-6</sup> M de carbacol (CE<sub>50</sub> = 49,6 ± 7,2 µg/mL) ou com histamina (CE<sub>50</sub> = 36,0 ± 5,2 µg/mL), sugerindo que o extrato deve inibir o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (Ca<sub>v</sub>). Essa hipótese foi confirmada, uma vez que o extrato inibiu as contrações cumulativas induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>. Além disso, o EL-MeOH<sub>PA</sub> relaxou de maneira equipotente o íleo pré-contraído com S(-)-Bay K8644, um agonista dos Ca<sub>v</sub>1 (CE<sub>50</sub> = 83,2 ± 6,4 µg/mL), em comparação ao efeito observado com KCl, demonstrando que o extrato inibe de forma direta o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos Ca<sub>v</sub>1. Também foram investigadas outras vias de relaxamento, entretanto foi constatado a não participação dos canais de K<sup>+</sup> e das vias adrenérgica, do óxido nítrico e das ciclo-oxigenases no efeito espasmolítico desse extrato em íleo de cobaia. Tendo em vista que os mecanismos de mobilização de Ca<sup>2+</sup> nas células musculares das camadas circular e longitudinal se diferenciam, investigou-se também um possível bloqueio da mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. Para isso, foi utilizada a camada circular do íleo de cobaia, e observou-se que o extrato antagonizou as contrações fásicas induzidas por 10<sup>-5</sup> M de histamina (CE<sub>50</sub> = 53,5 ± 5,7 µg/mL), modulando assim, negativamente, a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. Diante do exposto, foi possível inferir que o EL-MeOH<sub>PA</sub> possui atividade não seletiva nos órgãos testados e que seu mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia envolve bloqueio do influxo de Ca<sup>2+</sup> via Ca<sub>v</sub>1, além de uma modulação negativa dos mecanismos de liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares, resultando na redução da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, promovendo assim o relaxamento muscular.

**Palavras-chave:** *Evolvulus linarioides*; atividade espasmolítica; canais de cálcio; mobilização de cálcio; íleo de cobaia.

# Abstract

Several species of Convolvulaceae are popularly used to treat smooth muscle disorders and others have already shown spasmolytic effect. Among the species of this family, *Evolvulus linarioides* Meisn., stands out, a species commonly found in the states of Bahia, Minas Gerais, Pernambuco and Paraíba. Thus, this study aimed to investigate the spasmolytic activity of the crude methanolic extract obtained from the aerial parts (EL-MeOH<sub>AP</sub>) in rat aorta and trachea, rat uterus and guinea-pig ileum, in addition to characterizing its mechanism of action in the organ it presented greater relaxing power. All functional experimental protocols (n = 5) performed were approved by the UFPB Ethics Committee on the Use of Animals (certificate 3059100918). EL-MeOH<sub>AP</sub> showed non-selective spasmolytic activity in the tested organs, being more potent in rat trachea (EC<sub>50</sub> = 139.4 ± 17.4 µg/mL) and guinea-pig ileum (IC<sub>50</sub> = 124.8 ± 18.1 µg/mL). Following the study of the mechanism of action in guinea-pig ileum, it was observed that EL-MeOH<sub>AP</sub> relaxed the ileum pre-contracted with KCl 40 mM (EC<sub>50</sub> = 53.5 ± 5.7 µg/mL), carbachol 10<sup>-6</sup> M (EC<sub>50</sub> = 49.6 ± 7.2 µg/mL) or histamine 10<sup>-6</sup> M (EC<sub>50</sub> = 36.0 ± 5.2 µg/mL) in an equipotent manner, suggesting that the extract should inhibit the Ca<sup>2+</sup> influx through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels (Ca<sub>v</sub>). This hypothesis was confirmed, since the extract inhibited the cumulative contractions induced by CaCl<sub>2</sub> in depolarizing medium (70 mM KCl) nominally without calcium. In addition, EL-MeOH<sub>AP</sub> relaxed the ileum pre-contracted with S-(-)-Bay K8644, a Ca<sub>v</sub>1 agonist (EC<sub>50</sub> = 83.2 ± 6.4 µg/mL), compared to the effect observed with KCl, demonstrating that the extract directly inhibits the influx of Ca<sup>2+</sup> through Ca<sub>v</sub>1. Other relaxation pathways were also investigated, however it was found that K<sup>+</sup> channels, adrenergic, nitric oxide and cyclooxygenase pathway were not involved in the spasmolytic effect of this extract in guinea-pig ileum. Knowing that the mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilization in muscle cells of the circular and longitudinal layers are different, a possible blockage of Ca<sup>2+</sup> mobilization from intracellular stores was also investigated. Therefore, the circular layer of guinea-pig ileum was used, and it was observed that the extract antagonized the phasic contractions induced by histamine 10<sup>-5</sup> M (EC<sub>50</sub> = 53.5 ± 5.7 µg/mL), thus modulating negatively the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. In view of this, it was possible to infer that EL-MeOH<sub>AP</sub> has non-selective activity in the tested organs and that its mechanism of action in isolated guinea-pig ileum involves blocking the Ca<sup>2+</sup> influx by Ca<sub>v</sub>1, in addition to a negative modulation of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms from intracellular stores, resulting in a reduction in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, thus promoting muscle relaxation.

**Keywords:** *Evolvulus linarioides*; spasmolytic activity; calcium channels; calcium mobilization; guinea-pig ileum.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de distribuição da família Convolvulaceae no mundo, representada pelas áreas coloridas, segundo a ocorrência.....32
- Figura 2** – Mapa de distribuição do gênero *Evolvulus* L., representada pelas áreas coloridas, com gradação de cor segundo a ocorrência .....34
- Figura 3** – Mapa de distribuição do gênero *Evolvulus* L. no Brasil .....35
- Figura 4** – Espécie *Evolvulus linarioides* Meisn.....37
- Figura 5** – Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de  $K^+$ .....40
- Figura 6** – Acoplamento farmacomecânico da contração muscular lisa pelo sistema efector  $G_{q/11}$  - PLC- $\beta_1$  .....42
- Figura 7** – Acoplamento farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pelas vias efectoras do cAMP e do cGMP .....44
- Figura 8** – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em aorta isolada de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.....63
- Figura 9** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em traqueia isolada de rato pré-contraída com  $10^{-5}$  M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....65
- Figura 10** – Registros originais representativos do efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (A), por CCh (B) e por histamina (C) em íleo isolado de cobaia.....71
- Figura 11** – Registros representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl (A) e com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (B). .....75
- Figura 12** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.....77
- Figura 13** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5  $\mu$ M de (S)-(-)-propranolol em íleo isolado de cobaia.....79
- Figura 14** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 1,3  $\mu$ M de ioimbina em íleo isolado de cobaia.....81



**Figura 15** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de  $10^{-4}$  M de L-NAME em íleo isolado de cobaia.....83

**Figura 16** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 10  $\mu$ M de indometacina em íleo isolado de cobaia.....85

**Figura 17** – Registros representativos do efeito inibitório do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-5}$  M de histamina na camada circular do íleo de cobaia.....87

**Figura 18** – Mapa conceitual do mecanismo de ação espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo de cobaia.....102

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito vasorrelaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional em aorta isolada de rato .....64
- Gráfico 2** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-5}$  M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional em traqueia isolada de rato.....66
- Gráfico 3** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) ou por  $10^{-5}$  M de CCh (B) em útero isolado de rata.....67
- Gráfico 4** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M CCh de (A) ou de histamina (B) em íleo isolado de cobaia .....69
- Gráfico 5** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▲), por  $10^{-6}$  M de histamina (Δ) e por  $10^{-6}$  M de CCh (◆) em íleo isolado de cobaia.....72
- Gráfico 6** – Efeito inibitório do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> na ausência (▲) e na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 27 (Δ), 81 (◆) e 243 (◇) µg/mL em íleo isolado de cobaia.....74
- Gráfico 7** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▲) e por  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 (▽) em íleo isolado de cobaia.....76
- Gráfico 8** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (Δ) e na presença (●) de CsCl em íleo isolado de cobaia.....78
- Gráfico 9** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (Δ) e na presença (▼) de (S)-(-)-propranolol em íleo isolado de cobaia.....80
- Gráfico 10** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (Δ) e na presença (◆) de ioimbina em íleo isolado de cobaia.....82
- Gráfico 11** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (Δ) e na presença (■) de L-NAME em íleo isolado de cobaia.....84
- Gráfico 12** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (Δ) e na presença (▲) de indometacina em íleo isolado de cobaia.....86

**Gráfico 13** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na camada circular do íleo isolado de cobaia.....88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de $CE_{50}/CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) do EL-MeOH <sub>PA</sub> em órgãos tônicos e fásicos induzidos por vários agentes contráteis.....	72
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>	Concentração de Ca <sup>2+</sup> citosólico
<b>[K<sup>+</sup>]<sub>e</sub></b>	Concentração extracelular de K <sup>+</sup>
<b>4Ca<sup>2+</sup>-CaM</b>	Complexo 4 íons cálcio-calmodulina
<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AC</b>	Ciclase de adenilil
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>cAMP</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>Cav</b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>Cav1</b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
<b>Cav2</b>	Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 2
<b>CCh</b>	Carbacol
<b>CCS</b>	Centro de Ciências da Saúde
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>cGMP</b>	Monofosfato cíclico de guanosina
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>DAG</b>	Diacylglicerol
<b>e.p.m.</b>	Erro padrão da média
<b>EDHF</b>	Fator de hiperpolarização derivado do endotélio
<b>EL-MeOH<sub>PA</sub></b>	Extrato metanólico bruto das partes aéreas de <i>Evolvulus linarioides</i>
<b>E<sub>max</sub></b>	Efeito máximo
<b>eNOS</b>	Sintase do óxido nítrico endotelial
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>G<sub>αq</sub></b>	Subunidade α da proteína G <sub>q</sub>
<b>G<sub>12/13</sub></b>	Proteína G <sub>12</sub> ou proteína G <sub>13</sub>
<b>sGC</b>	Ciclase de guanilil solúvel

<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina
<b>GMP</b>	Monofosfato de guanosina
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados à proteína G
<b>G<sub>q/11</sub></b>	Proteína G <sub>q</sub> ou proteína G <sub>11</sub>
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>IPeFarm</b>	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trisfosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub> R</b>	Receptor de IP <sub>3</sub>
<b>L-NAME</b>	N-nitro L-arginina metil-ester
<b>M</b>	Concentração molar (mol/L)
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno
<b>MLC</b>	Cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	Cinase da cadeia leve da miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase da cadeia leve da miosina
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NCX</b>	Trocador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Sintase do NO
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PDE</b>	Fosfodiesterase
<b>PGE<sub>1</sub></b>	Prostaglandina E <sub>1</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	Proteína cinase dependente de cAMP
<b>PKC</b>	Proteína cinase dependente de cálcio
<b>PKG</b>	Proteína cinase dependente de cGMP
<b>PLC<sub>β1</sub></b>	Fosfolipase C do tipo β <sub>1</sub>
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase da membrana plasmática
<b>PPgPNSB</b>	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
<b>rMLC</b>	Cadeia leve regulatória da miosina
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RyR</b>	Receptor de rianodina
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo endosarcoplasmático

<b>sGC</b>	Ciclase de guanilil solúvel
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba
<b>UPA</b>	Unidade de produção animal

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

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b>	25
<b>2 Fundamentação teórica</b>	29
2.1 Produtos naturais e os avanços de sua pesquisa no Brasil	30
2.2 A família Convolvulaceae Juss.	32
2.3 O gênero <i>Evolvulus</i> L.	34
2.4 A espécie <i>Evolvulus linarioides</i> Meisn.	36
2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso	38
<b>3 Objetivos</b>	45
3.1 Geral.	46
3.2 Específicos.	46
<b>4 Material e métodos</b>	47
<b>4.1 Material</b>	48
4.1.1 Material botânico.	48
4.1.2 Drogas-teste	48
4.1.3 Animais	48
4.1.4 Substâncias e reagentes.	49
4.1.5 Solução nutritiva	49
4.1.6 Equipamentos	50
<b>4.2 Métodos</b>	51
4.2.1 Preparação da solução-mãe do extrato para os ensaios farmacológicos.	51
4.2.2 Triagem farmacológica preliminar	51
4.2.2.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato	51
4.2.2.2 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato	52



4.2.2.3 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata .....	53
4.2.2.4 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia .....	54
4.2.2.5 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina .....	55
4.2.3 Investigação do mecanismo de ação do EL-MeOH <sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia.....	55
4.2.3.1 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante produzido pelo EL-MeOH <sub>PA</sub> .....	55
4.2.3.1.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> .....	55
4.2.3.1.2 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas pelo S-(-)-Bay K8644 .....	56
4.2.3.2 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH <sub>PA</sub> .....	56
4.2.3.2.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de cério (CsCl) .....	56
4.2.3.3 Avaliação do envolvimento da via adrenérgica no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH <sub>PA</sub> .....	57
4.2.3.3.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol .....	57
4.2.3.3.2 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de ioimbina .....	58
4.2.3.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH <sub>PA</sub> .....	58
4.2.3.4.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de L-NAME .....	58
4.2.3.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH <sub>PA</sub> .....	59
4.2.3.5.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de indometacina .....	59
4.2.3.6 Avaliação do efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre a camada circular do íleo de cobaia .....	59

4.2.3.6.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina na camada circular .....	59
<b>4.3 Análise estatística .....</b>	<b>60</b>
<b>5 Resultados .....</b>	<b>61</b>
5.1 Triagem farmacológica preliminar .....	62
5.1.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato .....	62
5.1.2 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato .....	64
5.1.3 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata .....	66
5.1.4 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por histamina em íleo isolado de cobaia .....	68
5.1.4.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina .....	70
5.2 Investigação do mecanismo de ação do EL-MeOH <sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia .....	73
5.2.1 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações cumulativas induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> .....	73
5.2.2 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas pelo S-(-)-Bay K8644 .....	74
5.2.3 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de cério .....	76
5.2.4 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol .....	78
5.2.5 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de ioimbina .....	80
5.2.6 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de L-NAME .....	82
5.2.7 Efeito relaxante do EL-MeOH <sub>PA</sub> sobre às contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de indometacina .....	84

5.2.8 Efeito do EL-MeOH <sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina na camada circular .....	86
<b>6 Discussão .....</b>	<b>89</b>
<b>7 Conclusões .....</b>	<b>103</b>
<b>Referências .....</b>	<b>105</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>123</b>
<b>Apêndice .....</b>	<b>125</b>

# 1 Introdução

O uso de produtos naturais está diretamente ligado a nossa história, a utilização de plantas na medicina popular para a cura de doenças, além do comércio de especiarias e corantes de origem vegetal têm sido descritos desde os primórdios da humanidade. No Brasil, os indígenas utilizavam seus conhecimentos para se beneficiarem do “poder” das plantas contra doenças endêmicas da época. O estudo mais amplo dos produtos naturais impulsionou o desenvolvimento da química medicinal ao longo dos anos. Com os avanços nesta área, foram aplicadas técnicas e metodologias modernas, como a criação do "Protein Data Bank (PDB)", além das estratégias de modificação molecular no desenho de novos protótipos, que favoreceram a descoberta de novos fármacos (LIMA, 2007; ALMEIDA; MARTINEZ; PINTO, 2017).

Atualmente, o uso de plantas medicinais e produtos fitoterápicos se tornam cada vez maior. É fato que até os dias atuais a realização de novos estudos a respeito das formas, dos usos e da terapêutica dos produtos vegetais, têm sido impulsionados e vem se tornando muito importante. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 85% da população utiliza produtos naturais no que tange a atenção primária a saúde, devido a essa procura ainda há muito o que ser estudado (CUNHA, 2011; ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011; BRASIL, 2012).

Cerca de 25% dos medicamentos presentes no mercado são produzidos direta ou indiretamente a partir de alguma planta (RODRIGUES; AMARAL, 2012). Embora ainda existam dificuldades no desenvolvimento de fármacos provenientes de plantas, essas representam os produtos naturais de maior interesse da indústria farmacêutica. Isso, devido às inúmeras substâncias vegetais biologicamente ativas presentes na sua composição com possíveis atividades farmacológicas que possibilitam o estudo para a descoberta de novos fármacos (WALSH; FISCHBACH, 2010; PALMA; VILAÇA, 2012).

Diversas técnicas têm sido empregadas para auxiliar o isolamento e identificação desses compostos bioativos, como por exemplo, a espectroscopia atrelada a métodos estatísticos e/ou computacionais, que possibilita analisar padrões de produtos naturais com sistemas biológicos (FUNARI et al., 2013; ZAGO, 2018). Além de diversos modelos de testes *in vivo* e *in vitro*, através dos quais consegue-se avaliar o efeito farmacológico desses produtos naturais, como é o caso dos modelos de células, de tecidos, de receptores/enzimas, de biocromatografia e

modelos genômicos (*in vitro*) e da farmacologia sérica e dos modelos animais (*in vivo*) (WANG et al., 2011).

Dessa forma, tanto a química quanto a farmacologia, devem ser empregadas na pesquisa de novas substâncias provenientes de plantas, ampliando e direcionando as buscas para o campo da bioatividade desses produtos naturais (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; FOGLIO et al., 2006). A orientação inicial para a busca de substâncias farmacologicamente ativas é a descrição do seu uso etnofarmacológico, tendo em vista que plantas utilizadas na medicina popular têm mais chances de desempenharem efeitos farmacológicos comprovados do que aquelas escolhidas ao acaso (YUNES, 2001; BESSA et al., 2013). Além disso, existe também a escolha quimiotaxonômica para a seleção de espécies, na qual investiga-se os marcadores que estão presentes num determinado grupo, relacionando-os a atividades farmacológicas descritas (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; LIMA; SANTOS; LA PORTA, 2018).

Inserida nas plantas medicinais popularmente utilizadas na medicina tradicional destaca-se a família Convolvulaceae, que apresenta espécies com diversas atividades farmacológicas descritas na literatura, tais como: antimicrobiana, antidiabética, sedativa, anti-inflamatória, e espasmolítica em diversos músculos lisos como, jejuno de coelho, e traqueia e íleo de cobaia (PONGPRAYOON et al., 1992; PERUSQUIA et al., 1995; KHARE, 2001; PAULA; HAYASHI; FREITAS, 2003; ÉON-RIVERA; HERRERA-RUIZE; ESTRADA-SOTOB, 2011; MEIRA et al., 2012; SHAREEF et al., 2014; MART-NEZ-PÉREZ et al., 2018). Além disso, algumas espécies dessa família vêm sendo utilizadas para tratar distúrbios como esplenomegalia, anemia, tumores, aumento de lipídios, tosse, asma, úlcera gástrica, obesidade, constipação e diarreia (KHARE, 2001; AMBIKA; NAIR, 2019).

Dentre as espécies presentes nessa família, destaca-se *Evolvulus linarioides* Meisn., que apresenta poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos descritos até o momento (QUEIROGA, 2012; PEREIRA, 2016). Assim, tendo em vista que espécies presentes na mesma família já desempenharam ação em músculos lisos e sabendo que substâncias que agem nesses alvos possuem capacidade de se tornarem possíveis fármacos para o tratamento de diversos distúrbios, surge o interesse em se investigar farmacologicamente a espécie *Evolvulus linarioides* (WEBB, 2003; DENTI, 2015).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (EL-MeOH<sub>PA</sub>) em aorta e traqueia de rato, útero de rata e íleo de cobaia, além de investigar o seu possível mecanismo de ação no órgão que apresentou maior potência espasmolítica.

## **2 Fundamentação teórica**



## 2.1 Produtos naturais e os avanços de sua pesquisa no Brasil

Desde os primórdios da humanidade a natureza tem servido como fonte de medicamentos para os seres vivos, sendo muitas drogas desenvolvidas por meio de fontes vegetais (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além desta finalidade, os produtos naturais também colaboraram no desenvolvimento do processo de aprendizado necessário a evolução humana, através dos quais o homem foi capaz de compreender e ultrapassar os desafios impostos a sua sobrevivência (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os primeiros escritos sobre recursos naturais feitos pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este último, descoberto e publicado por Georg Ebers, descreve cerca de 100 doenças e um grande número de drogas de origem animal e vegetal (VILELA, 1977; DREYFUS; CHAPELA, 2007). Diversas civilizações como, por exemplo, a grega, deixaram registros da utilização da natureza como fonte de remédios (VALLE, 1978).

No Brasil, a influência dos recursos naturais faz parte de sua história, estando intimamente ligada ao comércio e disputa de terras durante o período de colonização. Nessa época, a exploração de plantas como o pau-brasil, que produzia uma tintura em seu interior bastante utilizada para tingimentos, despertou grande interesse na Europa, sendo comercializado a um alto valor, o que resultou na movimentação da economia (PINTO, 1995; D'AGOSTINI et al., 2013). No início da década de 90, ocorreram avanços na bioprospecção e nos estudos de atividades farmacológicas de produtos naturais, especialmente de plantas e micro-organismos, o que por sua vez concedeu financiamento para a descoberta de diversas novas substâncias de interesse terapêutico como, por exemplo, a vimblastina e a vincristina, ambos antineoplásicos de origem natural (BUTLER, 2008; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Em decorrência de possuir uma das maiores biodiversidades do mundo, o Brasil dispõe de diversas fontes de origem animal, mineral ou vegetal, para o desenvolvimento de pesquisas científicas na área. Dentre, aproximadamente, 500 mil espécies vegetais existentes no mundo, o Brasil acomoda em torno de 55 mil espécies e estima-se que apenas 15% destas tenham sido estudadas com finalidade medicinal (PRESTES, 2000; CONSERVATION INTERNATIONAL, 2010; NOGUEIRA; CERQUEIRA; SOARES, 2010).

Desde o início do processo de colonização, muitos extratos de plantas já eram produzidos e utilizados no território nacional para o tratamento de doenças locais (ELDIN; DUNFORD, 2001). Com o passar dos anos e com a crescente evolução da tecnologia e das indústrias farmacêuticas, as plantas medicinais passaram por diversos processos até se tornarem um medicamento. Como resultado disso tem-se os fitoterápicos, que são medicamentos produzidos a partir de partes de vegetais ou o próprio vegetal (GIRALDI; HANAZAKI, 2010). Graças a crescente produção científica nessa área, a cada dia mais drogas e extratos vegetais são lançados no mercado e introduzidos na terapêutica com segurança e eficácia comprovadas (BOORHEM; LAGE, 2009). Em decorrência disso, a utilização desses medicamentos tem sido cada vez maior, principalmente devido ao fácil acesso no mercado (SILVA et al., 2017).

O fato de o Brasil possuir uma vasta biodiversidade faz com que cada vez mais pesquisadores sejam atraídos com interesse de desenvolver novos estudos na área de produtos naturais (BERLINCK, 2012). A pesquisa nessa área não apenas permite elucidar novos compostos, como também indica estruturas moleculares com possibilidade de serem utilizadas como modelos para novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016; BERLINCK et al., 2017). Acredita-se que cerca de 80% dos quase 160.000 compostos cadastrados no *Dictionary of Natural Products* possuem características favoráveis para serem considerados como potenciais modelos de fármacos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Dessa forma, torna-se importante o conhecimento a respeito da condução de abordagens e análises em purificações, caracterização, determinação estrutural, dinâmica química e metabólica inter-relacionais, bem como, características diversificadas de uso e funções baseados na farmacologia (CONCHA; LONG, 2003; PUCHEAULT, 2008; KWAN; SCHMIDT, 2013). Os detalhes mais refinados nos ambientes ecológicos dos recursos naturais influenciam na produção dos compostos bioativos e suas variações no *design* e na diversificação (ATANASOV et al., 2015).

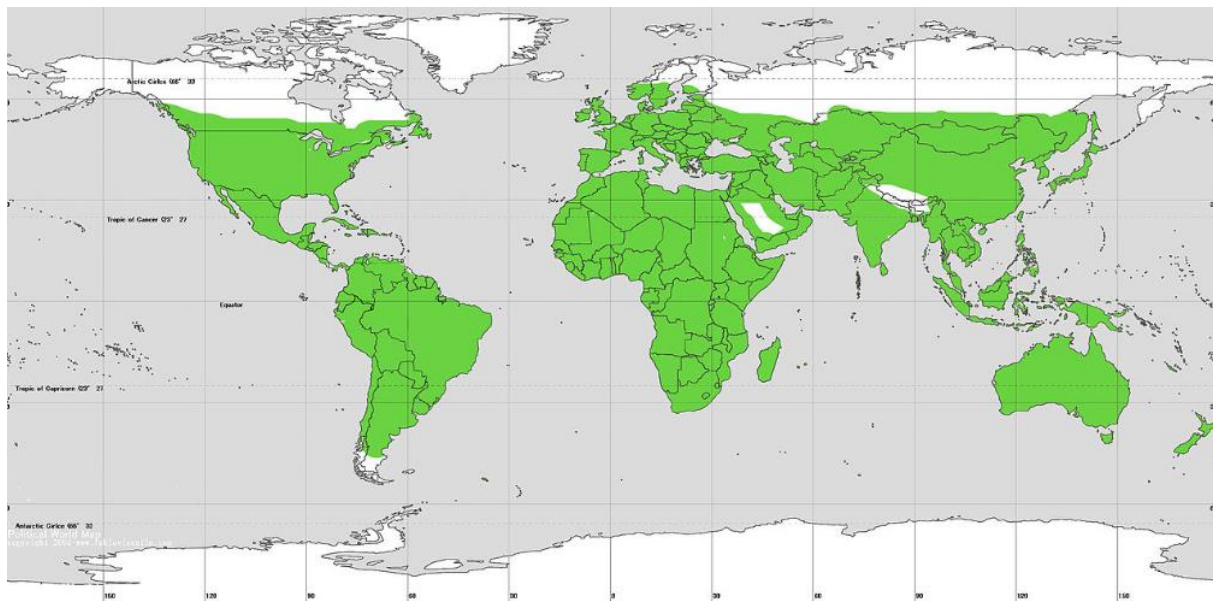
Com o desenvolvimento da inovação tecnológica, surgiram diversos modelos nos quais é possível avaliar o efeito farmacológico desses produtos naturais, como é o caso dos modelos animais e de farmacologia sérica, ambos *in vivo*. De forma *in vitro* temos os modelos de células, de tecidos, de receptores/enzimas, de biocromatografia e modelos genômicos. A escolha do modelo mais adequado se dá, principalmente, através do conhecimento do produto a ser testado (WANG et al.,

2011). Em virtude disso, é de suma importância o avanço e aperfeiçoamento de pesquisas com diferentes espécies buscando substâncias com capacidade farmacológica de se tornarem novos medicamentos.

## 2.2 A família Convolvulaceae Juss.

A família Convolvulaceae é composta por cerca de 55 gêneros e 1650 espécies, distribuídas em regiões tropicais e temperadas de todo o mundo (Figura 1). No Brasil, ocorrem, em média, 20 gêneros e 400 espécies, sendo *Ipamoema* L., *Jacquemontia* Choisy e *Evolvulus* L. predominantes. Dados sugerem que essa família surgiu na América do Norte e hoje está presente em uma ampla gama de habitats. Atualmente, representa um grupo monofilético, composto por duas subfamílias: Convolvuloideae e Humbertioideae. A grande maioria de seus membros são ervas perenes, trepadeiras ou cipós lenhosos, poucas vezes ervas, arbustos ou árvores que são endêmicas das regiões tropicais (APG III, 2009; SULTANA; RAHMAN, 2016; BFG, 2018; SRIVASTAVA; MEHROTRA; DILCHER, 2018).

**Figura 1** – Mapa de distribuição da família Convolvulaceae no mundo, representada pelas áreas coloridas, segundo a ocorrência.



Fonte: adaptado de wikiwand.com, acesso em 05 de novembro de 2019.

