



**Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Ciências da Saúde  
Curso de Graduação em Farmácia**

**IARA LEÃO LUNA DE SOUZA**

**Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico  
bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth.  
(Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308**

**João Pessoa-PB**

**2013**

**IARA LEÃO LUNA DE SOUZA**

**Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico  
bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth.  
(Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso  
de Graduação em Farmácia, do Centro  
de Ciências da Saúde, da Universidade  
Federal da Paraíba, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

**ORIENTADORA:**

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

**João Pessoa-PB  
2013**

S729i Souza, Iara Leão Luna de.

**Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308 / Iara Leão Luna de Souza. - - João Pessoa: [s.n.], 2013.**

101 f.: il. -

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

**IARA LEÃO LUNA DE SOUZA**

**Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico  
bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth.  
(Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Coordenação do Curso  
de Graduação em Farmácia, do Centro  
de Ciências da Saúde, da Universidade  
Federal da Paraíba, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

---

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

---

**Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos**  
**Examinadora**

---

**Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras**  
**Examinador**

*Ao meu inesquecível avô, Sr. Gleuber José de Araújo Luna (in memoriam), por sempre ter estendido sua mão e seu abraço acolhedor, tendo depositado em mim a sua confiança, possibilitando a concretização dos meus ideais. Mesmo que não possa partilhar fisicamente deste momento junto a mim, creio que também realizou esta conquista. Por acreditar sempre nos meus sonhos, a você eu dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Nada é mais reconfortante do que chegar aonde sozinhos não chegaríamos. Por isso agradeço:

À Deus, pela sua presença constante na minha vida, por me confortar nas horas mais difíceis, pelo auxílio nas minhas escolhas e por ter me guiado a mais esta conquista.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, que é muito mais que minha orientadora, por ter me escolhido para fazer parte do seu grupo de pesquisa, fazendo da minha Iniciação Científica uma inspiração para o resto da vida. Como não agradecer pelos conselhos no início do curso? Obrigada por sempre me ajudar a tomar as melhores decisões, achar o melhor caminho, pelas conversas e risadas. Agradeço pela paciência, compreensão, empenho e ajuda incondicional para a conclusão desta etapa da minha vida.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela identificação botânica da espécie *Hyptis macrostachys* Benth., objeto deste estudo.

Aos Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e Dr. Josean Fachine Tavares e ao doutorando Vicente Carlos de Oliveira Costa da UFPB, pelo fornecimento do extrato e do composto isolado obtidos de *Hyptis macrostachys* Benth., objetos de estudo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robson Cavalcante Veras e à Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos por participarem desta importante etapa da minha formação e pelas contribuições a este trabalho.

A todos os Professores que fazem parte do Curso de Graduação em Farmácia, em especial a: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Bagnólia Araújo, Bárbara Santos, Eduardo Oliveira, Fábio Santos, João Vianney, Jória Guerreiro, José Rodrigues, Núbia Kelly, Robson Veras, Rossana Souto, Pablo Queiroz e Zélia Braz, por serem exemplos de professor que engrandecem o curso de Farmácia.

A todos os colegas que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do CCS/UFPB, entre eles, Alice Bezerra, Aline Brito, Ana Carolina Correia, Ana Caroline Lima, Anne Abreu, Cibério Macêdo, Fabiana Cavalcante, Fabio Monteiro, Fernando Queiroga, Filipe Oliveira, Gislaine Oliveira, Giulyane Moreno, Hannah Olga, Italo Martins, Joedna Cavalcante, Juliana Carreiro, Layanne Cabral, Luiz Henrique César, Maria da Conceição, Massilon Junior, Polyana Silva, Rafael Travassos, Rosimeire Ferreira, Sarah Rebeca, Tamyris Freire pela amizade, boa convivência e pelo suporte que me foi dado desde o dia que passei a fazer parte dessa equipe. Em especial, àqueles que estiveram também presentes fora das atividades científicas, entre eles, Aline Brito, Ana Caroline Lima, Gislaine Oliveira, Italo Martins, Joedna Cavalcante, Luiz Henrique César e Rafael Travassos por se tornarem amigos que levarei para sempre comigo.

Aos meus amigos Jeimison Duarte, Luiz Henrique Agra, Marcela Silva e Max Viana, dentre tantas pessoas que conheci em congressos, cursos, e/ou que visitaram o nosso laboratório, vocês se destacaram e se tornaram peças chaves no meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores e monitores da disciplina Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Patologia (DFP), grupo do qual fiz parte durante o período de 2011 - 2012. Aos alunos do curso de Enfermagem, Farmácia, Fisioterapia, Medicina e Odontologia da UFPB dos semestres letivos 2011.2 e 2012.1. Obrigada por proporcionarem meu primeiro contato e experiência nas suas salas de aula.

A todos os amigos e colegas da turma Tarja Preta, Farmácia 2012.2, por trazerem nos momentos de aperreios, uma solução, por fazerem dos dias cansativos, dias felizes, da espera na fila do Restaurante Universitário, um momento de descontração, enfim, por fazerem parte da minha vida nos últimos 5 anos. Em especial, Alysson Santiago (meu parceiro), Amanda Pedrosa, Andressa Lira, Danillo Macêdo, Lindemberg Damasceno, Mayza Neves, Priscila Ramos, Priscilla Maria, Romulo Pereira e Tarliane Pedrosa.

A José Crispim Duarte, Luís C. Silva e Adriano S. Cordeiro pelo auxílio técnico no Laboratório e no Biotério, possibilitando a realização dos nossos experimentos.

A Mônica por alegrar o laboratório cada vez que abre a porta do mesmo, por sempre querer nosso sucesso e por representar uma mãezona pra todos.

A todos os amigos que estiveram sempre comigo me apoiando e aos que mesmo de longe torceram por mim.

A minha família por estarem ao meu lado me dando forças pra seguir em frente, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, em especial a minha mãe Conceição de Maria Luna de Souza, aos meus irmãos Camila Luna e Ivan Luna, e as minhas avós queridas que não se cansam de me ajudar e torcer para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Iara Leão Luna de Souza*

*Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante*

**Antoine de Saint-Exupéry**

## RESUMO

O gênero *Hyptis* é distribuído mundialmente e conhecido por seus diversos usos na medicina popular. *Hyptis macrostachys* Benth., espécie conhecida popularmente como “alfavaca-brava” e “hortelã-do-mato”, é utilizada na medicina popular para o tratamento da asma, tosse e sintomas de bronquite. A partir do extrato etanólico das partes aéreas de *H. macrostachys* foi obtida uma pirona (HM308). Assim, nesse trabalho investigou-se o possível efeito espasmolítico do extrato etanólico das partes aéreas de *H. macrostachys* (HM-EtOH<sub>PA</sub>) e do seu composto isolado, o HM308, em modelos de músculo liso. Observou-se que, em útero de rata, aorta de rato e traqueia de cobaia, HM-EtOH<sub>PA</sub> apresentou efeito espasmolítico significativo, mas que não foi dependente de concentração ( $E_{max} = 76,1 \pm 5,1\%$ ;  $E_{max} = 99,1 \pm 0,9\%$ ;  $E_{max} = 43,2 \pm 5,8\%$ , respectivamente), não sendo, portanto, viável prosseguir com o estudo da atividade espasmolítica nesses órgãos. No entanto, em íleo de cobaia, HM-EtOH<sub>PA</sub> (1-729  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (CCh) ou de histamina ( $CI_{50} = 164,7 \pm 36,9$  e  $93,2 \pm 22,2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) bem como relaxou esse órgão pré-contraído com  $10^{-6}$  M de CCh ( $CE_{50} = 54,8 \pm 2,8$   $\mu\text{g/mL}$ ),  $10^{-6}$  M de histamina ( $CE_{50} = 38,9 \pm 5,5$   $\mu\text{g/mL}$ ) ou 40 mM de KCl ( $CE_{50} = 52,9 \pm 4,7$   $\mu\text{g/mL}$ ) de maneira equipotente, significativa e dependente de concentração, sugerindo que HM-EtOH<sub>PA</sub> agiria em um passo comum da via de sinalização desses agentes contráteis, que poderia ser o bloqueio dos canais de cálcio dependente de voltagem ( $Ca_v$ ). Esta hipótese foi confirmada, uma vez que HM-EtOH<sub>PA</sub> (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu as contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem cálcio, desviando as curvas controle para direita de maneira não paralela e com redução do  $E_{max}$ , além de relaxar o íleo pré-contraído com  $3 \times 10^{-7}$  M de S(-)-Bay K8644 de maneira significativa e dependente de concentração ( $CE_{50} = 444,4 \pm 159,6$   $\mu\text{g/mL}$ ). O composto HM308, similarmente ao HM-EtOH<sub>PA</sub>, mostrou-se pouco eficaz em útero de rata. Entretanto foi observado que o composto HM308 não apresentou efeito relaxante em aorta de rato e traqueia de cobaia. Interessantemente, em íleo de cobaia, HM308 ( $10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M) inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de CCh ou de histamina ( $CI_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  e  $0,9 \pm 0,05 \times 10^{-4}$  M, respectivamente) sendo mais potente em antagonizar as contrações induzidas por histamina. Dessa maneira, tanto HM-EtOH<sub>PA</sub> quanto a pirona HM308 mostraram efeito espasmolítico, sendo a ação do extrato, sobre o íleo de cobaia, provavelmente através do bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos  $Ca_v$ . No entanto não se descarta o envolvimento de outras vias na ação do extrato, bem como outros estudos são necessários para melhor caracterizar o efeito espasmolítico para o composto HM308.

**Palavras-chave:** Lamiaceae; *H. macrostachys* Benth.; espasmolítico; íleo de cobaia; canal de cálcio.

**Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308**

SOUZA, I. L. L. (2013)

Trabalho de Conclusão de Curso/Farmácia/CCS/UFPB

**ABSTRACT**

*Hyptis* are a worldwide genus cited by their many medicinal uses. *Hyptis macrostachys* Benth., a species popularly known as “alfavaca-brava” and “hortelã-do-mato”, is used in folk medicine to relief asthma, cough and bronchitis symptoms. From the aerial parts ethanolic extract from *H. macrostachys* was obtained a pyrone (HM308). Thus, in this work was investigated a possible spasmolytic effect of ethanolic extract of aerial parts from *Hyptis macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>) and its isolated compound, HM308, on smooth muscle models. We observed that on rat uterus, rat aorta and guinea pig trachea HM-EtOH<sub>PA</sub> showed a significant spasmolytic action, but not in a concentration-dependent manner ( $E_{max} = 76.1 \pm 5.1\%$ ;  $E_{max} = 99.1 \pm 0.9\%$ ;  $E_{max} = 43.2 \pm 5.8\%$ , respectively), so it is not viable proceed the investigation in these organs. However, on guinea pig ileum HM-EtOH<sub>PA</sub> (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited significantly and concentration-dependently phasic contractions induced by  $10^{-6}$  M carbachol (CCh) or histamine ( $IC_{50} = 164.7 \pm 36.9$  and  $93.2 \pm 22.2$   $\mu\text{g/mL}$ , respectively) as well as relaxed this organ in an equipotent, significant and concentration-dependent manner (1-729  $\mu\text{g/mL}$ ) when contracted by  $10^{-6}$  M CCh,  $10^{-6}$  M histamine or 40 mM KCl suggesting an action in a common step of the signalling pathway of these contractile agents, which could be the voltage-gated calcium channels ( $Ca_v$ ) blockade. This was confirmed, since HM-EtOH<sub>PA</sub> (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited  $Ca^{2+}$ -induced contractions in a medium nominally without  $Ca^{2+}$ , shifting the curves to right in a non-parallel manner with  $E_{max}$  reduction and relaxed ileum pre-contracted by  $3 \times 10^{-7}$  M S(-)-Bay K8644 in a concentration-dependent manner ( $EC_{50} = 444.4 \pm 159.6$   $\mu\text{g/mL}$ ). The compound HM308, in a similarly to HM-EtOH<sub>PA</sub>, in rat uterus HM308 showed a low efficacy. However, were observed that HM308 do not showed relaxant effect in rat aorta and guinea pig trachea. Interestingly, in guinea pig ileum, HM308 ( $10^{-5}$ – $3 \times 10^{-4}$  M) inhibited in a significant and concentration-dependent manner the phasic contractions induced by  $10^{-6}$  M CCh or  $10^{-6}$  M histamine ( $IC_{50} = 1.7 \pm 0.3 \times 10^{-4}$  and  $0.9 \pm 0.05 \times 10^{-4}$  M, respectively), being more potent in antagonize contractions induced by histamine. Thereby, both HM-EtOH<sub>PA</sub> and the pyrone HM308 showed spasmolytic effect, and the extract action, on guinea pig ileum, probably is due to calcium influx blockade through  $Ca_v$ . However additional mechanism are not discarded in the extract action, as well as other studies are necessary to better characterize the spasmolytic effect of HM308.

**Keywords:** Lamiaceae; *H. macrostachys* Benth.; spasmolytic; guinea pig ileum; calcium channel.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo representada em vermelho ..... 23
- Figura 2** – Espécie *Hyptis macrostachys* Benth..... 26
- Figura 3** – Distribuição da espécie *Hyptis macrostachys* Benth. no Brasil ..... 27
- Figura 4** – Registros originais representativos do efeito do composto HM308 ( $3 \times 10^{-5}$  –  $10^{-4}$  M) sobre a aorta de rato pré-contraída com FEN ( $3 \times 10^{-7}$  M) na ausência (**A**) e na presença (**B**) do endotélio funcional ..... 74
- Figura 5** – Registros originais representativos do efeito do composto HM308 ( $3 \times 10^{-5}$  –  $10^{-4}$  M) sobre a traqueia de cobaia pré-contraída com CCh ( $10^{-6}$  M) na ausência (**A**) e na presença (**B**) do epitélio funcional..... 75

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-5}$  M) (**A**) e por ocitocina ( $10^{-2}$  UI/mL) (**B**) em útero isolado de rata..... 73

**Gráfico 2** – Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-6}$  M) (**A**) e por histamina ( $10^{-6}$  M) (**B**) em íleo isolado de cobaia. .... 76

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Mercado de fitoterápicos, quantidade (mil unidades) e faturamento (R\$ mil), no período de 2005 a 2007 ..... 22
- Quadro 2** – Espécies de *Hyptis* utilizadas na medicina popular ..... 24

## LISTA DE ESQUEMA

**Esquema 1** – Obtenção das fases hexânica, diclorometânica e acetato de etila a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. .... 28

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>	concentração de Ca <sup>2+</sup> citosólico
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AMPc</b>	monosfato cíclico de adenosina
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>CaM</b>	calmodulina
<b>Cav</b>	canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>Cav1</b>	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
<b>CavL</b>	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
<b>CCh</b>	carbacol
<b>CEPA</b>	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>e.p.m.</b>	erro padrão da média
<b>E<sub>max</sub></b>	efeito máximo
<b>G<sub>q/11</sub></b>	proteína G <sub>q</sub> ou proteína G <sub>11</sub>
<b>GMPc</b>	monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPCRs</b>	receptores acoplados à proteína G
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina

<b>HM-EtOH<sub>PA</sub></b>	extrato etanólico bruto das partes aéreas de <i>Hyptis macrostachys</i> Benth.
<b>HM308</b>	composto isolado da fase diclorometânica do HM-EtOH <sub>PA</sub>
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trisfosfato de inositol
<b>M</b>	concentração molar (mol/L)
<b>MLC</b>	cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	cinase da cadeia leve da miosina
<b>PgPNSB</b>	Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	proteína cinase A
<b>PKG</b>	proteína cinase G
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>RS</b>	retículo sarcoplasmático
<b>UFPB</b>	Universidade Federal da Paraíba

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1 Produtos Naturais e a Fitoterapia no Brasil .....	20
1.2 A família Lamiaceae, o gênero <i>Hyptis</i> e a espécie <i>Hyptis macrostachys</i> Benth. .....	23
1.3 Fisiologia da contração e do relaxamento do músculo liso .....	28
<b>2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO EXTRATO HM-ETOH<sub>PA</sub> EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE MÚSCULO LISO (ÚTERO DE RATA, AORTA DE RATO, TRAQUEIA E ÍLEO DE COBAIA) .....</b>	<b>37</b>
2.1 Spasmolytic activity of <i>Hyptis macrostachys</i> Benth. (Lamiaceae) .....	37
<b>3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO COMPOSTO HM308 EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE MÚSCULO LISO (ÚTERO DE RATA, AORTA DE RATO, TRAQUEIA E ÍLEO DE COBAIA) .....</b>	<b>66</b>
3.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	66
3.1.1 Material .....	66
3.1.1.1 Material Botânico .....	66
3.1.1.2 Droga teste .....	66
3.1.1.3 Animais .....	66
3.1.1.4 Drogas e Reagentes .....	67
3.1.1.5 Soluções nutritivas .....	68
3.1.1.6 Preparação da solução do composto HM308 para os ensaios farmacológicos.....	68
3.1.1.7 Aparelhos .....	68
3.1.2 Métodos .....	69
3.1.2.1 Triagem Farmacológica Preliminar .....	69
3.1.2.2 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata .....	69

3.1.2.3 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com fenilefrina em aorta isolado de rato .....	70
3.1.2.4 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol em traqueia isolada de cobaia .....	71
3.1.2.5 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia .....	71
3.2 Análise estatística .....	72
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>73</b>
4.1 Triagem Farmacológica Preliminar .....	73
4.1.1 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata .....	73
4.1.2 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com fenilefrina em aorta isolado de rato .....	74
4.1.3 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol em traqueia isolada de cobaia .....	75
4.1.4 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia .....	76
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXO A –</b> Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFPB .....	101

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Produtos Naturais e a Fitoterapia no Brasil

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Além de serem usados pela população como fonte de remédios, os produtos naturais têm servido como fonte e inspiração para uma grande fração da atual Farmacopeia (KINGSTON, 2011).

