

ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NA AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DE *Solanum agrarium* SENDTNER EM ÍLEO DE
COBAIA E ÚTERO DE RATA**

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

João Pessoa - PB

2009

ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NA AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DE *Solanum agrarium* SENDTNER EM ÍLEO DE
COBAIA E ÚTERO DE RATA**

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

João Pessoa - PB

2009

C824p Correia, Ana Carolina de Carvalho.
Participação dos canais de potássio na ação espasmolítica de
Solanum agrarium Sendtner em íleo de cobaia e útero de rata/
Ana Carolina de Carvalho Correia. – João Pessoa, 2009.
96f. :il.
Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.
Dissertação (Mestrado)– UFPb – LTF/CCS

1.Produtos naturais . 2. *Solanum agrarium* Sendtner. 3. Extrato
Etanólico.

UFPb/BC

CDU: 547.9 (043)

Responsável pela catalogação: Maria de Fátima dos Santos Alves-CRB -15/149

ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA

**PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE POTÁSSIO NA AÇÃO
ESPASMOLÍTICA DE *Solanum agrarium* SENDTNER EM ÍLEO DE
COBAIA E ÚTERO DE RATA**

Aprovada em 12/11/2009

BANCA EXAMINADORA

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

**Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal de Alagoas)
Examinadora Externa**

**Prof. Dra. Marianna Vieira Sobral Castello Branco
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

Dedicatórias

*A meus pais, José Correia (in memoriam) e Ana Regina,
pelo exemplo de amor, força de trabalho, dedicação, apoio e
incentivo durante toda a minha vida.*

*A meus irmãos, Aninha e Arthur, que sempre me
incentivaram e apoiaram nessa caminhada.*

*Ao meu namorado, Leandro Cabanez, pelo companheirismo,
amor e incentivo nessa caminhada.*

Agradecimientos

A Deus, que sempre esteve presente nesta caminhada, dando-me força e sabedoria, ajudando-me a conquistar todas as coisas que almejo. É através Dele que consegui conquistar mais uma etapa em minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva por toda a dedicação, sabedoria, competência, amizade e principalmente por ser um exemplo de educadora.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante da Universidade Federal de Alagoas, por ter me conduzido ao meio científico, dando-me total apoio de sair de Alagoas e vim para Paraíba estudar, pela amizade e confiança depositada em mim.

À Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa do Departamento de Biologia Molecular/UFPB por ter me acompanhado nos experimentos de atividade hemolítica.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Agra pela contribuição na identificação da espécie *Solanum agrarim* Sendtner, objeto deste estudo.

À Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva, pesquisadora do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela colaboração na área da fitoquímica, fornecendo o extrato obtido de *Solanum agrarim* Sendtner.

À Coordenação da Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos em nome dos Professores Dra. Márcia Regina Piuvezam e Dr. Eduardo de Jesus Oliveira pela dedicação, empenho e competência.

À Direção do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB) na pessoa da Profa. Silvana Teresa Lacerda Jales, pelo apoio Institucional.

À Tânia Maria Alves de Araújo, secretária do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da UFPB, por toda dedicação, eficiência e por sua amizade.

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

A Luís Cordeiro da Silva e Adriano Soares Cordeiro pelo apoio realizado tanto no Biotério quanto nos laboratórios, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar.

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

Ao Biotério Prof. Thomas George do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFPB pelo fornecimento dos animais.

Ao grande amigo Cibério Landim Macêdo pelas nossas conversas, boas risadas, por compartilhar todo seu conhecimento e principalmente pela grande ajuda nessa etapa final para a concretização deste trabalho.

Ao grande amigo Fabio de Souza Monteiro pelos bons momentos de descontração no laboratório e principalmente pela grande ajuda nessa última etapa deste trabalho.

Ao grande amigo Vicente Carlos de Oliveira Costa que conquistei nesse período do mestrado, por todo incentivo e pelo grande exemplo de funcionário público que é.

À Gislaine Alves de Oliveira, aluna de Iniciação Científica, que me acompanhou na reta final desse trabalho, sem medir esforços para me ajudar na parte experimental.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Cibério Macêdo, Fabio Monteiro, Joelmir Silva, Gislaine Oliveira, Ana Caroline de Lima, Anne Abreu, Italo Martins, Juliana Carreiro, Rafael Travassos, Rosimeire Santos, pela amizade, pela boa convivência e pela força desde o momento que cheguei ao LTF até hoje.

Aos grandes e eternos amigos de Maceió Danielle Flores, Daniel Lira, Daniel Fortes, Allysson Haide, Valéria Nunes, Mariana Santos, Polyana Cristina, Rafaela Martins, Fernanda Martins, Ana Márcia Viana, Isabela Galvão, Hermann Hasten-Reiter, Gabriela Mendes, Andressa Lopes, Pollyana Meirelle dentre outros que mesmo distantes sempre estavam torcendo por mim.