Um aspecto de destaque nessa família é a presença de células secretoras de resinas glicosídicas em tecidos foliares, e principalmente nas raízes, tais substâncias apresentam propriedades purgantes que são características de espécies pertencentes a essa família (ARGAÉZ; PÉREZ-AMADOR, 1997; PEREDA-MIRANDA; TAKETA; VILLATORO-VERA, 2003). Além disso, diversos metabólitos também são encontrados, tais como: alcaloides (SCHIMMING et al., 2005), amidas (TOFERN et al., 1999), antocianidinas (GODA et al., 1997; PALE et al., 1998; TERAHARA et al., 2000; MORI et al., 2006), cianidinas (SAITO et al., 1995), cumarinas (GUPTA et al., 2007; CERVENKA et al., 2008; KUMAR et al., 2010), flavonoides (MANN et al., 1999; GUPTA et al., 2007; KUMAR et al., 2010), esteroides (AKHTAR et al., 2009), terpenoides (KUMAR et al., 2010) e lignanas (PÁSKA et al., 1999; TOFERN et al., 2000). Inseridas nos alcaloides destacam-se as calisteginas, que são consideradas marcadores para a família (SCHIMMING et al., 1998; SCHIMMING et al., 2005).

Alguns dos gêneros possuem o número de espécies aproximadamente relatadas, como é o caso do *Ipomoea* (500, “glória-da-manhã”), *Convolvulo* (250, “erva-cega”), *Jacquemontia* (120), *Evolvulus* (100) e *Calystegia* (25). A família tem sido utilizada como importante fonte de alimento, dentre as espécies com essa finalidade, destaca-se a *Ipomoea batatas* (“batata-doce”), comumente consumida no Brasil, uma raiz rica em açúcar e amido, que além de ser utilizada para alimentação também serve de matéria-prima para a produção de álcool industrial, pectina, amido e xarope de açúcar, e a *Ipomoea aquatica* (“Nari-ka-Sag”), das quais folhas e brotos são usados como vegetais (SULTANA; RAHMAN, 2016).

Além do uso com finalidade alimentícia, algumas plantas dessa família possuem valor medicinal, como as espécies: *Evolvulus alsinoides*, *Exogonio purga* e *Ipomoea violacea* e *Ipomoea batatas* (MEIRA et al., 2012; SULTANA; RAHMAN, 2016).

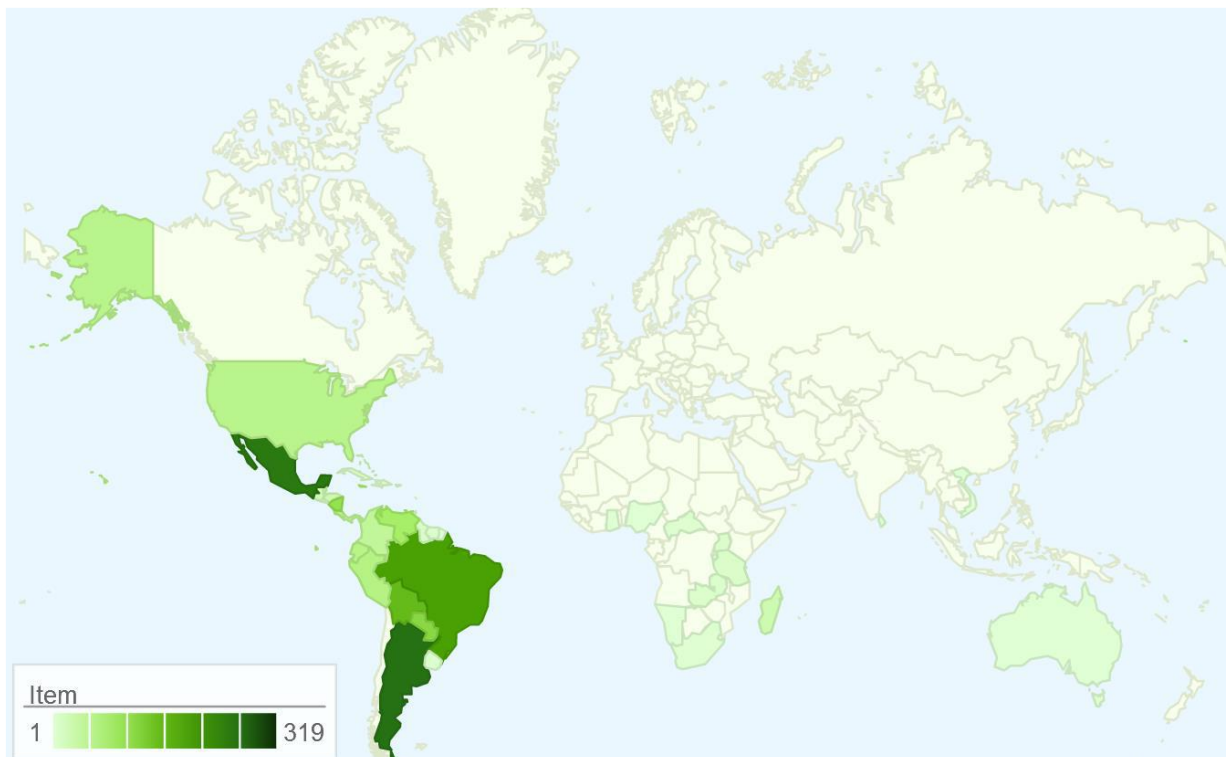
Várias atividades farmacológicas para espécies da família Convolvulaceae já foram relatadas na literatura, tais como antidiabética, cicatrizante e espasmolítica de *Evolvulus alsinoides*, anti-inflamatória de *Evolvulus nummularius*, purgativa e antimicrobiana da *Ipomoea carnea*, e espasmolítica de *Argyreia speciosa* (GALANI; PATEL; PATEL, 2010), *Operculina turpethum* (SHAREEF et al., 2014), *Ipomoea imperati* (PAULA; HAYASHI; FREITAS, 2003), *Ipomoea cairica* e *Ipomoea stans* (PERUSQUIA et al., 1995; MEIRA et al., 2012) e *Ipomoea pes-caprae*

(PONGPRAYOON et al., 1992; MART-NEZ-PÉREZ et al., 2018). Além disso, espécies dessa família são usadas para tratar distúrbios como esplenomegalia, anemia, tumores, hiperlipidemia, tosse, asma, úlcera gástrica, obesidade, constipação e diarreia (KHARE, 2001; DHANALEKSHMI et al., 2010; PAVITHRA; SREEVIDYA; RAMA, 2009; ÉON-RIVERA; HERRERA-RUIZE; ESTRADA-SOTOB, 2011; DURAISAMY et al., 2013; VELLINGIRI; PERMAIAH, 2017; AMBIKA; NAIR, 2019).

### 2.3 O gênero *Evolvulus* L.

O gênero *Evolvulus*, pertencente à família Convolvulaceae, apresenta 97 espécies distribuídas, predominantemente, no continente americano, sendo, apenas duas dessas com distribuição cosmopolita, *E. alsinoides* e *E. nummularius* (Figura 2) (OOSTSTROOM, 1934).

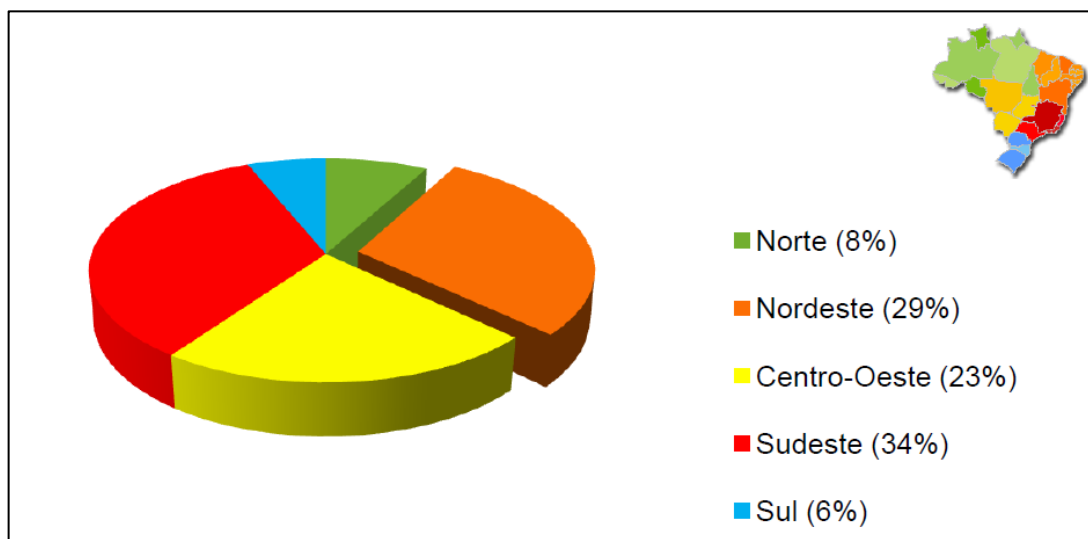
**Figura 2** – Mapa de distribuição do gênero *Evolvulus* L., representada pelas áreas coloridas, com gradação de cor segundo a ocorrência.



Fonte: adaptado de trópicos.org, acesso em 07 de novembro de 2019.

No Brasil, é possível encontrar aproximadamente 70 espécies (Figura 3), mais comumente nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Destaca-se a grande incidência dessas nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, tendo sido listados 46 espécies de *Evolvulus* dentre os 160 taxons da família Convolvulaceae da região (SIMÃO-BIANCHINI; FERREIRA, 2016).

**Figura 3** – Mapa de distribuição do gênero *Evolvulus* L. no Brasil.



Fonte: adaptado de BIANCHINI; FERREIRA, 2012.

Em relação às características morfológicas, *Evolvulus* é delimitado em sete seções, são elas: *Linoidei* Meisn., *Paniculati* Peter., *Passerinoidei* Meisn., *Involucrati* Ooststr., *Lagopodini* Meisn., *Alsinoidei* Meisn. e *Phyllostachyi* Meisn (OOSTSTROOM, 1934).

A nomenclatura do gênero é uma palavra originada do latim “evolvo”, que significa “aquele que não se enrola”. Referindo-se a ausência de plantas volúveis no gênero. Sua morfologia é semelhante às dos gêneros *Convolvulus* L. e *Jacquemontia* Choisy e se distingue apenas por possuir um estilete com dois estigmas ovais e elipsoidais (JUNQUEIRA; SIMÃO-BIANCHINI, 2006; SILVA, 2008).

As plantas desse gênero são ervas ou subarbustos, eretos ou prostrados, de pequeno porte; apresentam folhas inteiras, ovais ou lineares, sésseis ou pecioladas; inflorescências axilares, solitárias ou em dicásio; flores com corola pequena, infundibuliforme ou salverforme, azuis, brancas ou branco-azuladas; cálice com 5 sépalas, iguais a desiguais; fruto do tipo cápsula, globosa ou ovoide com 1-4 sementes, glabras ou pubescentes (AUSTIN; CAVALCANTI, 1982).

No que se refere à composição química desse gênero, existe uma grande variedade de metabólitos secundários, já havendo sido relatado o isolamento de antocianinas (TOKI et al., 1994), alcaloides (GOYAL; SINGH, 2005), flavonoides glicosilados, triterpenos, cumarinas (KUMAR et al., 2010) e cromonas (AKHTAR et al., 2009).

Alguns usos etnofarmacológicos para espécies do gênero *Evolvulus* já foram descritos na literatura, tais como: a utilização da espécie *Evolvulus nummularius* como cicatrizante para casos de queimadura, cortes e feridas (JAIN, 1991; PAVITHRA; SREEVIDYA; VERMA, 2009); *Evolvulus arbuscula* para dores nas articulações e músculos (GONZÁLEZ et al., 2013); *Evolvulus alsinoides* no tratamento de febre, perda de memória, sífilis, bronquite crônica, asma, disenteria e diarreia (SINGH, 2008; INDHUMOL et al., 2013; PEREIRA, 2016).

Estudos realizados reportaram atividades farmacológicas comprovadas para espécies do gênero *Evolvulus*, como, cicatrizante (MAHIBALAN et al., 2016), antimicrobiana (DHANALEKSHMI et al., 2010), anti-helmíntica (KUMAR et al., 2010), antioxidante (GOMATHI et al., 2013), anti-inflamatória, antipirética e antidiarreica (LEKSHMI; REDDY, 2011). Além dessas, também foi relatada atividade espasmolítica para *Evolvulus alsinoides* (KHAN et al., 2019).

#### **2.4 A espécie *Evolvulus linarioides* Meisn.**

*Evolvulus linarioides* apresenta-se como um subarbusto ereto, de ramos seríceos, folhas membranáceas, lineares a estreito elípticas, com ápice agudo, margem plana, base oblíqua, concolores, faces adaxial rugosa e glabrescente (Figura 4). É comumente encontrada no Paraguai e no Brasil, onde se distribui pelos estados de Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, e Paraíba (JUNQUEIRA; SIMÃO-BIANCHINI, 2006; PEREIRA, 2016).



**Figura 4** – Espécie *Evolvulus linarioides* Meisn.



Fonte: Josean Fechine Tavares, 2009.

Poucos estudos fitoquímicos foram desenvolvidos com essa espécie, entre eles o isolamento de dois sesquiterpenos denominados linariofileno e evolfileno, além de outras substâncias como o polifenol ferulato de alquila, os esteroides estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, e de duas cromonas a cnidimol C e cnidimol C glicosilado (QUEIROGA, 2012; PEREIRA, 2016).

De maneira similar, ainda não há estudos a respeito de atividades farmacológicas desenvolvidas por essa espécie. Porém, estudos demonstraram que alguns constituintes fitoquímicos semelhantes ao encontrados na espécie *Evolvulus linarioides* são capazes de atenuar a motilidade do músculo liso, tais como, terpenoides, polifenois, cumarinas e esteroides, em especial estigmasterol (HAMMAD; ABDALLA, 1997; HAYASHI; SEKINE; DEGUCHI, 2002; GHANADIAN et al., 2014; EMRAN et al., 2015).

Estudos publicados por Mint *et al.* (2016) em traqueia isolada de cobaia, com os constituintes das folhas das plantas *Ageratum conyzoides* L., *Aegle marmelos* Correa., *Clerodendrum indicum* (L.) Kuntze e *Mimosa pudica* L., já conhecidas por seu uso etnofarmacológico anti-asmático, revelou que o composto isolado estigmasterol, também presente no EL-MeOH<sub>PA</sub>, exibiu atividade espasmolítica no órgão testado.

Diante disso, é de extrema importância uma investigação farmacológica da espécie *Evolvulus linarioides*, sabendo que diversas espécies pertencentes ao gênero *Evolvulus* e à família Convolvulaceae já foram relatadas na literatura por



produzirem efeito relaxante em músculos lisos (KAZEM; ANVARI; BADVI, 2007; LEKSHMI; REDDY, 2011; KHAN et al., 2019).

## 2.5 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

O músculo liso encontra-se presente nas paredes dos tratos digestivo, respiratório, circulatório, nos ductos urinários e genitais e na pele. Esse músculo é constituído por células em formato fusiforme, com um núcleo central, que estão incorporadas em uma matriz extracelular composta por fibras de colágeno. As fibras musculares lisas arranjam-se de modo que a parte mais espessa de uma está justaposta às extremidades delgadas de fibras adjacentes. Dessa forma, em cortes transversais, é possível observar contornos que variam de arredondados até triangulares ou poligonais (WEBB, 2003; GUIMARÃES; ADELL; FELÍCIO, 2019).

A contração das células musculares lisas está entre os processos de grande importância para todo o organismo. Este é regulado principalmente pelos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, seja pela liberação de íons cálcio de reservatórios intracelulares ou pela sua entrada através dos canais de cálcio na membrana plasmática (SANDERS, 2001; THORNELOE; NELSON, 2005; CATTEERAL, 2011; PERRINO, 2016). Para o início de uma resposta contrátil o músculo liso necessita dos estímulos que levam a dois tipos de acoplamento: o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico (REMBOLD, 1996).

O acoplamento eletromecânico (Figura 5) produz uma resposta contrátil por meio do processo de despolarização de membrana ligada a elevação da concentração extracelular de potássio ( $[\text{K}^+]_e$ ) ou ainda a ligação de bloqueadores dos canais de  $\text{K}^+$  (REMBOLD, 1996).

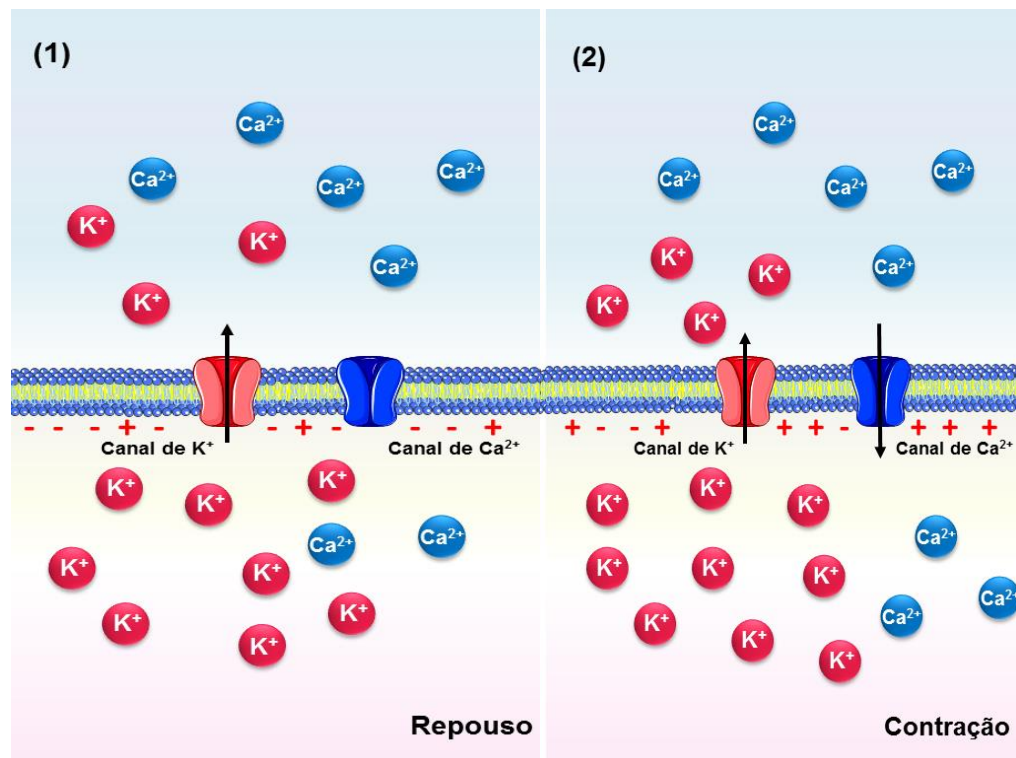
Dois tipos de canais participam desse processo: os  $\text{Cav}$  e os canais de  $\text{K}^+$ . Os  $\text{Cav}$  são complexos proteicos formados por 5 subunidades distintas, sendo elas: a subunidade  $\alpha_1$ , formadora do poro do canal e onde fica localizado o sensor de voltagem que determina sua abertura; um dímero formado pelas subunidades  $\alpha_2$  e  $\delta$ ; a subunidade  $\beta$  localizada no meio intracelular, e a subunidade  $\gamma$  transmembranar (CATTERALL, 2011). São conhecidas três famílias dos  $\text{Cav}$ :  $\text{Cav}1$  (1.1-1.4),  $\text{Cav}2$  (2.1-2.3) e  $\text{Cav}3$  (3.1-3.3). De acordo com essa nomenclatura, a família  $\text{Cav}1$  é constituída por canais sensíveis a di-hidropiridina ativados em alta tensão (tipo L). Os canais da família  $\text{Cav}2$  são insensíveis a di-hidropiridina e ativados em alta

tensão. E a família Cav3 inclui canais que são ativados a baixa tensão (tipo T) (ERTEL et al., 2000; CATTERAL et al., 2019).

No músculo liso, o canal presente é o Cav1.2. Esses canais permeiam o influxo rápido e altamente seletivo de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células e são necessários para diversas funções em células excitáveis, como o acoplamento excitação-contração. Para identificar quais canais de cálcio estão envolvidos em determinados processos, emprega-se drogas seletivas como bloqueadores; isto é particularmente importante nos estudos de potenciais tratamentos (BANNISTER; BEAM, 2013; TANG et al., 2013; ZAMPONI et al., 2015).

Já os canais de  $\text{K}^+$  são subdivididos em quatro classes, sendo eles: canais para potássio retificadores de entrada ( $\text{K}_{\text{IR}}$ ), canais de potássio de dois poros ( $\text{K}_{2\text{P}}$ ), canais de potássio ativados por cálcio ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) e canais de potássio dependentes de voltagem (HILLE, 2001). Os canais de potássio expressos no músculo liso são normalmente ativados durante a fase de repouso de potencial de membrana (Figura 5). O aumento do efluxo de potássio leva a hiperpolarização e consequente fechamento dos Cav, diminuindo a concentração de cálcio citosólica, levando ao relaxamento da musculatura lisa. (VOGALIS, 2000; BASHIR; MEMON; GILANI, 2011; KHAN et al., 2011; SHAH et al., 2011). Substâncias que promovem a abertura de canais de  $\text{K}^+$  podem representar moléculas com ampla gama de potenciais terapêuticos para o tratamento de diversos distúrbios como a asma, hipertensão, incontinência urinária e espasmos gastrintestinais (EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995; MANNHOLD, 2004).

**Figura 5** – Acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de  $K^+$ .



(1) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons  $K^+$  através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (2) um aumento na  $[K^+]_e$  diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos  $Ca_v$  que leva ao influxo de  $Ca^{2+}$  com consequente contração.

Fonte: Autor, 2020.

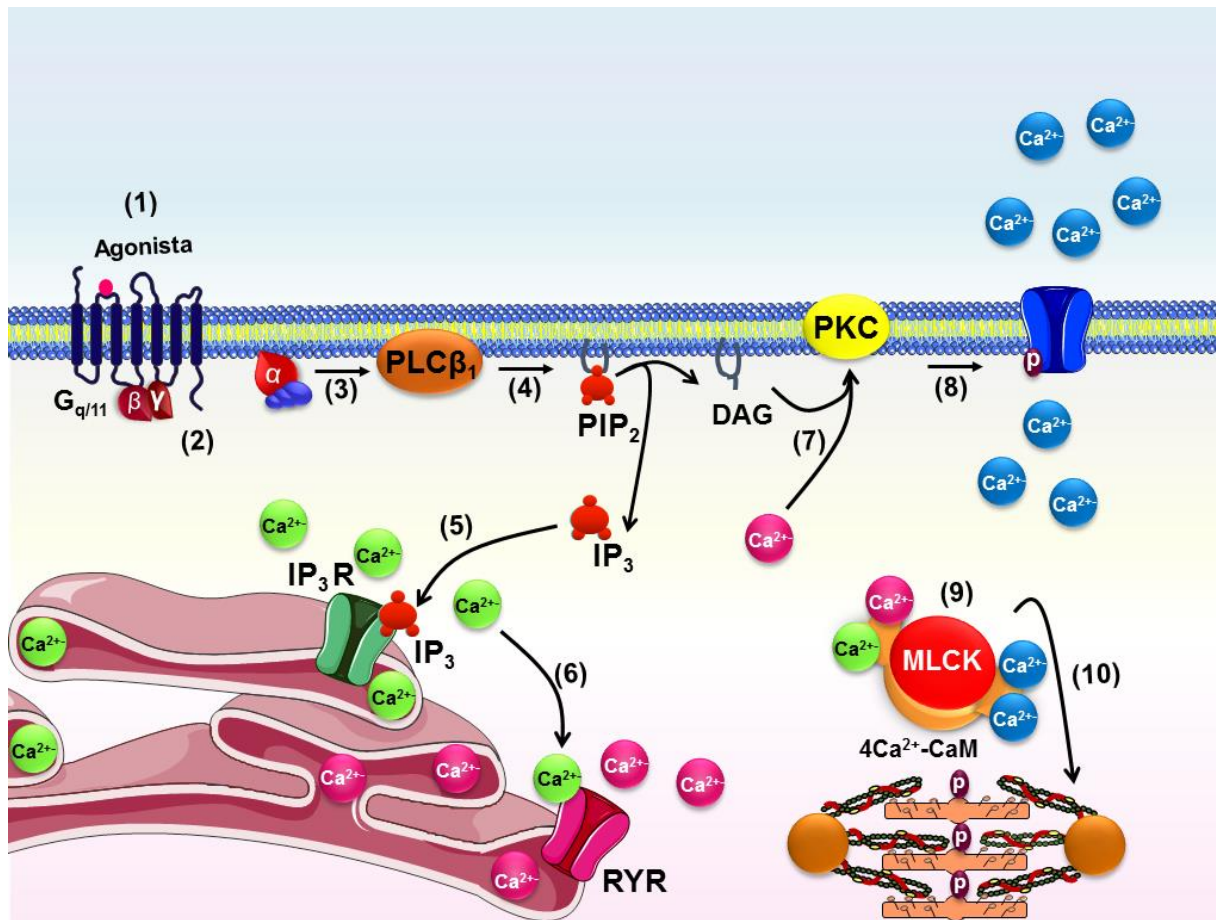
No acoplamento farmacomecânico da contração (Figura 6), tem-se a ligação de agonistas como a acetilcolina, noradrenalina, histamina e ocitocina a seus respectivos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativação da cascata do inositol, por meio das proteínas  $G_{q/11}$ , para levar ao processo de contração. Através da ação da fosfolipase C  $\beta_1$  (PLC $\beta_1$ ) ocorre a hidrólise de fosfolípidios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>), gerando o 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG) (BILLINGTON; PENN, 2003; BERRIDGE, 2008; AQUINO-MIRANDA; ARIAS-MONTAÑO, 2012). O IP<sub>3</sub> age se ligando e ativando os receptores de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) presentes no retículo sarcoplasmático, induzindo, assim, a liberação de  $Ca^{2+}$ . O  $Ca^{2+}$  transloca a proteína

cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) para a membrana onde, juntamente com o DAG, ocorre a sua ativação. Isso ocasiona em uma elevação na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  mediante a ativação direta dos Cav localizados na membrana plasmática (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  leva a ligação de quatro íons cálcio a calmodulina, formando um complexo que fosforila ativando a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez, fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), levando a interação actina/miosina e a contração muscular lisa (CHACKO; CONTI; ADELSTEIN, 1977; KAMM; STULL, 1985; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A finalização do estímulo contrátil resulta em uma diminuição de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , reduzindo, então, a atividade da MLCK. Consequentemente, a MLC sofre desfosforilação pela ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SHIRAZI; IIZUKA; FADDEN, 1994; HARTSHORNE; ITO; ERDÖD, 2004).

Como o aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  promove o processo de contração muscular, a redução dos níveis citosólicos desse íon resulta no relaxamento. Isso pode ocorrer através do mecanismo eletromecânico, mediante uma repolarização ou hiperpolarização da membrana, ou até mesmo pelo mecanismo farmacomecânico, quando se tem uma ativação de receptores de membrana que inibem as vias bioquímicas envolvidas no processo de contração muscular (WOODRUM; BROPHY, 2001).

No acoplamento eletromecânico do relaxamento, tem-se a abertura de canais de  $\text{K}^+$ , que resulta na condução desses íons através da membrana plasmática a favor de seu gradiente eletroquímico, proporcionando uma regulação do potencial de repouso da membrana e da excitabilidade celular. Substâncias que agem levando a abertura de canais de  $\text{K}^+$  promovem uma hiperpolarização da membrana das células musculares lisas por aumentarem o efluxo de  $\text{K}^+$  da célula (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

**Figura 6** – Acoplamento farmacomecânico da contração muscular lisa pelo sistema efetor  $G_{q/11}$  -  $PLC-\beta_1$ .



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) levando a troca do GDP por GTP na subunidade  $\alpha$  das proteínas  $G_{q/11}$  (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima  $PLC-\beta_1$ ; (4) a  $PLC-\beta_1$  cliva o fosfolípido de membrana  $PIP_2$  em  $IP_3$  e DAG; (5) o  $IP_3$  migra pelo citosol e ativa o  $IP_3R$  presente no RS, liberando o  $Ca^{2+}$  do estoque; (6) o  $Ca^{2+}$  liberado ativa o  $RyR$ , fazendo com que mais  $Ca^{2+}$  seja liberado para o citoplasma; (7) o  $Ca^{2+}$ , junto com o DAG ativam a PKC; (8) a PKC ativada fosforila os  $Ca_V$  promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$ ; (9) o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  aumenta a afinidade do  $Ca^{2+}$  pela CaM formando o complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM e ativando a MLCK; (10) a MLCK ativada fosforila a MLC que promove a interação dos filamentos de actina com miosina, desencadeando a contração do músculo liso.