A natureza, de uma forma geral, produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos, o vegetal contribui de forma bastante significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos desses de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

Estudos têm demonstrado que os produtos naturais continuam a desempenhar um papel muito importante no processo de descoberta e de desenvolvimento de medicamentos (NEWMAN; CRAGG, 2012). As plantas representam uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (VARANDA, 2006). No entanto, estima-se que das 300 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos (BRANDÃO et al., 2010).

Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em utilização clínica no mundo, sendo que as plantas contribuem com nada menos do que 25% desse total. Durante os últimos 40 anos, pelo menos uma dúzia de potentes drogas foi derivada de plantas, incluindo *Dioscorea* spp que originou a diosgenina a partir do qual derivaram os agentes contraceptivos; alcaloides de espécies de *Rauwolfia*, como a reserpina com atividade anti-hipertensiva; a pilocarpina isolada de *Pilocarpus* sp usada para tratar glaucoma e boca seca, vincristina e vinblastina, anticancerígenos obtidos da *Catharanthus roseus*; agentes laxantes de *Cassia* sp. e agente cardiotônico para

tratamento de doenças do coração obtidos a partir de espécies de *Digitalis* (GURIB-FAKIM, 2006).

O isolamento e caracterização de compostos farmacologicamente ativos de plantas medicinais continua até os dias atuais (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Foi relatado que 60% das drogas anticancerígenas e 75% das utilizadas no tratamento de doenças infecciosas são de origem natural ou derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENR, 2007).

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Dados estatísticos indicam ainda que existam 55 mil espécies de plantas (LEWINSONHN; PRADO, 2002). Somente 10% das espécies vegetais, do Brasil, têm sido avaliadas com respeito às suas características biológicas e apenas 5% com objetivos fitoquímicos (LUNA, 2005).

Além disso, nota-se nos últimos anos que o interesse em trabalhar com fitoterapia tem ressurgido. Na última década, registrou-se um aumento expressivo no interesse em substâncias derivadas de espécies vegetais, o que incentivou a pesquisa científica para a comprovação dos efeitos observados empiricamente. Outro fator que incentiva esses estudos com espécies vegetais é a complexidade na descoberta de novas drogas; atualmente são necessários de sete a dez anos para o desenvolvimento completo de um novo medicamento (FLISCHER; MONTARI, 1995; CALIXTO, 2000; SIXEL; PECINALLI, 2005).

De acordo com a Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde - Abifisa (2009), que se apresenta como a principal associação do setor, o mercado brasileiro de fitoterápicos é dimensionado a partir de um faturamento de R\$ 660,5 milhões, em 2007, e uma quantidade vendida de 37,3 milhões de unidades. Esses valores correspondem a cerca de 3% do mercado farmacêutico. O mercado de fitoterápicos, com o crescimento acelerado, teve um faturamento de quase 11%, em relação a 2005, e de mais de 18% em relação a 2006. As quantidades vendidas, também tiveram uma aceleração significativa, passando de 1,8% para 8,5% (Quadro 1).

**Quadro 1** – Mercado de fitoterápicos, quantidade (mil unidades) e faturamento (R\$ mil), no período de 2005 a 2007.

	2005		2006		2007	
	Quant.	Fat.	Quant.	Fat.	Quant.	Fat.
Fitoterápicos	33.783	504.178	34.380	559.015	37.302	660.542
Farmacêuticos	1.390.526	19.228.537	1.468.714	21.684.868	1.503.228	23.528.081
Participação relativa	2,4	2,6	2,3	2,6	2,5	2,8
Taxa de cresc. fito. (%)	-	-	1,8	10,9	8,5	18,2
Taxa de cresc. farmac. (%)	-	-	5,6	12,8	2,3	8,5

Fonte: Adaptado de HASENCLEVER et al., 2009.

Atualmente, diferente do mercado de medicamentos farmacêuticos, das 20 principais indústrias de medicamentos fitoterápicos, 14 apresentam-se como empresas nacionais, ou seja, o capital tem predominância brasileira. Apenas uma dessas empresas localiza-se fora do eixo Rio de Janeiro – São Paulo, localização semelhante ao do mercado farmacêutico (HASENCLEVER et al., 2009).

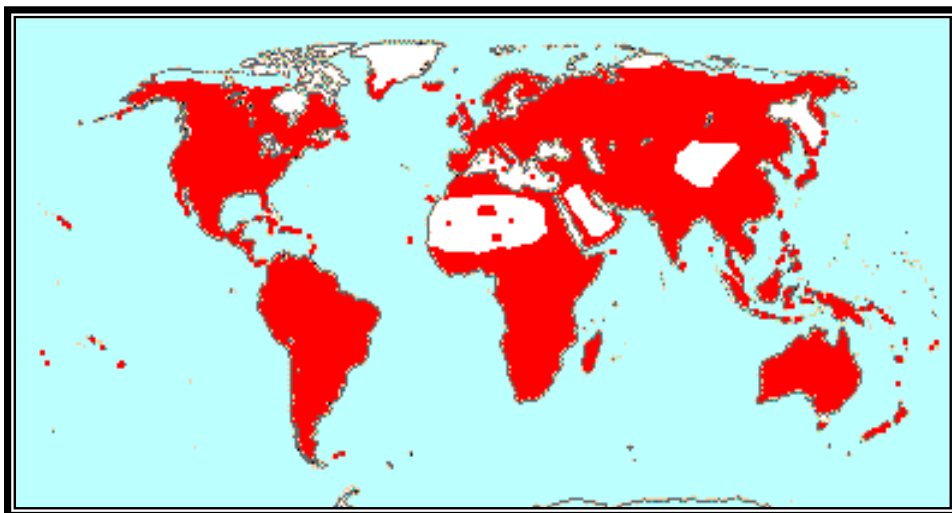
Numa comparação realizada entre as taxas de crescimento dos mercados farmacêuticos e fitoterápicos, percebeu-se que o primeiro apresentou maior dinâmica no ano de 2006, porém o crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos ultrapassou muito o mercado farmacêutico, tanto em quantidade quanto em faturamento, em 2007.

Com tamanha biodiversidade o Brasil tem condições de ser um dos principais países a adotar a Fitoterapia como uma alternativa segura e eficaz no tratamento de várias doenças. Diante desses fatos, é premente a necessidade de pesquisas que envolvam o uso de plantas medicinais consagradas no meio popular (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007).

## 1.2 A família Lamiaceae, o gênero *Hyptis* e a espécie *Hyptis macrostachys* Benth.

Inserida na grande diversidade das plantas medicinais, destaca-se a família Lamiaceae que é uma das maiores famílias de Angiospermas. Apresenta 295 gêneros e aproximadamente 7.775 espécies, sendo formada por plantas herbáceas a arbustivas. Possui uma distribuição cosmopolita e medra principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas de clima tropical a subtropical. Estima-se que pelo menos 22 gêneros e 402 espécies ocorrem no Brasil (BASÍLIO et al., 2006). O mapa a seguir (Figura 1) esboça a distribuição mundial em vermelho.

**Figura 1** – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo representada em vermelho.



Adaptado de: <http://www.mobot.org>. Acesso em: 04 de fevereiro de 2013.

Essa família tem grande importância econômica por ser fonte de óleos essenciais aromáticos, voláteis e de plantas ornamentais. Muitas espécies como o manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), o orégano (*Origanum vulgare* L.) e a sálvia (*Salvia officinalis* L.), são utilizadas como condimentos importantes em culinária, sendo apreciadas pelo aroma ou pelo sabor que concedem aos alimentos (FALCÃO; MENEZES, 2003).

Dentre os vários gêneros pertencentes a esta família, temos o *Hyptis* que compreende aproximadamente 400 espécies (SANTOS et al. 2007) distribuídas

nas Américas, África oriental, Oceania e no oeste da Índia (RAJA, 2012). *Hyptis* é um gênero rico em espécies de grande importância econômica e etnofarmacológica (FALCÃO; FERNANDES; MENEZES, 2003).

Este gênero caracteriza-se pela presença de plantas fortemente aromáticas. No nordeste do Brasil são popularmente usadas na forma de infuso, decocto e cigarro, sendo indicadas no tratamento de várias doenças especialmente das vias respiratórias e amplamente comercializadas nas feiras livres (BASÍLIO et al., 2006).

Há relatos de que espécies desse gênero apresentaram atividades anti-hiperglicêmica (MISHRA et al., 2011), antiulcerogênica (CALDAS et al., 2011), hipotensiva (SANTOS et al., 2007), anti-inflamatória e antinociceptiva (RAYMUNDO et al., 2011). Várias espécies são utilizadas na medicina popular para diversos fins, por exemplo para o tratamento de distúrbios digestivos (Quadro 2).

**Quadro 2** – Espécies de *Hyptis* utilizadas na medicina popular.

<b>Espécie</b>	<b>Parte da Planta</b>	<b>Uso Popular</b>	<b>Referência</b>
<i>H. suaveolens</i>	Raízes  Flores	Propriedades estomacais  Doenças respiratórias, digestão e dor de cabeça	MUKHERJEE, et al., 1984  AGRA et al., 2008
<i>H. capitata</i>	Partes aéreas	Resfriado, febre, asma, doenças fúngicas	LEE et al., 1988 ALMTORP et al., 1991
<i>H. verticillata</i>	Planta inteira	Dor de cabeça, estômago e distúrbios gastrintestinais	ROJAS et al., 1992

<i>H. pectinata</i>	Não informado  Flores	Antibacteriana, antimicótica e antitussígena  Asma, tosse, bronquite e doenças do fígado	MALAN et al., 1989  AGRA et al., 2008
<i>H. martiusii</i>	Folhas  Raízes	Doenças intestinais e estomacais Inflamação dos ovários	AGRA et al., 2008
<i>H. fruticosa</i>	Frutos e folhas	Gripe, resfriado, doenças respiratórias e asma	AGRA et al., 2008
<i>H. macrostachys</i>	Folhas	Asma, tosse e bronquite	AGRA et al., 2008
<i>H. umbrosa</i>	Folhas	Doenças articulares, estomacais e expectorante	AGRA et al., 2008

A constituição química de espécies desse gênero é bastante variada, tendo destaque os diterpenos, principalmente do tipo abietano, os quais tem demonstrado atividade citotóxica em células V79 (CAVALCANTI et al., 2008), antimalárica (CHUKWUJEKWU et al., 2005), antimicrobiana e antineoplásica (DELLE MONACHE et al., 1977). Espécies desse gênero também apresentam uma composição muito rica em óleos essenciais os quais tem demonstrado atividades: antioxidante (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009), antimicrobiana (SANTOS et al., 2008; YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009) e antinoceptiva (LIMA; CARDOSO, 2007).

Radicada no gênero *Hyptis* está a espécie *Hyptis macrostachys* Benth. (Figura 2), que é uma espécie arbustiva, encontrada no semiárido nordestino (Figura 3), sendo conhecida popularmente como “alfavaca-brava” e

“hortelã-do-mato” e utilizada na medicina popular para o tratamento da asma e da bronquite (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

**Figura 2** – Espécie *Hyptis macrostachys* Benth.



Fonte: TAVARES, J.F.® (2007).

As partes aéreas dessa espécie, coletadas no município de Matureia-PB, foram secas em estufa com ar circulante a uma temperatura de 40 °C, trituradas em moinho mecânico obtendo-se 3 kg do pó, que foi macerado com etanol (95%). A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida obtendo-se o extrato etanólico bruto. O extrato etanólico bruto foi submetido a uma filtração a vácuo em funil de placa porosa, utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária, como fase móvel foram utilizados os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila, puros ou em misturas binárias, em grau crescente de polaridade. As soluções obtidas nesse processo foram concentradas sob pressão reduzida em rotaevaporador a uma temperatura média de 40 °C obtendo-se três fases: 1 g da fase hexânica, 12,3 g da fase diclorometânica e 18,7 g da fase acetato de etila. Foi isolado da fase diclorometânica do extrato etanólico das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth., um composto inédito da classe das pironas que passou a ser codificado como HM308 (Esquema 1, dados não publicados) (COSTA et al., 2012).

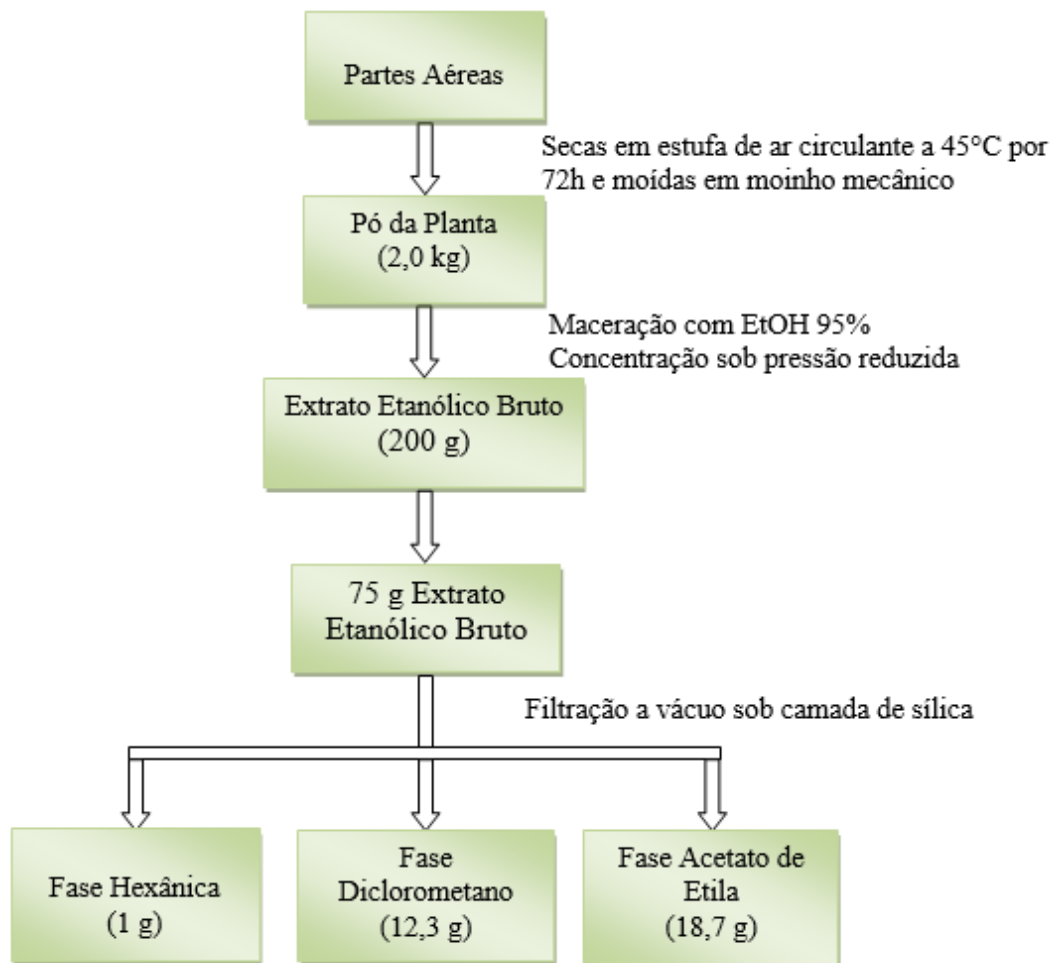
**Figura 3** – Distribuição da espécie *Hyptis macrostachys* Benth. no Brasil



Adaptado de: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?r=.125&la=-9.5&lo=-42&kind=Hyptis+macrostachys&txt=Encyclopedia+of+Life&burl=http://www.eol.org/pages/8756384&bi=/DB/logos/eol.png&b=EOL/pages/8756384&txt=Encyclopedia+of+Life&burl=www.eol.org/pages/8756384> . Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

Recentemente, Vasconcelos (2011) relatou que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *H. macrostachys* Benth. apresentou atividade antidiarreica em camundongos.

**Esquema 1** – Obtenção das fases hexânica, diclorometânica e acetato de etila a partir do extrato etanólico das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth.