Aos todos os colegas e amigos da turma do Mestrado 2008: Maria do Carmo de Alustau, Bruna Priscila Vasconcelos, Rubens Batista, João Carlos Pita, Vivyanne Falcão, Filipe de Oliveira, Geraldo Gonçalves, John Paul Albuquerque, Antônia Rosângela Soares, Charlane Kelly Souto, Carlos Alberto de Almeida, Marcelo Duarte, Fábio Henrique Tenório, Thiago Bezerra, Daysianne Pereira, Renata Moura, Wenerson Matias, Camila Holanda, Karine Queiroga, Vitor Lorenzo e Thaisa Rolim.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação, Bagnólia A. Silva, Demétrius A. M. Araújo, Isac A. Medeiros, Margareth F. F. Melo Diniz, Bruno F. Lira, José M. Barbosa-Filho, Celidarque S. Dias, Rui O. Macêdo, Reinaldo N. Almeida, Liana Clébia S. L. Moraes, Márcia R. Piuvezam entre outros, muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, através da concessão da bolsa de estudo e suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

A todos que direta ou indiretamente participaram da produção desta dissertação.

Muito obrigada!

Ana Carolina de Carvalho Correia

Resumo

RESUMO

Solanum agrarium Sendtner é conhecida popularmente por “babá”, “gogóia” e “melancia da praia”. O decocto da raiz é empregado popularmente como abortivo (AGRA, 1991). Em estudos anteriores, Santos et al., (2003) demonstraram que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *S. agrarium* (SA-EtOH) apresentou atividade espasmolítica não seletiva em íleo de cobaia e útero de rata. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial citotóxico do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato e investigar o mecanismo de ação espasmolítica em íleo de cobaia e útero de rata. O extrato SA-EtOH apresentou uma atividade hemolítica moderada apenas nas concentrações de 243 e 500 µg/mL ($E_{max} = 21,2 \pm 3,2\%$). Em íleo de cobaia, o extrato SA-EtOH inibiu as curvas cumulativas ao carbacol (CCh) e à histamina e estas foram desviadas para a direita de maneira não paralela com redução do E_{max} , sugerindo um antagonismo não competitivo. O extrato SA-EtOH relaxou de maneira dependente de concentração e significativa o íleo de cobaia pré-contráído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 17,4 \pm 3,5$ µg/mL), ou com 10^{-6} M de CCh ($CE_{50} = 119,4 \pm 24,3$ µg/mL) ou de histamina ($CE_{50} = 18,7 \pm 4,6$ µg/mL), sugerindo que o extrato SA-EtOH deve estar agindo bloqueando os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_v). A confirmação desta hipótese veio com a observação de que o extrato SA-EtOH antagonizou as contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . O fato do extrato SA-EtOH ter relaxado ($CE_{50} = 187,2 \pm 27,3$ µg/mL) o íleo pré-contráído com S-(-)-BAY K 8644 sugere que o canal de Ca^{2+} envolvido é o tipo Ca_v1 . Como a potência relaxante do extrato SA-EtOH foi maior quando o órgão foi pré-contráído com KCl do que pelo S-(-)-Bay K8644, isto é sugestivo de que há um bloqueio indireto dos Ca_v1 . Decidiu-se investigar a participação dos canais de K^+ na ação espasmolítica do SA-EtOH. A curva de relaxamento induzida pelo extrato SA-EtOH foi desviada para direita apenas na presença de tetraetilamônio (TEA^+) 1 mM, nessa concentração um bloqueador dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) ($CE_{50} = 37,7 \pm 4,9$ µg/mL) e na de 4-aminopiridina, bloqueador dos canais de K^+ operados por voltagem (K_v) ($CE_{50} = 48,9 \pm 6,2$ µg/mL). Em útero de rata, o extrato SA-EtOH inibiu as curvas cumulativas à ocitocina e esta foi desviada para a direita de maneira não paralela com redução do E_{max} , sugerindo um antagonismo não competitivo. O extrato SA-EtOH não foi eficaz em relaxar o útero pré-contráído com 60 mM de KCl ($E_{max} = 10,5 \pm 5,0\%$), entretanto relaxou de maneira dependente de concentração o útero pré-contráído com 10^{-2} UI/mL ocitocina ($CE_{50} = 56,3 \pm 8,2$ µg/mL). Diante deste fato, pode-se sugerir que o extrato SA-EtOH pode estar promovendo seu efeito espasmolítico pelo bloqueio indireto do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , assim como o observado em íleo de cobaia. Entretanto, a curva de relaxamento induzida pelo extrato SA-EtOH foi desviada para direita apenas na presença de glibenclamida ($CE_{50} = 124,8 \pm 21,0$ µg/mL), bloqueador seletivo dos canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), diferente do observado em íleo de cobaia. Esses resultados são sugestivos de que o extrato SA-EtOH não esteja promovendo injúrias a membrana dos eritrócitos de ratos e que o mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH se dá pela modulação/ativação dos BK_{Ca} e K_v em íleo de cobaia e pelos K_{ATP} em útero de rata.