Fonte: Autor, 2020.

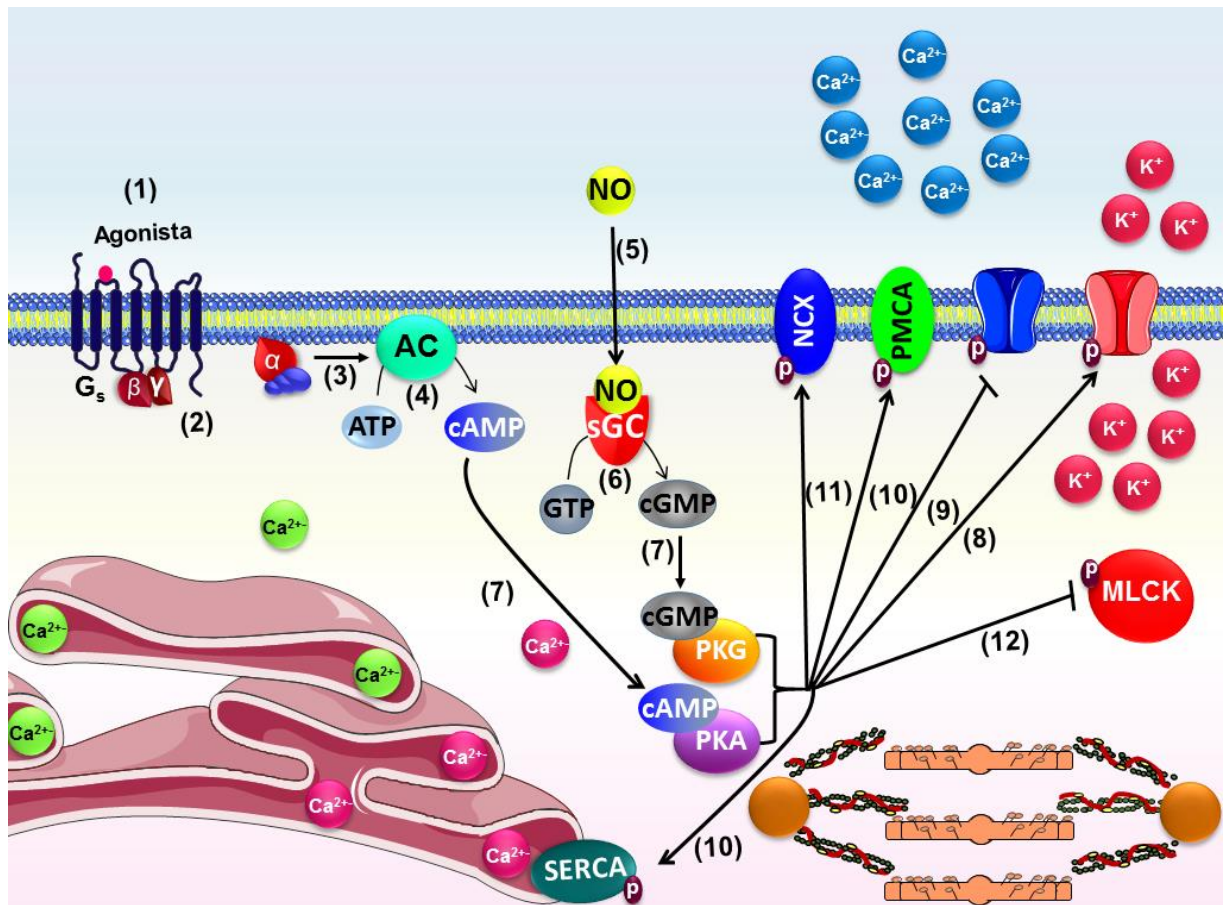
O acoplamento farmacomecânico leva ao relaxamento do músculo (Figura 6) por meio de uma fosforilação, através da proteína cinase dependente de  $cAMP$  (PKA), de uma série de substratos, gerando: a ativação das bombas de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA) e da membrana plasmática (PMCA), reduzindo, assim, a  $[Ca^{2+}]_c$ ; inativação do receptor de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ), diminuindo a liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, e consequente diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$ ; inativação do

trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), reduzindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol; inibição da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), diminuindo sua afinidade pelo complexo  $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ , gerando uma diminuição no processo contrátil; inibição direta dos  $\text{Cav}$ , diminuindo o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  levando a uma redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ; ativação de canais de  $\text{K}^+$  que promovem uma hiperpolarização da membrana plasmática e consequente bloqueio dos  $\text{Cav}$ . Tudo isso culmina no processo de relaxamento da musculatura lisa (WOODRUM; BROPHY, 2001; DUTTA et al., 2002; DANILA; HAMILTON, 2004).

Outro neurotransmissor importante responsável por numerosos processos fisiológicos no nosso organismo é o óxido nítrico (NO), formado em diferentes tipos celulares como células endoteliais vasculares, plaquetas e células epiteliais. No músculo liso (Figura 7), ele age modulando a motilidade através de sua ligação ao receptor de guanilil ciclase solúvel ( $s\text{GC}$ ) no citosol, que hidrolisa e cicliga o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina ( $c\text{GMP}$ ), o aumento da  $[c\text{GMP}]_c$  leva a ativação de uma proteína quinase dependente de monofosfato cíclico de guanosina (PKG), que ativa, irá fosforilar ativando os canais de  $\text{K}^+$ , a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática (PMCA), o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e a bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA), e inativando o  $\text{Cav}$ ,  $\text{IP}_3\text{R}$  e a MLCK, levando ao processo de relaxamento do músculo liso (SCHIMMER; MAUTHNER, 1996; DIDION; HEISTAD; FARACI, 2001; VALENTÃO et al., 2003; GHARIB et al., 2011).

Tendo em vista que substâncias que atuem inibindo o processo de contração do músculo liso podem ser utilizadas no tratamento de diversos distúrbios e que alguns estudos já demonstraram ações farmacológicas promissoras de produtos naturais nessa musculatura (BAKER et al., 2007; BUTLER, 2008). Faz-se necessário o estudo de novas substâncias de origem natural, acreditando que podem ser desenvolvidas novas alternativas terapêuticas mais potentes e com baixo custo.

**Figura 7** – Acoplamento farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pelas vias efectoras do  $c$ AMP e do  $c$ GMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína  $G_s$  troca GDP por GTP na sua subunidade  $\alpha$  (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade  $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em  $c$ AMP; (5) o NO formado estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em  $c$ GMP; (7) os nucleotídeos cíclicos,  $c$ AMP e  $c$ GMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de  $K^+$ ; (9) inibem os  $Ca_v$ ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os  $IP_3R$ . Todos esses mecanismos diminuem a  $[Ca^{2+}]_i$ ; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo  $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor, 2020.

## **3 Objetivos**



### 3.1 Geral

Investigar uma possível atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (EL-MeOH<sub>PA</sub>) em músculos lisos fásicos e tônicos.

### 3.2 Específicos

Realizar uma triagem preliminar farmacológica e comparar uma possível atividade espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> em:

- Aorta de rato
- Traqueia de rato
- Útero de rata
- Íleo de cobaia

Avaliar o mecanismo de ação do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia, quanto ao envolvimento de:

- Canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem;
- Canais de K<sup>+</sup>;
- Via adrenérgica;
- Via do óxido nítrico;
- Via da ciclo-oxigenase;
- Mobilização de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares.

## **4 Material e métodos**

## 4.1. Material

### 4.1.1 Material botânico

As partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. foram coletadas em 19 de junho de 2009, no município de Matureia, no Estado da Paraíba. A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata desta espécie encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (UFPB), sob o código AGRA et al. 6970.

### 4.1.2 Droga-teste

Para o desenvolvimento desta pesquisa foi utilizado o extrato metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (EL-MeOH<sub>PA</sub>), que foram gentilmente cedidos pela equipe do Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### 4.1.3 Animais

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratas e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente oito semanas de idade, pesando entre 150-250 g e 200-300 g, respectivamente, como também, cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g, todos provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da UFPB.

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

princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão 3059100918) da UFPB (Anexo 1).

#### 4.1.4 Substâncias e reagentes

O ácido clorídrico (HCl), o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), o cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), o cloreto de magnésio di-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), o cloreto de potássio (KCl), o cloreto de sódio (NaCl), o fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), o fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), a glicose, o hidróxido de sódio (NaOH) e o sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foram obtidos da Êxodo científica (Brasil).

O ácido araquidônico (AA), o cloridrato de acetilcolina (ACh), cloridrato de carbamilcolina (CCh), o cloreto de cério ( $\text{CsCl}$ ), o cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN), o cloridrato de  $N_\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), o Cremophor<sup>®</sup>, o dietilestilbestrol, o diidrocloridrato de histamina, a indometacina, a ioimbina e o S(-)-Bay K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-trifluorometil]fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster), foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). O cloridrato de cetamina 10% e o cloridrato de xilazina 2% foram obtidos da Syntec. A ocitocina foi advinda da Eurofarma (Brasil). O (S)-(-)-propranolol foi adquirido da Cayman Chemical Company (EUA).

Essas substâncias utilizadas nos experimentos, exceto o Cremophor<sup>®</sup>, foram mantidas sob refrigeração (-20 °C). Todas foram dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o AA, S(-)-Bay K8644, dietilestilbestrol, (S)-(-)-propranolol e a indometacina que foram dissolvidos em etanol absoluto (96 °GL) para obtenção de cada solução-estoque, as quais foram diluídas em água para obtenção de concentrações apropriadas para cada protocolo experimental.

A mistura carbogênica (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) foi adquirida da White Martins (Brasil).

#### 4.1.5 Solução nutritiva

De acordo com os experimentos realizados foram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH, 1N), todas gaseificadas com carbogênio (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) e mantidas a 37 °C para

traqueia e aorta de rato, e íleo de cobaia, e a 32 °C para útero de rata, cujas composições estão descritas abaixo:

- **Composição da solução de Krebs (mM):** NaCl (118,0), KCl (4,5), MgSO<sub>4</sub> (5,7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1), CaCl<sub>2</sub> (2,5), glicose (11,0) e NaHCO<sub>3</sub> (25,0).
- **Composição da solução de Locke Ringer por Revuelta, Catabrana e Hidalgo (1997) (mM):** NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl<sub>2</sub> (2,1), CaCl<sub>2</sub> (2,2), glicose (5,6), NaHCO<sub>3</sub> (6,0).
- **Composição da solução de Krebs modificado por Sun e Benishin (1994) (mM):** NaCl (117,0), KCl (4,7), MgSO<sub>4</sub> (1,3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), CaCl<sub>2</sub> (2,5), glicose (11,0) e NaHCO<sub>3</sub> (25,0).
- **Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem cálcio:** NaCl (52,7), KCl (70,0), MgSO<sub>4</sub> (1,3), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), glicose (11,0), NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

#### 4.1.6 Equipamentos

O processo de pesagem das substâncias foi realizado em balança analítica modelo AY220, enquanto os animais foram pesados em balança semianalítica modelo BK2000. O pH das soluções foi aferido em pHmetro digital PG2000. Todos estes equipamentos foram adquiridos da Gehaka (Brasil).

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos foram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil). Tais cubas foram acopladas a uma bomba termostática modelo Polystat 12002 Cole-Palmer (Vernon Hills, IL, EUA) para o controle da temperatura.

Para registrar as contrações isométricas, os órgãos foram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL), modelo BOI-04, e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise. O sistema possui uma bomba termostática modelo BT-60 que controla

a temperatura das cubas. Esses aparelhos foram adquiridos junto a AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparação da solução-mãe do extrato para os ensaios farmacológicos**

O extrato foi solubilizado em Cremophor® e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10 mg/mL, respectivamente, 3% Cremophor® v/v) que foi armazenada a uma temperatura de 0 °C. A concentração final de Cremophor® na cuba nunca excedeu 0,01%. Nesta concentração, o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante nos órgãos estudados, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações do EL-MeOH<sub>PA</sub> foram utilizadas em múltiplos de três, sendo a concentração submáxima 243 e a máxima 729 µg/mL. Em seguida, quando na concentração submáxima o efeito observado ultrapassasse 50% e na concentração máxima o efeito observado ultrapassasse 70%, era realizada uma curva concentração-resposta completa testando concentrações menores para obtenção do zero de efeito e maiores para obtenção do efeito máximo ( $E_{max}$ ) do extrato.

### **4.2.2 Triagem farmacológica preliminar**

#### **4.2.2.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato**

Os ratos foram eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de exsanguinação. Um segmento da aorta torácica era retirado e limpo de todo o tecido conjuntivo e adiposo, em seguida, foi seccionado em anéis de 3-5 mm. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável, em cubas de banho (6 mL) contendo solução de Krebs a 37 °C. As preparações foram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual se manteve uma tensão de repouso de 1 grama, gaseificados com

carbogênio. Durante esse período, a solução nutritiva foi renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização foi induzida uma contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN e durante o componente tônico foi adicionado  $10^{-6}$  M de ACh para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular foi considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentassem relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis foram considerados sem endotélio funcional (AJAYA; GILANI; MUSTAFAA, 2003). Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o EL-MeOH<sub>PA</sub> foi adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração induzida por FEN. Os valores de concentração de uma droga que produz 50% do seu efeito máximo (CE<sub>50</sub>) foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o extrato em anéis com e sem endotélio funcional.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>, o tempo de reversão foi observado.

#### **4.2.2.2 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato**

Os ratos, após serem eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método de exsanguinação, tinham a traqueia retirada e limpa, de modo a separá-la de todo o tecido conectivo e adiposo. O órgão foi dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 anéis de cartilagem. Cada segmento suspenso individualmente através de uma haste de aço inoxidável em cubas de banho (6 mL), conectados a transdutores isométricos, e contendo solução nutritiva de Krebs sob tensão de 1 grama. Estes segmentos foram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneceram em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização foi induzida uma contração com  $10^{-5}$  M de CCh, e durante o componente tônico adicionou-se  $3 \times 10^{-4}$  M de AA para verificar a integridade do epitélio. O epitélio foi considerado íntegro quando os anéis de

traqueia apresentaram relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento igual ou inferior a 10%, os anéis foram considerados sem epitélio funcional. Após a lavagem, esperou-se 30 minutos e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, adicionou-se o EL-MeOH<sub>PA</sub> em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba (TSCHIRHART et al., 1987).

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por CCh. Os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para o extrato em anéis com e sem epitélio funcional.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>, o tempo de reversão era observado.

#### **4.2.2.3 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata**

As ratas foram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) por via subcutânea para sincronização hormonal do estro. Decorrido este tempo, os animais foram eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método complementar de exsanguinação. Após a abertura da cavidade abdominal, foi feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C e gaseificados com carbogênio. Em seguida, os dois cornos uterinos foram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente, e cada um era suspenso verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL).

Estes tecidos foram mantidos sob tensão de 1 g e permaneciam em repouso por 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva foi trocada a cada 10 minutos. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração isotônica com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Após um período de 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, foram obtidas com 10<sup>-2</sup> UI/mL de ocitocina ou com 10<sup>-5</sup> M de CCh. O EL-MeOH<sub>PA</sub> foi incubado em diferentes concentrações por 15 minutos em preparações diferentes e independentes, e a



inibição da resposta submáxima aos agonistas foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do extrato à cuba (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000). Este efeito foi avaliado por comparação das respostas antes e após a adição do extrato à cuba, sendo sua eficácia expressa como  $E_{max}$ . Os valores de concentração de uma droga que inibe 50% do efeito máximo de um agonista ( $CI_{50}$ ) foram calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito tocolítico do EL-MeOH<sub>PA</sub> era observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

#### **4.2.2.4 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina ou por CCh em íleo isolado de cobaia**

Os cobaias foram mantidos em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período, os animais foram eutanasiados por anestesia com cetamina 100 mg/kg (i.p.) e xilazina 10 mg/kg (i.p.), seguido por método de exsanguinação. O abdômen foi aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento foi retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C gaseificados com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo foi seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de banho, conectados a uma alavanca de inscrição frontal por uma linha de algodão, e essa a cilindros esfumados de um quimógrafo. Os órgãos foram deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação foi lavada e após 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, foram obtidas com  $10^{-6}$  M de histamina ou de CCh, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplada ao cilindro esfumado de um quimógrafo. O EL-MeOH<sub>PA</sub> foi incubado em diferentes concentrações por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença deste, foi induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas acima citados (DANIEL; KWAN; JANSSEN, 2001).

A inibição da resposta contrátil induzida pelos agonistas foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do extrato à cuba, sendo sua eficácia expressa como  $E_{\max}$ . Os valores de  $CI_{50}$  foram expressos como a média e o e.p.m. (erro padrão da média) dos valores individuais da  $CI_{50}$  obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito espasmolítico do EL-MeOH<sub>PA</sub> era observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

#### **4.2.2.5 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 40 mM de KCl ou por  $10^{-6}$  M de CCh ou de histamina, e sobre o componente tônico desta contração o EL-MeOH<sub>PA</sub> foi adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelos agentes contráteis. A potência e a eficácia relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> foram calculadas e avaliadas comparando-se os valores da  $CE_{50}$  e do  $E_{\max}$ , respectivamente.

Após o relaxamento máximo produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>, o tempo de reversão era observado.

#### **4.2.3 Investigação do mecanismo de ação do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia**

##### **4.2.3.1 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito relaxante produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>**

###### **4.2.3.1.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>**

O íleo foi montado conforme descrito no item 4.2.2.4. Após um período de estabilização do órgão por 30 minutos, a solução de Krebs modificado era substituída pela solução despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  durante um período de 45 minutos. Durante esse tempo, a preparação foi lavada a cada 15 minutos. Foram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$ , em seguida, o EL-MeOH<sub>PA</sub> foi incubado em diferentes concentrações, na ausência de  $\text{CaCl}_2$  por 15 minutos e, após esse período, uma terceira curva concentração-resposta cumulativa ao  $\text{CaCl}_2$  era obtida na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub> (VAN ROSSUM, 1963).

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do extrato com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle. O efeito inibitório do EL-MeOH<sub>PA</sub> foi avaliado com base na análise dos valores de  $\text{CE}_{50}$  e do  $\text{E}_{\text{max}}$  do  $\text{CaCl}_2$  calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub>.

#### **4.2.3.1.2 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas pelo S-(-)-Bay K8644**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após estabilização por 30 minutos em solução de Krebs modificado, o íleo era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos e, então, era induzida uma contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos  $\text{Ca}_v$  (FERRANTE et al., 1989), ao abrigo da luz. Durante a fase tônica dessa contração, o EL-MeOH<sub>PA</sub> foi adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644 e o valor de  $\text{CE}_{50}$  foi calculado por regressão não linear.

#### **4.2.3.2 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>**

##### **4.2.3.2.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de cézio**

O íleo foi retirado e montado segundo o descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação foi lavada e, após 15 minutos, foi adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K<sup>+</sup> (CECCHI et al., 1987; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), após 20 minutos na presença do bloqueador foi induzida uma contração com 10<sup>-6</sup> M de histamina e sob o componente tônico dessa contração o extrato foi adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de E<sub>max</sub> e de CE<sub>50</sub> do extrato foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do bloqueador e comparados com os valores de E<sub>max</sub> e CE<sub>50</sub> do EL-MeOH<sub>PA</sub> na ausência do bloqueador.

#### **4.2.3.3 Avaliação do envolvimento da via adrenérgica no efeito relaxante produzido por EL-MeOH<sub>PA</sub>**

##### **4.2.3.3.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, foi adicionado à cuba 5 µM de (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos-β, e após 20 minutos, uma contração foi induzida com 10<sup>-6</sup> M de histamina e sobre o componente tônico foi adicionado o EL-MeOH<sub>PA</sub> de maneira cumulativa (BAUER, 1982).

O relaxamento produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de E<sub>max</sub> e CE<sub>50</sub> do extrato foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do antagonista e comparados com seus valores na ausência do antagonista.

#### **4.2.3.3.2 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de ioimbina**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação foi lavada e, após 15 minutos, era adicionado à cuba 1,3  $\mu$ M de ioimbina, um antagonista dos receptores adrenérgicos- $\alpha$ , e após 20 minutos, uma contração foi induzida com  $10^{-6}$  M de histamina e sobre o componente tônico foi adicionado o EL-MeOH<sub>PA</sub> de maneira cumulativa (FARGBEMI; SALAKO, 1982).

O relaxamento produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE<sub>50</sub> do extrato foram calculados como descrito anteriormente.

#### **4.2.3.4 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito relaxante promovido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub>**

##### **4.2.3.4.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de L-NAME**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação foi lavada e, após 15 minutos, era adicionado à cuba  $10^{-4}$  M de L-NAME, inibidor não seletivo de sintase do óxido nítrico (NOS) (HOLZER et al., 1997), e após 20 minutos foi induzida uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina e sobre o componente tônico dessa contração o extrato era adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de E<sub>max</sub> e CE<sub>50</sub> do extrato foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do inibidor e comparados com seus valores na ausência do inibidor.

#### **4.2.3.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito relaxante promovido por EL-MeOH<sub>PA</sub>**

##### **4.2.3.5.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de indometacina**

O íleo foi montado como descrito no item 4.2.2.4. Após o período de estabilização, foi induzida uma contração com 40 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação foi lavada e, após 15 minutos, foi adicionado à cuba 10  $\mu$ M de indometacina, um inibidor da ciclo-oxigenase (MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004) e após 20 minutos foi induzida uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina e sobre o componente tônico foi adicionado o extrato de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de  $E_{\max}$  e  $CE_{50}$  do extrato foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença e na ausência do inibidor.

#### **4.2.3.6 Avaliação do efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre a camada circular do íleo de cobaia**

##### **4.2.3.6.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina na camada circular**

O íleo foi retirado como descrito no item 4.2.2.4. Para obtenção da camada circular, a camada mucosa foi removida mecanicamente através do atrito com algodão embebido em solução de Krebs modificado, na parede interna do órgão. Um segmento do íleo em forma de anel com cerca de 5 mm era então isolado e suspenso, com a ajuda de hastes de aço inoxidável, em transdutores de força isométrica acoplados a um sistema de aquisição digital. A solução do banho foi trocada a cada 15 minutos, permanecendo o órgão em repouso por 120 minutos para completa estabilização da preparação (adaptado de CHENG, SHINOKUZA, 1987). Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, foram obtidas com  $10^{-6}$  M de

histamina, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima e registradas através de um sistema de aquisição digital. O EL-MeOH<sub>PA</sub> foi incubado em várias concentrações, individualmente por 15 minutos em preparações diferentes e na presença deste foi induzida uma terceira contração com histamina.

A inibição da resposta submáxima da histamina foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do extrato à cuba. Os valores da CI<sub>50</sub> para o EL-MeOH<sub>PA</sub> foram calculados por regressão não linear.

### 4.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando  $p < 0,05$ . Os valores de CE<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

## **5 Resultados**



## 5.1 Triagem farmacológica preliminar

### 5.1.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por FEN em aorta isolada de rato

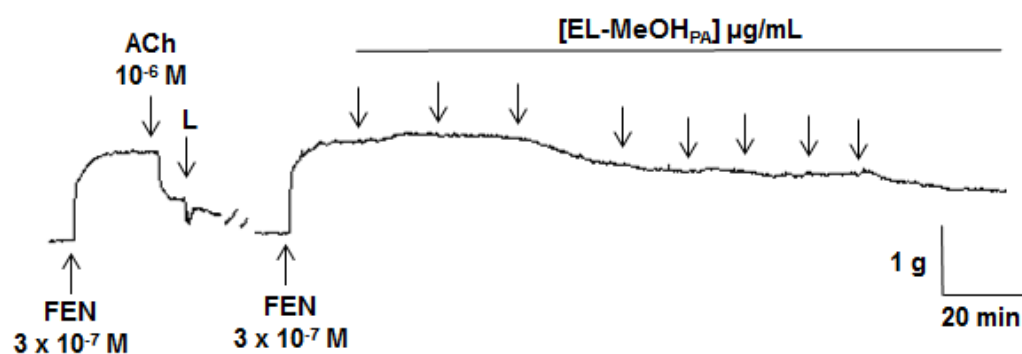
O EL-MeOH<sub>PA</sub> (1-2187 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração a aorta de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN, sendo mais eficaz e potente em relaxar a aorta na ausência ( $E_{\max} = 96,0 \pm 5,4\%$  e  $CE_{50} = 210,5 \pm 22,5$  µg/mL) do que na presença ( $E_{\max} = 108,6 \pm 0,6\%$  e  $CE_{50} = 382,0 \pm 52,6$  µg/mL) de endotélio funcional (Figura 8, Gráfico 1 e Tabela 1).

O tempo médio para que o EL-MeOH<sub>PA</sub> alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2 horas, tanto na presença quanto na ausência de endotélio funcional.

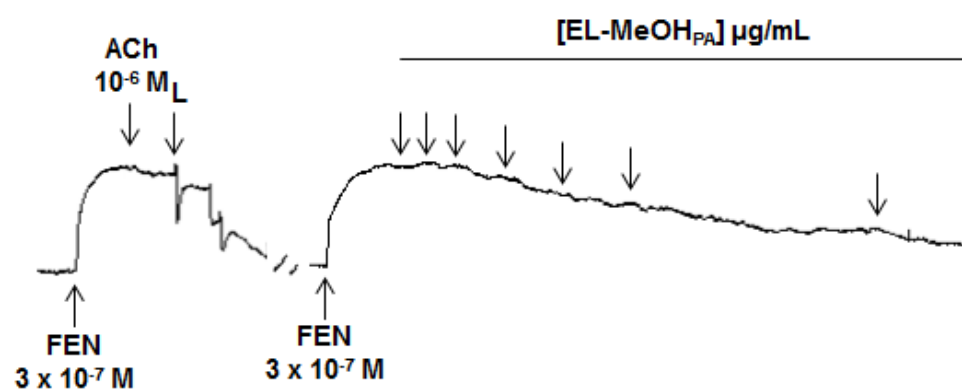
A responsividade da aorta à fenilefrina na presença e na ausência de endotélio funcional foi restaurada em  $80,5 \pm 12,0$  e  $69,9 \pm 10,4\%$ , respectivamente, em 2 horas após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

**Figura 8** – Registros originais representativos do efeito vasorrelaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em aorta isolada de rato pré-contraída com  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.

A



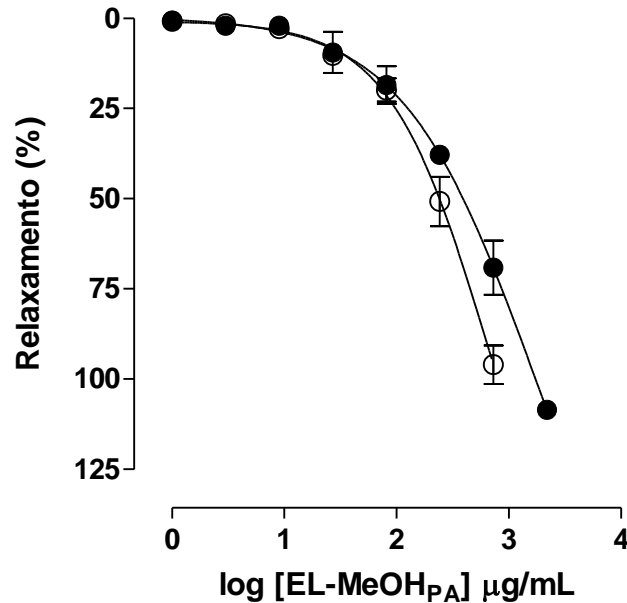
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 1-2187 e 1-729  $\mu\text{g/mL}$  na presença (A) e na ausência (B) de endotélio, respectivamente. FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2020.

**Gráfico 1** – Efeito vasorrelaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de FEN na presença (●) e na ausência (○) de endotélio funcional em aorta isolada de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2019.