Fonte: COSTA et al., 2012

### 1.3 Fisiologia da contração e do relaxamento do músculo liso

Sabendo-se da importância dos produtos naturais como fonte de substâncias potencialmente terapêuticas, há um grande interesse em se investigar fármacos com ação espasmolítica, que são aqueles que reduzem o tônus dos músculos lisos inibindo a sua contração ou induzindo o seu relaxamento.

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo, como vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga e vias aéreas. A regulação/desregulação da contração do músculo liso

desempenha um papel integral em muitos processos fisiopatológicos sendo os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o mediador de grande parte desses processos e das ações dos fármacos no organismo humano (WEBB, 2003).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$ , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997).

No músculo liso, um aumento na concentração citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) é a causa primária para a produção da contração. Esta elevação no conteúdo citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  também está envolvida na proliferação celular do músculo liso (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol (PAN; MA, 2003).

A principal porta de entrada para o  $\text{Ca}^{2+}$  que vem do meio extracelular são os  $\text{Cav}$  (CATTERALL, 2000), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). A entrada de cálcio em músculo liso visceral é controlada pelo potencial de membrana, uma vez que este determina a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (SHMIGOL; EISNER; WRAY, 1998; WRAY et al., 2001).

Pelo menos 10 tipos diferentes de  $\text{Cav}$  subdivididos em três grandes famílias foram até agora descritos: (1) sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem [ $\text{Cav}1$  (tipo L)]; (2) insensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem,  $\text{Cav}2$  (tipos N, P/Q e R); e (3) ativados por baixa voltagem [ $\text{Cav}3$  (tipo T)], (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O  $\text{Cav}1.2$  é amplamente expresso no corpo humano (músculo cardíaco, músculo liso, células endócrinas, neurônios) (CATERRALL et al., 2005) e acoplado a despolarização de membrana em muitos processos celulares essenciais, incluindo ativação da transcrição (DOLMETSCH et al., 2001), excitose (ARTALEJO; ADAMS; FOX, 1994), contração muscular (CLEEMANN; MORAD, 1991; LOPEZ-LOPEZ et al., 1995), entre outros.

Os Cav-L ou Cav1 são os principais, e muitas vezes o único tipo de canal de Ca<sup>2+</sup> expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005). Outro tipo de canal Cav envolvido com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o Cav3 ou Cav-T (SARSERO et al., 1998; CATERRALL et al., 2005).

O RS representa a mais importante fonte de Ca<sup>2+</sup> intracelular. A liberação de Ca<sup>2+</sup> desta organela se dá principalmente em decorrência da ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup> ativados por 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), os IP<sub>3</sub>R e também pelos canais de rianodina (RyR), neste, em um processo denominado de liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida pelo Ca<sup>2+</sup> (CICR). Através dessas duas vias, ocorre um aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> (DELLIS et al., 2006; McHALE et al., 2006).

O movimento dos íons K<sup>+</sup> através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca<sup>2+</sup> através dos Cav (THORNELOE; NELSON, 2005). Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração no músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K<sup>+</sup>, levando a uma hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao K<sup>+</sup>, levando a uma despolarização (KNOT et al., 1996).

A atividade dos canais de K<sup>+</sup> pode ser regulada por voltagem, Ca<sup>2+</sup> ou por neurotransmissores e conseqüentemente as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Os abridores de canais de K<sup>+</sup> são substâncias que incluem um grupo de diversas moléculas com um largo potencial terapêutico (QUEST, 1992; EMPFIELD; RUSSELL; TRAINOR, 1995). Estes compostos abrem os canais de K<sup>+</sup>, causando hiperpolarização de membrana através do aumento do efluxo de K<sup>+</sup>, desta forma causando diminuição do Ca<sup>2+</sup> intracelular livre e conseqüente relaxamento do músculo liso (QUEST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992).

No músculo liso, o tônus basal pode ser regulado por vários subtipos de canais de K<sup>+</sup>, entre eles: canais de K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem (Kv); canais de potássio ativados por Ca<sup>2+</sup> e voltagem de grande condutância (BK<sub>Ca</sub>); canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de pequena condutância (SK<sub>Ca</sub>); canais de K<sup>+</sup> retificadores de entrada (K<sub>IR</sub>); canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>), entre outros (THORNELOE;

NELSON, 2005). Sendo que, a repolarização ou a hiperpolarização da membrana ocorre devido, principalmente, a ativação dos  $BK_{Ca}$ , que são ativados quando a  $[Ca^{2+}]_c$  se eleva na ordem de  $\mu M$ , e a ativação dos  $K_v$ , em decorrência à despolarização de membrana (LEDOUX et al., 2006). Tal ativação leva a uma redução no influxo de  $Ca^{2+}$  através dos  $Cav$  por sua inibição e, conseqüentemente, a uma redução da  $[Ca^{2+}]_c$  (LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

Os canais de potássio que são inibidos por ATP intracelular foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Posteriormente, os  $K_{ATP}$  com características semelhantes foram demonstrados em muitos outros tecidos, tais como, células  $\beta$ -pancreáticas, músculo esquelético, neurônios e músculo liso (TERAMOTO, 2006). Uma característica primária deste canal é ser inibido por ATP intracelular, sulfoniluréias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de  $Ba^{2+}$  (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). Sun e Benishin (1994) mostraram que os  $K_{ATP}$  podem estar presentes em músculo longitudinal de íleo de cobaia, pois a cromacalina, nicorandil e pinacidil, ativadores desses canais, inibiram as contrações tônicas induzidas por histamina ( $0,5 \mu M$ ) e KCl ( $30 \text{ mM}$ ).

Os  $K_v$  possuem uma grande importância na manutenção do potencial de repouso no íleo de cobaia e são bastante distribuídos neste órgão (GORDIENKO et al., 1999).

Os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) contribuem para a repolarização do potencial de ação e são divididos em três grandes famílias com base em sua condutância, cinética e farmacologia (SAH; FABER, 2002): **1)**  $SK_{Ca}$ , que são bloqueados por apamina; **2)** canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ), que são bloqueados pelo clotrimazole, e **3)**  $BK_{Ca}$ , que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de tetraetilamônio ( $TEA^+$ ). Os canais do tipo  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular ( $< 1,0 \mu M$ ), em contraste aos  $BK_{Ca}$  que são ativados tanto por voltagem como por  $Ca^{2+}$  (WEI et al., 2005).

A associação entre o aumento da atividade dos canais de  $K^+$  e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e em

diversos canais de  $K^+$ , como por exemplo, os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de pequena condutância em aorta de rato (SILVA et al., 1994), os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de grande condutância em traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), de porco (YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994), em aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), em miométrio humano (MEERA et al., 1995), em artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e em íleo de cobaia (HONG; ROAN; CHANG, 1997; SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999).

Diante do exposto, compostos como os ativadores de canais de  $K^+$  podem hiperpolarizar a membrana e, indiretamente, bloquear os Cav 1, inibir o influxo de  $Ca^{2+}$ , e conseqüentemente, diminuir a  $[Ca^{2+}]_c$  (WESTON; EDWARDS, 1992; KURIYAMA et al., 1995; LEDOUX et al., 2006; LIN et al., 2006).

O aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  no músculo liso favorece a ligação do  $Ca^{2+}$  à calmodulina (CaM) e este complexo ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) para fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e promover a interação de miosina com actina, levando a contração. No músculo liso, a contração pode ser alcançada quer através da despolarização da membrana (acoplamento eletromecânico), levando a um aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  e contração muscular, ou induzida por um agonista (acoplamento fármaco-mecânico) que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Os agonistas tais como ocitocina, serotonina, carbacol e histamina se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína  $G_{q/11}$  mediando a produção de  $IP_3$ , que estimulam a liberação de  $Ca^{2+}$  do RS (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a  $[Ca^{2+}]_c$  através de receptores RyR e estimular a entrada de  $Ca^{2+}$  através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais de  $Ca^{2+}$  operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil (MORGAN, 1990). Independentemente, o processo requer uma diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$  e aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (SOMLYO et al., 1999).

O mecanismo eletromecânico para o relaxamento muscular se dá pela hiperpolarização da membrana, que pode ocorrer em função da liberação do fator relaxante derivado do endotélio/epitélio (óxido nítrico - NO), que ativa diretamente uma ciclase de guanilil solúvel ou, no caso dos agonistas que induzem relaxamento, a ligação aos seus receptores ativa diretamente uma ciclase de guanilil ou de adenilil, resultando na formação do monofosfato cíclico de guanosina ( $GMP_c$ ) ou monofosfato cíclico de adenosina ( $AMP_c$ ), respectivamente (REMBOLD, 1996). O aumento na  $[GMP_c]$  ativa a proteína cinase de  $GMP_c$  (PKG), enquanto que o aumento na  $[AMP_c]$  ativa a proteína cinase dependente de  $AMP_c$  (PKA), que resultam na ativação de canais de  $K^+$  (REMBOLD, 1996). Além disso, a hiperpolarização da membrana das células musculares lisas pode ser produzida por substâncias que abrem canais de  $K^+$  (por exemplo, cromacalina, levocromacalina e nicorandil) e, conseqüentemente, aumentam o efluxo de  $K^+$  da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais  $Cav$  1, diminuindo, portanto, a  $[Ca^{2+}]_c$ , a fosforilação da miosina e a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem a fosforilação via PKG ou PKA de vários substratos, levando a: (1) o aumento na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e a extrusão de  $Ca^{2+}$ , respectivamente, diminuindo assim a  $[Ca^{2+}]_c$ ; (2) a inativação dos  $IP_3R$ , reduzindo assim a sua capacidade de liberar o  $Ca^{2+}$  do RS; (3) diminuição da formação do  $IP_3$ , levando a uma diminuição da liberação de  $Ca^{2+}$  do RS; (4) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo  $(Ca^{2+})_4$ -CaM, causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada e assim do processo contrátil; (5) inibição dos  $Cav$ , causando uma redução da  $[Ca^{2+}]_c$  por diminuir o influxo  $Ca^{2+}$ ; (6) ativação de canais de  $K^+$ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos  $Cav$  (DANILA; HAMILTON, 2004; DUTTA et al., 2002; WOODRUM; ROPHY, 2001).

O músculo liso possui um sistema de manutenção da contração mesmo em baixa  $[Ca^{2+}]_c$ . Esse mecanismo se dá a partir da pequena proteína G (RhoA) e o seu alvo Rho cinase (ROK) que desempenham um papel importante na regulação da atividade da MLCP. A Rho cinase, uma cinase de serina/treonina, fosforila a

subunidade de ligação da miosina da MLCP, inibindo a sua atividade e, assim, promovendo o estado fosforilado da MLC. Inibidores farmacológicos da Rho cinase, como fasudil e Y-27632, bloqueiam a sua atividade por competir com o sítio de ligação do ATP na enzima (UEHATA, 1997; CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001).

A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da RhoA, dependente das proteínas G heterotriméricas tipos 12 e 13 ( $G_{12/13}$ ). A RhoA-GTP estimula a sua cinase associada ROK e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase dependente de  $Ca^{2+}$  (PKC) (EXTON, 1997). A ativação da PKC pode resultar da ativação, dependente de  $G_{q/11}$ , da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol ( $PIP_2$ ). A ROK e a PKC agem isoladas ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização do cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos de treonina 696 e 853 da subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina (MYPT1) humana (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROK pode também fosforilar o resíduo de treonina 38 da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a MLCP por mais de 1000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Nesse sentido, o interesse em investigar produtos de plantas ou seus derivados com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: hipertensão, arritmias cardíacas, angina do peito, diarreias, espasmos tanto intestinais como uterinos e asma. Além disso, como os mecanismos de contração e de relaxamento muscular envolvem mobilizações de íons cálcio e este íon medeia grande parte das ações das drogas no nosso organismo, o modelo do músculo liso se apresenta como meio relativamente simples e eficaz para se investigar mecanismos de ação de substâncias que envolvem o metabolismo do cálcio (WEBB, 2003). Diante dessas premissas, decidiu-se investigar a atividade espasmolítica do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>) e do composto

isolado HM308 da fase diclorometânica do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas desta espécie em modelo animal de musculatura lisa uterina, intestinal, vascular e das vias aéreas superiores.

# *Capítulo 1*

## **2 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO EXTRATO HM-EtOH<sub>PA</sub> EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE MÚSCULO LISO (ÚTERO DE RATA, AORTA DE RATO, TRAQUEIA E ÍLEO DE COBAIA)**

### **2.1 Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae)**

Os resultados da investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato HM-EtOH<sub>PA</sub> estão agrupados no artigo intitulado Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae), que será submetido ao Journal of Medicinal Plants Research.

**Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae)**

Iara Leão Luna de Souza<sup>1</sup>, Gislaine Alves de Oliveira<sup>1</sup>, Rafael de Almeida Travassos<sup>1</sup>, Luiz Henrique César Vasconcelos<sup>1</sup>, Ana Carolina de Carvalho Correia<sup>1</sup>, Italo Rossi Roseno Martins<sup>1</sup>, Massilon da Silva Moreira dos Santos Júnior<sup>1</sup>, Vicente Carlos de Oliveira Costa<sup>1</sup>, Josean Fechine Tavares<sup>1,2</sup>, Marcelo Sobral da Silva<sup>1,2</sup> and Bagnólia Araújo da Silva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Tel. : +55-83-32167126 Fax: +55-83-3216-7502. E-mail: bagnoliasilva@yahoo.com or bagnolia@pq.cnpq.br

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58.051-970, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

\* Author for correspondence and reprint requests

## ABSTRACT

*Hyptis* are a worldwide genus cited by their medicinal uses. *Hyptis macrostachys* Benth. a species popularly known in Brazil as “alfavaca-brava” and “hortelã-do-mato” is used in folk medicine to relief asthma, cough and bronchitis symptoms. Thus, we investigated a possible spasmolytic effect of aerial parts ethanolic extract from *Hyptis macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>) on several smooth muscle models. We observed that on rat aorta, uterus and guinea pig trachea HM-EtOH<sub>PA</sub> did not showed relevant spasmolytic action in tested concentrations (243-729 µg/mL). However, on guinea pig ileum HM-EtOH<sub>PA</sub> (9-729 µg/mL) inhibited significantly and concentration-dependent contractions induced by carbachol (CCh) 10<sup>-6</sup> M and histamine 10<sup>-6</sup> M as well as relaxed this organ in an equipotent, significant and concentration-dependent (1-729 µg/mL) manner when pre-contracted by CCh 10<sup>-6</sup> M, histamine 10<sup>-6</sup> M and KCl 40 mM suggesting an action in a common step, which could be the voltage-gated calcium channels (Ca<sub>v</sub>) blockade. Since HM-EtOH<sub>PA</sub> (9-729 µg/mL) inhibited Ca<sup>2+</sup>-induced contractions in Ca<sup>2+</sup>-free depolarizing medium and relaxed ileum pre-contracted with S-(-)-Bay K8644 (3 x 10<sup>-7</sup> M) in a concentration-dependent manner the hypothesis of Ca<sub>v</sub> was confirmed. Thus, *Hyptis macrostachys* Benth. showed a selective spasmolytic action on guinea pig ileum by blocking Ca<sup>2+</sup> entry through Ca<sub>v</sub>.

**Keywords:** Lamiaceae; *H. macrostachys* Benth.; relaxant; antispasmodic; calcium channel.

## INTRODUCTION

Plants are a known source of chemical constituents with spasmolytic activity that relieve colicky pain, constituting a very important part of gastrointestinal motility disorders treatment such as dyspepsia (indigestion), intestinal spasms such as colic; peptic and duodenal ulceration; nausea and vomiting; constipation and irritable bowel syndrome (IBS) (Williamson et al., 1996; Sadraei et al., 2003).

Lamiaceae members have been used for centuries in folk medicine (Deo et al., 2011), being characterized as a flowering family and also called of mint family (Harley et al., 2004). The *Hyptis* genus includes around 400 species distributed in Americas, West Africa, Fiji Island (Oceania) and western India (Raja, 2012). In Brazil, *Hyptis* genus is found in northern region and these genus members have high economic importance since they are source of aromatic essential oils (Falcão and Menezes, 2003).

Some *Hyptis* species presented interesting biological activities such as anti-hyperglycemic (Mishra et al., 2011), antiulcerogenic (Caldas et al., 2011), hypotensive (Santos et al., 2007), anti-inflammatory and antinociceptive activities (Raymundo et al., 2011). Additionally, other species showed spasmolytic effect as *H. capitata* used on folk medicine for asthma treatment (Almtorp et al., 1991) and *H. suaveolens* used for dysmenorrhoea treatment (Agra et al., 2007).

*Hyptis macrostachys* Benth. is a species found in semi-arid region of Brazil, popularly known as “alfavaca-brava” and “hortelã-do-mato”. In folk medicine, its aerial parts are used orally to relief symptoms in asthma, cough and bronchitis, being consumed as tea made from boiled leaves or as syrup (Agra et al., 2008).