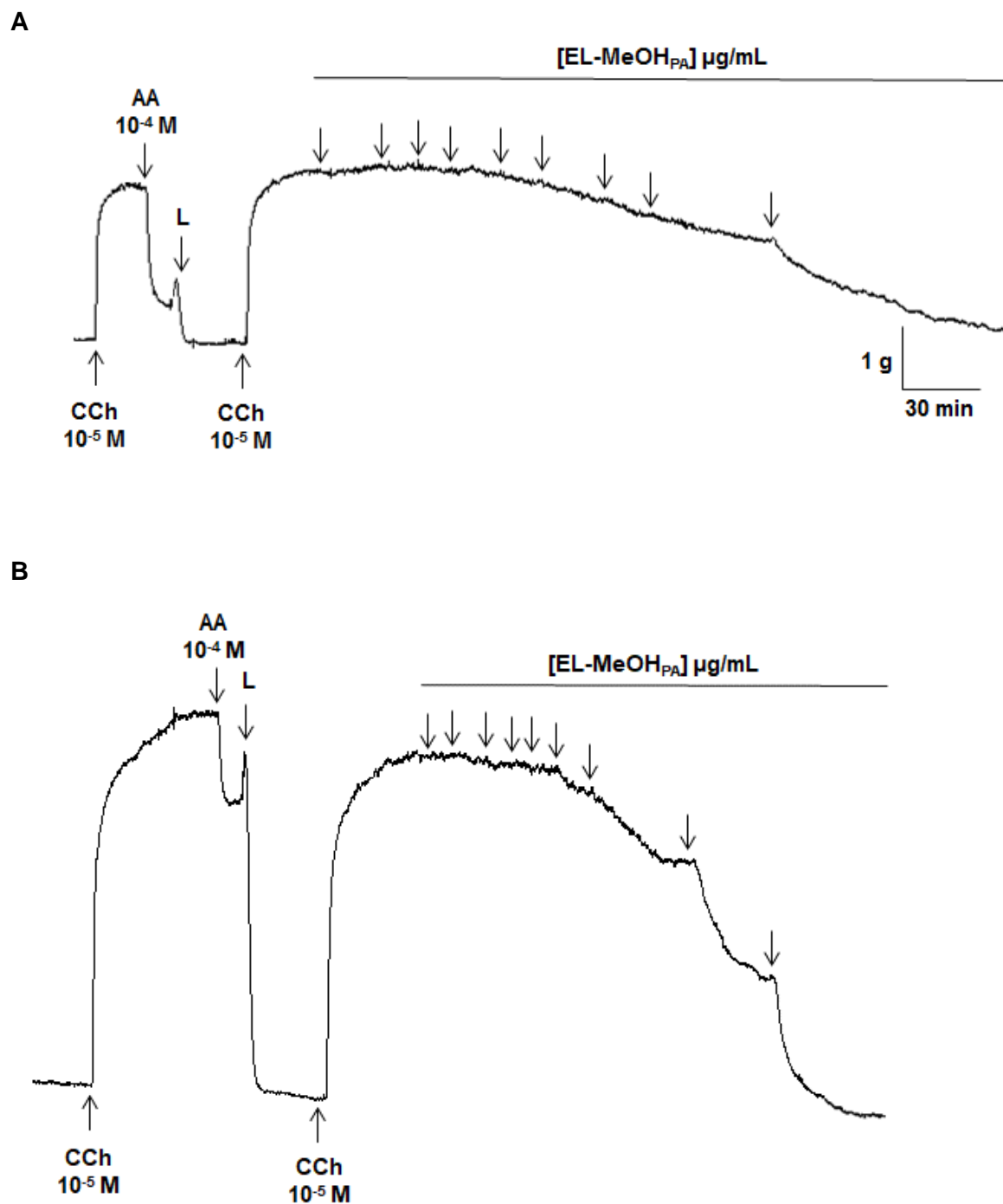
### 5.1.2 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia isolada de rato

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) relaxou a traqueia de rato pré-contraída com  $10^{-5}$  M de CCh de maneira dependente de concentração e com mesma eficácia, sendo mais potente em relaxar a traqueia na presença ( $E_{\max} = 102,1 \pm 1,2\%$  e  $CE_{50} = 139,4 \pm 17,4$  µg/mL) do que na ausência ( $E_{\max} = 92,3 \pm 8,9\%$  e  $CE_{50} = 255,9 \pm 32,0$  µg/mL) de epitélio funcional (Figura 9, Gráfico 2 e Tabela 1).

O tempo médio para que o EL-MeOH<sub>PA</sub> alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2,5 horas na ausência e 3,5 horas na presença de epitélio funcional.

A responsividade da traqueia ao CCh na presença de epitélio funcional, foi totalmente restaurada em 1 hora. Já na ausência de epitélio, foi restaurada em  $60,5 \pm 5,5\%$ , em 2 horas após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

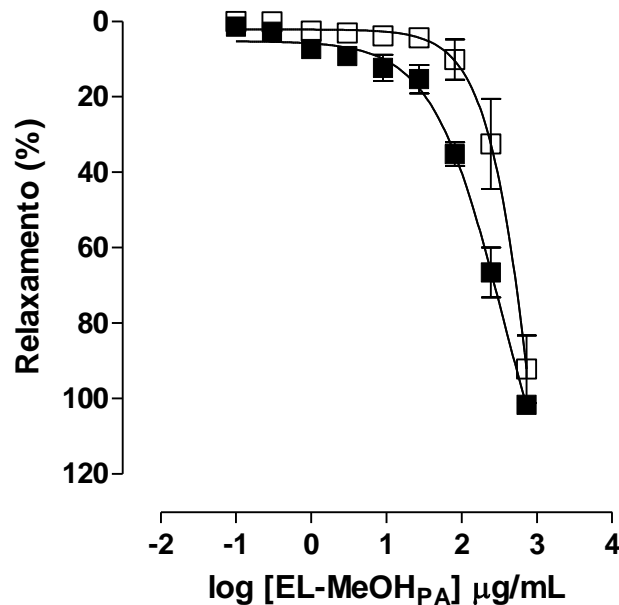
**Figura 9** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em traqueia isolada de rato pré-contráida com 10<sup>-5</sup> M de CCh na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,1-729 µg/mL. CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 2** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-5}$  M de CCh na presença (■) e na ausência (□) de epitélio funcional em traqueia isolada de rato.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

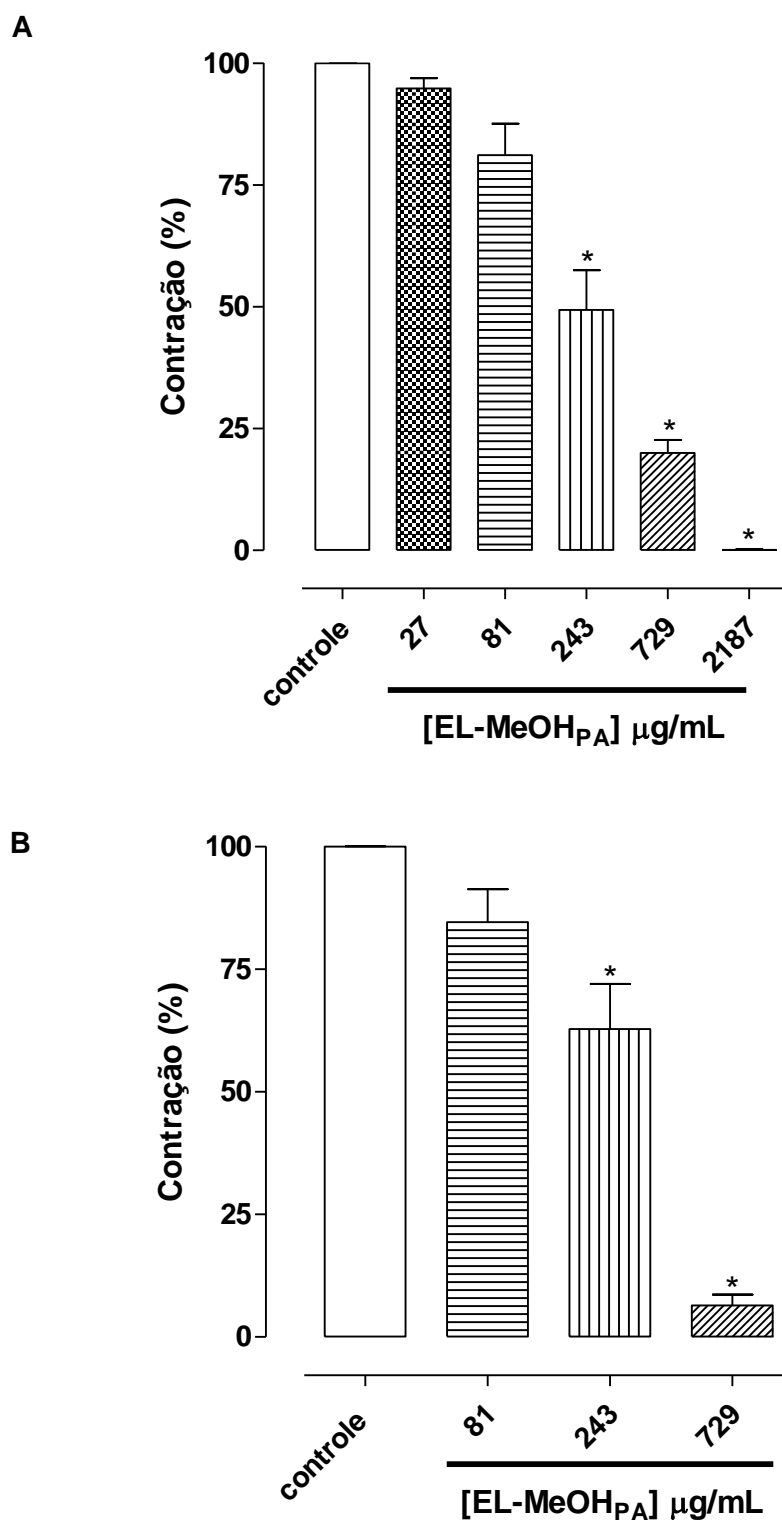
**Fonte:** Autor, 2020.

### 5.1.3 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (27; 81; 243; 729 e 2187 µg/mL, n = 5) antagonizou de maneira dependente de concentração e equipotente as contrações fásicas induzidas tanto por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina ( $E_{\max} = 100\%$  e  $CI_{50} = 280,8 \pm 44,9$  µg/mL), como por  $10^{-5}$  M de CCh ( $E_{\max} = 93,6 \pm 2,2\%$  e  $CI_{50} = 253,8 \pm 54,6$  µg/mL) (Gráfico 3 e Tabela 1).

A responsividade do útero à ocitocina e ao CCh foi restaurada em  $82,4 \pm 6,7\%$  em 1 hora e  $100\%$  em  $35,0 \pm 3,2$  minutos, respectivamente, após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

**Gráfico 3** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (**A**) ou por  $10^{-5}$  M de CCh (**B**) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).  
\* $p < 0,05$  (Controle vs EL-MeOH<sub>PA</sub>).

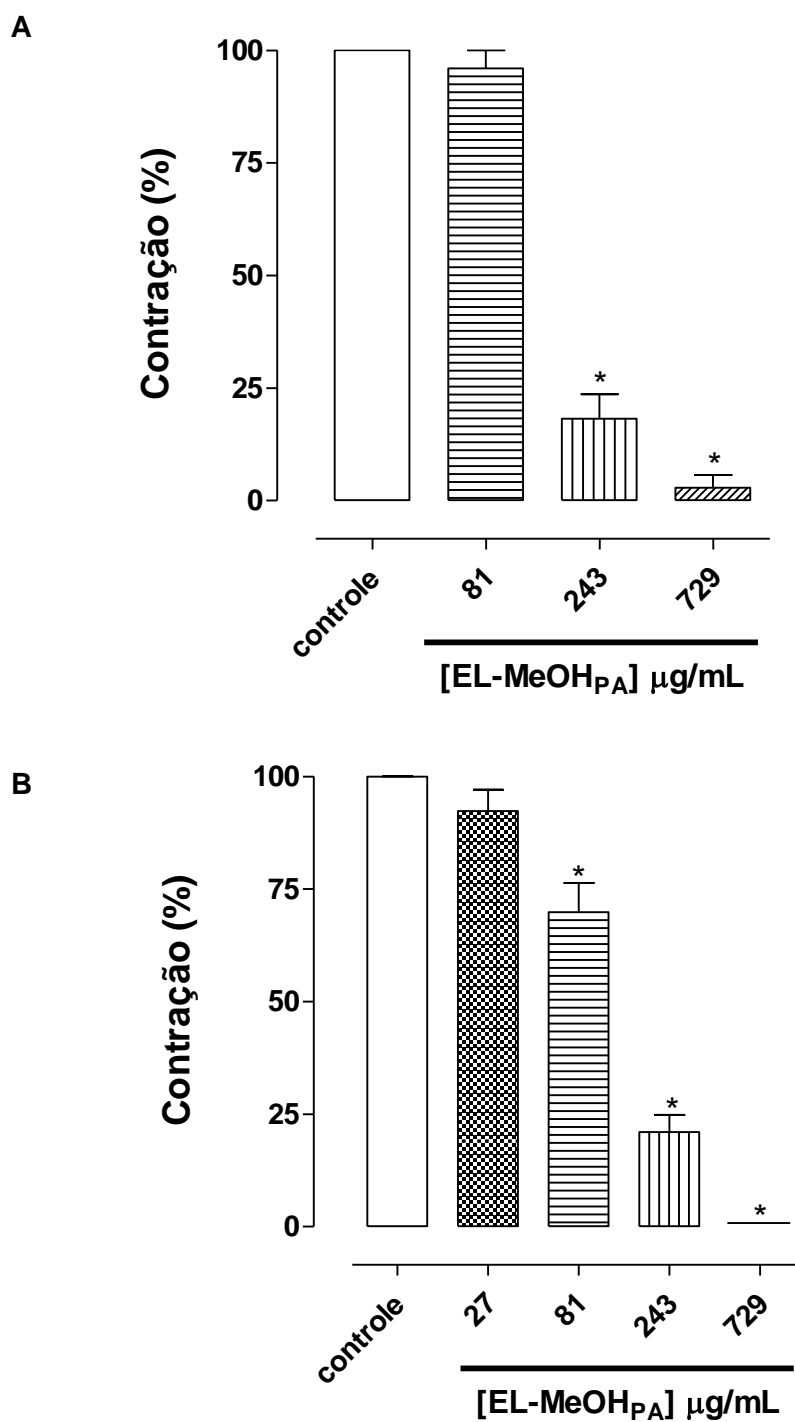
**Fonte:** Autor, 2020.

#### 5.1.4 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por CCh e por histamina em íleo isolado de cobaia

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas tanto por 10<sup>-6</sup> M de CCh ( $E_{\max} = 97,1 \pm 2,8\%$  e  $CI_{50} = 197,9 \pm 23,8$  µg/mL) como de histamina ( $E_{\max} = 100\%$  e  $CI_{50} = 124,8 \pm 18,1$  µg/mL) (Gráfico 4 e Tabela 1), sendo cerca de 1,5 vezes mais potente frente à histamina.

A responsividade do íleo à histamina e ao CCh foi restaurada em  $33,8 \pm 7,2$  e  $82,5 \pm 7,5$  minutos após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

**Gráfico 4** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de CCh (A) ou de histamina (B) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).  
\* $p < 0,05$  (Controle vs EL-MeOH<sub>PA</sub>).

**Fonte:** Autor, 2020.



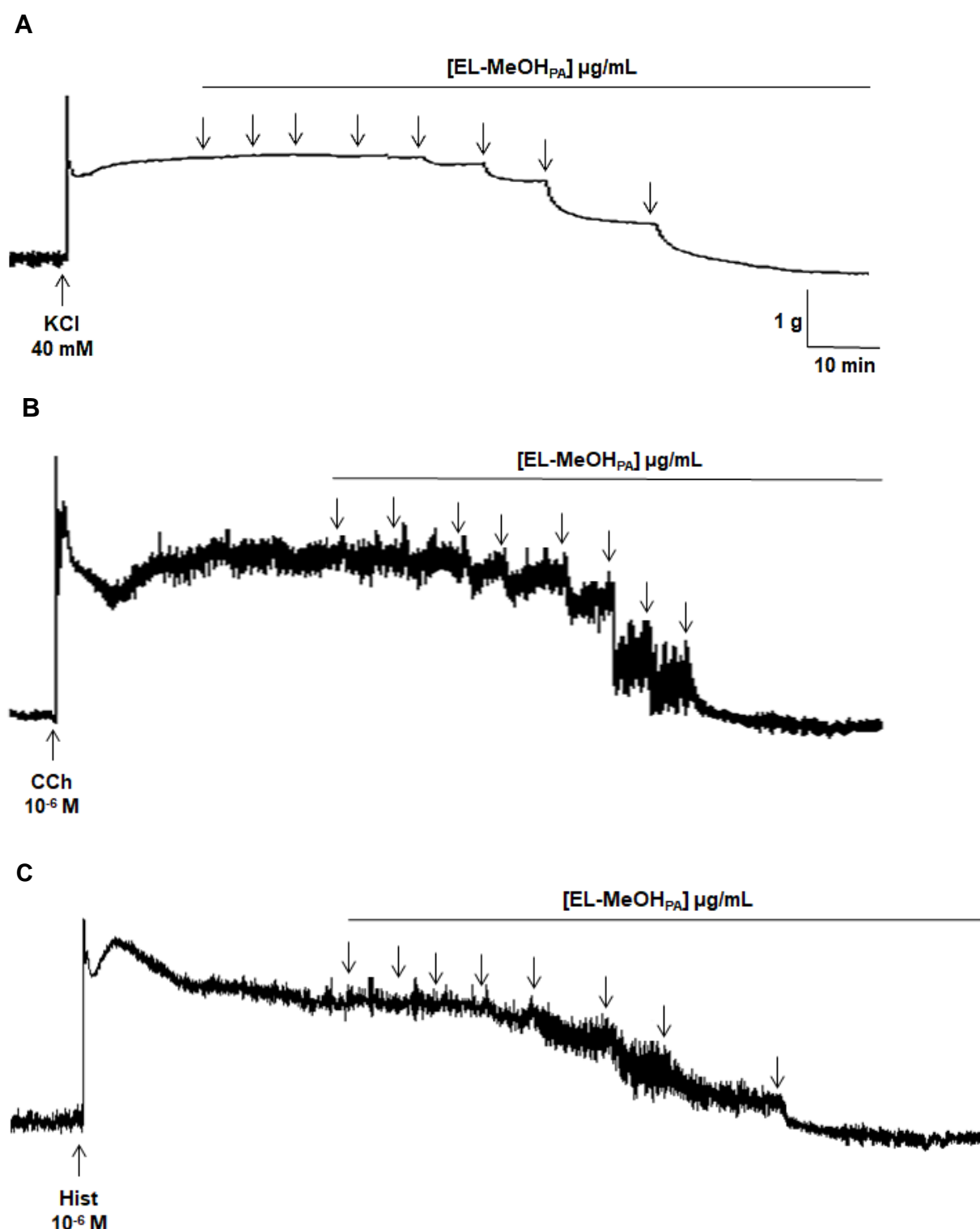
#### 5.1.4.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL, n = 5) também relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração o íleo de cobaia pré-contraído com 40 mM de KCl ( $E_{\max} = 105,3 \pm 6,8\%$  e  $CE_{50} = 53,5 \pm 5,7$  µg/mL), com  $10^{-6}$  M de CCh ( $E_{\max} = 104,3 \pm 0,9\%$  e  $CE_{50} = 49,6 \pm 7,2$  µg/mL) ou de histamina ( $E_{\max} = 107,9 \pm 3,5\%$  e  $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2$  µg/mL) (Figura 10, Gráfico 5 e Tabela 1).

O tempo médio para que o EL-MeOH<sub>PA</sub> alcançasse o seu efeito relaxante máximo total era cerca de 2 horas para o KCl e histamina e de 1 hora para o CCh.

A responsividade do íleo ao KCl, ao CCh e à histamina foi restaurada em  $60,5 \pm 7,5$ ;  $73,0 \pm 12,5$  e  $83,6 \pm 7,8\%$ , respectivamente, em até 2 horas após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

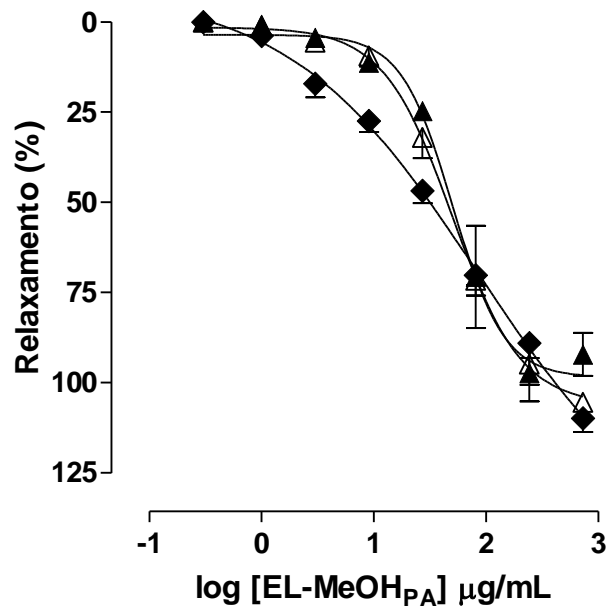
**Figura 10** – Registros originais representativos do efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl (**A**), por CCh (**B**) e por histamina (**C**) em íleo isolado de cobaia.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL (**A**, **B** e **C**). KCl = cloreto de potássio, CCh = carbacol, Hist = histamina, L = lavagem.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 5** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▲), por 10<sup>-6</sup> M de CCh (Δ) e por 10<sup>-6</sup> M de histamina (◆) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

**Fonte:** Autor, 2020.

**Tabela 1** – Valores de CE<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub> (μg/mL) do EL-MeOH<sub>PA</sub> em órgãos tônicos e fásicos induzidos por vários agentes contráteis.

Órgão	Agente contrátil	Contração	CE <sub>50</sub> /CI <sub>50</sub> (μg/mL)
Aorta íntegra	Fenilefrina	Tônica	382,0 ± 52,6
Aorta desnuda-	Fenilefrina	Tônica	210,5 ± 22,5 <sup>a</sup>
Traqueia íntegra	Carbacol	Tônica	139,4 ± 17,4 <sup>b</sup>
Traqueia desnuda	Carbacol	Tônica	255,9 ± 32,0
Útero	Ocitocina	Fásica	280,8 ± 44,9
Útero	Carbacol	Fásica	253,8 ± 54,6
Íleo	Histamina	Fásica	124,8 ± 18,1 <sup>c</sup>
Íleo	Carbacol	Fásica	197,9 ± 23,8
Íleo	KCl	Tônica	53,5 ± 5,7 <sup>d</sup>
Íleo	Carbacol	Tônica	49,6 ± 7,2 <sup>d</sup>
Íleo	Histamina	Tônica	36,0 ± 5,2 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>p < 0,05 (aorta íntegra vs. desnuda); <sup>b</sup>p < 0,05 (traqueia íntegra vs. desnuda); <sup>c</sup>p < 0,05 (fásica de íleo histamina vs. carbacol.); <sup>d</sup>p < 0,05 (tônicas de íleo vs. demais situações).

**Fonte:** Autor, 2020.

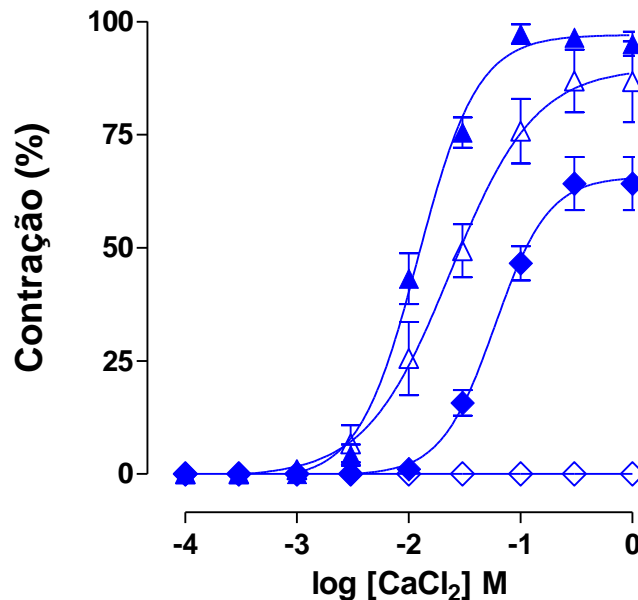
## **5.2 Investigação do mecanismo de ação do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia**

### **5.2.1 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>**

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (27, 81 e 243 µg/mL, n = 5) inibiu as contrações cumulativas induzidas por concentrações crescentes de CaCl<sub>2</sub> de forma dependente de concentração, tendo a curva desviada para a direita e com redução do E<sub>max</sub> de 100% (controle) para 86,9 ± 6,9; 64,2 ± 6,0 e 0,0%, respectivamente (Gráfico 6).

Os valores de CE<sub>50</sub> do CaCl<sub>2</sub> passaram de 1,4 ± 0,1 x 10<sup>-2</sup> M (controle) para 2,2 ± 0,2 x 10<sup>-2</sup> M, 5,8 ± 1,0 x 10<sup>-3</sup> M e ND, na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 27, 81 e 243 µg/mL, respectivamente.

**Gráfico 6** – Efeito inibitório do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações induzidas por CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca<sup>2+</sup> na ausência (▲) e na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 27 (△), 81 (◆) e 243 (◇) µg/mL em óleo isolado de cobaia.



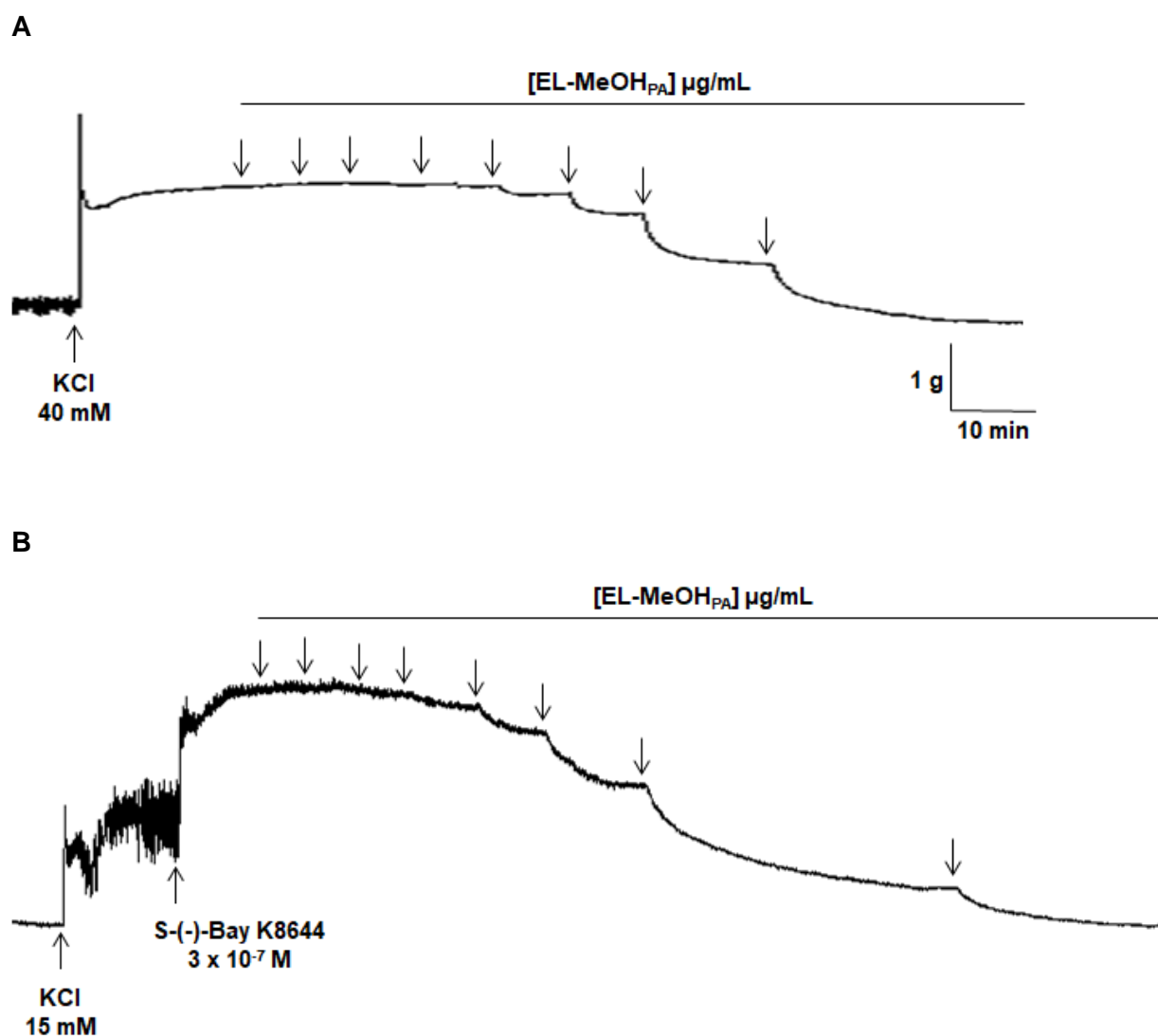
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

**Fonte:** Autor, 2020.

### 5.2.2 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas pelo S-(-)-Bay K8644

O extrato (0,3-729 µg/mL, n = 5) relaxou o óleo de cobaia pré-contraído com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 ( $E_{\max} = 105,7 \pm 3,3\%$  e  $CE_{50} = 83,2 \pm 6,4$  µg/mL), um agonista dos Cav1, em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl. Não foi observada redução da potência relaxante quando comparado ao seu efeito sobre a contração induzida por 40 mM de KCl ( $E_{\max} = 105,3 \pm 6,8\%$  e  $CE_{50} = 53,5 \pm 5,7$  µg/mL) (Figura 11 e Gráfico 7).

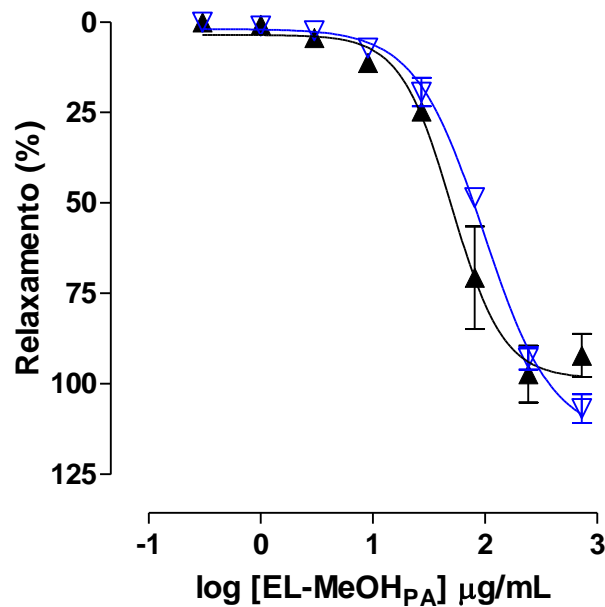
**Figura 11** – Registros representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo de cobaia pré-contráido com 40 mM de KCl (**A**) e com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (**B**).



As setas para baixo representam as concentrações cumulativas do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. KCl = cloreto de potássio

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 7** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (▲) e por  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 (▼) em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

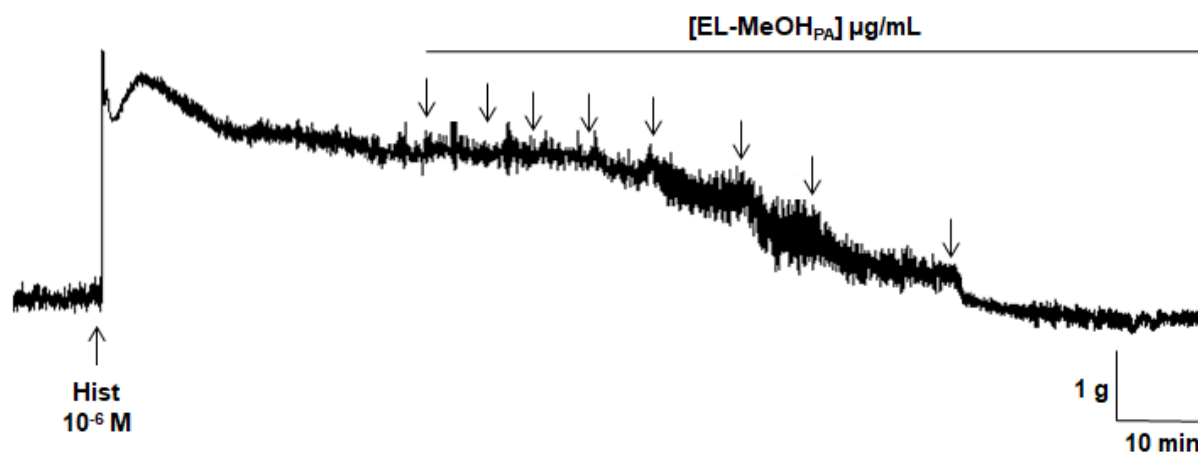
**Fonte:** Autor, 2020.

### 5.2.3 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de cloreto de cério

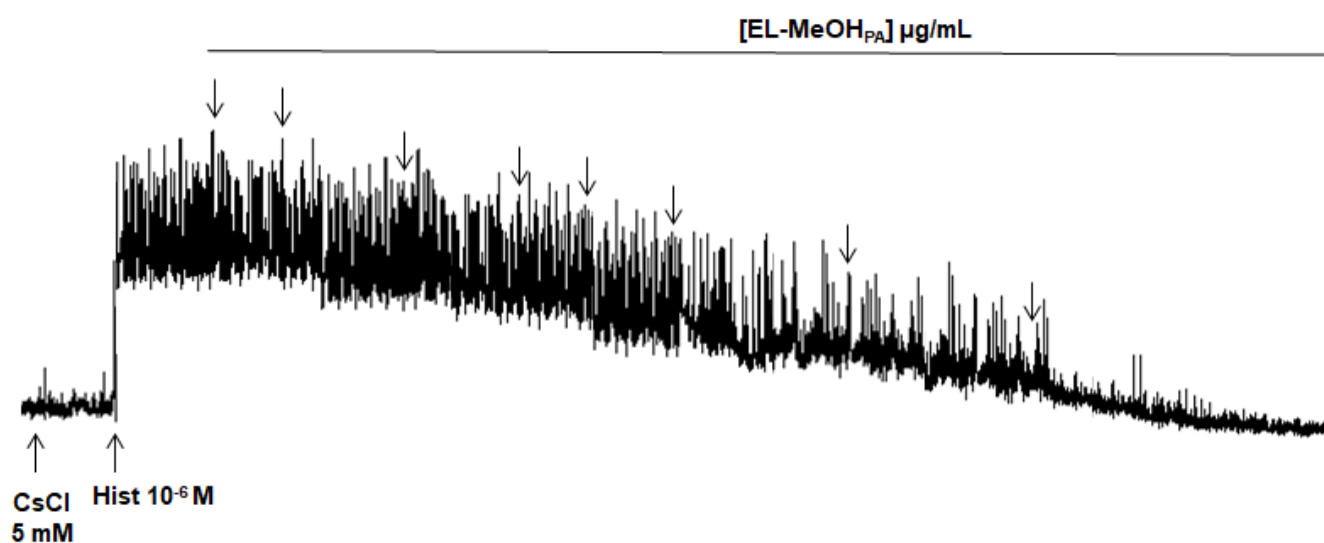
A curva controle de relaxamento ( $E_{\max} = 107,9 \pm 3,5\%$  e  $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ , n = 5) do EL-MeOH<sub>PA</sub> ( $0,3-729 \mu\text{g/mL}$ ) não foi deslocada na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ( $E_{\max} = 95,2 \pm 4,6\%$  e  $CE_{50} = 34,8 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$ , n = 5) (Figura 12 e Gráfico 8).

**Figura 12** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia.

**A**



**B**

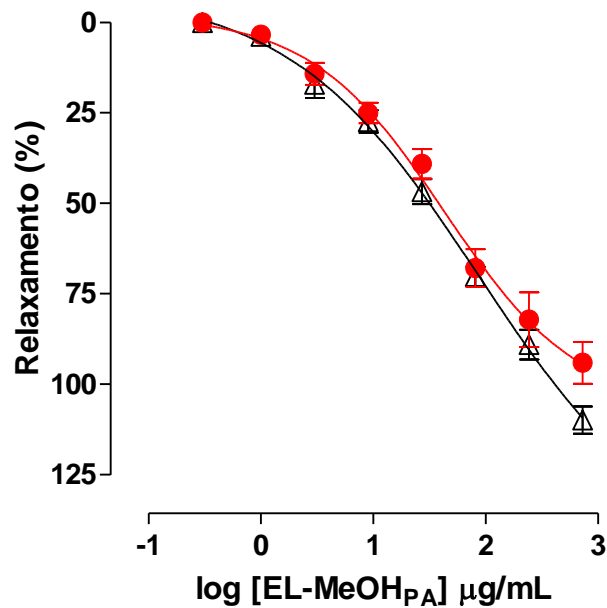


As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. CsCl = cloreto de cério, Hist = histamina

**Fonte:** Autor, 2020.



**Gráfico 8** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ( $\Delta$ ) e na presença ( $\bullet$ ) de CsCl em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ( $n = 5$ ).

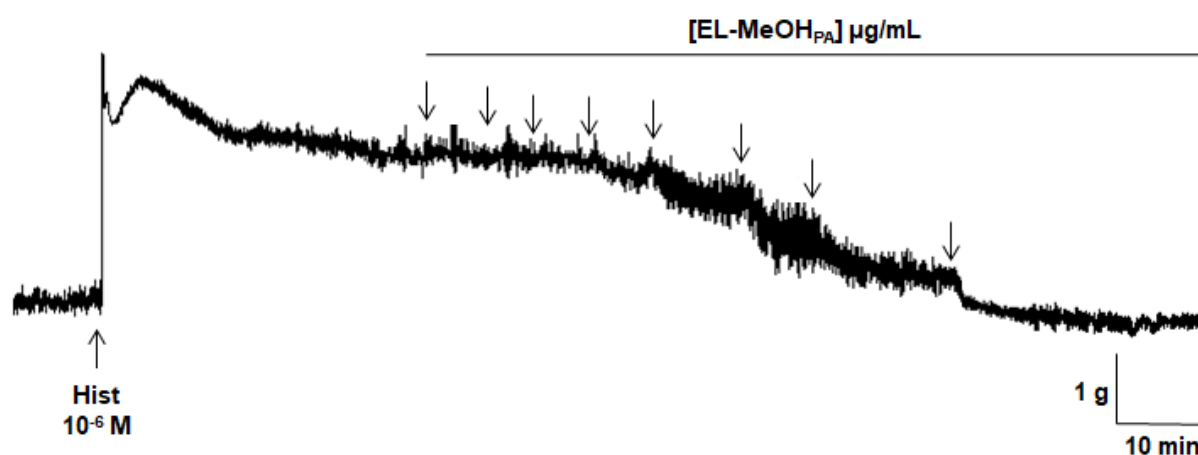
**Fonte:** Autor, 2020.

#### 5.2.4 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol

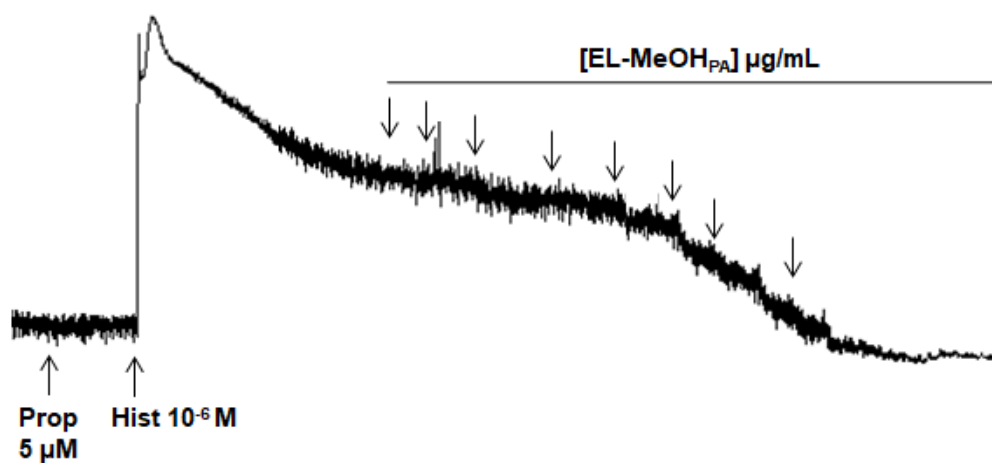
A curva controle de relaxamento ( $E_{\max} = 107,9 \pm 3,5\%$  e  $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) do EL-MeOH<sub>PA</sub> ( $0,3\text{--}729 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) não foi deslocada na presença de  $5 \mu\text{M}$  de (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos  $\beta$  ( $E_{\max} = 106,6 \pm 2,9\%$  e  $CE_{50} = 46,4 \pm 6,6 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) (Figura 13 e Gráfico 9).

**Figura 13** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 µM de (S)-(-)-propranolol em íleo isolado de cobaia.

A



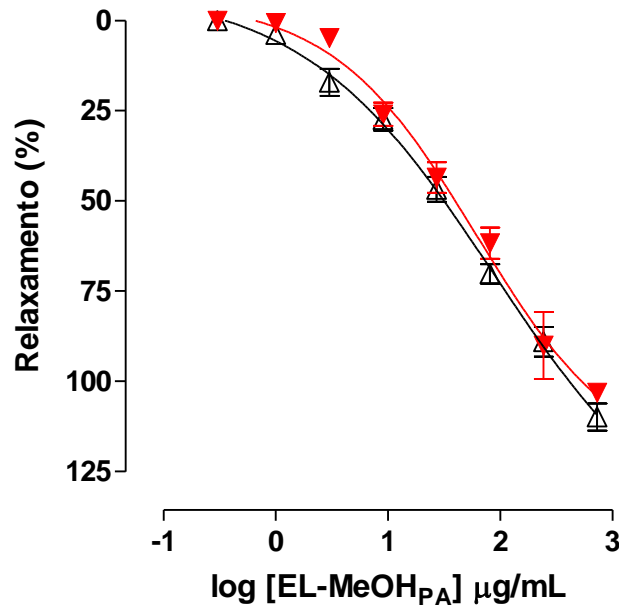
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. Prop = (S)-(-)-propranolol, Hist = histamina.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 9** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ( $\Delta$ ) e na presença ( $\blacktriangledown$ ) de (S)-(-)-propranolol em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

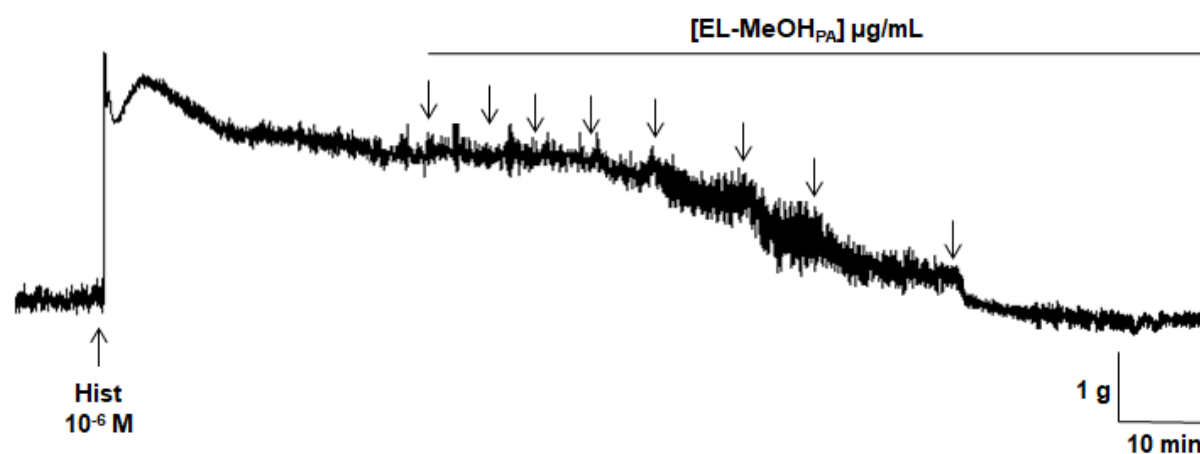
**Fonte:** Autor, 2020.

#### 5.2.5 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de ioimbina

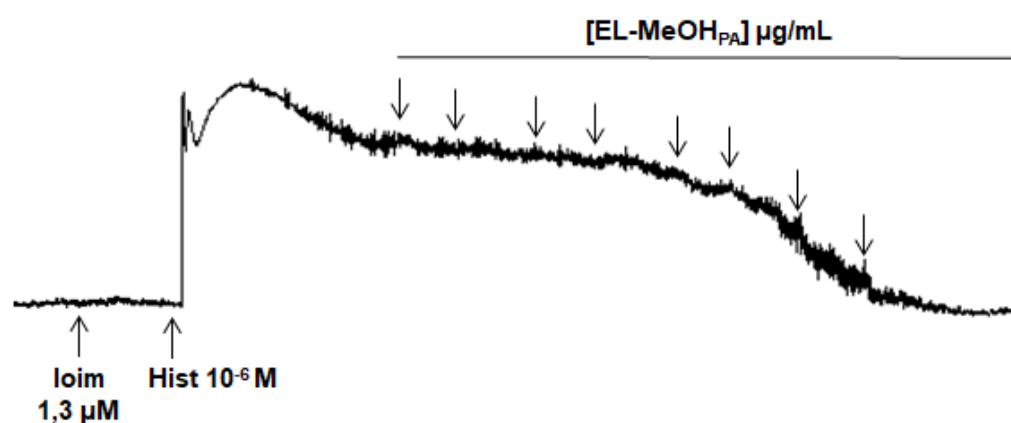
A curva controle de relaxamento ( $E_{\max} = 107,9 \pm 3,5\%$  e  $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) do EL-MeOH<sub>PA</sub> ( $0,3\text{--}729 \mu\text{g/mL}$ , n = 5) não foi deslocada na presença de  $1,3 \mu\text{M}$  de ioimbina, um antagonista dos receptores adrenérgicos  $\alpha$  ( $E_{\max} = 102,3 \pm 5,3\%$  e  $CE_{50} = 25,7 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ , n = 5) (Figura 14 e Gráfico 10).

**Figura 14** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 1,3 µM de ioimbina em íleo isolado de cobaia.

A



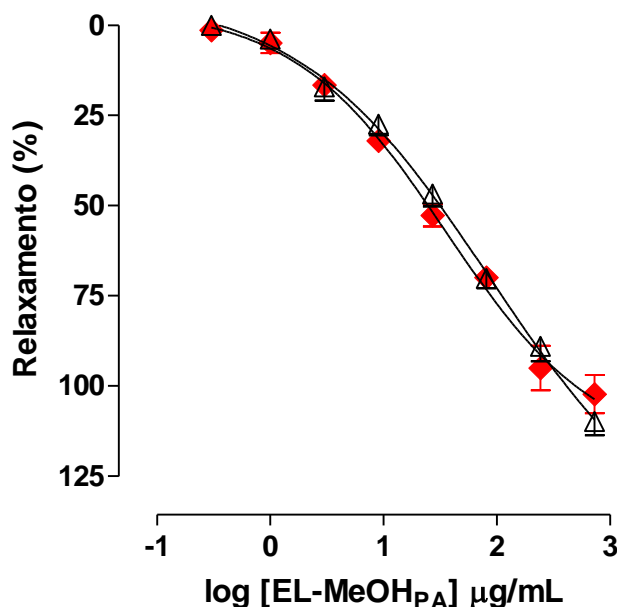
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. Ioim = ioimbina, Hist = histamina.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 10** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ( $\Delta$ ) e na presença ( $\blacklozenge$ ) de ioimbina em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

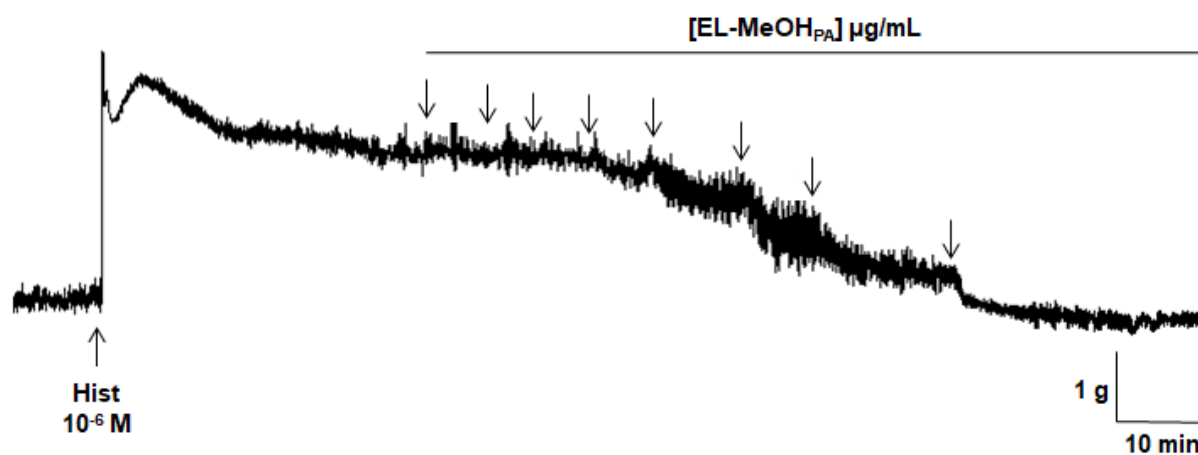
**Fonte:** Autor, 2020.

#### 5.2.6 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de L-NAME

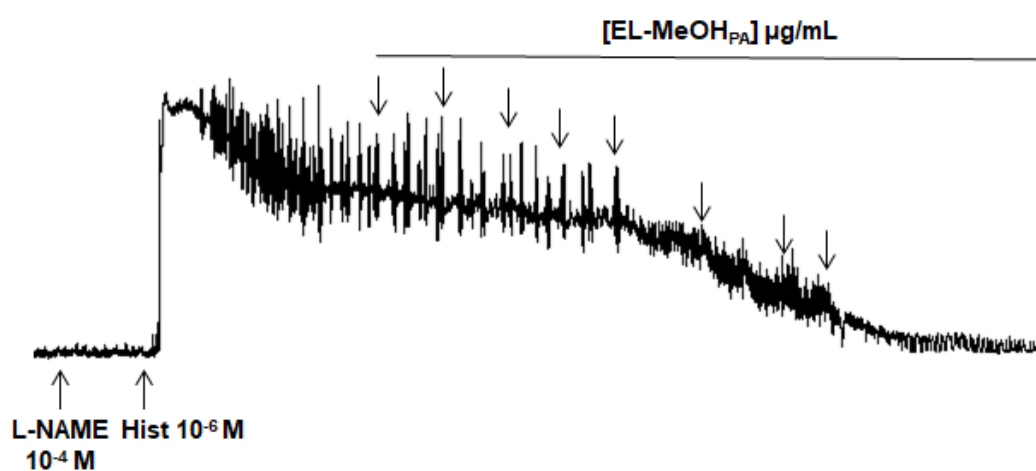
A curva controle de relaxamento ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) do EL-MeOH<sub>PA</sub> ( $0,3\text{-}729 \mu\text{g/mL}$ , n = 5) não foi deslocada na presença de  $10^{-4}$  M de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS ( $CE_{50} = 24,0 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$ , n = 5). O  $E_{\text{max}}$  foi atingido na concentração de  $729 \mu\text{g/mL}$ , na ausência ( $E_{\text{max}} = 107,9 \pm 3,5\%$ ) e na presença ( $E_{\text{max}} = 108,5 \pm 4,3\%$ ) do inibidor, respectivamente (Figura 15 e Gráfico 11).

**Figura 15** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 10<sup>-4</sup> M de L-NAME em íleo isolado de cobaia.

A



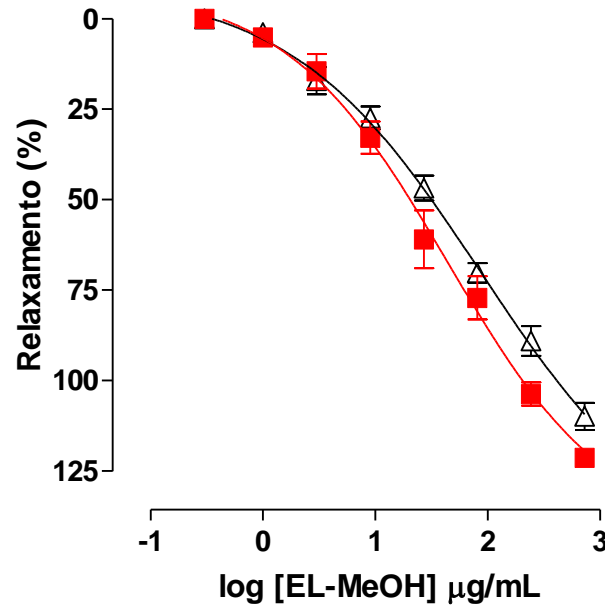
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. Hist = histamina.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 11** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ( $\Delta$ ) e na presença ( $\blacksquare$ ) de L-NAME em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ( $n = 5$ ).

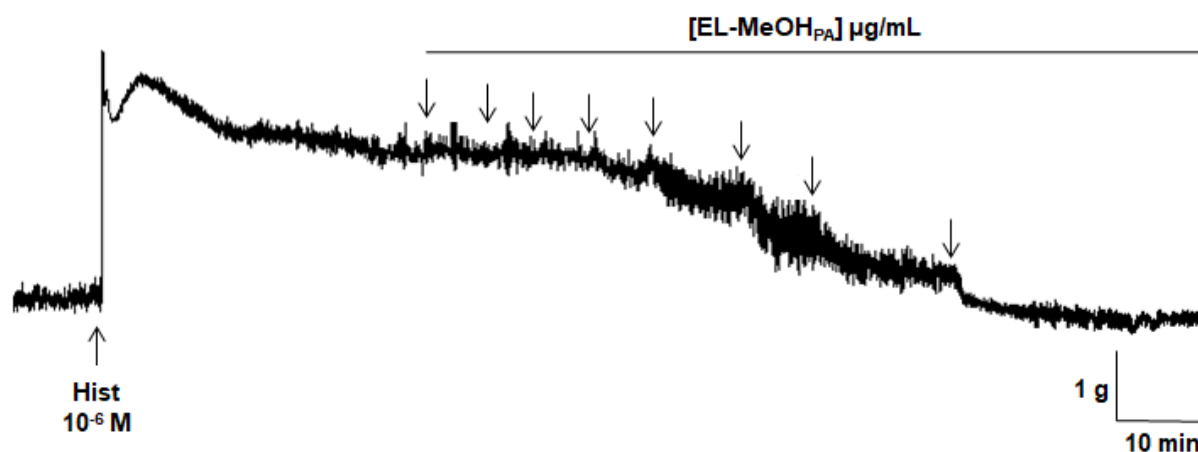
**Fonte:** Autor, 2020.

### 5.2.7 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de indometacina

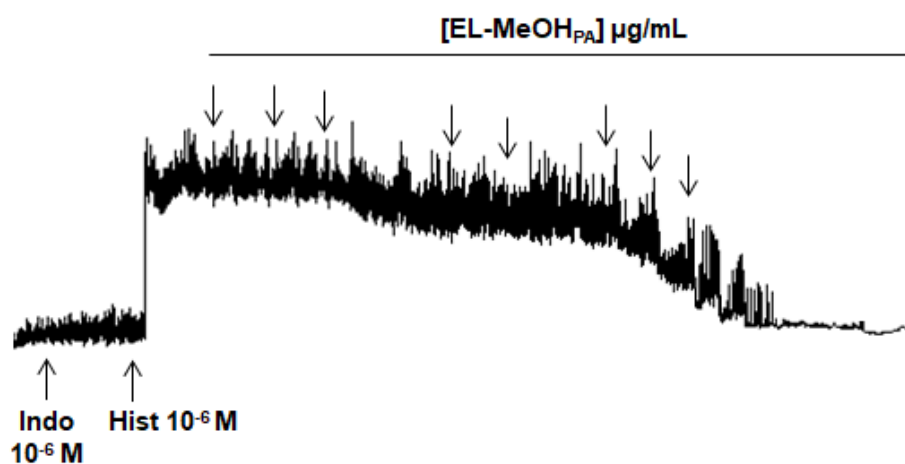
A curva controle de relaxamento ( $E_{\text{max}} = 107,9 \pm 3,5\%$  e  $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) do EL-MeOH<sub>PA</sub> ( $0,3\text{-}729 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) não foi deslocada na presença de  $10^{-6}$  M de indometacina, um inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases ( $E_{\text{max}} = 107,1 \pm 1,6\%$  e  $CE_{50} = 29,0 \pm 4,0 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) (Figura 16 e Gráfico 12).