Based on ethnopharmacological uses and spasmolytic activity related for *Hyptis* genus and *Hyptis macrostachys* Benth., we aimed to investigate a possible

spasmolytic action to this species on guinea pig ileum and trachea, rat uterus and male rat aorta and so contribute to Lamiaceae pharmacological studies.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant Material**

*Hyptis macrostachys* Benth. was collected in Matureia municipality, Paraíba, in March 2009 and identified by Maria de Fátima Agra (PhD) of the Department of Botany of Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A voucher specimen was deposited in the Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) under the identification code AGRA 6947.

### **Extraction**

The collected plant material was dried in a stove with circulating air at 40°C temperature and then was chopped by a mechanical mill. The fine powdered from aerial parts (3.0 kg) was macerated with ethanol (95%). The extraction solution was concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator and was obtained 200 g of ethanolic extract of aerial parts from *Hyptis macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>).

### **Drugs and salts**

Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), calcium chloride bihydrate (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O), potassium chloride (KCl) and magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) were purchased from Vetec Química Fina Ltda. (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Monosodium phosphate-1-hydrate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) and monopotassium

phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) were purchased from Nuclear (São Paulo, Brazil). Glucose and sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) were purchased from Dinâmica (São Paulo, Brazil). Sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ) was purchased from Fmaia (São Paulo, Brazil).

Histamine dihydrochloride, Cremophor EL<sup>®</sup>, diethylstilbestrol, oxytocin, acetylcholine (ACh), arachidonic acid (AA) and phenylephrine hydrochloride (Phe) were obtained from Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Ethanol PA was purchased from Reagen Ltda. (Colombo, PR, Brazil). Carbamylcholine hydrochloride (CCh) was purchased from Merck & Co., Inc. (Whitehouse Station, NJ, USA). All substances were dissolved in distilled water except for HM-EtOH<sub>PA</sub>, which was solubilized in Cremophor EL<sup>®</sup> (3%), dissolved in distilled water to the concentration of 10 µg/mL, and re-diluted in distilled water as required for each experimental protocol. The final Cremophor EL<sup>®</sup> concentration in the organ-bath never exceeded 0,01% (v/v).

### **Animal and organ manipulation**

Experiments were performed with trachea rings and ileum segments of guinea pigs (*Cavia porcellus*, 300-500 g), rat uterus (150-250 g) and male rat aorta (250-350 g) (*Rattus norvegicus*) from bioterium Prof. Thomas George of Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB. The animals had full access to food and water, were kept in rooms at  $21 \pm 1$  °C submitted to a 12 h light-dark cycle. Adult guinea pigs of both sexes were fasted for 18 h before the experiments (only water available). Adult female rats were treated with diethylstilbestrol (1.0 mg/kg s.c.) 24 h before the experiments for estrus induction. All experimental procedures were performed in accordance with guidelines approved by Animal Research Ethic Committee of UFPB (protocol: 0506/05).

Animals were euthanized by cervical dislocation. Organs were immediately removed, cleaned of adhering fat and connective tissue and suspended under organ baths containing the following physiological solutions: modified Krebs for ileum, Locke-Ringer for uterus and Krebs for trachea and aorta, kept under appropriate temperature (37 °C for ileum, trachea and aorta, and 32 °C for uterus) and continuously aerated with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The solutions composition (mM) were: Krebs: NaCl (118), KCl (4.55), MgSO<sub>4</sub> (5.7), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.1), CaCl<sub>2</sub> (2.52), NaHCO<sub>3</sub> (25), glucose (11); modified Krebs: NaCl (117), 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), NaHCO<sub>3</sub> (25), glucose (11); Locke Ringer: NaCl (154), KCl (5.63), MgCl<sub>2</sub> (2.1), CaCl<sub>2</sub> (2.16), NaHCO<sub>3</sub> (5,95), glucose (5.55). The pH was adjusted to 7.4.

All organs were suspended in 5 ml organ baths under resting load of 1.0 g. To register isometric contractions, organs were suspended in steel rods, connected to a force transducer (FORT-10) attached to an amplifier (TMB4M, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) and connected to an A/D converter into a PC running Biomed<sup>®</sup> software (BioData, Brazil). To isotonic contractions, organs were suspended by cotton yarn and recorded on smoked drum through levers coupled to kymographs.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on phenylephrine-induced tonic contractions in rat aorta in both absence and presence of endothelium**

After a 60 min resting period, the aortic rings were contracted with phenylephrine ( $3 \times 10^{-7}$  M) and the isometric tension was recorded. When a stable contraction was attained (15 - 20 min), acetylcholine ( $10^{-6}$  M) was added to the organ bath to confirm the presence of functional endothelium (Furchgott and

Zawadzki, 1980). Endothelium functionality was confirmed by the presence of acetylcholine-induced relaxation (above 50% of maximal tension). In some aortic rings, the luminal surface was low rubbed with Krebs-wet cotton to remove the endothelial layer. The absence of functional endothelium was confirmed by the absence of acetylcholine-induced relaxation or when the relaxation was inferior to 10% of maximal tension. During the tonic phase of a second response to phenylephrine, HM-EtOH<sub>PA</sub> was cumulatively added as an attempt to obtain concentration-relaxation curves in both absence and presence of functional endothelium. The relaxant effect induced by HM-EtOH<sub>PA</sub> was expressed as the reverse percentage of the initial contraction force elicited by phenylephrine.

#### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on carbachol-induced tonic contractions in guinea pig trachea in both absence and presence of epithelium**

After a 60 min resting period, the tracheal rings were contracted with CCh ( $10^{-6}$  M) and the isometric tension was recorded. When a stable contraction was attained (15 - 20 min), arachidonic acid ( $10^{-4}$  M) was added to the organ bath to confirm the presence of epithelium (TSCHIRHART et al., 1987). Epithelium functionality was confirmed by the presence of arachidonic acid-induced relaxation (above 50% of maximal tension). In some tracheal rings, the luminal surface was gently rubbed with Krebs-wet cotton to remove the epithelial layer. The absence of epithelium was confirmed when arachidonic acid-induced relaxation was absent or when the relaxation was inferior to 10% of maximal tension. During the tonic phase of a second response to CCh, HM-EtOH<sub>PA</sub> was cumulatively added as an attempt to obtain concentration-relaxation curves in both absence and presence of

epithelium. The relaxant effect induced by HM-EtOH<sub>PA</sub> was expressed as the reverse percentage of the initial contraction force elicited by CCh.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on oxytocin and carbachol-induced phasic contractions in rat uterus**

After a 40 min stabilization period, two similar dose-response curves were obtained with oxytocin ( $10^{-2}$  IU/mL) and CCh ( $10^{-5}$  M). The contraction process was repeated until a stable response to oxytocin or CCh was obtained. HM-EtOH<sub>PA</sub> effects were then determined by pre-incubating the uterine strips for 15 min with a single concentration of the extract in independent experiments before adding oxytocin or CCh.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on histamine and carbachol-induced phasic contractions in guinea pig ileum**

After a 30 min stabilization period, two similar dose-response curves were obtained with submaximal concentration to CCh ( $10^{-6}$  M) and histamine ( $10^{-6}$  M). The contraction process was repeated until a stable response to CCh or histamine was obtained. HM-EtOH<sub>PA</sub> effects were then determined by pre-incubating the ileum strips for 15 min with a single concentration of the extract in independent experiments before adding CCh or histamine.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on KCl, histamine and carbachol-induced tonic contractions in guinea pig ileum**

After the stabilization period, a contraction was induced with KCl (40 mM), CCh ( $10^{-6}$  M) or histamine ( $10^{-6}$  M). During the tonic phase, HM-EtOH<sub>PA</sub> was

cumulatively added as an attempt to obtain concentration-relaxation curves in different preparations. The relaxant effect induced by HM-EtOH<sub>PA</sub> was expressed as the reverse percentage of the initial contraction force elicited by CCh.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on CaCl<sub>2</sub>-induced contractions in a depolarizing nominally Ca<sup>2+</sup>-free medium in guinea pig ileum**

After the appropriated stabilization period, the modified Krebs solution was replaced by a depolarizing Ca<sup>2+</sup>-free modified Krebs solution (KCl 4 mM was increased to 40 mM with equimolar exchange for NaCl). After 45 minutes, two concentration-response curves to CaCl<sub>2</sub> (10<sup>-6</sup> – 10<sup>-1</sup> M) were constructed in absence of HM-EtOH<sub>PA</sub>. After washing, the tissues were pre-incubated with different concentrations of HM-EtOH<sub>PA</sub> for 15 minutes and a new CaCl<sub>2</sub> concentration-response curve was constructed. The maximal contraction obtained with CaCl<sub>2</sub> concentration-response curve was considered to be 100% (control), and all contractions were assessed referring to it. Each preparation was exposed to a single concentration of HM-EtOH<sub>PA</sub>.

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on S-(-)-Bay K8644-induced tonic contractions in guinea pig ileum**

After the stabilization period, the ileum was partially depolarized by adding KCl (15 mM) for 10 minutes (Usovicz et al., 1995) and a contraction was induced with S-(-)-Bay K8644 (3 x 10<sup>-7</sup> M), a selective voltage-dependent calcium channel (Ca<sub>v</sub>) agonist to L-type or Cav1 (Ferrante et al., 1989). In the sustained tonic phase of the contraction, HM-EtOH<sub>PA</sub> was added cumulatively in different

preparations, in order to obtain a relaxation curve. The relaxation was expressed as the reversal percentage of initial contraction elicited by contractile agents.

### **Statistical analysis**

Results were statistically analyzed using Student's test and one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni correction when appropriate. Differences between values were considered significant when a calculated  $p < 0.05$ .

IC<sub>50</sub> (Molar concentration of an antagonist which produces 50% of its maximum inhibitory response) and EC<sub>50</sub> (molar concentration of an agonist which produces 50% of its maximum effective response) were calculated with nonlinear regression and used to express spasmolytic potency and maximum effect (E<sub>max</sub>) used to express spasmolytic efficacy. Values were presented as mean and Standard Error of Mean (S.E.M.) in all experiments.

All data were analyzed with GraphPad Prism software version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

## **RESULTS**

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on phenylephrine-induced tonic contractions in rat aorta in both absence and presence of endothelium**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (243 and 729 µg/mL) relaxed aorta rings pre-contracted with Phe ( $3 \times 10^{-7}$  M) in both absence (E<sub>max</sub> =  $97.4 \pm 2.6\%$ , n = 3) and presence (E<sub>max</sub> =  $99.1 \pm 0.9\%$ , n = 3) of functional endothelium (Figure 1). HM-EtOH<sub>PA</sub>

relaxant effect was reversed 60 min after its removal from organ baths (data not shown).

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on carbachol-induced tonic contractions in guinea pig trachea in both absence and presence of epithelium**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (243 and 729 µg/mL) relaxed tracheal rings pre-contracted with CCh ( $10^{-6}$  M) in both absence ( $E_{\max} = 12.8 \pm 5.6\%$ ,  $n = 3$ ) and presence ( $E_{\max} = 43.2 \pm 5.8\%$ ,  $n = 3$ ) of functional epithelium (Figure 2). HM-EtOH<sub>PA</sub> relaxant effect was reversed 60 min after its removal from organ baths (data not shown).

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on oxytocin and carbachol-induced phasic contractions in rat uterus**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (243 and 729 µg/mL) antagonized significantly phasic contractions induced by CCh ( $10^{-5}$  M) ( $E_{\max} = 71.6 \pm 5.2$  µg/mL;  $n = 3$ ) (Figure 3 A) and oxytocin ( $10^{-2}$  UI/mL) ( $E_{\max} = 76.1 \pm 5.1$  µg/mL;  $n = 3$ ) (Figure 3 B) on rat uterus. HM-EtOH<sub>PA</sub> inhibitory effect was reversed 45 min after its removal from organ baths (data not shown).

### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on histamine and carbachol-induced phasic contractions in guinea pig ileum**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (9 - 729 µg/mL) antagonized in a significant and concentration-dependent manner phasic contractions induced by CCh ( $10^{-6}$  M) ( $IC_{50} = 164.7 \pm 36.9$  µg/mL;  $n = 5$ ) (Figure 4 A) and histamine ( $10^{-6}$  M) ( $IC_{50} = 93.2 \pm 22.2$  µg/mL;  $n = 5$ ) (Figure 4 B) on guinea pig ileum. HM-EtOH<sub>PA</sub>

inhibitory effect was reversed 30 min after its removal from organ baths (data not shown).

#### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on KCl, histamine and carbachol-induced tonic contractions in guinea pig ileum**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (1 - 729 µg/mL) showed a significant, equipotent and concentration-dependent spasmolytic effect in ileum pre-contracted with KCl (40 mM) ( $EC_{50} = 52.9 \pm 4.7$  µg/mL,  $n = 5$ ), CCh ( $10^{-6}$  M) ( $EC_{50} = 54.8 \pm 2.8$  µg/mL,  $n = 5$ ) or histamine ( $10^{-6}$  M) ( $EC_{50} = 38.9 \pm 5.5$  µg/mL,  $n = 5$ ) (Figure 5). HM-EtOH<sub>PA</sub> relaxant effect was reversed 30 min after its removal from organ baths (data not shown).

#### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on CaCl<sub>2</sub>-induced contractions in a depolarizing nominally Ca<sup>2+</sup>-free medium in guinea pig ileum**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (9 - 729 µg/mL) concentration-dependently inhibited Ca<sup>2+</sup>-induced contractions in Ca<sup>2+</sup>-free depolarizing medium (figure 6). CaCl<sub>2</sub> cumulative concentration-response curves were non-parallelly shifted to the right and  $E_{max}$  reduced from 100% (control) to  $98.6 \pm 0.8$ ,  $72.4 \pm 1.6$ ,  $67.7 \pm 2.3$ ,  $16.9 \pm 2.5$  and  $2.3 \pm 0.4$  % which indicates a possible  $Ca_v$  blockade.

#### **Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on S-(-)-Bay K8644-induced tonic contractions in guinea pig ileum**

HM-EtOH<sub>PA</sub> (9 - 729 µg/mL) showed a concentration-dependent spasmolytic effect in ileum pre-contracted with S-(-)-Bay K8644 ( $3 \times 10^{-7}$  M). HM-EtOH<sub>PA</sub> was 8 folds more potent in relaxing the ileum pre-contracted with KCl

(40 mM) ( $EC_{50} = 444.4 \pm 159.6 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) than with S-(-)-Bay K8644 ( $EC_{50} = 52.4 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) (Figure 7).

## DISCUSSION

In our investigation, the ethanolic extract of aerial parts from *Hyptis macrostachys* Benth. (HM-EtOH<sub>PA</sub>) was studied on several smooth muscle models and showed a selective spasmolytic effect on guinea pig ileum and possibly the observed effect is due to blockade of the  $C_{av}$  that reduces cytosolic calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ) leading to smooth muscle relaxation.

Initially, we evaluated a possible relaxant effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on rat aorta pre-contracted by Phe in both functional endothelium absence and presence (Figure 1), but the relaxant effect was only observed in the highest concentration tested but not concentration-dependent.

In folk medicine, some species of *Hyptis* (e.g. *H. capitata*) (Almtorp et al., 1991) as well as *H. macrostachys* Benth. are used for asthma treatment (Agra et al., 2008). In our investigation we evaluated a possible activity of HM-EtOH<sub>PA</sub> on guinea pig trachea contracted by CCh in both functional epithelium absence and presence. Figure 2 showed that HM-EtOH<sub>PA</sub> relaxant effect was significant but not concentration-dependent. These findings suggested that aerial parts of *H. macrostachys* did not presented spasmolytic effect on non-sensitized (healthy) guinea pig trachea, but an action in asthma of *H. macrostachys* is not discarded being necessary studies using asthmatic animal model (e.g. sensitized guinea pigs) to confirm or refute this species usage in folk medicine.

Additionally, we evaluated a possible antispasmodic action on rat uterus since other species of *Hyptis* are used for dysmenorrhoea treatment (Agra et al., 2007) and was observed an antagonism of phasic contractions induced by CCh or oxytocin, but only in a higher concentration (Figure 3).

Interestingly, as showed in Figures 4 and 5, in guinea pig ileum HM-EtOH<sub>PA</sub> inhibited both CCh and histamine-induced contractions and relaxed this organ pre-contracted by KCl, CCh and histamine in a significant and concentration-dependent manner presenting a selective spasmolytic activity to guinea pig ileum. Furthermore, as HM-EtOH<sub>PA</sub> was equipotent in antagonize CCh or histamine-induced contractions and the fact of pharmacological potency has presented no difference in tonic contractions induced by KCl (electromechanical coupling) and carbachol or histamine (pharmacomechanical and electromechanical coupling) indicates that HM-EtOH<sub>PA</sub> is not acting at receptor level but possibly in a common step in the contraction pathway elicited by these contractile agents in guinea pig ileum.

Since ileal smooth muscle presents biphasic contraction where, in the first phase, muscle exhibits a fast and transient contraction followed by a long-lasting second phase characterized by maintained tonic contraction (Horie et al., 2005), both phasic and tonic contractions depend on extracellular Ca<sup>2+</sup> since both are inhibited in its absence (Honda et al., 1996) and the main responsible by Ca<sup>2+</sup> entry are Ca<sub>v</sub> (Rembold, 1996), we decided to evaluate the participation of this channels on HM-EtOH<sub>PA</sub> spasmolytic action.