**Figura 16** – Registros originais representativos do efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 10 µM de indometacina em íleo isolado de cobaia.

A



B

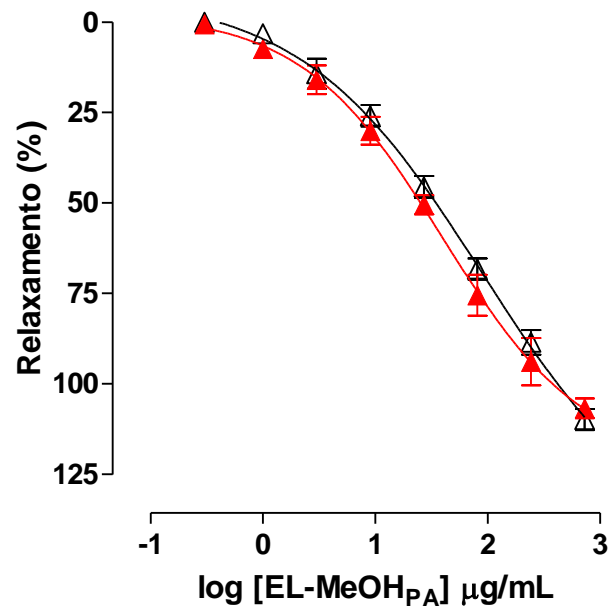


As setas para baixo representam a adição cumulativa do EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 0,3-729 µg/mL. Indo = indometacina, Hist = histamina.

**Fonte:** Autor, 2020.



**Gráfico 12** – Efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência ( $\Delta$ ) e na presença ( $\blacktriangle$ ) de indometacina em íleo isolado de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

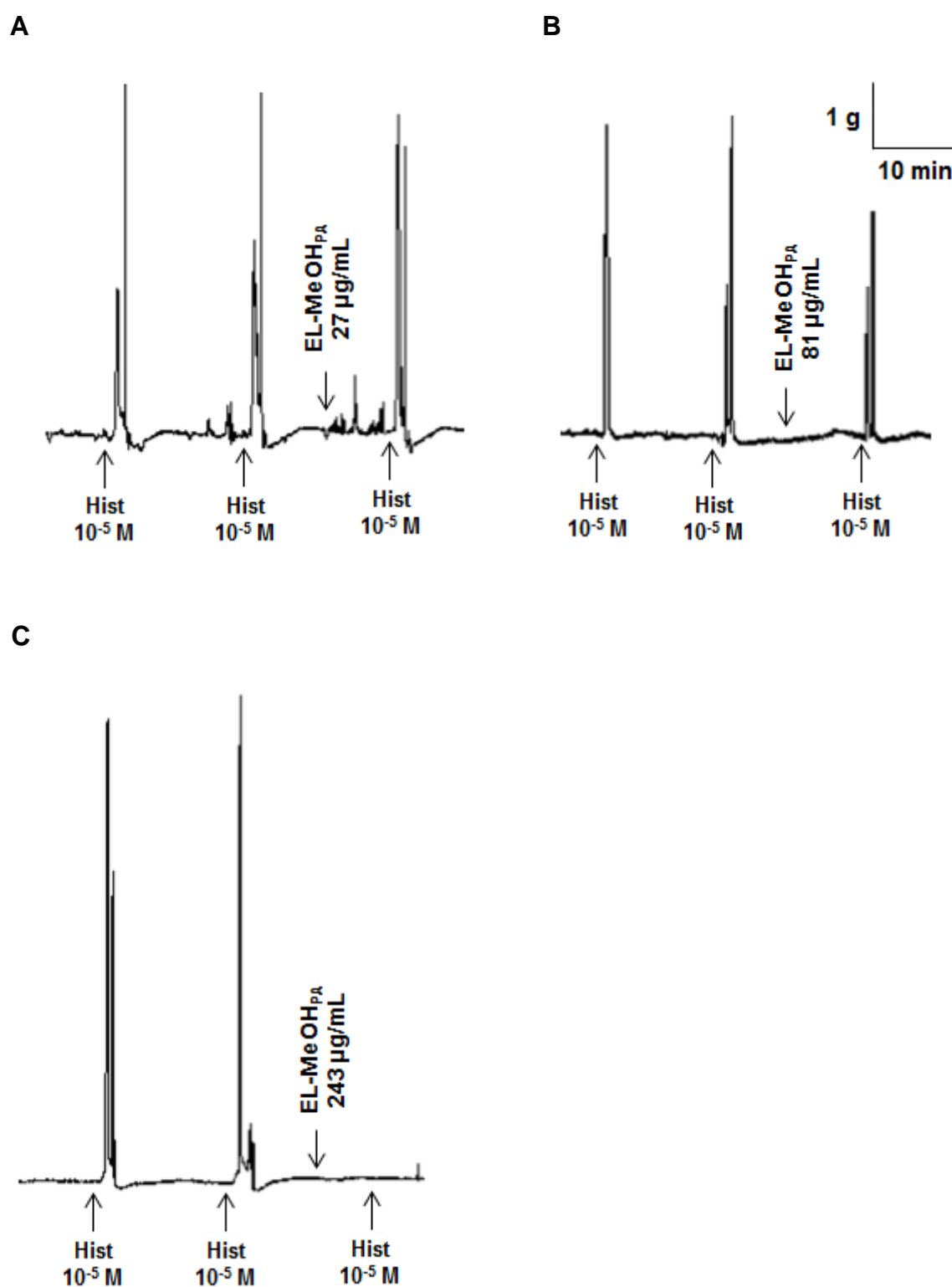
**Fonte:** Autor, 2020.

#### 5.2.8 Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por histamina na camada circular

O EL-MeOH<sub>PA</sub> (27-243 µg/mL, n = 5) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por  $10^{-5}$  M de histamina na camada circular do íleo isolado de cobaia ( $CI_{50} = 86,9 \pm 3,0$  µg/mL) (Figura 17 e Gráfico 13). O valor de  $E_{max}$  de 100% do extrato foi atingido na concentração de 243 µg/mL.

A responsividade do íleo à histamina foi 100% restaurada, em  $24,0 \pm 3,7$  min após a retirada do EL-MeOH<sub>PA</sub> da cuba.

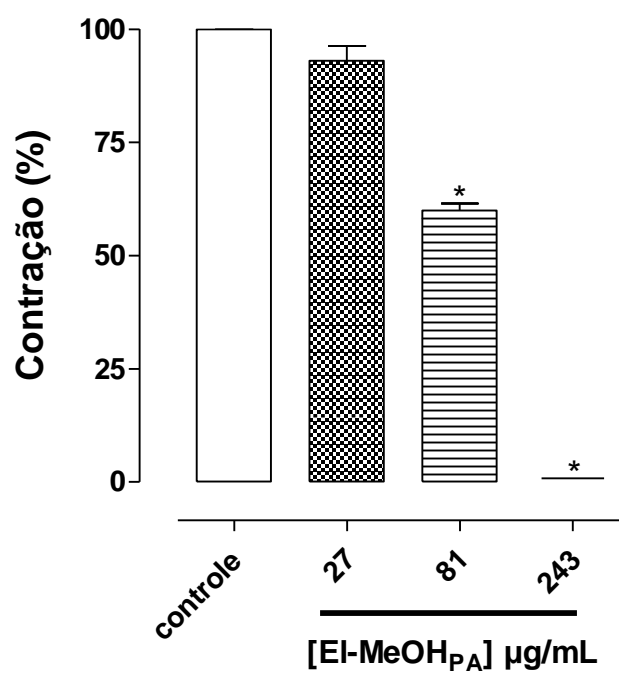
**Figura 17** – Registros representativos do efeito inibitório do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-5}$  M de histamina na camada circular do íleo de cobaia.



EL-MeOH<sub>PA</sub> nas concentrações de 27 (A); 81 (B) e 243 (C) µg/mL. Hist = histamina.

**Fonte:** Autor, 2020.

**Gráfico 13** – Efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> frente às contrações fásicas induzidas por 10<sup>-6</sup> M de histamina na camada circular do íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).  
\* $p < 0,05$  (Controle vs. EL-MeOH<sub>PA</sub>).

**Fonte:** Autor, 2020.

## **6 Discussão**

Neste trabalho, foi realizada a investigação de uma possível atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto obtido de *Evolvulus linarioides* (EL-MeOH<sub>PA</sub>) e do seu possível mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia. Os resultados demonstraram que o EL-MeOH<sub>PA</sub> possui atividade não seletiva nos órgãos testados, sendo mais potente em íleo isolado de cobaia, onde age inibindo tanto o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  via Cav1 como a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos estoques intracelulares. Tudo isso culmina numa diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  e, consequente, relaxamento da musculatura lisa intestinal.

Baseado no fato de que há descrições do uso etnofarmacológico de espécies pertencentes ao gênero *Evolvulus* para o tratamento de distúrbios do músculo liso, por exemplo, *Evolvulus alsinoides* como antiasmático, antidiarreico e antiespasmódico (CERVENKA et al., 2008; SINGH, 2008; INDHUMOL et al., 2013; PEREIRA, 2016; KHAN et al., 2019), além dos relatos de atividades espasmolíticas de várias espécies da família Convolvulaceae, entre elas para *Ipomoea imperati* (PAULA; HAYASHI; FREITAS, 2003), *Ipomoea cairica* e *Ipomoea stans* (PERUSQUIA et al., 1995; MEIRA et al., 2012) e *Ipomoea pes-caprae* (PONGPRAYOON et al., 1992; MART-NEZ-PÉREZ et al., 2018) e *Evolvulus alsinoides* (KHAN et al., 2019), decidiu-se avaliar uma possível atividade espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> em aorta e traqueia de rato, útero de rata e íleo de cobaia.

A perfeita funcionalidade do músculo liso é necessária para diversos processos fisiológicos no nosso organismo. Tendo em vista que as células musculares lisas revestem as paredes de diversos órgãos, qualquer distúrbio que acometa esse músculo pode resultar no desenvolvimento de distúrbios que afetam diretamente a homeostase do corpo humano, entre eles, hipertensão arterial, asma, cólicas uterinas e intestinais, e diarreia (SOMLYO; SOMLYO, 1994; STOTT; JEPPE; GREENWOOD, 2014; BROZOVICH et al., 2016).

A constrição funcional da musculatura lisa é apontada como um dos principais mecanismos envolvidos na hipertensão arterial. A hipertrofia da parede vascular eleva a resistência vascular periférica resultando em um aumento na contratilidade da musculatura lisa dos vasos (NOBRE et al., 2013).

A hipertensão arterial é um problema que acomete pessoas em todo o mundo. Estima-se que cerca de 600 milhões de pessoas apresentem o distúrbio, com uma taxa de crescimento global de 60% dos casos até 2025, e de 7,1 milhões

de mortes anualmente (WORLD, 2010; MALTA et al., 2018). Níveis elevados de pressão arterial elevam as chances de desenvolvimento de doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, doença vascular encefálica, acidente vascular cerebral, insuficiência renal crônica e, portanto, há significativa morbimortalidade relacionada a essa doença (CHOBANIAN et al., 2003; MALACHIAS et al., 2016).

A participação do endotélio no tônus vascular foi evidenciada por meio de um estudo onde observaram que o relaxamento induzido por acetilcolina era dependente da integridade da célula endotelial. Quando a acetilcolina interagiu com a célula endotelial, liberava uma substância que se difundia para o músculo liso vascular, levando ao relaxamento, a qual foi denominada fator relaxante derivado do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; COLAÇO, 2010). Atualmente, se conhecem outros fatores como: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), peptídeo natriurético C e os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, que podem ser metabólitos do ácido araquidônico, derivados da enzima do citocromo P450, endocanabinoides, entre outros. Diante disso, substâncias que desempenhem ação reguladora sobre o tônus basal ou que relaxem a musculatura lisa dos vasos podem ser candidatos a futuros fármacos com utilização terapêutica (CARVALHO, 2003; COLAÇO, 2010).

Na avaliação de uma possível atividade espasmolítica em aorta isolada de rato, observou-se que o EL-MeOH<sub>PA</sub> relaxou o órgão pré-contraído com fenilefrina (Gráfico 1) de maneira dependente de concentração, contudo foi mais potente em relaxar a aorta na ausência ( $\text{CE}_{50} = 210,5 \pm 22,5 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ) do que na presença de endotélio funcional ( $\text{CE}_{50} = 382,0 \pm 52,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que o mecanismo de ação do EL-MeOH<sub>PA</sub> para promover o seu efeito vasorrelaxante ocorra em nível de células do músculo liso vascular e não no endotélio.

Outra doença que atinge a população mundial é a asma, e se caracteriza por um processo inflamatório crônico, onde há hiperresponsividade brônquica e limitação do fluxo de ar das vias aéreas (MASOLI et al., 2004). Nas vias aéreas, estão presentes as células epiteliais que são responsáveis por modular o tônus basal e a reatividade do músculo liso através da liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (HASHIBA et al., 1999), como o NO (NIJKAMP, 1993) e as prostaglandinas, sendo a prostaciclina a mais importante neste órgão (FARMER et al., 1987). Mediadores broncoconstrictores como a histamina e a ACh, são liberados

de forma exacerbada quando em condições patológicas, como na asma brônquica (GROSS, 1988).

Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo sejam acometidas por asma (LAMBRECHT; HAMMAD, 2015). Nos últimos anos, a prevalência e a incidência dessa doença têm crescido em grandes proporções, não somente devido à influência genética, mas principalmente devido a um grande número de fatores de risco ambientais e de estilo de vida adotados pela sociedade (NUNES; PEREIRA; ALMEIDA, 2017). Dessa forma, substâncias que atuem relaxando o músculo liso das vias aéreas podem ser importantes no combate à asma.

A investigação do efeito espasmolítico do EL-MeOH<sub>PA</sub> em traqueia isolada de rato (Gráfico 2) revelou uma atividade relaxante dependente de concentração, contudo o extrato foi mais potente em relaxar a traqueia de rato na presença ( $CE_{50} = 139,4 \pm 17,4 \mu\text{g/mL}$ ) do que na ausência ( $CE_{50} = 255,9 \pm 32,0 \mu\text{g/mL}$ ) de epitélio funcional, sugerindo uma possível participação dos fatores relaxantes derivados do epitélio no efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> nesse órgão. Estudos com a espécie *Operculina turpethum*, também pertencente à família Convolvulaceae, apresentaram atividade espasmolítica de maneira dependente de concentração em traqueia isolada de rato, resultado similar ao expresso neste trabalho (SHAREEF et al., 2014).

Buscando-se avaliar um possível efeito tocolítico, investigou-se a ação do extrato sobre a musculatura lisa uterina. A parede uterina é constituída por três camadas: perimétrio, miométrio e endométrio. A mais externa é denominada perimétrio e é responsável pelo revestimento epitelial do órgão. A camada intermediária e mais espessa é o miométrio, que são feixes entrelaçados de fibras musculares lisas envolvidas em tecido conjuntivo. O crescimento e alongamento dessa camada durante o período gravídico favorece um ambiente protetor para o feto, além de atuar no processo de contração durante o trabalho de parto. O endométrio é a camada mais interna formada por um revestimento epitelial e um tecido conjuntivo (estroma endometrial) (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990; GRUBER; O'BRIEN, 2011; RIBEIRO, 2013).

Diversos problemas como abortos, partos prematuros, hemorragias e cólicas uterinas estão relacionados a uma desregulação da contratilidade desse músculo (WORD, 1995; WRAY et al., 2001; SHMYGOL, WRAY, 2004). Com isso,

substâncias que agem desencadeando um efeito tocolítico no músculo liso uterino podem ser utilizadas para o tratamento de desordens que afetam este órgão.

Dessa forma, foi observado que o EL-MeOH<sub>PA</sub> inibiu de maneira equipotente as contrações fásicas induzidas tanto por ocitocina ( $CI_{50} = 280,8 \pm 44,9 \mu\text{g/mL}$ ) quanto por CCh ( $CI_{50} = 253,8 \pm 54,6 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 3), sugerindo que o extrato não está agindo em nível de receptores (OT e M<sub>3</sub>), mas sim em um passo comum na via de sinalização desses dois agonistas contráteis.

Através do músculo liso intestinal é possível realizar o estudo de mecanismos de ação de substâncias que possam vir a ser utilizadas no tratamento de processos fisiopatológicos, como constipação, diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008). A diarreia é um sintoma comum a uma grande diversidade de doenças gastrintestinais, devido a isso se tornou um importante desafio à saúde pública em regiões subdesenvolvidas do mundo (SURAWICZ, 2010). A etiologia está relacionada a vírus, bactérias, parasitas, intoxicação alimentar ou medicamentos (ESTRADA-SOTO et al., 2007). Um aumento da motilidade intestinal e/ou da secreção da mucosa gastrintestinal aumenta a fluidez das fezes, caracterizando o processo diarreico (GURGEL, 2000).

Diversos distúrbios do músculo liso no trato gastrintestinal já foram descritos em estudos utilizando íleo e duodeno de rato (IRIE et al., 1991; MORADI et al., 2013), duodeno de cachorro (TODA; BABA; OKAMURA, 1990) e jejuno e esôfago humano (ZHANG; PATERSON, 2001; ZYROMSKI et al., 2001), e o tratamento tem sido relacionado à diminuição das concentrações intracelulares de cálcio. Devido a isso, frequentemente tem-se estudado os efeitos miorelaxantes de plantas medicinais como uma alternativa aos medicamentos de alto custo utilizados no tratamento dessas doenças (CHOKRI et al., 2010; ALI et al., 2014).

Investigando-se uma possível atividade espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia (Gráfico 4), foi evidenciado que o extrato inibiu as contrações fásicas de maneira dependente de concentração, sendo apenas aproximadamente 1,5 vezes mais potente em antagonizar as contrações induzidas por histamina ( $CI_{50} = 124,8 \pm 18,1 \mu\text{g/mL}$ ) do que por CCh ( $CI_{50} = 197,9 \pm 23,8 \mu\text{g/mL}$ ). Essa pequena alteração na potência relaxante, sugere que o extrato esteja agindo em um passo comum na via de sinalização desses dois agonistas contráteis, e não em nível de receptor histaminérgico.



Resultados semelhantes foram observados para a espécie da família Convolvulaceae *Argyreia speciosa*, que apresentou efeito espasmolítico em útero de rata e íleo de cobaia (BHAKUNI et al., 1990; GALANI; PATEL; PATEL, 2010).

Diante dos resultados da triagem preliminar farmacológica em músculos lisos tônicos e fásicos, na qual o EL-MeOH<sub>PA</sub> se mostrou mais potente em traqueia de rato e em íleo de cobaia do que em aorta de rato e útero de rata, decidiu-se avaliar o efeito relaxante do extrato também sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em íleo de cobaia, assim como foi avaliado em traqueia de rato, para a partir daí, elegermos um órgão para prosseguir com o seu estudo de mecanismo de ação.

Tendo em vista que o íleo é um órgão que apresenta uma contração bifásica, ou seja, possui uma contração rápida e transiente (fásica), seguida por uma contração sustentada que acontece mais lentamente (tônica) (ABDEL-LATIF, 1989; BOLTON, 1979), comparou-se o efeito do extrato frente às contrações fásicas (Gráfico 4) com seu efeito observado sobre as contrações tônicas.

Com isso, foi possível observar que o EL-MeOH<sub>PA</sub> relaxou de maneira equipotente e dependente de concentração o íleo de cobaia pré-contráído tanto com KCl ( $CE_{50} = 53,5 \pm 5,7 \mu\text{g/mL}$ ), como o CCh ( $CE_{50} = 49,6 \pm 7,2 \mu\text{g/mL}$ ) e a histamina ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 5). A partir desses resultados, comparou-se o efeito relaxante do extrato sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em traqueia de rato e íleo de cobaia, constatando-se uma potência cerca de 3 vezes maior em íleo de cobaia. Dessa forma, optou-se por seguir com a investigação do mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia.

Tendo em vista que, sobre as contrações tônicas, o extrato relaxou o íleo de cobaia de maneira equipotente quando pré-contráído com KCl, CCh e histamina, pode-se sugerir que o EL-MeOH<sub>PA</sub> age em um passo comum na via desses agentes contráteis. Com isso, levantou-se a hipótese de que o extrato estaria inibindo o influxo de cálcio através dos Cav. Para tal, foram induzidas curvas cumulativas concentrações-resposta ao CaCl<sub>2</sub> em meio despolarizante (alto K<sup>+</sup>) nominalmente sem Ca<sup>2+</sup>, na presença e na ausência das diferentes concentrações do EL-MeOH<sub>PA</sub>.

Devido a despolarização causada pela alta [K<sup>+</sup>]<sub>e</sub>, ocorre a abertura dos Cav, permitindo o influxo de Ca<sup>2+</sup>, levando ao processo de contração, principalmente pelo Ca<sup>2+</sup> oriundo do meio extracelular (REMBOLD, 1996). Neste protocolo, observou-se que as curvas controle cumulativas ao CaCl<sub>2</sub> na presença do EL-MeOH<sub>PA</sub> foram

deslocadas para a direita de forma não paralela, com redução do  $E_{\max}$  e da potência contrátil do  $\text{CaCl}_2$  (Gráfico 6). Isto sugere uma inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Cav}$  no efeito espasmolítico promovido pelo EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo isolado de cobaia.

Resultados semelhantes foram observados por Gilani et al. (2008) com o  $\beta$ -sitosterol (um dos compostos isolados desse extrato) no músculo liso das vias urinária, aérea e do trato gastrointestinal, constatando um possível bloqueio dos  $\text{Cav}$ .

A família de canais de cálcio dependentes de voltagem ( $\text{Cav}$ ) serve como principal transdutor das alterações de potenciais da membrana da superfície celular em transientes locais intracelulares de cálcio que iniciam diferentes eventos fisiológicos. Eles medeiam o influxo de cálcio em resposta à despolarização da membrana e regulam processos intracelulares, como propagação do potencial de ação, contração, secreção, neurotransmissão e expressão gênica em muitos tipos diferentes de células. Existem dez membros da família de  $\text{Cav}$  que foram caracterizados em mamíferos, e eles desempenham papéis distintos na transdução de sinal celular (CATTERALL 2011; CATTERALL et al., 2019).

Os  $\text{Cav}$  formam complexos hetero-oligoméricos. A subunidade  $\alpha 1$  é formadora de poros e fornece o local de ligação para praticamente todos os agonistas e antagonistas. As 10 subunidades  $\alpha 1$  clonadas podem ser agrupadas em três famílias:  $\text{Cav}1$ , os canais sensíveis à di-hidropiridina ativados em alta tensão (tipo L ou  $\text{Cav}1.1$ , 1.2, 1.3 e 1.4);  $\text{Cav}2$ , os canais insensíveis à di-hidropiridina ativados em alta tensão ( $\text{Cav}2.1$ , 2.2 e 2.3); e  $\text{Cav}3$ , os canais ativados a baixa tensão (tipo T,  $\text{Cav}3.1$ , 3.2 e 3.3). Cada subunidade  $\alpha 1$  possui quatro repetições homólogas (I-IV), cada repetição tendo seis domínios transmembranares e uma região formadora de poros entre os domínios transmembranares S5 e S6. O *Gating* parece estar associado ao segmento S4, e contém cargas positivas altamente conservadas (CATTERALL et al., 2019).

Apesar de já ser relatado a presença dos subtipos  $\text{Cav}3.1$  e 3.2 no músculo liso, é bem descrito que os  $\text{Cav}1.2$  são os principais canais de cálcio responsáveis pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  neste músculo (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; ALEXANDER et al., 2019; CATTERALL et al., 2019).

Desta forma, buscando-se avaliar se os  $\text{Cav}1$  estariam envolvidos no mecanismo de ação espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub>, foram induzidas contrações

tônicas com o S-(-)-Bay K8644, um derivado di-hidropiridínico, ativador seletivo desses canais (LACINOVÁ, 2005).

Nesta situação, a potência relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> sobre o íleo de cobaia pré-contraído com S-(-)-Bay K8644 ( $CE_{50} = 83,2 \pm 6,4 \mu\text{g/mL}$ ) não foi alterada quando comparado com a pré-contracção induzida por KCl ( $CE_{50} = 53,5 \pm 5,7 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 7), sugerindo um possível bloqueio dos Cav1 no mecanismo de ação espasmolítica do extrato neste órgão. Porém, não se descartam que outros mecanismos possam estar envolvidos no mecanismo de ação espasmolítica do extrato em íleo de cobaia.

Os canais de K<sup>+</sup> desempenham um importante papel na regulação de diversos processos fisiológicos, tais como: regulação do potencial de membrana, do tônus vascular e da  $[Ca^{2+}]_c$ , secreção de hormônios e de neurotransmissores (MILESI et al., 2003; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

Sabendo que substâncias que ativam canais de K<sup>+</sup> podem levar a um relaxamento do músculo liso, pois regulam o potencial de membrana através do processo de hiperpolarização, resultando no fechamento dos Cav, decidiu-se investigar a participação desses canais no mecanismo de ação relaxante do extrato em íleo de cobaia (GUTTERMAN; MIURA; LIU, 2005; MARQUES, 2008).

Os resultados apontam que não houve alteração no efeito relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> no órgão testado na ausência ou na presença de CsCl (Gráfico 8), um bloqueador não seletivo dos canais de K<sup>+</sup> (CECCHI et al., 1987), uma vez que o extrato relaxou o órgão de maneira equipotente em ambas as situações ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$  e  $CE_{50} = 34,8 \pm 6,8 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Sendo assim, acredita-se que não há uma modulação positiva do extrato sobre esses canais no seu mecanismo de ação relaxante em íleo de cobaia.

A motilidade gastrointestinal também é afetada pela modulação adrenérgica. Inicialmente, os receptores adrenérgicos foram classificados em duas grandes famílias,  $\alpha$  e  $\beta$ . E dessas, surgiram os subtipos  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  com o uso de antagonistas seletivos e através do sequenciamento de aminoácidos estruturais (LANGER, 1974; STARKE, 1981; SILVA, ZANESCO, 2010). Esses receptores medeiam ações fisiológicas das catecolaminas, tais como epinefrina e norepinefrina (MCNEELL; MERSMANN, 1999; SAUNDERS; LIMBIRD, 1999). Entre essas ações cita-se a contracção do músculo liso, liberação de neurotransmissores e alteração na frequência cardíaca e contracção. Alguns estudos relatam a participação adrenérgica

no controle inibitório tônico extrínseco da motilidade intestinal (VIRAMONTES et al., 2001).

Essa atividade inibitória envolve uma modulação negativa dos processos de motilidade e secreção do intestino através da ação da noradrenalina nos receptores  $\alpha_2$  e  $\beta$ . Os receptores  $\alpha_2$  pré-sinápticos promovem a inibição da liberação tanto de noradrenalina quanto de acetilcolina. Já os receptores  $\beta$  adrenérgicos acoplam a proteína  $G_s$ , que ativa a via da ciclase de adenilil, levando a um aumento dos níveis citosólicos de cAMP, que por sua vez ativa a proteína cinase dependente de cAMP (PKA), e essa, ativa, fosforila ativando canais de  $K^+$ , bomba de cálcio da membrana plasmática (PMCA), trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) e bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA). Além de fosforilar inibindo os  $Ca_v$ , resultando numa diminuição da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$ . Também fosforila inibindo MLCK, impedindo a interação da actina com a miosina, culminando no processo de relaxamento do músculo liso (SCHRAMM, 2000; YASMIN; WINNIE; SHARKEY, 2006; DAMABI; MOAZEDI; SEYYEDNEJAD, 2010; SEDIGHI; RAFIEIAN-KOPAEI; NOORI-AHMADABADI, 2012).

Estudos envolvendo músculo liso longitudinal de íleo de rato demonstraram a participação dos receptores adrenérgicos nas atividades contráteis e relaxantes espontâneas desse órgão (SEILER et al., 2005). A resposta relaxante está relacionada à ativação de receptores adrenérgicos- $\beta$  que estão acoplados à proteína  $G_s$ , ocasionando um aumento de cAMP e, conseqüente, ativação da PKA. Como descrito anteriormente, essa proteína irá ativar diversos alvos que culminam com o relaxamento do músculo liso (BROWN; SUMMERS, 2001; YASMIN; WINNIE; SHARKEY, 2006; DAMABI; MOAZEDI; SEYYEDNEJAD, 2010).

Sabendo disso, inicialmente resolveu-se investigar se o EL-MeOH<sub>PA</sub> estaria atuando sobre os receptores adrenérgicos- $\beta$  para exercer sua ação relaxante. Utilizou-se, então, o S(-)-propranolol, um antagonista não seletivo desses receptores (BAUER, 1982), para a verificação. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre a curva controle de relaxamento do extrato ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu g/mL$ ) e a curva de relaxamento na presença do propranolol ( $CE_{50} = 46,4 \pm 6,6 \mu g/mL$ ) (Gráfico 9), descartando a ativação desses receptores na atividade espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub>.

Os receptores adrenérgicos- $\alpha_2$  estão acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , via AC, e estão localizados nos neurônios colinérgicos do plexo intestinal. Quando ativos,

levam a uma hiperpolarização com consequente redução da liberação de neurotransmissores (BAUER, 1982; BÜLBRING; TOMITA, 1987; DE PONTI et al., 1996).

Esses receptores pré-sinápticos têm sido descritos por apresentarem atividade protetora no músculo liso gastrointestinal, inibindo a liberação de ácido gástrico e a motilidade intestinal, especialmente através do bloqueio da liberação de acetilcolina (BENNETT; FRIEDMANN; VANE, 1967; GYIRES et al., 2000; JAMES et al., 2004). Com base nisso, se o EL-MeOH<sub>PA</sub> estivesse agindo sobre esse receptor seria observado uma redução de seu efeito relaxante. O que não foi visto, pois a curva controle de relaxamento do extrato ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) não foi deslocada na presença de ioimbina ( $CE_{50} = 25,7 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ ), um antagonista dos receptores adrenérgicos- $\alpha$  (FARGBEMI; SALAKO, 1982) (Gráfico 10), sugerindo que o EL-MeOH<sub>PA</sub> não atua sobre esses receptores.

Sabe-se que o NO endógeno originado de várias fontes no organismo, é capaz de regular o tônus contrátil no músculo liso intestinal. Sua liberação é estimulada por diversos agentes, em especial a acetilcolina (KUBES; MCCAFFERTY, 2000; DESSY; FERON, 2004). O NO, na célula, atua ativando a guanilil ciclase solúvel resultando no aumento da produção de cGMP, que gera a ativação da proteína cinase dependente de cGMP (PKG), que por sua vez inibe o influxo de cálcio e diminui a sensibilidade dos elementos contráteis ao cálcio (SURKS, 2007; MARTÍNEZ et al., 2011). Dessa forma, buscou-se avaliar se a via do óxido nítrico estaria participando do mecanismo de ação espasmolítica do extrato. No entanto, essa via parece não estar envolvida na resposta relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> nesse órgão, uma vez que a curva controle de relaxamento ( $CE_{50} = 36,0 \pm 5,2 \mu\text{g/mL}$ ) não foi deslocada na presença de L-NAME ( $CE_{50} = 24,0 \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 11), um inibidor não seletivo da sintase de óxido nítrico (NOS) (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2013).

As prostaglandinas resultam da ação de uma enzima denominada ciclo-oxigenase (COX) sobre o ácido araquidônico (WONG et al., 2010). Atualmente, se conhecem duas isoformas dessa enzima, a COX-1 e -2. Ambas são expressas no TGI, particularmente no músculo liso, lâmina própria de células mononucleares e neurônios mioentéricos (COSME et al., 2000; FORNAI; BLANDIZZI; ANTONIOLI, 2006). A COX-1 é constitutivamente ativa e é responsável por gerar prostaglandinas que desempenham funções reguladoras na fisiologia do organismo, especialmente

citoproteção (DEY; LEJEUNE; CHADEE, 2006). Em contrapartida, a atividade da COX-2 é induzida predominantemente por inflamação e leva a formação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), importantes vasoconstrictores da musculatura lisa, além de outros produtos. As prostaglandinas sintetizadas pelas COX, têm sido implicadas como mediadores de diversas doenças que afetam o trânsito gastrointestinal. Diante disso, sua inibição pode levar ao processo de relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal, possibilitando o tratamento de doenças (CARTER et al., 1995; FAIRBROTHER et al., 2011).

Diversos estudos demonstraram que as prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> agem estimulando neurônios colinérgicos no sistema nervoso entérico promovendo a liberação de ACh, a fim de intensificar a resposta contrátil em íleo da cobaia (BENNETT et al., 1975; NAKAHATA; ONO; NAKANISHIET, 1984). Dentre essas, a PGE<sub>2</sub> tem se destacado como um agente inflamatório envolvido em um grande número de patologias gastrointestinais que afetam o trânsito intestinal normal (FAIRBROTHER et al., 2011). Os receptores envolvidos nessas respostas são denominados EP e podem ser classificados funcionalmente a partir de seus efeitos sobre a musculatura lisa, são eles: (I) receptor EP<sub>1</sub> acoplado a G<sub>q</sub> (contrátil); (II) receptores EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> acoplados a G<sub>s</sub> (relaxantes) e (III) receptor EP<sub>3</sub> acoplado a G<sub>i</sub> (contrátil) (NAMBA; SUGIMOTO; NEGISHI, 1993; DEY; LEJEUNE; CHADEEE, 2006). Além disso, estão presentes no intestino receptores EP, cuja ativação indireta altera a motilidade através da despolarização de neurônios mioentéricos (MANNING; SHARKEY; MAWE, 2002). Dessa forma, a produção excessiva de prostaglandinas pode resultar em contrações anormais da musculatura lisa gastrointestinal com o desenvolvimento de diversos problemas. Buscando esclarecer o possível mecanismo subjacente, decidiu-se avaliar a ação do EL-MeOH<sub>PA</sub> na inibição da COX e, portanto, da via biossintética das prostaglandinas para promover seu efeito relaxante.

Foi observado que a presença da indometacina (CE<sub>50</sub> = 29,0 ± 4,0 µg/mL), um inibidor não seletivo das COXs (YAKAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 1996) não modificou a resposta relaxante do EL-MeOH<sub>PA</sub> (CE<sub>50</sub> = 36,0 ± 5,2 µg/mL) (Gráfico 12), sugerindo que não há a inibição dessa enzima na atividade antiespasmódica do extrato.

No músculo liso intestinal, a camada longitudinal apresenta células dispostas em paralelo ao eixo longo do intestino, já na camada circular, mais interna, as

células estão em paralelo com a circunferência intestinal. Dessa forma, essa musculatura lisa apresenta-se em duas camadas separadas por um sistema de neurônios, conhecido como plexo mioentérico (MAKHLOU; MURTHY, 1997).

Atualmente são conhecidos três padrões de contração: fásica, tônica e rítmica. Os mecanismos que mantêm as contrações se diferenciam em ambas as camadas e algumas características de cada tipo celular são importantes para compreender essa diferença (AL-SAFFAR; HELLSTRÖM, 2001). Por exemplo, nas células musculares lisas da camada longitudinal acontece preferivelmente a hidrólise do 4-monofosfato de fosfatidilinositol (PIP), isso porque sua membrana plasmática conta com baixas quantidades de  $PIP_2$  fazendo com que se gere quantidades mínimas de  $IP_3$ , diferentemente das células musculares lisas da camada circular que apresentam preferencialmente a hidrólise de  $PIP_2$ .

Além disso, a camada longitudinal não apresenta receptores de  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) de alta afinidade, contudo dispõe de receptores de rianodina ( $RyR$ ) de alta afinidade e exibem elevada sensibilidade ao cálcio e à ADP-ribose cíclica, o que explica a dependência do  $Ca^{2+}$  extracelular no processo de contração da camada longitudinal do íleo. Na camada circular, o RS possui canais de cálcio que funcionam como receptores de alta afinidade para o  $IP_3$  e liberam  $Ca^{2+}$  quando se tem baixa concentração citosólica de  $IP_3$  (MURTHY, 2006).

Estudos demonstram que, em células musculares lisas da camada circular, a contração inicial e o aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  não foram afetados por bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$  ou por retirada do cálcio extracelular, mas foram abolidas em células da camada longitudinal (GRIDER; MAKHLOUF, 1988; MURTHY; GRIDER; MAKHLOUF, 1991; GANOUNG, 2003). Dessa forma, demonstra-se que os mecanismos de mobilização de  $Ca^{2+}$  em células musculares das camadas circular e longitudinal são diferenciados.

Tanto na camada circular interna quanto na longitudinal externa, agonistas que se ligam a receptores acoplados a proteína G iniciam o processo de contração por uma elevação da  $[Ca^{2+}]_c$  (MURTHY; GRIDER; MAKHLOUF, 1991). O trabalho conjunto de ambas as camadas resulta no processo de peristaltismo que consiste em uma onda de contração da musculatura. A contração da camada longitudinal reduz o espaço que o quimo deve percorrer, além de ajudar a aumentar o diâmetro do intestino. Na frente da onda, a camada circular se contrai e o músculo longitudinal relaxa (FEHER, 2017).

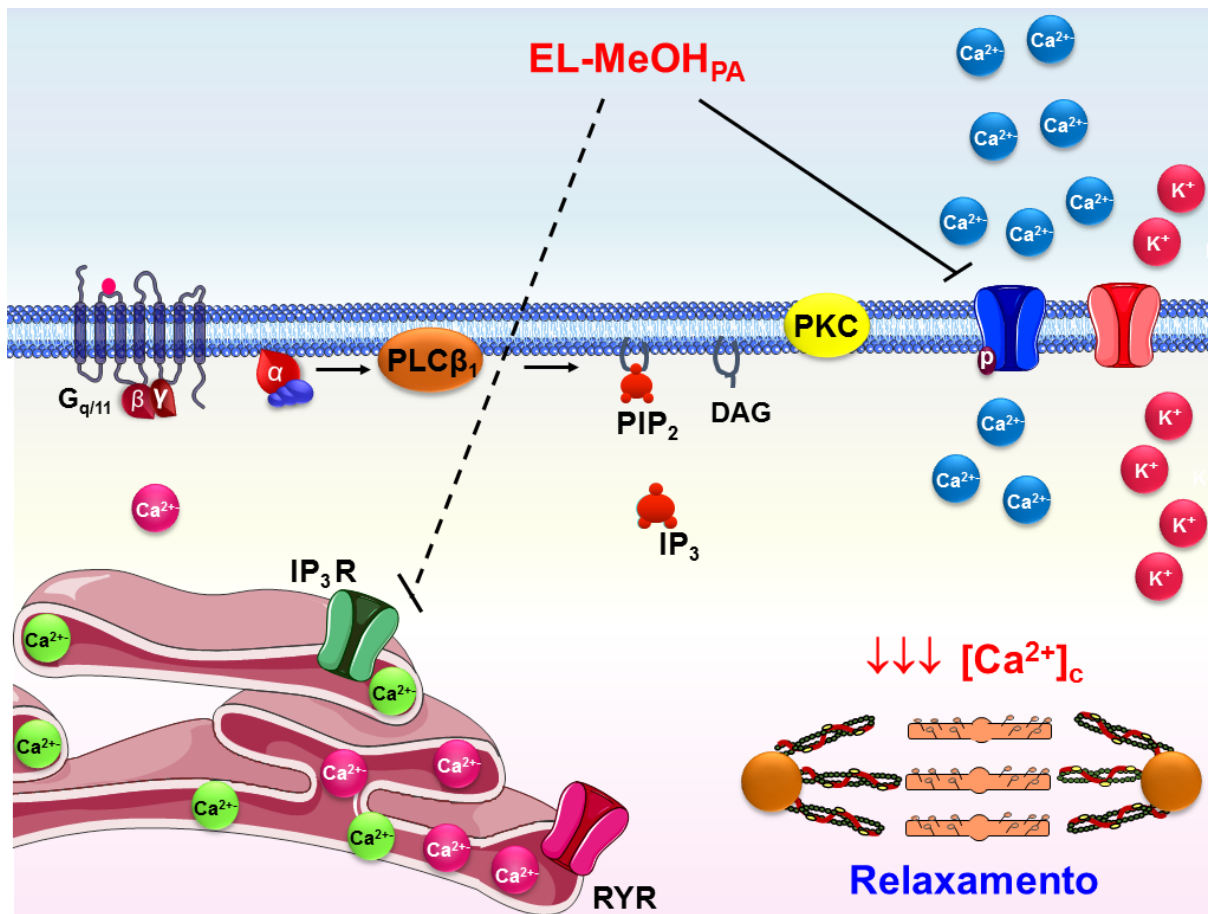
Sabendo que a utilização do íleo íntegro em protocolos experimentais colabora nos estudos da contração da camada muscular longitudinal, e tendo em vista que a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  difere em ambas as camadas (MURTHY; GRIDER; MAKHLOUF, 1991), supôs-se que o extrato poderia estar agindo impedindo a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares.

Dessa forma, investigou-se o efeito do EL-MeOH<sub>PA</sub> em relação às contrações fásicas na camada circular do íleo de cobaia. A partir dos resultados, observou-se que o extrato inibiu de maneira dependente de concentração ( $\text{CI}_{50} = 86,8 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$ ) essas contrações induzidas por histamina (Gráfico 13), sugerindo que o EL-MeOH<sub>PA</sub> age modulando negativamente a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares desse órgão. Quando comparamos esse resultado ao efeito do extrato frente às contrações fásicas induzidas por histamina no íleo íntegro ( $\text{CI}_{50} = 124,8 \pm 18,1 \mu\text{g/mL}$ , Gráfico 4), pode-se observar uma maior potência do EL-MeOH<sub>PA</sub> na camada circular. Constatando que, possivelmente, o extrato atue principalmente sobre as reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que o EL-MeOH<sub>PA</sub> possui um efeito espasmolítico não seletivo sobre os órgãos testados, e que seu mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia não envolve a ativação de canais de  $\text{K}^+$  nem das vias de sinalização adrenérgica, do NO ou das ciclo-oxigenases, porém exerce seu efeito espasmolítico por bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , via Cav1, e por modulação negativa dos mecanismos de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, levando ao relaxamento da musculatura lisa intestinal (Figura 18).



**Figura 18** – Mapa conceitual do mecanismo de ação espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> em íleo de cobaia.



O mecanismo de ação espasmolítica do EL-MeOH<sub>PA</sub> parece ser por inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , via os  $\text{Ca}_v1$  (linha contínua), e por modulação negativa dos mecanismos de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, provavelmente via receptores de IP<sub>3</sub> (linha tracejada) levando ao relaxamento da musculatura lisa intestinal.

Fonte: Autor, 2020.

## **7 CONCLUSÕES**

No estudo investigativo da atividade espasmolítica do extrato metanólico bruto de *Evolvulus linarioides* Meisn. (EL-MeOH<sub>PA</sub>), conclui-se que:

- O extrato possui atividade espasmolítica não seletiva nos órgãos testados, sendo mais potente em íleo de cobaia.

Na avaliação do mecanismo de ação em íleo isolado de cobaia, conclui-se que o EL-MeOH<sub>PA</sub>:

- Inibe o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), especialmente do tipo 1;
- Não age por antagonismo dos receptores adrenérgicos  $\alpha$  e  $\beta$ ;
- Não modula positivamente os canais de  $\text{K}^+$ ;
- Não atua pela via do óxido nítrico;
- Não modula negativamente a via das ciclo-oxigenases;
- Modula negativamente os mecanismos de liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

## **Referências**

- ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, p. 757-786, 1989.
- AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603–612, 2003.
- AKHTAR, M. S.; KASKOOS, R. A.; MIR, S. R.; ALI, M. New chromone derivative from *Evolvulus alsinoides* Linn. aerial parts. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, p. 191-194, 2009.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5ª edição. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 1, p. 142-143, 2011.
- ALEXANDER, S. P. H.; KELLY, K.; MATHIE, A.; PETERS, J. A.; VEALE, E. L.; ARMSTRONG, J. F.; FACCENDA, E.; HARDING, S. D.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; SOUTHAN, C.; BUNEMAN, O. P.; CIDLOWSKI, J. A.; CHRISTOPOULOS, A.; DAVENPORT, A. P.; FABBRO, D.; SPEDDING, M.; STRIESSNIG, J.; DAVIES, J. A.; ARUMUGAM, T. V.; BENNETT, A.; SJÖGREN, B.; SOBEY, C.; WONG, S. S. The concise guide to pharmacology 2019/20: introduction and other protein targets. **British Journal Pharmacology**, v. 176, n. 1, p. S1–S20, 2019.
- ALI, N.; ALAM, H.; KHAN, A.; AHMED, G.; SHAH, W. A.; NABI, M.; JUNAID, M. Antispasmodic and antidiarrhoeal activity of the fruit of *Rosa moschata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 485, 2014.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C. Química de Produtos Naturais: Plantas que testemunham histórias. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1117-1153, 2017.
- AL-SAFFAR, A.; HELLSTRÖM, P. M. Contractile responses to natural tachykinins and selective tachykinin analogs in normal and In amed Ileal and colonic muscle. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 5, 2001.
- 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.
- AMBIKA, A. P.; NAIR, S. N. Wound healing activity of plants from the Convolvulaceae Family. **Advances in Wound Care**, v. 8, n. 1, 2019.
- APG - ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP III. 2009. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>. Acesso em 07 de novembro de 2019.
- AQUINO-MIRANDA, G.; ARIAS-MONTAÑO, J. A. Neuromodulación e histamina: regulación de la liberación de neurotransmissores por receptores H<sub>3</sub>. **Salud Mental**, v. 35, p. 345-352, 2012.

- ARGAÉZ, A. G.; PÉREZ-AMADOR, M. C. Distribution in the plant of glycoresins and ergoline alkaloids in three species of *Ipamoema* (Convolvulaceae). **Phyton - Revista Internacional de Botânica Experimental**, v. 60, n 1-2, p. 73-76, 1997.
- ATANASOV, A.G., WALTENBERGER, B., PFERSCHY-WENZIG, E.M., LINDER, T., WAWROSCH, C., UHRIN, P. Discovery and resupply of pharmacologically active plant derived natural products: a review. **Biotechnology Advanced**, v. 33, p. 1582–1614, 2015.
- AUSTIN, D. F.; CAVALCANTI, P. B. Convolvuláceas da Amazônia. **Publ. Avulsas Mus. Paraense Emilio Goeldi**, v. 36, p. 1-134, 1982.
- BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGAHIA. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Research**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BANNISTER, R. A.; BEAM, K. G. Ca(V)<sub>1.1</sub>: The atypical prototypical voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1587–1597, 2013.
- BASHIR, S.; MEMON, R.; GILANI, A. H. Antispasmodic and antidiarrheal activities of *Valeriana haniwickii* rhizome are putatively mediated through calcium channel blockade. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.
- BAUER, V. Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum: the action of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor blocking agents. **British Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 569-572, 1982.
- BENNETT, A.; FRIEDMANN, C. A.; VANE, J. R. Release of prostaglandin E<sub>1</sub> from rat stomach. **Nature**, v. 216, p. 873-876, 1967.
- BENNETT, A.; KENNETH, G.; STOCKELY, E.; STOCKELY, H.L. Modulation by prostaglandins of contractions in guinea pig ileum. **Prostaglandins**, v. 9, p. 377-384, 1975.
- BERLINCK, R. G. S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, p. 27, 2012.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Revista Química Nova**, v. 40, n. 6, 2017.
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.
- BESSA, N. G. F.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Revista Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2018.
- BHAKUNI, D. S.; GOEL, A. K.; GOEL, A. K.; JAIN, S.; MEHROTRA, B. N.; SRIMAL, R. C. Screening of Indian plants for biological activity: Part XIV. **India Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 619-637. 1990.
- BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

- BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.
- BOORHEM, R. L.; LAGE, E. B. Drogas e extratos vegetais utilizados na fitoterapia. **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, 2012.
- BROWN, K. J.; SUMMERS, R. J.  $\beta_1$  and  $\beta_3$ -adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation In hypothyroid rat ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, p. 257-263, 2001.
- BROZOVICH, F. V.; NICHOLSON, C. J.; DEGEN, C. V.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K. G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 476-532, 2016.
- BÜLBRING, E.; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 39, p. 49-96, 1987.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Products Reports**, v. 25, n. 3, p. 475-516, 2008.
- CARTER, D.; CHAMPNEY, M.; HWANG, B.; EGLIN, R. M. Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea-pig isolated ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 280, p. 243-250, 1995.
- CARVALHO, M. H. C. Funções normais do endotélio - Uma visão geral. **Endotélio & Doenças Cardiovasculares**. Atheneu, p. 17-32, São Paulo, 2003.
- CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.
- CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, R.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. Voltage-gated calcium channels (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. **IUPHAR /BPS Guide to Pharmacology CITE**, 2019.
- CECCHI, X.; WOLFF, D.; ALVAREZ, O.; LATORRE, R. Mechanisms of  $\text{Cs}^+$  blockade in a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.
- CERVENKA, F.; KOLECKAR, V.; REHAKOVA, Z.; JAHODAR, L.; KUNES, J.; OPLETAL, L.; HYSPLER, R.; JUN, D.; KUKA, K. Evaluation of natural substances from *Evolvulus alsinoides* L. with the purpose of determining their antioxidant potency. **Journal of Enzyme inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 574-578, 2008.
- CHACKO, S.; CONTI, M. A.; ADELSTEIN, R. S. Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 74, p. 129-133, 1977.
- CHENG, J. T.; SHINOKUZA, K. Prostaglandin  $\text{E}_2$  induced the cyclic AMP-dependent release of acetylcholine in circular muscles of the isolated guinea pig ileum. **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 293-297, 1987.
- CHOBANIAN, A. V.; BAKRIS, G. L.; BLACK, H. R.; CUSHMAN, W. C.; GREEN, L. A.; IZZO, J. L. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention,

Detection, Evaluation, and Treatment of High **Blood Pressure: The JNC 7 Report**. **JAMA**, v. 289, p. 2560-2571, 2003. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/196589> Acesso em: 25 de dezembro de 2019.

CHOKRI, A.; DOUKALI, R.; EL ABIDA, K. B. E. M.; CHEIKH, R. Myorelaxant and spasmolytic effects of *Globularia alypum* L. extract on Rabbit Jejunum. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 608-615, 2010.

COLAÇO, A. L. Papel dos receptores ativados por proteases (PARs) na reatividade vascular de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **Tese de doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2010.

CONCHA, N.P., LONG, P.F. Mining the microbial metabolome: a new Frontier for natural product lead discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1078–1084, 2003.

CONSERVATION INTERNATIONAL. **Biodiversity Hotspots**. <http://www.biodiversityhotspots.org/xp/hotspots/Pages/default.aspx>. Acessado em: 04 de novembro de 2019.

COSME, R.; LUBLIN, D.; TAKAFUI, V.; LYNCH, K.; ROCHE, J. K. Prostanoids in human colonic mucosa: effects of inflammation on PGE<sub>2</sub> receptor expression. **Human Immunology**, v. 61, p. 684-696, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. **ESALQ**, p. 1-6, 2011.

D'AGOSTINI, S.; BACILIERI, S.; HOJO, H.; VITIELLO, N.; BILYNSKYJ, M. C. V.; BATISTA-FILHO, A.; REBOUÇAS, M. M. Ciclo econômico do pau-brasil-*Caesalpinia echinata* Lam., 1785. **Páginas do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 15-30, 2013.

DAMABI, N. M.; MOAZEDI, A. A.; SEYYDNEJAD, S. M. The role  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in the spasmolytic effects on rat ileum of *Petroselinum crispum* Latifolium (parsley). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 866-870, 2010.

DANIEL, E. E.; KWAN, C.Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 45, p. 159, 2001.

DANILA, C. I.; HAMILTON, S. L. Phosphorylation of ryanodine receptors. **Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 521-525, 2004.

DE PONTI, F.; GIARONI, C.; COSENTINO, M.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: from basic science to clinical applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 69, p. 59-78, 1996.



- DENTI, M. Avaliação do efeito espasmolítico do extrato aquoso de *Simarouba amara* na musculatura lisa de cobaia. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- DESSY, C.; FERON, O. Pathophysiological roles of nitric oxide: in the heart and the coronary vasculature. **Current Medicinal Chemistry – Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents**, v. 3, p. 207-216, 2004.
- DEY, I.; LEJEUNE, M.; CHADEE, K. Prostaglandin E<sub>2</sub> receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. **British Journal Pharmacology**, p. 611-623, 2006.
- DHANALEKSHMI, U. M.; POOVI, G.; KISHORE, N.; RAJA, M. D.; REDDY, P. N. Evaluation of wound healing potential and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Evolvulus alsinoides*. **Annals of Biological Research**, v. 1, p. 49-61, 2010.
- DIDION, S. P.; HEISTAD, D. D.; FARACI, F. M. Mechanisms that produce nitric oxide-mediated relaxation of cerebral arteries during atherosclerosis. **Stroke**, v. 32, n. 3, 2001.
- DREYFUS, M. M.; CHAPELA, I. H. The discovery of natural products with ECHTAY, K. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 1351-1371, 2007.
- DURASAMY, G.; GANESAN, R.; MANOKARAN, K.; KANAKASABAPATHI, D.; CHANDRASEKAR, U. Protective effect of the whole plant extract of *Evolvulus alsinoides* on glycoprotein alterations in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Acute Disease**, v. 2, p. 148–150, 2013.
- DUTTA, K.; CARMODY, M. W.; CALA, S. E.; DAVIDORFF, A. J. Depressed PKA activity contributes to impaired SERCA function and is linked to the pathogenesis of glucose-induced cardiomyopathy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, n. 8, p. 985-996, 2002.
- ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: **Manole**, 2001.
- EMPFIELD, J. R.; RUSSELL, K.; TRAINOR, D. A. Potassium channel openers: Therapeutic possibilities. **Pharmaceutical News**, v. 6, p. 23-27, 1995.
- EMRAN, T. B.; UDDIN, M. M. N.; RAHMAN, A.; UDDIN, Z.; ISLAM, M. Phytochemical, antimicrobial, cytotoxic, analgesic and anti-inflammatory properties of *Azadirachta Indica*: a therapeutic study. **Journal of Bioanalysis and Biomedicine**, v. 12, p. 1-7, 2015.
- ÉON-RIVERA, I.; HERRERA-RUIZE, M.; ESTRADA-SOTOB, S.; et al. Sedative, vasorelaxant, and cytotoxic effects of convolvulin from *Ipomoea tyrianthina*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 434–439, 2011.
- ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; TSIEN, R. W. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, n. 3, p. 533-535, 2000.
- ESTRADA-SOTO, S.; RODRÍGUEZ-AVILEZ, A.; CASTANEDA-AVILA, C.; CASTILLO-ESPANA, P.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, L.; AGUIRRE-CRESPO, F. Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium

channel blockade and NO release. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 364-370, 2007.

FAIRBROTHER, S. E.; SMITH, J. E.; BORMAN, R. A.; COX, H. M. Characterization of the EP receptor types that mediate longitudinal smooth muscle contraction of human colon, mouse colon and mouse ileum. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 23, p. 782-336, 2011.

FARGBEMI, S. O.; SALAKO, L. A. The effects of prazosin, phentolamine and phenoxybenzamine on inhibitory alpha-adrenoceptors in the guinea-pig isolated ileum. **British Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 235-243, 1982.

FARMER, S. G.; HAY, D. W.; RAEBURN, D.; FEDAN, J. S. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 231-236, 1987.

FEHER, J. Intestinal and colonic chemoreception and motility. **Quantitative Human Physiology**, 2ª edição, 2017.

FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p. 149-154, 1989.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. Construindo a história dos produtos naturais, 2006. **MultiCiência**. Disponível em: [http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_04\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf). Acesso em: 09 de dezembro de 2019.

FORNAI, M.; BLANDIZZI, C.; ANTONIOLI, L. Differential role of cyclooxygenase 1 and 2 isoforms in the modulation of colonic neuromuscular function in experimental inflammation. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, p. 938-945, 2006.

FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios. **Revista Química Nova**, v. 36, p.1605, 2013.