Thus, CaCl<sub>2</sub> induced contractions in depolarizing nominally Ca<sup>2+</sup>-free medium were used to assess the possible Ca<sub>v</sub> blockade. This protocol is based on the fact that contraction will be obtained almost exclusively by Ca<sup>2+</sup> from

extracellular medium, since depolarization promoted by elevated extracellular potassium concentrations leads to  $Ca_v$  opening (Rembold, 1992). HM-EtOH<sub>PA</sub> inhibited significantly  $CaCl_2$  induced contractions, shifting them to the right and reducing  $E_{max}$ , reinforcing the hypothesis of calcium influx blockade.

In smooth muscle,  $Ca_v1$  are the main responsible to  $Ca^{2+}$  influx. These channels are subdivided as  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  and  $Ca_v1.4$  and are sensitive to dihydropyridine and high voltage (Alexander et al., 2008).  $Ca_v$  are composed by 4 subunits (2  $\alpha$ , 1  $\beta$  and 1  $\gamma$ ) where  $\alpha1$  forms the pore that leads  $Ca^{2+}$  influx (Kuriyama et al., 1995). Thus, the next step was to confirm and identify the  $Ca_v$  subtype involved on HM-EtOH<sub>PA</sub> spasmolytic activity. Therefore, tonic contractions were obtained using S-(-)-Bay K8644, a specific dihydropyridine derivative agonist for  $Ca_v1$  that binds directly with  $\alpha1$  subunit to open these channels, but not by depolarization (Spedding and Paoletti, 1992). HM-EtOH<sub>PA</sub> was more potent in relaxing the ileum pre-contracted with KCl than S-(-)-Bay K8644 can be explained by the fact that KCl, in addition to induce  $Ca_v$  activation by depolarization, utilizes other mechanisms to sustain the tonic phase of smooth muscle contraction, such as  $Ca^{2+}$  sensitization involving translocation and activation of RhoA Kinase (Ratz et al., 2005). On the other hand, S-(-)-Bay K8644 keeps contraction mainly by direct activation of  $Ca_v$  (Spedding & Paoletti, 1992). Furthermore, as the more expressive  $Ca_v$  subtype in ileum is  $Ca_v1.2$  (Catterall et al., 2005), we suggest that the  $Ca^{2+}$  influx blockade through  $Ca_v1.2$  is implicated in the mechanism of HM-EtOH<sub>PA</sub> spasmolytic action on guinea pig ileum.

In conclusion, we demonstrated that HM-EtOH<sub>PA</sub> not presented a relevant spasmolytic activity on rat uterus, guinea pig trachea and rat aorta, but showed a

selective action on guinea pig ileum, probably, due to a Ca<sup>2+</sup> influx blockade through Cav1.2.

### **Acknowledgments**

The authors thank CAPES, CNPq and FAPESQ-PB for financial support, and UFPB for structural support.

### **REFERENCES**

Agra MF, Baracho GS, Basílio IJD, Nurit K, Coelho VP, Barbosa DA (2007). Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. *Oecol. Bras.*, 11: 323-330.

Agra MF, Rocha EA, Formiga SC, Locatelli E (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18: 472-508.

Alexander, SPH, Mathie, A, Peters, JA (2008). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 3rd edition. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 2, S1-209.

Almtorp GT, Hazell AC, Torssell, KBG (1991). A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochem.*, 30: 2753-2756.

Caldas GF, Costa IMA, Silva JB, Nóbrega RF, Rodrigues FF, Costa JG, Wanderley AG (2011). Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 137:886-892.

---

Catterall WA, Reyes EP, Snutch TP, Striessnig J (2005). International union of pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.*, 57: 411-425.

Deo SS, Inam F, Mahashabde RP (2011). Antimicrobial Activity and HPLC Fingerprinting of Crude *Ocimum* Extracts. *E-J. Chem.* 8:1430-1437.

Falcão DQ, Menezes FS (2003). Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. *Rev. Bras. Farm.*, 84: 69-74.

Ferrante, J, Luchowski, E, Rutledge, A, Triggle, DJ (1989). Binding of A 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, (-)-S-BayK 8644, to cardiac preparations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 149-154.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-376.

Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD (2004). Labiatae. In: *The Families and Genera of Vascular Plants*, Kubitzki, K. and J.W. Kadereit (Eds.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 7:167-275.

Honda K, Takano Y, Kamiya H (1996). Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. *Gen. Pharmacol.*, 27: 957-961.

---

Horie S, Tsurumaki Y, Someya A, Hirabayashi T, Saito T, Okuma Y, Nomura Y, Murayama T (2005). Involvement of cyclooxygenase-dependent pathway in contraction of isolated ileum by urotensin II. *Peptides*, 26: 323-329.

Kuriyama, H, Kitamura, K, Nabata, H (1995). Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol. Rev.*, 47: 387-573.

Mishra SB, Verma A, Mukerjee A, Vijayakumar M (2011). Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 4: 689-693.

Raja RR (2012). Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. *J. Med. Plants Res.*, 6: 203-213.

Ratz PH, Berg KM, Urban NH, Miner AS (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288: C769- C783.

Raymundo LJ, Guihon CC, Alviano DS, Matheus ME, Antonioli AR, Cavalcanti SC, Alves PB, Alviano CS, Fernandes PD (2011). Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. *J. Ethnopharmacol.*, 12;134: 725-732.

---

Rembold, CM (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Hypertension*, 20: 129-137.

Rembold CM (1996). Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. *Biochemistry of smooth contraction*. San Diego, Academic press, p. 227-239.

Sadraei H, Ghannadi A, Malekshashi K (2003). Relaxant effects of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*, 74: 445-452.

Santos MRV, Carvalho AA, Medeiros IA, Alves PB, Marchioro M, Antonioli AR (2007). Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. *Fitoterapia* 78: 186-191.

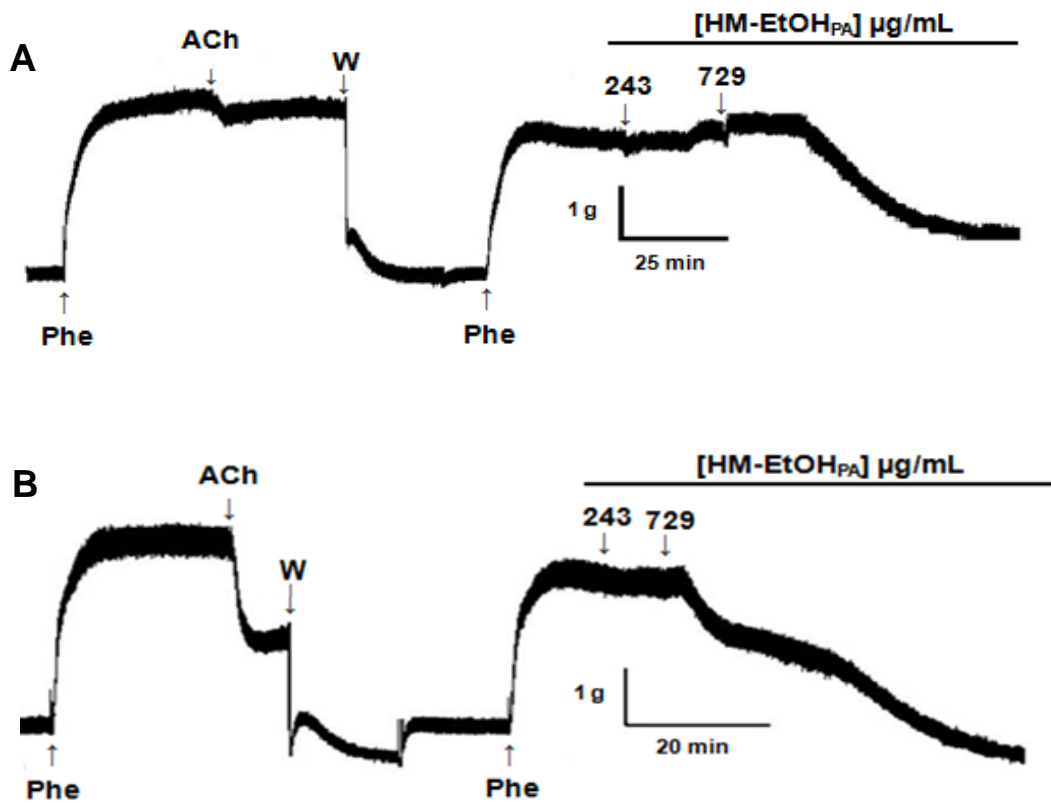
Spedding, M, Paoletti, R (1992). Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacol. Rev.*, 44: 363-376.

Tschirhart E, Frossard N, Bertrand C, Landry Y (1987). Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 243: 310-316.

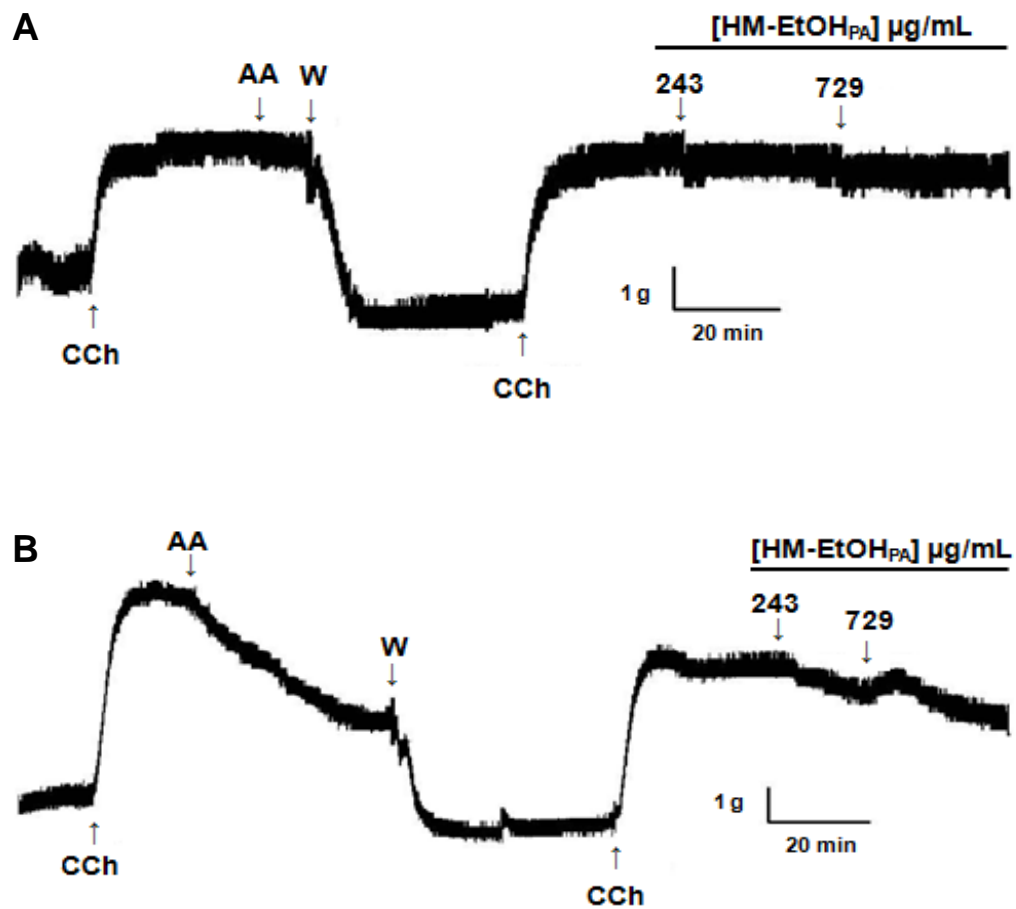
Usovicz, MM, Gigg, M, Jones, LM, Cheung, CW, Hartley, SA (1995). Allosteric interactions at L-type calcium channels between FPL 64176 and the enantiomers of the dihydropyridine Bay K 8644. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275: 638-645.

Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ (1996). Pharmacological methods in phytotherapy research. In: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Materials, John Wiley, Chichester, 1:184–186.

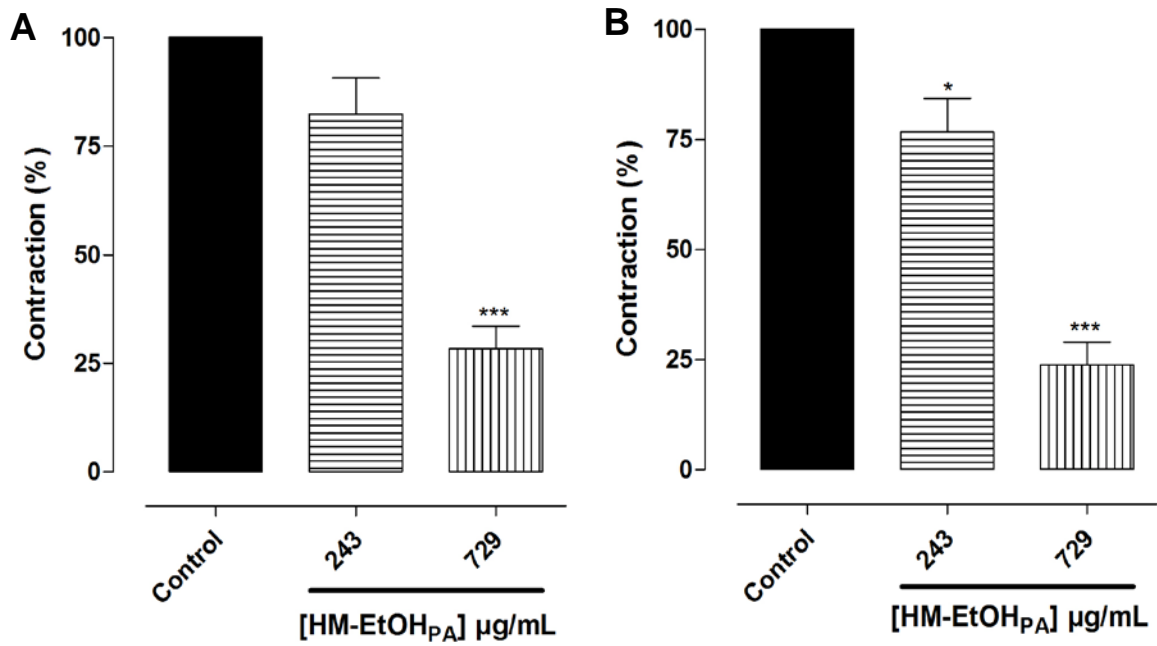
## FIGURES AND LEGENDS



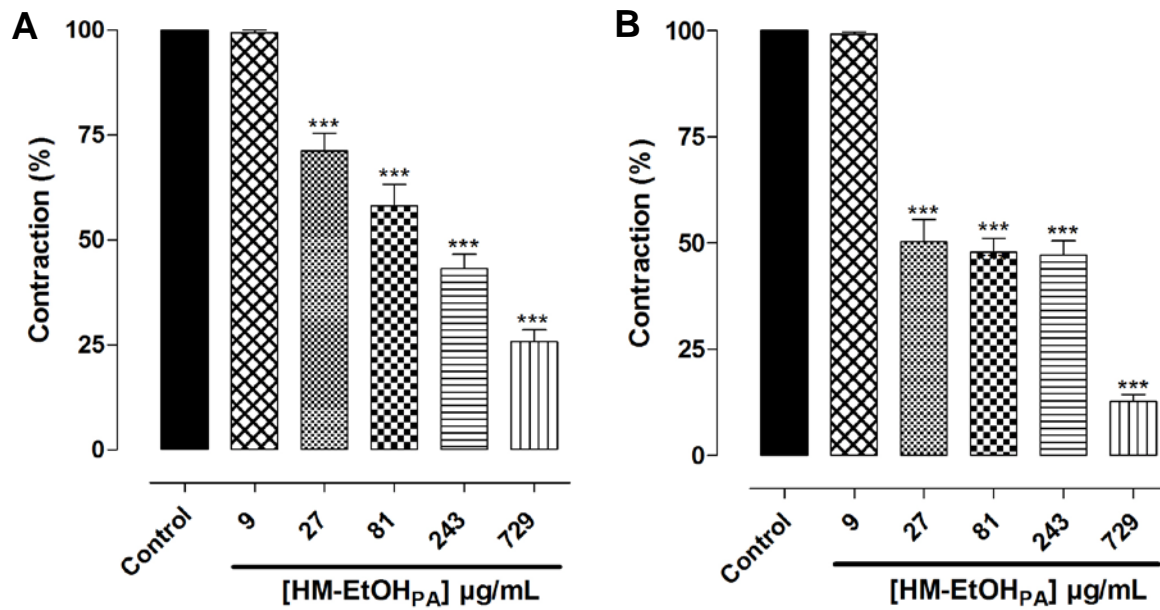
**Figure 1.** Representative register of HM-EtOH<sub>PA</sub> relaxant effect (243 and 729  $\mu\text{g/mL}$ ) on rat aorta pre-contracted with Phe ( $3 \times 10^{-7}$  M) in functional endothelium absence (A) and presence (B) ( $n = 3$ ).



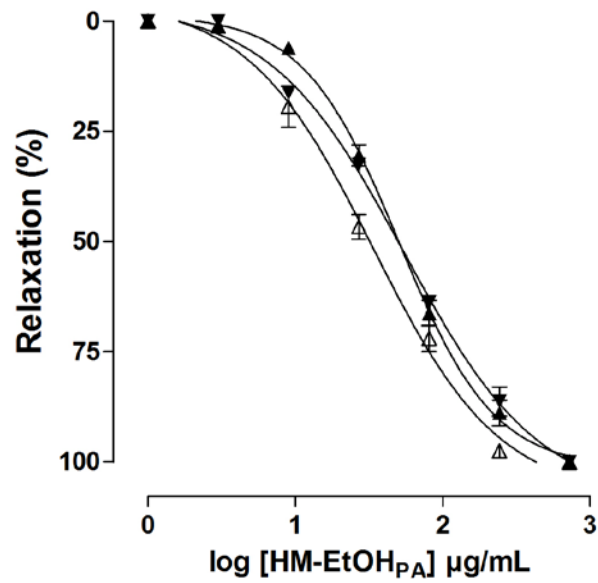
**Figure 2.** Representative register of HM-EtOH<sub>PA</sub> relaxant effect (243 and 729 μg/mL) on guinea pig trachea pre-contracted with CCh (10<sup>-6</sup> M) in functional epithelium absence (**A**) and presence (**B**) (n = 3).



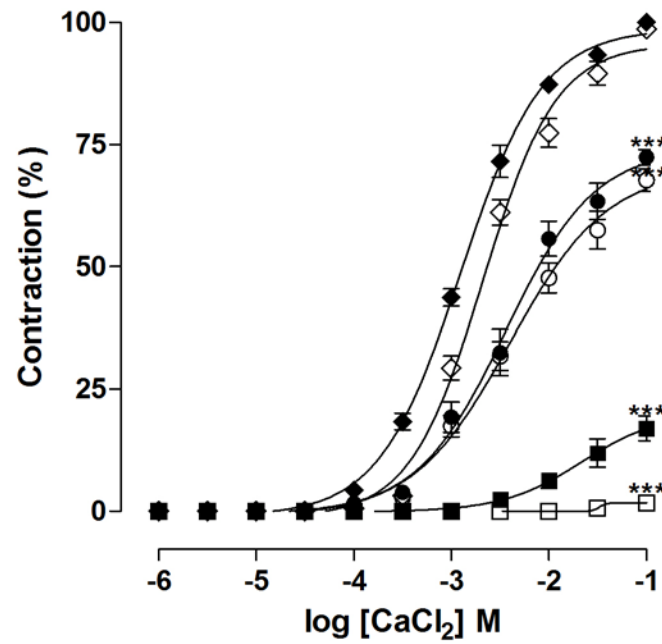
**Figure 3.** Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on phasic contractions induced with CCh ( $10^{-5}$  M) (A) or oxytocin ( $10^{-2}$  UI/mL) (B) on rat uterus ( $n = 3$ ). The columns and vertical bars represent mean and S.E.M. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, significant differences are indicated by \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$  (Control vs. HM-EtOH<sub>PA</sub>).



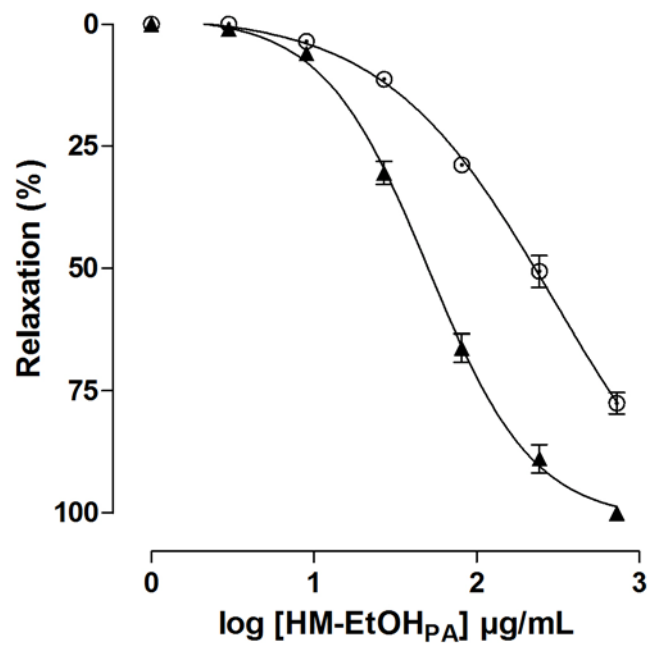
**Figure 4.** Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on phasic contractions induced with CCh (10<sup>-6</sup> M) (A) or histamine (10<sup>-6</sup> M) (B) on guinea pig ileum (n = 5). The columns and vertical bars represent mean and S.E.M. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, significant differences are indicated by \*\*\**p* < 0.001 (Control vs. HM-EtOH<sub>PA</sub>).



**Figure 5.** Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on tonic contractions induced with KCl (40 mM) (▲), CCh (10<sup>-6</sup> M) (▼) or histamine (10<sup>-6</sup> M) (△) on guinea pig ileum (n = 5). The symbols and vertical bars represent mean and S.E.M, respectively. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test.



**Figure 6.** Cumulative concentration-response curves to  $\text{CaCl}_2$  in depolarizing medium nominally without  $\text{Ca}^{2+}$  in the absence (◆) and presence of HM-EtOH<sub>PA</sub>: 9 (◇), 27 (●), 81 (○), 243 (■) and 729  $\mu\text{g/mL}$  (□) ( $n = 5$ ). Symbols and vertical bars represent the mean and S.E.M. One-way ANOVA followed by Bonferroni's test, significant differences are indicated by \*\*\* $p < 0.001$  (Control vs. HM-EtOH<sub>PA</sub>).



**Figure 7.** Effect of HM-EtOH<sub>PA</sub> on tonic contractions induced with KCl (40 mM) (▲) or S(-)-Bay K8644 ( $3 \times 10^{-7}$  M) (○) on guinea pig ileum (n = 5). The symbols and vertical bars represent mean and S.E.M., respectively.

# *Capítulo 2*

### **3 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO ESPASMOLÍTICA DO COMPOSTO HM308 EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE MÚSCULO LISO (ÚTERO DE RATA, AORTA DE RATO, TRAQUEIA E ÍLEO DE COBAIA)**

#### **3.1 MATERIAL E MÉTODOS**

##### **3.1.1 Material**

###### **3.1.1.1 Material Botânico**

A espécie *Hyptis macrostachys* Benth. foi coletada no Pico do Jabre, município de Matureia, estado da Paraíba. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB sob código de identificação AGRA et al., 6947.

###### **3.1.1.2 Droga teste**

Foi utilizado o composto HM308, uma pirona isolada da fase diclorometânica do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth., o qual foi gentilmente cedido pela equipe do Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva, do Setor de Fitoquímica do PgPNSB do CCS/UFPB.

###### **3.1.1.3 Animais**

Eram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g, ratas Wistar virgens pesando entre 150-250 g e ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-300 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB.

Antes dos experimentos, os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Labina®) com livre acesso a água, 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 eram realizados no período de 08h00 às 20h00. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal - CEPA (Certidão N° 0506/05) do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF), hoje CBiotec, da UFPB (Anexo A).

#### 3.1.1.4 Drogas e Reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e o sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e o cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ) foram adquiridos da Fmaia (Brasil). O fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), a glicose e o fosfato de sódio monobásico anidro ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). O cloreto de magnésio hexa-hidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foi adquirido da Merck (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose e o bicarbonato de sódio, eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque que eram mantidas sob refrigeração.

O cloridrato de carbamilcolina (CCh), o cloridrato de acetilcolina (ACh) e o di-hidrocloridrato de histamina foram adquiridos da Merck (Brasil). A fenilefrina (FEN) foi obtida da Pfizer (EUA). A ocitocina foi obtida da Eurofarma (Brasil). Estas substâncias eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque ( $10^{-2}$  M) que eram mantidas a 0 °C em refrigerador, essas soluções estoques eram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas a cada protocolo experimental.

O óleo de castor (Cremofor®) e o ácido araquidônico (AA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). O AA era dissolvido em etanol absoluto.

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

### 3.1.1.5 Soluções nutritivas

As soluções nutritivas eram aeradas com carbogênio, o pH era ajustado para 7,4 com solução de HCl ou NaOH 1 N e mantidas a 37 °C para aorta de rato, íleo e traqueia de cobaia e a 32 °C para útero de rata.

**Locke Ringer (mM)** – NaCl 154,0; KCl 5,6; CaCl<sub>2</sub> 2,2; MgCl<sub>2</sub> 2,1; Glicose 5,6; NaHCO<sub>3</sub> 6,0 (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000).

**Krebs Normal (mM)** – NaCl 118,0; KCl 4,6; 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; NaHCO<sub>3</sub> 25,0.

**Krebs modificado (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; NaHCO<sub>3</sub> 25,0 (SUN; BENISHIN, 1994).

### 3.1.1.6 Preparação da solução do composto HM308 para os ensaios farmacológicos

O composto HM308 foi solubilizado em Cremophor® e diluído em água destilada para obtenção da solução estoque (10<sup>-2</sup> M, 3% Cremophor® v/v) que era estocada à 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 significativo nos órgãos estudados, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações do composto HM308 eram utilizadas em múltiplos de 3, sendo as concentrações submáxima e máxima de 3 x 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-4</sup> M para o composto. Quando na concentração submáxima o efeito observado ultrapassou 50% e na concentração máxima o efeito observado foi superior a 75%, procurou-se determinar a curva concentração-resposta testando concentrações para verificar o zero e o efeito máximo (E<sub>max</sub>) do composto.

### 3.1.1.7 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas os órgãos eram suspensos em cubas de 5 mL aerados com carbogênio e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo DTF (São Paulo, SP, Brasil).

As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força isométricos FORT-10 ligados a um amplificador modelo TBM4M, ambos da World Precision Instruments (Sarasota, FL, EUA), os quais estavam conectados a um computador utilizando o programa BioMed<sup>®</sup> versão Rv2 BioData (João Pessoa, PB, Brasil).

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

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 e os animais em balança semianalítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

### **3.1.2 MÉTODOS**

#### **3.1.2.1 Triagem Farmacológica Preliminar**

#### **3.1.2.2 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata**

As ratas eram tratadas 24 horas antes do experimento com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) via subcutânea, para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. Após aberta a cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C sob aeração com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro de 5 mL. Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de

1 g, efetuando-se neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 minutos. As curvas concentrações-resposta para ocitocina ( $10^{-2}$  UI/mL) ou para CCh ( $10^{-5}$  M) eram obtidas e o composto HM308 era incubado por 15 minutos em preparações diferentes e a inibição da resposta a ocitocina e ao CCh era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do composto HM308 à cuba. Os valores de  $CI_{50}$  (concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista) foram obtidos por regressão não linear.

### **3.1.2.3 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com fenilefrina em aorta isolada de rato**

Os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. Os anéis aórticos de 3-5 mm eram obtidos livres de tecido conjuntivo e gordura. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis eram suspensos individualmente por uma alça de aço inoxidável, em cubas de vidro de 5 mL contendo solução de Krebs Normal a 37 °C.

As preparações eram estabilizadas por um período de 60 minutos, durante o qual eram mantidas sob uma tensão 1 g e aerados com carbogênio. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização era induzida uma contração com fenilefrina ( $3 \times 10^{-7}$  M) e durante o componente tônico, 12 a 15 minutos da resposta, era adicionado ACh ( $10^{-6}$  M) à todas as preparações para verificar a integridade do endotélio (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentaram relaxamento igual ou superior a 50% (AJAYA; GILANIB; MUSTAFAA, 2003). Em relaxamento inferior a 10%, os anéis eram considerados sem endotélio funcional. Após a lavagem, esperava-se 30 minutos, e durante o componente tônico de uma segunda contração de magnitude semelhante deste agonista, o composto HM308 era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba.

O relaxamento foi expresso como o efeito máximo ( $E_{max}$ ) do composto sob a contração induzida por fenilefrina.

#### **3.1.2.4 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol em traqueia isolada de cobaia**

Os cobaias eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais, a traqueia era retirada e limpa, de modo a separá-la de todo o tecido conectivo e adiposo. O órgão era dividido em segmentos, contendo de 3 a 4 aneis de cartilagem. Os segmentos eram suspensos individualmente através de hastes de aço inoxidável em cubas de vidro de 5 mL, contendo solução nutritiva de Krebs normal sob tensão de 1 g. Estes segmentos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C e permaneciam em repouso durante 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização era induzida uma contração com CCh ( $10^{-6}$  M) e durante o componente tônico, 12 a 15 minutos da resposta, era adicionado AA ( $10^{-4}$  M) à todas as preparações para verificar a integridade do epitélio (TSCHIRHART et al., 1987). O epitélio vascular era considerado íntegro quando os aneis apresentaram relaxamento igual ou superior a 50%. Em relaxamento inferior a 10%, os aneis eram considerados sem epitélio funcional. Após a lavagem, esperava-se 30 minutos, e durante o componente tônico de uma segunda resposta ao agonista, o composto HM308 era adicionado em preparações diferentes de maneira cumulativa à cuba

O relaxamento foi expresso como o  $E_{max}$  do composto sob a contração inicial induzida por CCh.

#### **3.1.2.5 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia**

Os cobaias eram mantidos em jejum por um período de 18 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio.

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro de 5 mL e deixados em repouso por 30 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com CCh ( $10^{-6}$  M) ou com histamina ( $10^{-6}$  M), concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima. O composto HM308 era incubado em várias concentrações por 15 minutos em preparações diferentes, e na sua presença, era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas acima citados.

A inibição da resposta contrátil induzida por CCh ou por histamina era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição do composto HM308 à cuba. Os valores de  $CI_{50}$  foram obtidos por regressão não linear.

### 3.2 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de Student (não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) com medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni, sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados significantes. Os valores de  $CI_{50}$  e  $CE_{50}$  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.).

## 4 RESULTADOS

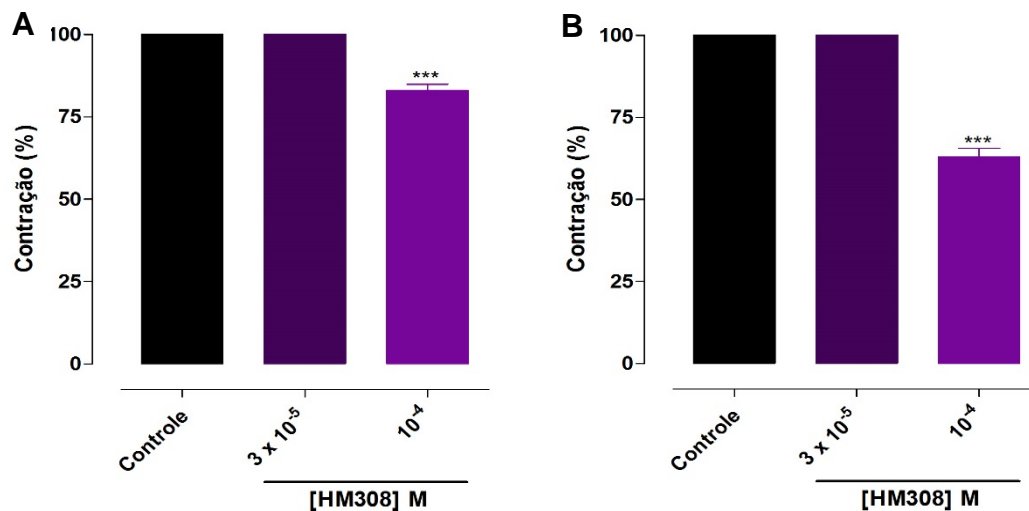
### 4.1 Triagem Farmacológica Preliminar

#### 4.1.1 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata

O composto HM308 ( $3 \times 10^{-5}$  –  $10^{-4}$  M) apresentou um discreto efeito espasmolítico em útero isolado de rata, inibindo as contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-5}$  M) ( $E_{\max} = 17,1 \pm 1,9\%$ , Gráfico 1A), bem como aquelas induzidas por ocitocina ( $10^{-2}$  UI/mL) ( $E_{\max} = 37,1 \pm 2,7\%$ , Gráfico 1B).

A responsividade do útero aos agonistas testados foi restabelecida após 30-45 minutos da retirada do composto HM308 da cuba (dados não mostrados).

**Gráfico 1** - Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-5}$  M) (A) e por ocitocina ( $10^{-2}$  UI/mL) (B) em útero isolado de rata.