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

GALANI, V.; PATEL, B.; PATEL, N. *Argyrea speciosa* (Linn. f.) sweet: A comprehensive review. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 172-178 2010.

GANOUNG, F. W. Review of Medical Physiology. **McGraw - Hill Companies**, USA; 21ª ed., 2003.

GHANADIAN, M.; SADRAEI, H.; YOUSUF, S.; ASGHARI, G.; CHOUDHARY, M. I.; JAHED, M. New diterpene polyester and phenolic compounds from *Pycnocycla spinosa* Decne. Ex Boiss with relaxant effects on KCl-induced contraction in rat ileum. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 57-61, 2014.

- GHARIB, N. M. K.; ADIBPOUR, N.; NAMJOOYAN, F.; REZAEI, S.; SHAHBAZI, Z. Spasmolytic effect of *Stachys Lavandulifolia* Vahl. crude methanolic extract and fractions on rat ileum. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, p. 307-312, 2011.
- GILANI, A.; KHAN, A.; RAOOF, M.; GHAYUOR, M.; SIDDIQUI, B.; VOHRA, W.; BEGUM, S. Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effect of *Hyoscyamus niger* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and  $Ca^{2+}$  channels. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 22, p. 87-99, 2008.
- GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**. São Paulo, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.
- GODA, Y.; SHIMIZU, T.; KATO, Y.; NAKAMURA, M.; MAITANI, T.; YAMADA, T.; TERAHARA, N.; YAMAGUCHI, M. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. **Phytochemistry**, v. 44, n. 1, p. 183-186, 1997.
- GOMATHI, D.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; DEVAKI, K.; UMA, C. Efficacy of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 12, p. 39, 2013.
- GONZÁLEZ, E. A. L.; LÓPEZ, E. M.; GÓMEZ, A. A. F.; CHARÓN, A. A.; CARBALLO, A. C. R. Marcaje radioisotópico de *Evolvulus arbuscular* (Tebenque) y su farmacocinética. **Revista Información Científica**, v. 82, n. 6, 2013.
- GOYAL, P. R.; SINGH K.P. Shankhpuspi (*Evolvulus alsinoides* Linn.): a medicinal herb. **International Journal Mendel**, v. 22, p. 124, 2005.
- GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. Contraction mediated by  $Ca^{2+}$  release in circular and  $Ca^{2+}$  influx in longitudinal intestinal muscle cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 244, p. 432-437, 1988.
- GROSS, N. J. Drug therapy: ipratropium bromide. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 486-494, 1988.
- GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Utero tonic plants and their bioactive constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p.207-220, 2011.
- GUIMARÃES, J. L. ADELL, E. A.; FELÍCIO, P. E. **Estrutura e função do músculo e tecidos associados.** Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/deptos/dta/carnes/files/estrut.pdf> Acesso em: 27 de novembro de 2019.
- GUPTA, P.; AKANKSHA; SIRIPURAPU, K. B.; AHMAD, A.; PALIT, G.; ARORA, A.; MAURYA, R. Anti-stress constituents of *Evolvulus alsinoides*: an ayurvedic crude drug. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 5, p. 771-775, 2007.
- GURGEL, L. A. Avaliação experimental da atividade antidiarreica do látex do *Croton urucurana* Baill. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, 2000.
- GUTTERMAN, D. D.; MIURA, H.; LIU, H. Redox modulation of vascular tone: Focus of potassium channel mechanisms of dilation. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 25, p. 671-678, 2005.

- GYIRES, K.; MULLNER, K.; FURST, S.; RONAL, A. Z. Alpha-2 adrenergic and opioid receptor-mediated gastroprotection. **Journal of Physiology**, v. 94, p. 117-121, 2000.
- HAMMAD, H. M.; ABDALLA, S. S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 28, n. 5, p. 767-771, 1997.
- HARTSHORNE, D. J.; ITO, M.; ERDÖDI, F. Role of protein phosphatase type 1 in contractile functions: myosin phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, p. 37211-37214, 2004.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.
- HASHIBA, K. M.; SATO, T.; HIROTA, K.; HASHIMOTO, Y.; MATSUKI, A.; The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesthesia & Analgesia**, v. 89, p. 191-196, 1999.
- HAYASHI, J.; SEKINE, T.; DEGUCHI, S. Phenolic compounds from *Gastrodia rhizome* and relaxant effects of related compounds on isolated smooth muscle preparation. **Phytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 513-519, 2002.
- HILLE, B. Potassium channels and chloride channels. In: **Ionic channels of excitable membranes**. 3ª ed., capítulo 5, p. 131-167, 2001.
- HOLZER, P.; LIPPE, I. T.; TABRIZI, A. L.; LENARD, L.; BARTHO, L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 1, p. 154-161, 1997.
- INDHUMOL, V. G.; PRADEEP, H. R. SUSHRUTHA, C. K.; JYOTHI, T.; SHAVAS, M. M. Ethnomedicinal, phytochemical and therapeutic applications of *Evolvulus alsinoides* Linn. – A review. **An International Research Journal of Pharmacy and Plant science**, v. 1, 2013.
- IRIE, K.; MURAKI, T.; FURUKAWA, F.; NOMOTO, T. LNG nitro-arginine inhibits nicotine-induced relaxation of isolated rat duodenum. **European Journal of Pharmacology**, v. 202, p. 285-288, 1991.
- JACOB, S. W.; FRANCONI, C. A.; LOSSOW, W. J. Anatomia e fisiologia humana. 5ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 569, 1990.
- JAIN, S. K. Dictionary of Indian folk medicine and ethnobotany. **New Delhi: Deep Publication**, p. 92, 1991.
- JAMES, A. B.; RYAN, J. P.; PARKMAN, H. P. Effects of clonidine and tricyclic antidepressants on gastric smooth muscle contractility. **Neurogastroenterology**, v. 16, p. 143-153, 2004.
- JUNQUEIRA, M. E. R.; SIMÃO-BIANCHINI, R. O gênero *Evolvulus* L. (Convolvulaceae) no município de Morro do Chapéu, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 157-172, 2006.
- KAMM, K. E.; STULL, J. T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, p. 593-620, 1985.

- KAZEM, G. N. M.; ANVARI, E.; BADVI, M. Spasmolytic effect of *Cuscuta pentagona* fruit aqueous extract on rat ileum. **Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 9-20, 2007.
- KHAN, A.; KHAN, A. A.; JABEEN, A.; JAHANGIR, U.; PARVEEN, S. Efficacy of sankhaholi (*Evolvulus alsinoides* linn.) in the management of essential hypertension: a randomized standard control clinical study. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 7, p. 3467-3473, 2019.
- KHAN, A.; REHMAN, N.; ALKHARFY, K. M.; GILANI, A. H. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* mediated through activation of K<sup>+</sup> channels. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 6, p. 111-116, 2011.
- KHARE, C. P. Indian medicinal plants: An Illustrated Dictionary. **Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag**, p. 449-450, 2001.
- KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, p. 2165-2180, 2008.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BĂRĂNY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction, San Diego, **Academic Press**, p. 203-219, 1996.
- KUBES, P.; MCCAFFERTY, D. M. Nitric oxide and intestinal inflammation. **The American Journal of Medicine**, v. 109, n. 2, p. 150-158, 2000.
- KUMAR, M.; AHMAD, A.; RAWAT, P.; KHAN, M. F.; RASHEED, N.; GUPTA, P.; SATHIAMOORTHY, B.; BHATIA, G.; PALIT, G.; MAURYA, R. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*. **Revista Fitoterapia**, v. 81, p. 234-242, 2010.
- KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.
- KWAN, J.C., SCHMIDT, E.W. Bacterial endosymbiosis in a chordate host: long-term co-evolution and conservation of secondary metabolism. **PLOS ONE**, v. 201, n. 8, 2013.
- LACINOVÁ, L. Voltage-dependent calcium channels. **General Physiology and Biophysics**, v. 24, p. 1-78, 2005.
- LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of asthma. **Nature Immunology**, v. 16, p. 45-56, 2015.
- LANGER, S. Z. Presynaptic regulation of catecholamine release. **Biochemistry & Pharmacology**, v. 23, p. 1793-1800, 1974.
- LEKSHMI, U. M. D.; REDDY, P. N. Preliminary studies on anti-inflammatory, antipyretic, and antidiarrhoeal properties of *Evolvulus alsinoides*. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 611-618, 2011.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 6, 2007.
- LIMA, N. M.; SANTOS, V. N. C.; LA PORTA, F. A. Quimiodiversidade, bioatividade e quimiosistemática do gênero *Inga* (FABACEAE): Uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 3, p. 459-473, 2018.

- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Crotonne petae* folius on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 5, p. 539-546, 2004.
- MAHIBALAN, S.; STEPHEN, M.; NETHRAN, R. T.; KHAN, R.; BEGUM, S. Dermal wound healing potency of single alkaloid (betaine) versus standardized crude alkaloid enriched ointment of *Evolvulus alsinoides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 2851-2856, 2016.
- MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. **Cell Signal**, v. 9, p. 269-276, 1997.
- MALACHIAS, M. V. B.; PLAVNIK, F. L.; MACHADO, C. A.; MALTA, D.; NAZARIO, L. C. S.; FUCHS, S. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 1 - Conceituação, Epidemiologia e Prevenção Primária. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1-6, 2016. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066782X2016004800002&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066782X2016004800002&lng=es) Acesso em: 25 de dezembro de 2019.
- MALTA, D. C.; GONÇALVES, R. P. F.; MACHADO, I. E.; FREITAS, M. I. F.; AZEREDO, C.; SZWARCOWALD, C. L. Prevalência da hipertensão arterial segundo diferentes critérios diagnósticos, Pesquisa Nacional de Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, 2018.
- MANN, P.; TOFERN, B.; KALOGA, M.; EICH, E. Flavonoid sulfates from the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 50, n. 2, p. 267-271, 1999.
- MANNHOLD, R. K<sub>ATP</sub> channel openers: structure-activity relationships and therapeutic potential. **Medicine Research Review**, v. 24, p. 213-266, 2004.
- MANNING, B. P.; SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Effects of PGE<sub>2</sub> in guinea pig colonic myenteric ganglia. **American Journal of Physiology**, v. 283, p. 1388-1397, 2002.
- MARQUES, B. J. S. Estudo dos mecanismos implicados na vasorelaxação induzida pelos estrógenos na artéria umbilical humana. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2008.
- MARTÍNEZ, R. V.; OSORNOA, O. R.; GÓMEZA, C.; TRUJANOB, M. E. G. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1528-1532, 2011.
- MART-NEZ-PÉREZ, E. F.; JUÁREZ, Z. N.; HERNÁNDEZ, L. R.; BACH, H. Natural antispasmodics: source, stereochemical configuration, and biological activity. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1-32, 2018.
- MASOLI, M.; FABIAN, D.; HOLT, S.; BEASLEY, R. The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 469-478, 2004.
- MCNELL, R. L.; MERSMANN, H. J. Distribution and quantification of Beta-1, Beta-2, and Beta-3-adrenergic receptor subtype transcripts in porcine tissue. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 3, p. 611-621, 1999.
- MEIRA, M.; SILVA, E. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Review of the genus Ipomoea: traditional uses, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 682-713, 2012.

- MILESI, V.; RAINGO, J.; REBOLLEDO, A.; GRASSI DE GENDE, A. O. Potassium channels in human umbilical artery cells. **Journal of the Society of Gynecologic Investigation**, v. 10, p. 339-346, 2003.
- MINT, P. P.; KYI, M. M.; MYINT, S. H. NGWE, D. H. Investigation of Phytochemical Constituents and Smooth Muscle Relaxation Activity of Various Herbal Plants in Myanmar. **Journal of Complementary and Alternative Medicine Research**, v. 1, n. 4, 2016.
- MORADI, M. T.; RAFIEIAN-KOUPAEI, M.; IMANI-RASTABI, R.; NASIRI, J.; SHAHRANI, M.; RABIEI, Z.; ALIBABAEI, Z. Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 10, n. 6, p. 499-503, 2013.
- MORI, M.; KONDO, T.; TOKI, K.; YOSHIDA, K. Structure of anthocyanin from the blue petals of *Phacelia campanularia* and its blue flower color development. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 622-629, 2006.
- MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.
- MURTHY, K. S.; GRIDER, J. R.; MAKHLOUF, G. M. InsP<sub>3</sub>-dependent Ca<sup>2+</sup> mobilization in circular but not longitudinal muscle cells of intestine. **American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 261, p. 937-944, 1991.
- NAKAHATA, N.; ONO, T.; NAKANISHIET, H. Possible involvement of a product of the 5-lipoxygenase pathway in mediation of indomethacin induced inhibition of cholinergic transmission in guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 133-138, 1984.
- NAMBA, T.; SUGIMOTO, Y.; NEGISHI, M. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP<sub>3</sub> determines G-protein specificity. **Nature**, v. 365, p. 166-170, 1993.
- 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**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629, 2016.
- NIJKAMP, F. P.  $\beta$ -Adrenergic receptors in the lung: an introduction. **Life Sciences**, v. 52, p. 2073-2082, 1993.
- NOBRE, F.; COELHO, E. B.; LOPES, P. C.; GELEILETE, T. J. Hipertensão arterial sistêmica primária. **Medicina (Ribeirão Preto Online)**, v. 46, n. 3, p. 256-272, 2013.
- NOGUEIRA, R. C.; CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion Ther**, vol. 20, n. 2, p. 1-13, 2010.
- NUNES, C.; PEREIRA, A. M.; ALMEIDA, M. M. Asthma costs and social impact. **Asthma Research and Practice**, v. 3, 2017.

- OOSTSTROOM, S. J. V. A monograph of the genus *Evolvulus*. **Mededeelingen van het botanisch museum en herbarium van de rijks universiteit te Utrecht**, v. 14, p. 1-267, 1934.
- PALE, E.; MOUHOSSINE, N.; VANHAELLEN, M.; VANHAELLEN-FASTRÉ, R.; OTTINGER, R. Acylated anthocyanins from the flowers of *Ipomea asarifolia*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1433-1437, 1998.
- PALMA, A.; VILAÇA, M. M. Conflitos de interesse na pesquisa, produção e divulgação de medicamentos. **História, Ciências, Saúde – Manguinhos**, v. 19, n. 3, 2012.
- PÁSKA, C.; INNOCENTI, G.; KUNVÁRI, M.; LÁSZLÓ, M.; SZILÁGYI, L. Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. **Phytochemistry**, v. 52, n. 5, p. 879-883, 1999.
- PAULA, A. C. B.; HAYASHI, L. S. S.; FREITAS, J. C. Anti-inflammatory and antispasmodic activity of *Ipomoea imperati* (Vahl) Griseb (Convolvulaceae), **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 105-112 2003.
- PAVITHRA, P. S.; SREEVIDYA, N.; VERMA, R. S. Antibacterial and antioxidant activity of methanol extract of *Evolvulus nummularius*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 233-236, 2009.
- PEREDA-MIRANDA, R.; TAKETA, A. T. C.; VILLATORO-VERA, R. A. Alucinógenos naturais: etnobotânica e psicofarmacologia. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6 ed. (Cap. 36), Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, P. 938-940, 2007.
- PEREIRA, L. C. O. Sesquiterpenos cariofilanos e outros constituintes químicos de *Evolvulus linarioides* MEISN. (CONVOLVULACEAE). **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- PERRINO, B. A. Calcium sensitization mechanisms in gastrointestinal smooth muscle. **Journal Neurogastroenterology & Motility**, v. 22, n. 2, 2016.
- PERUSQUIA, M.; MENDOZA, S.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 63-69, 1995.
- PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Revista Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of  $\beta$ -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Medica**, v. 58, p. 19-21, 1992.
- PRESTES, M. E. B. A investigação da natureza no Brasil colônia. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental da Universidade Federal de São Paulo, 2000.
- PUCHEAULT, M. Natural products: chemical instruments to apprehend. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 7, p. 424-432, 2008.
- QUEIROGA, C. S. Novas substâncias isoladas de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae). **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de



Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintético Bioativos – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; **M. B. of Smooth Muscle Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by  $\text{CaCl}_2$ . **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life sciences**, v. 67, n. 3, p. 251-259, 2000.

RIBEIRO, F. P. R. A. Investigação da atividade espasmogênica de *Erytroxylum caatingae* Plowman em útero isolado de rata. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, da Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2013.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. In: Brasil. Ministério da Saúde. **Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica**, p. 13, 2012.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Revista Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, 2011.

SAITO, N.; TATSUZAWA, F.; YODA, K.; YOKOL, M.; KASAHARA, K.; IIDA, S.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. Acylated cyanidin glycosides in the violet-blue flowers of *Ipomoea purpurea*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1283-1289, 1995.

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

SAUNDERS, C.; LIMBIRD, L. E. Localization and trafficking of  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes in cells and tissues. **Journal Pharmacology Therapeutical**, v. 84, n. 2, p. 193-205, 1999.

SCHIMMER, O.; MAUTHNER, H. Polymethoxylated xanthenes from the herb of *Centaurium erythraea* with strong antimutagenic properties in *Salmonella typhimurium*. **Planta Medica**, v. 62, p. 561-564, 1996.

SCHIMMING, T.; JENETT-SIEMS, K.; MANN, P.; TOFERN, B.; MILSON, J.; JOHNSON, R. W.; DEROIN, T.; AUSTIN, D. F.; EICH, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 66, n. 2, p. 469-480, 2005.

SCHIMMING, T.; TOFERN, B.; MANN, O.; RICHTER, A.; JENETT-SIEMS, K.; DRAGES, B.; ASANO, N.; GUPTA, M. P. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p.1989-1995, 1998.

SCHRAMM, C. M.  $\beta$ -Adrenergic relaxation of rabbit tracheal smooth muscle: A receptor deficit that improves with corticosteroid administration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutical**, v. 292, n. 1, p. 280-287, 2000.

- SEDIGHI, M.; RAFIEIAN-KOPAEI, M.; NOORI-AHMADABADI, M. *Kelussia odoratissima* Mozaffarian inhibits ileum contractions through voltage dependent and beta adrenergic receptors. **Life Science Journal**, v. 9, n. 4, 2012.
- SEILER, R.; RICKENBACHER, A.; SHAW, S. G.; BALSIGER, B. M.  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor mechanisms in spontaneous contractile activity of rat ileal longitudinal smooth muscle. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 9, p. 227-235, 2005.
- SHAH, A. J.; ZAIDI, M. A.; HAMIDULLAH, S. H.; GILANI, A. H. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Vincetoxicum stocksii* are mediated through calcium channel blockade. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 6, p. 46-50, 2011.
- SHAREEF, H.; RIZWANI, G. H.; MANDUKHAIL, S. R.; WATANABE, N.; GILANI, A. H. Studies on antidiarrhoeal, antispasmodic and bronchodilator activities of *Operculina turpethum* Linn. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 479, 2014.
- SHIRAZI, A.; IIZUKA, K.; FADDEN, P. Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. **Journal of Biological Chemistry**, p. 31598-31606, 1994.
- SHMYGOL, A.; WRAY, S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 35, p. 501-508, 2004.
- SILVA, A. L.; ZANESCO, A. Exercícios físicos, receptores  $\beta$ -adrenérgicos e resposta vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 9, n. 2, 2010.
- SILVA, C. V. O gênero *Evolvulus* L. (Convolvulaceae) no estado de São Paulo e no Distrito Federal, Brasil. **Dissertação de Mestrado** apresentado no Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.
- SILVA, N. C. S.; VITOR, A. M.; BESSA, D. H. S.; BARROS, R. M. S. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **ÚNICA Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.
- SIMÃO-BIANCHINI, R.; FERREIRA, P.P.A. *Evolvulus* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6990>>. Acesso em: 07 de novembro de 2019.
- SINGH, A. Review of Ethnomedicinal Uses and pharmacology of *Evolvulus alsinoides* Linn. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, p. 734-740, 2008.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 82, 1325-1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.
- SRIVASTAVA, G.; MEHROTRA, R. C.; DILCHER, D. L. *Paleocene Ipomoea* (Convolvulaceae) from India with implications for an East Gondwana origin of Convolvulaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, p. 6028-6033, 2018.

- STARKE, K. Alpha-adrenoceptor subclassification. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 88, p. 199-236, 1981.
- STOTT, J. B.; JEPPE, T. A.; GREENWOOD, I. A. Kv7 potassium channels: a new therapeutic target in smooth muscle disorders. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 4, p. 413-424, 2014.
- SULTANA, R.; RAHMAN, A. H. M. M. Convolvulaceae: A taxonomically and medicinally important morning glory family. **International Journal of Botany Studies**, v. 1, n. 3, p. 47-52, 2016.
- SUN, Y. D.; BENISHIN, C. G. K<sup>+</sup> channel openers relaxes longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.
- SURAWICZ, C. M. Mechanisms of diarrhea. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 4, 2010.
- SURKS, H. K. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation. **Circulation Research**, v. 101, p. 1078-1080, 2007.
- TANG, L.; TAMER, M.; GAMAL, E.; PAYANDEH, J.; MARTINEZ, G. Q.; HEARD, T. M.; SCHEUER, T.; ZHENG, N.; CATTERALL, W. A. Structural basis for Ca<sup>2+</sup> selectivity of a voltage-gated calcium channel. **Nature**, v. 505, 2013.
- TERAHARA, N.; KONCZAK-ISLAM, I.; NAKATANI, M.; YAMAKAWA, O.; GODA, Y.; HONDA, T. Anthocyanins in callus induced from purple storage root of *Ipomoea batatas* L. **Phytochemistry**, v. 54, n. 8, p. 919-922, 2000.
- THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215-242, 2005.
- TODA, N.; BABA, H.; OKAMURA, T. Role of nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic nerve-mediated relaxation in dog duodenal longitudinal muscle strips. **Japan Journal of Pharmacology**, v. 53, p. 281-284, 1990.
- TOFERN, B.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; JAKUPOVIC, J.; EICH, E. Bonaspectins and neobonaspectins, first sesquilignans and sesquieolignans from a convolvulaceous species. **Phytochemistry**, v. 53, n. 1, p. 119-128, 2000.
- TOFERN, B.; MANN, P.; KALOGA, M.; JENETT-SIEMS, K.; WITTE, L. Aliphatic pyrrolidine amides from two tropical convolvulaceous species. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1437-1441, 1999.
- TOKI, K.; SAITO, N.; KAWANO, K.; LU, T. S.; SHIGIHARA, A.; HONDA, T. An acylated delphinidin glycoside in the blue flowers of *Evolvulus pilosus*. **Revista Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 609-612, 1994.
- TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, p. 310-316, 1987.
- VALENTÃO, P.; ANDRADEA, P. B.; SILVA, A. M.; MOREIRA, M. M.; SEABRA, R. M. Isolation and structural elucidation of 5-formyl-2,3-dihydroisocoumarin from *Centaurium erythraea* aerial parts. **Natural Product Research**, v. 17, p. 361-364, 2003.
- VALLE, J. R. A Farmacologia no Brasil, antecedentes e perspectivas. **Academia de Ciências do Estado de São Paulo**, 1978.

- VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-response curves. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.
- VELLINGIRI, V.; PERMAIAH, B. Wound healing potential of *Ipomoea carnea* Jacq. an un-explored herb used in Indian Traditional System of Medicine. **Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 1–5, 2017.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Revista Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VILELA, J. D. Mummification and medicine in ancient Egypt. **Revista Paulista de Medicina**, v. 89, p. 115-124, 1977.
- VIRAMONTES, B. E.; MALCOLM, A.; CAMILLERI, M.; SZARKA, L. A.; MCKINZIE, S.; BURTON, D. D. Effects of an  $\alpha_2$ -adrenergic agonist on gastrointestinal transit, colonic motility, and sensation in humans. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 6, p. 1468-1476, 2001.
- VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.
- VOGALIS, F.; WARD, S. M.; SANDERS, K. M. Correlation between electrical and morphological properties of canine pyloric circular. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v. 260, p.390-398, 1991.
- WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n. 8, p. 2469-2493, 2010.
- WANG, B.; DENG, J.; GAO, Y.; ZHU, L.; HE, R.; XU, Y. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review. **Revista Fitoterapia**, v. 82, p. 1141-1151, 2011.
- WEBB, R. C.; Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.
- WONG, S. L.; WONG, W. T.; TIAN, X. Y.; LAU, C. W.; HUANG, Y. Chapter 3 - Prostaglandins in action: Indispensable roles of cyclooxygenase-1 and -2 in endothelium-dependent contractions. **Advances in Pharmacology**, v. 60, p. 61-83, 2010.
- WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.
- WORD, R. A. Myosin phosphorylation and the control of miometrial contraction/relaxation. **Seminars in Perinatology**, v. 19, n. 1, p. 3-14, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on non communicable diseases 2010. **Genebra: World Health Organization**. Disponível em: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/) Acesso em: 25 de dezembro de 2019.
- WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239–246, 2001.
- YAKAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-

- selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Research**, v. 739, p. 104-110, 1996.
- YASMIN, N.; WINNIE, H. O.; SHARKEY, K. A. Distribution of adrenergic receptor in the enteric nervous system of the guinea pig, mouse and rat. **Journal of Comparative Neurology**, p. 529-553, 2006.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo, fitoterápicos e fitofármacos, biotecnologia, patente. **Editora Argos**, 2001.
- ZAGO, L. M. S. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, 2018.
- ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Review**, p. 821-867, 2015.
- ZHANG, Y.; PATERSON, W. G. Nitric oxide contracts longitudinal smooth muscle of opossum oesophagus via excitation-contraction coupling. **Journal Physiology**, v. 536, p. 133-140, 2001.
- ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. Endothelial nitric oxide synthase-independent release of nitric oxide in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 344, p. 15-22, 2013.
- ZYROMSKI, N. J.; DUENES, J. A.; KENDRICK, M. L.; BALSIGER, B. M.; FARRUGIA, G.; SARR, M. G. Mechanism mediating nitric oxide induced inhibition in human jejunal longitudinal smooth muscle. **Surgery**, v. 130, p. 489-496, 2001.

**Anexo**

**Anexo 1 – Cópia da certidão de aprovação do Projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais.**

Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

Reitoria

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da atividade espasmolítica do extrato metanólico obtido de *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae) e da substância isolada 13alfa-acetoxi-4,5-epoxi-cariofilan-8beta-ol", protocolada sob o CEUA nº 3059100918 (ID 000405), sob a responsabilidade de **Fabiana de Andrade Cavalcante e equipe; Gleice Rayanne da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 01/11/2018.

We certify that the proposal "Investigation of the spasmolytic activity of the methanolic extract obtained from *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae) and the isolated substance 13alfa-acetoxi-4,5-epoxi-cariofilan-8beta-ol", utilizing 192 Heterogenics rats (144 males and 48 females), protocol number CEUA 3059100918 (ID 000405), under the responsibility of **Fabiana de Andrade Cavalcante and team; Gleice Rayanne da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 11/01/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2018** a **02/2020** Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 2 a 3 meses N: 48
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			Peso: 200 a 300 g
Origem:	Unidade de Produção Animal IPeFarM			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 2 a 3 meses N: 144
Linhagem:	Rattus Norvegicus - Wistar			Peso: 250 a 300 g

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas.

João Pessoa, 01 de novembro de 2018

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

# Apêndice





*Certificado*

**I Simpósio Paraibano de Estudos Químicos de Produtos Naturais**

Certificamos que o trabalho **Phytochemical investigation and tocolytic activity of the methanolic extract of *Evolvulus linarioides* Meisn. (Convolvulaceae)** foi apresentado na modalidade ORAL no I Simpósio Paraibano de Estudos Químicos de Produtos Naturais, realizado pelo PPqPNSB/CCS/UFPB, no período de 9 a 11 de outubro de 2018.

**Autores:** Laiane Caline Oliveira Pereira; Rayanne Fernandes Pessoa; Gleice Rayane da Silva; Indyra Alencar Duarte Figueiredo; Josean Fachine Tavares; Vicente Carlos de Oliveira Costa; Fabiana de Andrade Cavalcante e Marcelo Sobral da Silva.

**Realização:** 9 a 11 de outubro de 2018.

*Marcus Tullius Scotti*  
 Marcus Tullius Scotti  
 Coordenador Geral

*Ana Rita Rodrigues A. Silva*  
 Ana Rita Rodrigues de Almeida Silva  
 Coordenadora Discente