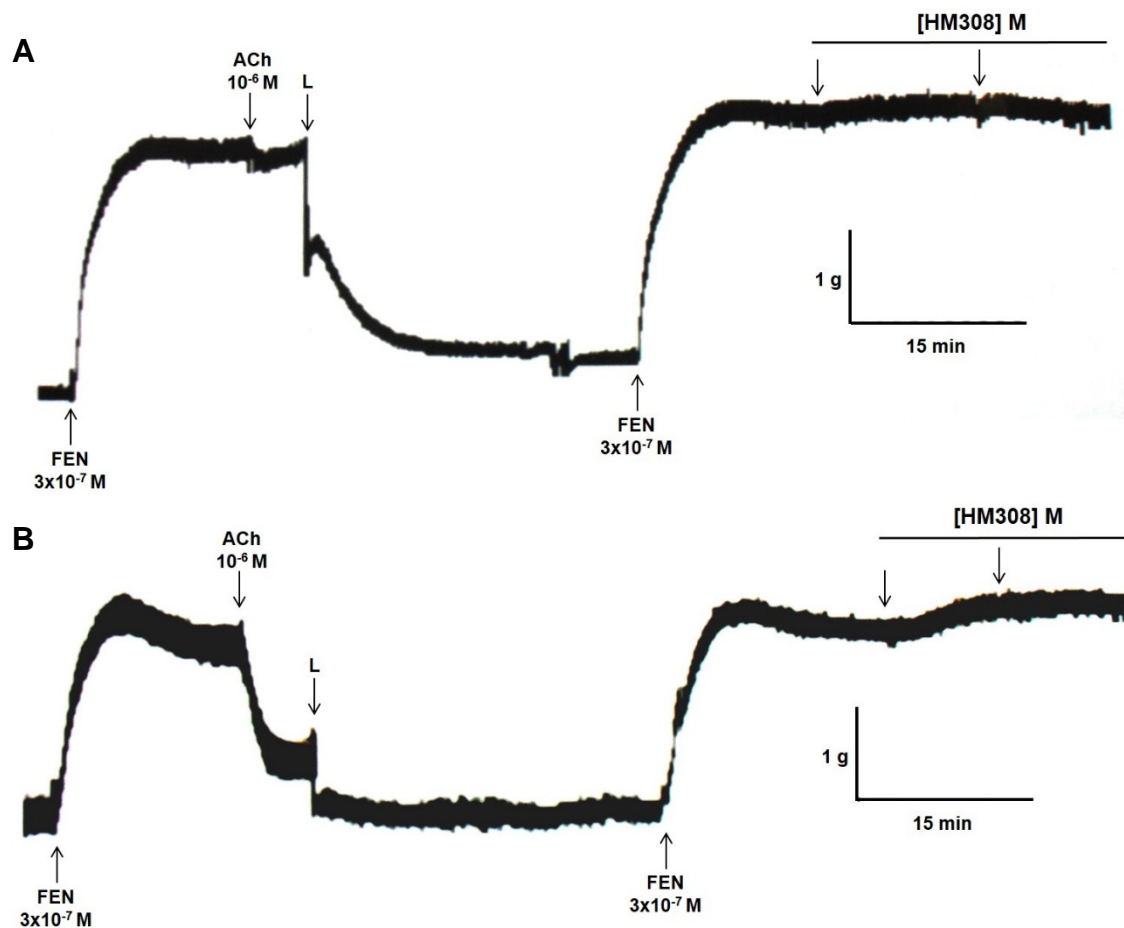


As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\*  $p < 0,001$  (controle vs. HM308) ( $n = 3$ ).

#### 4.1.2 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com fenilefrina em aorta isolada de rato

O composto HM308 ( $3 \times 10^{-5} - 10^{-4}$  M) não apresentou efeito espasmolítico significativo sobre os anéis aórticos de rato na ausência (Figura 4A) nem na presença (Figura 4B) do endotélio funcional.

**Figura 4** - Registros originais representativos do efeito do composto HM308 ( $3 \times 10^{-5} - 10^{-4}$  M) sobre a aorta de rato pré-contraída por FEN ( $3 \times 10^{-7}$  M) na ausência (A) e na presença (B) do endotélio funcional (n = 3). Fenilefrina (FEN), acetilcolina (ACh), lavagem (L).

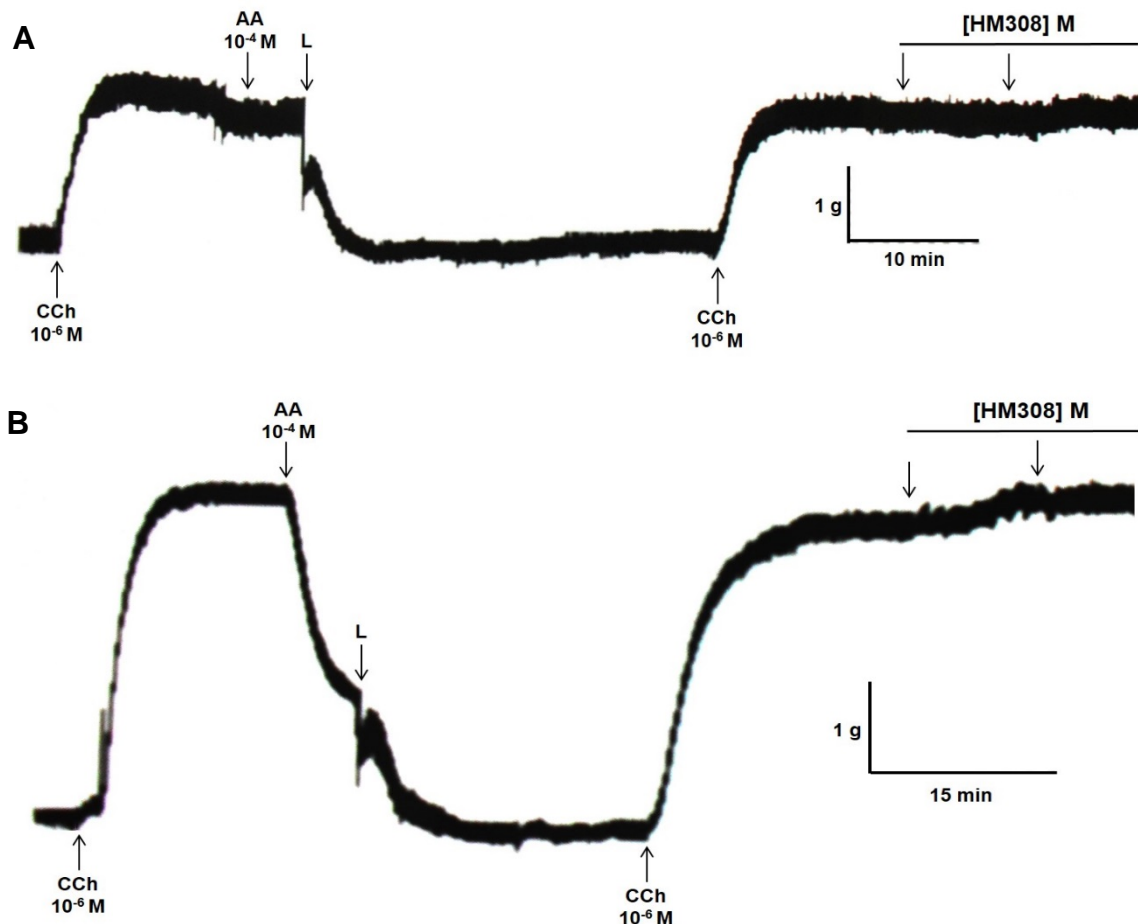


As setas para baixo representam as concentrações das drogas testadas.

#### 4.1.3 Efeito do composto HM308 sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol em traqueia isolada de cobaia

O composto HM308 ( $3 \times 10^{-5} - 10^{-4}$  M) não apresentou efeito espasmolítico significativo sobre os anéis de traqueia de cobaia na ausência (Figura 5A) nem na presença (Figura 5B) do epitélio funcional.

**Figura 5** - Registros originais representativos do efeito do composto HM308 ( $3 \times 10^{-5} - 10^{-4}$  M) sobre a traqueia de cobaia pré-contraída por CCh ( $10^{-6}$  M) na ausência (A) e na presença (B) do endotélio funcional ( $n = 3$ ). Carbacol (CCh), ácido araquidônico (AA), lavagem (L).



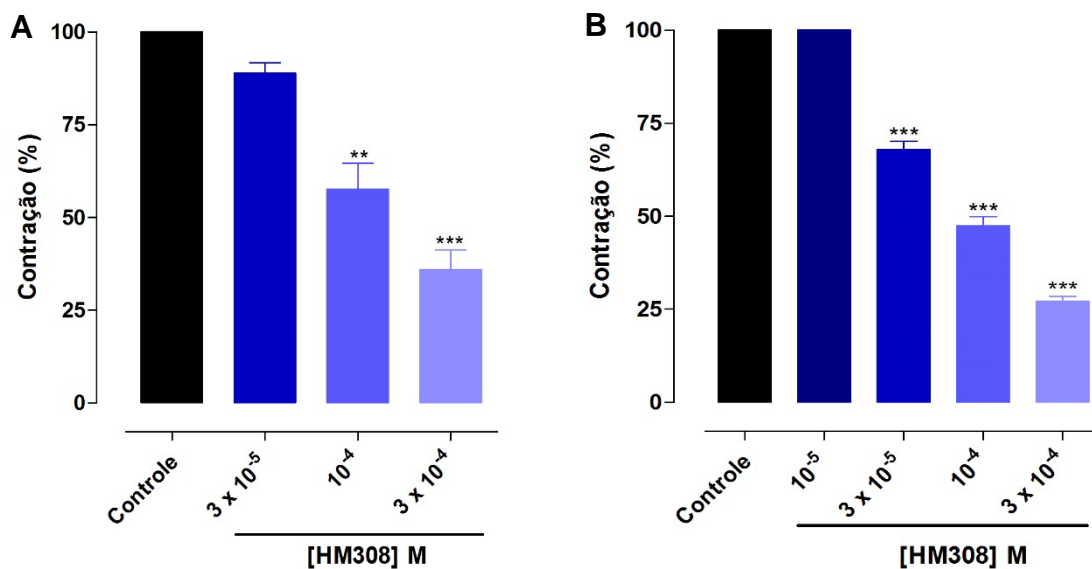
As setas para baixo representam as concentrações das drogas testadas.

#### 4.1.4 Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo isolado de cobaia

O composto HM308 inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-6}$  M) ( $3 \times 10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M), bem como aquelas induzidas por histamina ( $10^{-6}$  M) ( $10^{-5}$  –  $3 \times 10^{-4}$  M), apresentando valores de  $CI_{50}$  iguais a  $1,7 \pm 0,3 \times 10^{-4}$  ( $n = 3$ ) e  $0,9 \pm 0,05 \times 10^{-4}$  M ( $n = 5$ ), respectivamente (Gráficos 2A e 2B). Sendo significativamente mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas por histamina. O composto HM308, na concentração de  $3 \times 10^{-4}$  M, alcançou um efeito máximo ( $E_{max}$ ) igual a  $64,0 \pm 5,3\%$  frente às contrações fásicas induzidas por CCh  $10^{-6}$  M e  $72,8 \pm 1,4\%$  frente às induzidas por histamina  $10^{-6}$  M, não apresentando diferença significativa na eficácia em inibir as contrações induzidas por CCh ou histamina em íleo isolado de cobaia.

A responsividade do íleo aos agonistas testados foi restabelecida após 15-30 minutos da retirada do composto HM308 da cuba (dados não mostrados).

**Gráfico 2** - Efeito do composto HM308 frente às contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-6}$  M) (A) e por histamina ( $10^{-6}$  M) (B) em íleo isolado de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA “one-way” seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. HM308) (A,  $n = 3$ ; B,  $n = 5$ ).

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi investigada uma possível atividade espasmolítica do composto HM308, uma pirona isolada da fase diclorometânica do extrato etanólico bruto de *Hyptis macrostachy* Benth. (HM-ETOH<sub>PA</sub>), empregando-se modelos experimentais de útero de rata, aorta de rato, traqueia e íleo de cobaia. Por se tratar de um composto inédito na literatura, demonstra-se pela primeira vez que o mesmo apresenta efeito espasmolítico não seletivo em útero de rata e íleo de cobaia, sendo que o composto HM308 se mostrou mais potente em íleo de cobaia, de maneira similar ao extrato HM-ETOH<sub>PA</sub> (SOUZA et al., 2011).

A triagem farmacologia preliminar teve como objetivo investigar a faixa e a predominância de efeitos do composto HM308 com a finalidade ulterior de avaliar se os efeitos observados pelo extrato HM-ETOH<sub>PA</sub> também eram observados pelo composto HM308 ou se aumentar-se-ia o efeito espasmolítico em algum dos órgãos testados com o extrato HM-ETOH<sub>PA</sub>, para que em uma etapa posterior se pudesse elucidar o seu mecanismo de ação espasmolítica.

As espécies *Hyptis suaveolens* e *Hyptis martiusii* são utilizadas para o alívio de sintomas da dismenorreia (AGRA et al., 1994; AGRA et al., 2008). Esta é uma síndrome caracterizada por um ou mais sintomas que se manifestam no período pré ou intramenstrual. A dor geralmente é mais intensa no primeiro dia da menstruação e, em mais de 50% dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA, 2000). Essa contração exagerada, que culmina na dor, promove a redução do fluxo vascular uterino, causando hipóxia e isquemia, aumentando ainda mais o quadro doloroso (BORTOLETO, 1995). Acredita-se que cerca de 50% a 90% das mulheres apresentem cólica uterina em algum momento de suas vidas, sendo que 10% das pacientes tornam-se incapazes de desenvolver suas atividades habituais em decorrência da dor (MOTTA, 2000).

Substâncias que atuem no músculo liso uterino produzindo efeito espasmolítico podem ser utilizadas para o tratamento de desordens que afetam este órgão. Com o intuito de se investigar uma possível atividade relaxante do composto HM308 sobre a musculatura lisa uterina, avaliou-se seus efeitos sobre útero isolado de rata. Neste órgão, o composto HM308 apresentou um discreto

efeito espasmolítico apenas na concentração de  $10^{-4}$  M (Gráfico 1), não se caracterizando como um efeito tocolítico relevante, uma vez que este efeito não apresentou dependência de concentração, e só ocorreu em concentrações elevadas.

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

A pressão arterial é definida como o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total. A resistência ao fluxo sanguíneo na circulação é regulada principalmente pelo tônus vascular (SANTOS et al., 2007), que irá regular a pressão arterial e a distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo. O tônus vascular, por sua vez, é regulado por hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/o mecânicos, como a própria pressão sanguínea, além dos canais iônicos (JACKSON, 2000). Tendo em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento da hipertensão arterial, buscam-se novas drogas que sejam potentes, eficazes e com menos efeitos colaterais e/ou que sirvam como ferramenta farmacológica para o entendimento do processo fisiopatológico das doenças cardiovasculares (MONTEIRO, 2009).

As espécies *Hyptis capitata* e *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth. apresentam atividade hipotensiva (GOH et al., 1984; SANTOS et al., 2007; MOREIRA et al., 2010). Dessa forma, investigou-se se o composto HM308 apresentaria efeito espasmolítico sobre a aorta de rato no estado pré-contraído. O composto HM308 não apresentou efeito espasmolítico tanto na ausência quanto na presença do endotélio funcional (Figura 4).

Nas vias aéreas, as células epiteliais modulam o tônus basal e a reatividade do músculo liso por liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (FRDEp) (HASHIBA et al., 1999), tais como óxido nítrico (NO) (NIJKAMP et al., 1993) e prostaglandinas (FARMER et al., 1987). Em condições patológicas, como na asma brônquica, há uma liberação aumentada de mediadores broncoconstritores como a histamina e ACh (GROSS, 1988).

*Hyptis suaveolens*, *Hyptis capitata*, *Hyptis fruticosa*, *Hyptis pectinata* e *Hyptis macrostachy* Benth. (AGRA et al., 2008; ALMTORP et al., 1991) são utilizadas para o tratamento de doenças respiratórias.

Diante disso, decidiu-se investigar se o composto HM308 apresenta ação espasmolítica sobre traqueia de cobaia pré-contraída. Os ensaios farmacológicos mostraram que o composto em estudo não apresentou efeito relaxante neste órgão, na ausência ou na presença de epitélio funcional (Figura 5). O composto HM308 apresentou um efeito espasmolítico na concentração de  $3 \times 10^{-5}$  M apenas na presença do epitélio funcional (Figura 5), não sendo esse efeito dependente de concentração, uma vez que na concentração de  $10^{-4}$  M não houve alteração da resposta contrátil.

Distúrbios gastrintestinais, como a diarreia, estão entre as causas de mortalidade de maior prevalência em países em desenvolvimento (BERN et al., 1992). Cerca de 1,5 milhões de crianças de menos de cinco anos morrem todos os anos de diarreia (a segunda causa de mortalidade infantil depois da pneumonia), matando mais crianças do que a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a malária e o sarampo juntos (UNICEF/WHO, 2009).

No Nordeste do Brasil, a diarreia persistente associada à desnutrição aguda continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade infantil (GUERRANT et al., 1983 e 1992), no entanto a atenção oferecida a essa enfermidade não apresenta tanto destaque como a dada a doenças como a AIDS e a malária, que apresentam taxas de mortalidades semelhantes a da diarreia, com números de 2,1 e 1,3 milhões de mortes anualmente, respectivamente (WHO, 2009).

A diarreia pode estar associada a várias etiologias como vírus, bactérias, parasitas, intoxicação alimentar ou medicamentos (ESTRADA-SOTO et al., 2007). Muitas vezes apresenta-se como um sinal do aumento da motilidade intestinal e/ou aumento da secreção da mucosa gastrintestinal em resposta a diversos estímulos (FIELD; SEMRAD, 1993).

A utilização de espécies de *Hyptis* no tratamento de distúrbios gastrintestinais é uma prática relatada para as espécies *Hyptis suaveolens*, *Hyptis martiusii*, *Hyptis umbrosa* e *Hyptis verticillata* (AGRA et al., 2008; MUKHERJEE, et al., 1984; ROJAS et al., 1992).

Diante dessas premissas, foram realizados experimentos para verificar se o composto HM308 apresentaria atividade espasmolítica em íleo de cobaia, tendo sido observado que este composto inibiu as contrações fásicas induzidas por CCh ( $10^{-6}$  M) ou por histamina ( $10^{-6}$  M) (Gráfico 2). Ao compararmos os valores de  $CI_{50}$  obtidos para o composto, verificamos que este foi mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas por histamina do que por CCh, indicando uma possível participação dos receptores histaminérgicos ( $H_1$ ) no efeito espasmolítico observado para esse composto. Para testar tal hipótese, será necessário avaliar a característica do bloqueio exercido pelo composto HM308 frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por histamina.

Vasconcelos (2011), demonstrou em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* que o extrato HM-EtOH<sub>PA</sub> não apresenta efeito tóxico, mas uma significativa atividade antidiarreica. Além disso, conforme observado no presente estudo, tanto HM-EtOH<sub>PA</sub> quanto o seu composto isolado HM308 apresentaram atividade espasmolítica em íleo de cobaia. No entanto, não podemos descartar a hipótese de que outro(s) metabólito(s) contido(s) no extrato HM-ETOH<sub>PA</sub> também esteja atuando nesse efeito espasmolítico observado para HM-EtOH<sub>PA</sub>.

Esse conjunto de resultados fornece uma grande contribuição para a farmacologia da espécie *Hyptis macrostachys* Benth., uma vez que não se tem muitos estudos sobre a mesma, para o gênero *Hyptis* e conseqüentemente, para a família Lamiaceae, além de se demonstrar pela primeira vez uma atividade farmacológica para a pirona HM308.

## 5 CONCLUSÕES

Na investigação da atividade espasmolítica do composto HM308, uma pirona isolada da fase diclorometânica do extrato etanólico bruto de *Hyptis macrostachys* Benth (HM-ETOH<sub>PA</sub>), pode-se concluir que:

- O composto HM308 não apresenta atividade espasmolítica relevante em útero de rata, aorta de rato e traqueia de cobaia;

- Dentre os órgãos estudados, o composto HM308 mostrou seletividade de ação em íleo de cobaia, sendo mais potente em antagonizar as contrações induzidas por histamina neste órgão, apresentando dependência de concentração frente às contrações induzidas por carbacol e por histamina;
- São necessários mais estudos para caracterizar o mecanismo de ação espasmolítica do composto HM308 em íleo isolado de cobaia.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. **Informações sobre os fitoterápicos brasileiros**, 2004. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2013.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonouns in northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114 - 140, 2007.

AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; FORMIGA, S. C.; LOCATELLI, E. Plantas medicinais dos Cariris Velhos, Paraíba. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 75, p. 61 - 64, 1994.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472 - 508, 2008.

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.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 2nd edition (2007 Revision). **British Journal of Pharmacology**, v. 150 (Suppl. 1), p. S1 – S168, 2007.

ALMTORP, G. T.; HAZELL, A. C.; TORSSELL, K. B. G. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2753 - 2756, 1991.

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

ARTALEJO, C. R.; ADAMS, M. E.; FOX, A. P. Three types of Ca<sup>2+</sup> channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells, **Nature**, v. 367, p. 72 – 76, 1994.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431 - 441, 2005.

BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; LEAL, C. K. A.; ABRANTES, H. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518 - 525, 2006.

BERN, C.; MARTINES, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R. I. The magnitude of the global problem of diarrheal disease: a ten-year update. **Bulletin World Health Organization**, v. 70, n. 6, p. 705 - 714, 1992.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 289 - 330, 1989.

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

BRANDÃO, M. G. L.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em minas gerais. **In: Anais do XIV Seminário sobre a Economia Mineira**, 2010.

BORTOLETO, C. C. R. Dismenorréia primária, etiopatogenia e terapêutica. **Femina**, v. 23, p. 439 - 443, 1995.

CALDAS, G. F. R.; COSTA, I. M. A.; SILVA, J. B. R.; NÓBREGA, R. F.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; WANDERLEY, A. G. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 886 - 892, 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179 - 189, 2000.

CATTERALL, W. A. Structure and regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. **Annual Review of Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 521 - 555, 2000.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411 - 425, 2005.

CAVALCANTI, B. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MORAES, M. O.; ARAUJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; SAFFID, J.; HENRIQUES, J. A. P.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 388 - 392, 2008.

CLEEMANN, L.; MORAD, M. Role of  $Ca^{2+}$  channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from  $Ca^{2+}$  transients and contraction. **Journal of Physiology**, v. 432, p. 283 - 312, 1991.

CHITALEY, K.; WEBER, D. S.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 3, p. 139 - 144, 2001.

CHUKWUJEKWU, J. C.; SMITH, P.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND D. A.; VAN STADEN, J. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 295 - 297, 2005.

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, A. B.; QUEIROGA, C. S.; SILVA-FILHO, R. N.; DUARTE, M. C.; SILVA, M. S. Hyptenol, um novo diterpeno labdano de *Hyptis macrostachys* Benth. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2012.

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

DELLE MONACHE, F. D.; MARLETTI, F.; MARINI-BETTOLO, G.; MELLO, J. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L. Diterpenoids of *Hyptis fruticosa*-(Labiatae). 2. Hyptol. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 107, p. 319 - 321, 1977.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ UR, R.; DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca<sup>2+</sup> entry through plasma membrane IP<sub>3</sub> receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229 - 233, 2006.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels contribute to vascular tone. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. H1135 - H1141, 1994.

DOLMETSCH, R. E.; PAJVANI, U.; FIFE, K.; SPOTTS, J. M.; GREENBERG, M. E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. **Science**, v. 294, p. 333 – 339, 2001.

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.

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

EMPFIELD, J. R.; RUSSELL, K.; TRAINOR, D. A. Potassium channel openers: therapeutic possibilities. **Pharmaceutical News**, v. 6, p. 23 - 27, 1995.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533 – 535, 2000.

ESTRADA-SOTO, S.; RODRIGUEZ-AVILEZ, A.; CASTAÑEDA-ÁVILA, C.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; NAVARRETE-VÁZQUEZ, G.; HERNÁNDEZ, L.; AGUIRRE-CRESPO, F. Spasmolytic action of *Lepechinia caulenscens* is through calcium channel blockade and NO<sup>-</sup> release. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 367 - 370, 2007.

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

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 81 - 83, 2003.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 69 -74, 2003.

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.

FIELD, M.; SEMRAD, C. E. Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: Disorders of intestinal ion transport. **Annual Review of Physiology**, v. 55, p. 631 - 655, 1993.

FLISCHER, F.; MONTARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 56 - 64, 1995.

FONSECA. Dismenorréia. In: Halbe, H.W., São Paulo editor. **Tratado de Ginecologia**, v. 3, p. 748 - 54, 2000.

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.

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

GOH, S. H.; SOEPADMO, E.; CHANG, P.; BARNERJEE, U.; CHAN, K. C.; DEVERRE, J. R.; HADI, H.; LOKE, S. E.; NASRULHAWQ, A.; OO, S. L.; TAYLOR, C. E.; WONG, W. H.; ZAKARIA, M. Studies on Malaysian medicinal plants: preliminary results. **Fifth Asian Symposium on Medicinal Plants and Spices**, v. 5, p.473 - 483, 1984.

GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V.; BOLTON, T. B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca<sup>2+</sup> Signalling. **Journal of Microscopy**. v. 196, p. 305 – 316, 1999.

GROSS, N. J. Drug therapy: ipratropium bromide. **The New England Journal of Medicine**. v. 319, p. 486 - 494, 1988.

GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; SOUZA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E. Prospective study of diarrhoeal illnesses in northeastern Brazil: patterns of disease, nutritional impact, etiologies, and risk factors. **Journal Infectious Diseases**, v. 148, n. 6, p. 986 - 997, 1983.

GUERRANT, R. L.; SCHORLING, J. B.; MCAULIFFE, J. F.; DE SOUZA, M. A. Diarrhea as a cause and effect of malnutrition: diarrhea prevents catch-up growth and malnutrition increases diarrhea frequency and duration. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 47, n. 1, p. 28 - 35, 1992.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1 - 93, 2006.

GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242 - 251, 1994.

HASENCLEVER, L.; ANTUNES, A.; KLEIN, H.; MENDES, F.; LOPES, R.; HOEFLE, D.; CASTRO, L. L.; DONATI, L.; CACICEDO, T. Diagnóstico dos desafios e oportunidades no mercado de plantas medicinais e fitoterápicos brasileiro. **Relatório Final do Centro de Gestão de Estudos Estratégicos – CGEE**. Distrito Federal, 2009.

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.

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J.; Role of maxi-K<sup>+</sup> channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **American Journal of Physiology**, V. 273, P. G1087 - G1087, 1997.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K.; Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**, v. 21, p. 367 - 375, 1994.

HONG, S. J.; ROAN, Y; CHANG, C. C.; Spontaneous activity of guinea pig ileum longitudinal muscle regulated by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. G962 - G971, 1997.

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

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

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496 - 511, 2011.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 203 - 219, 1996.

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.

LEDOUX, J; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, n.1, p. 69 - 78, 2006.

LEE, K. H.; LIN, Y. M.; WU, T. S.; ZHANG, C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I. H.; CHANG, J. J.; WU, R. Y.; YANG, T. H. Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. **Planta Medica**, v. 54, n. 4, p. 308 - 311, 1988.

LEWINSONHN, T. M.; Prado, P. I. Biodiversidade Brasileira – **Síntese do Estado Atual do Conhecimento**, 1<sup>a</sup>. ed., Ed. Pinsky: São Paulo, cap. 1, p. 17 - 25, 2002.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14 - 24, 2007.

LIN, M. T.; HESSINGER, D. A.; PEARCE, W. J.; LONGO, L. D. Modulation of BK channel calcium affinity by differential phosphorylation in developing ovine basilar myocytes. **American Journal of Physiol – Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 2, p. H732 - H740, 2006.

LOPEZ-LOPEZ, J. R.; SHACKLOCK, P. S.; BALKE, C. W.; WIER, W. G. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells, **Science**, v. 268, p. 1042 – 1045, 1995.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199 - 206, 2005.

MALAN, K. A.; PELISSIER, Y.; BESSIERE, J. M.; PELLERIN, F. Variation in the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata*, L. Poit. **Planta Medica Phytotherapia**, v. 23, n. 2, p. 86 - 89, 1989.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENR, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015 - 2022, 2007.

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

McHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 570, n. 1, p. 23 - 28, 2006.

MEERA, P.; ANWER, K.; MONGA, M.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; TORO, L.; SAMBOR, B. M.; Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel activity via protein kinase A.; **American Journal of Physiology**, v. 269, p. C312 - C317, 1995.

MISHRA, S. B.; VERMA, A.; MUKERJEE A.; VIJAYAKUMAR, M. Anti-hypoglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 9, p. 689-93, 2011.

MONTEIRO, F. S. Participação dos receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcaloides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). 2009. **Dissertação** (mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MOREIRA, I. J. A.; MORENO, M. P. N.; FERNANDES, M. F. G.; FERNANDES, J. B., MOREIRA; FLÁVIA, V.; ANTONIOLLI, A R.; SANTOS, M. R. V. Vasorelaxant effect of *Hyptis fruticosa* salzm. ex benth., Lamiaceae, dichloromethane extract on rat mesenteric artery. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 762 - 765, 2010.

MORGAN, K. The role of calcium in the control of vascular tone as assessed by the Ca<sup>2+</sup> indicator Aequorin. **Cardiovascular Drugs**, v. 4, p. 1355 – 1362, 1990.

MOTTA, E. V. Dismenorreia – Como diagnosticar e tratar. **Revista Brasileira de Medicina**, n. 5, p.57, 2007.

MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GHOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 377 - 378, 1984.

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

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022 - 1037, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311 – 335, 2012.

NIJKAMP, F. P.; VAN DER LINDE, H. J.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea-pig in vivo and in vitro. Role of the epithelium. **American Review of Respiratory Disease**. v. 148, p. 727 - 734, 1993.

NOMA, A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p. 147 – 148, 1983.

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

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45 - 61, 2002.

QUEST, U. Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects. **Fundamentals in Clinical Pharmacology**, v. 6, p. 279 – 293, 1992.

QUEST, U.; COOK, N. S. Moving together: K<sup>+</sup>-channel openers and ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, p. 431 - 435, 1989.

RAJA R. R. Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 3, 203 - 213, 2012.

RAYMUNDO, L. J.; GUIHON, C. C.; ALVIANO, D. S.; MATHEYS, M. E.; ANTONIOLLI, A. R.; CAVALCANTI, S. C.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 725 - 32, 2011.

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

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

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275 - 283, 1992.

SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345 - 353, 2002.

SANBORN, B. M. Relationship of Ion Channel Activity to Control of Myometrial Calcium. **Journal of the Society Gynecologic Investigation.**, v. 7, p. 4 – 11, 2000.

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

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 186 - 191, 2007.

SANTOS, P. O.; COSTA, M. J. C.; ALVES, J. A. B.; NASCIMENTO, P. F. C.; MELO, D. L. F. M.; BARBOSA-JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C.; BLANKI, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; ALVES, P. B.; NASCIMENTO, M. P. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648 - 1652, 2008.

SARSERO, D.; FUJIWARA, T.; MOLENAAR, P.; ANGUS, J. A. Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T-type calcium channel antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, p. 109 - 119, 1998.

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J.; Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi-K<sup>+</sup> channel. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. C739 - C745, 1999.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características Farmacológicas Gerais Das Plantas Mediciniais. **Infarma**, v.16, n. 13/14, p. 74 - 77, 2005.

SHMIGOL, A.; EISNER, D. A.; WRAY, S. Properties of voltage-activated  $[Ca^{2+}]$  transients in single smooth muscle cells isolated from pregnant rat uterus. **Journal of Physiology (London)**, v. 511, p. 803 – 811, 1998.

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

SOMLYO, A. P.; WU, X.; LALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 134, p. 201– 234, 1999.

SOUZA, I. L. L.; SANTOS-JÚNIOR, M. S. M.; OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; VASCONCELOS, L. H. C.; CARREIRO, J. N.; COSTA, V. C. O.; SILVA, B. A. Investigation of the spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth.. (Lamiaceae). **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE)**, 2011.

STANDEN, N. B.; QUAYLE, J. M.; DAVIES, N. W.; BRAYDEN, J. E.; HUANG, Y.; NELSON, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive  $K^+$  channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 245, p. 177 - 180, 1989.

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

TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive  $K^+$  channels in smooth muscle, **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617 - 624, 2006.

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.

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

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310 - 316, 1987.

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

UNICEF/WHO, **Diarrhoea**: Why children are still dying and what can be done, 2009.

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

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciência Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n. 1, p. 1 - 7, 2006.

VASCONCELOS, M. A. Investigação das atividades tóxica e antidiarreica de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso – Farmácia**. Universidade Federal de Alagoas. 2011

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326 - 337, 2006.

WADE, G. R.; SIMS, S. M.; Muscarinic stimulations of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, p. C658 - C665; 1993.

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

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 463 – 472, 2005.

WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 47 - 54, 1992.

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.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397- 407, 2005.

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.

YAMAGAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 270, p. L338 - L345, 1996.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.



*Anexo*

**ANEXO A – Certidão de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFPB.**

 UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

*COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL*

João Pessoa, 8 de junho de 2005  
CEPA Nº. 0506/05

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. BAGNÓLIA ARAÚJO DA SILVA  
Departamento/Setor: CCS/Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - LTF

Ref.: Projeto de Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE PLANTAS MEDICINAIS (E/OU DE SEUS CONSTITUINTES ISOLADOS) DO NORDESTE BRASILEIRO

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

Atenciosamente,

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

---

LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA • UFPB • CAIXA POSTAL 5009 • CEP 58051-970  
JOÃO PESSOA • PARAÍBA • BRASIL • FAX: (083) 216-7502 - 216-7511  
FONE: (083) 216-7173 - 216-7125 • Home Page: <http://www.ltf.ufpb.br>