Palavras-chave: *Solanum agrarium* Sendtner. Extrato etanólico. Ação espasmolítica. Canais de potássio. Íleo de cobaia. Útero de rata.

Abstract

ABSTRACT

Solanum agrarium Sendtner known popularly as “babá”, “gogóia”, and “melancia da praia”. In folk medicine, the decoction of its roots is used as abortive (AGRA, 1991). In a preliminary study, Santos et al. (2003) demonstrated that crude ethanolic extract of aerial parts from *S. agrarium* (SA-EtOH) showed non-selective spasmolytic activity on guinea-pig ileum and rat uterus. The aim of the study was evaluate on the cytotoxic potential of SA-EtOH in rats erythrocytes and to investigate the spasmolytic action mechanism on guinea-pig ileum and rat uterus. SA-EtOH extract showed moderate hemolytic activity only at concentration of 243 and 500 µg/mL ($E_{max} = 21.2 \pm 3.2\%$). On guinea-pig ileum, SA-EtOH extract inhibited the cumulative concentration-response curves to carbachol (CCh) and histamine, and these were shifted to the right, in a non-parallel manner, with depression of the maximal effect (E_{max}), suggesting a noncompetitive antagonism. SA-EtOH extract relaxed in a significant and concentration dependent manner the ileum pre-contracted with 40 mM KCl ($EC_{50} = 17.4 \pm 3.5$ µg/mL), 10^{-6} M CCh ($EC_{50} = 119.4 \pm 24.3$ µg/mL) or 10^{-6} M histamine ($EC_{50} = 18.7 \pm 4.6$ µg/mL), suggesting that SA-EtOH extract could be acting on voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_v). This assumption was confirmed by observation that SA-EtOH extract antagonized the $CaCl_2$ induced contractions in the depolarizing medium without Ca^{2+} . The finding that SA-EtOH extract relaxed ($EC_{50} = 187.2 \pm 27.3$ µg/mL) the guinea-pig ileum pre-contracted with S(-)-BAY K8644 suggests that the Ca^{2+} channel subtype involved is the Ca_v1 . As the SA-EtOH extract was more potent in relaxing the body pre-contracted with KCl than by S(-)-Bay K8644, it is suggestive of indirect blockade of the Ca_v1 . We decided to investigate the participation of K^+ channels in the spasmolytic action of SA-EtOH extract. The relaxation curve induced by SA-EtOH extract was rightward displacement only in the presence of tetraethylammonium (TEA^+) 1 mM, this concentration is a selective blocker of the large conductance calcium-activated K^+ channels (BK_{Ca}) ($EC_{50} = 37.7 \pm 4.9$ µg/mL) and 4-aminopyridine, selective blocker of the voltage activated K^+ channels (K_v) ($EC_{50} = 48.9 \pm 6.2$ µg/mL). On rat uterus, SA-EtOH extract inhibited the cumulative concentration-response curves to oxytocin, and these were shifted to the right, in a non-parallel manner, with depression of the maximal effect (E_{max}) suggesting a noncompetitive antagonism. SA-EtOH extract did not effective at relax the uterus pre-contracted with 60 mM KCl ($E_{max} = 10.5 \pm 5.0\%$), however relaxed in a significant and concentration dependent manner the rat uterus pre-contracted with 10^{-2} UI/mL ($EC_{50} = 56.3 \pm 8.2$ µg/mL). Therefore, suggesting that SA-EtOH extract could be promoting its spasmolytic effect of indirect blockade influx Ca^{2+} by Ca_v , as observed in guinea-pig ileum. However, the relaxation curve induced by SA-EtOH extract was rightward displacement only in the presence of glibenclamide ($EC_{50} = 124.8 \pm 21.0$ µg/mL), selective blocker of the ATP-sensitive K^+ channels (K_{ATP}), different from that observed in guinea-pig ileum. These results suggest that SA-EtOH extract is not promoting the membrane injury on rat erythrocytes and that the spasmolytic action mechanism of SA-EtOH extract involves modulation/activation of BK_{Ca} and K_v on guinea-pig ileum, and of K_{ATP} on rat uterus.

Keywords: *Solanum agrarium* Sendtner. Ethanolic extract. Spasmolytic action. Potassium channels. Guinea-pig ileum. Rat uterus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia de <i>Solanum agrarium</i> Sendtner.....	5
Figura 2 – Aparelhos utilizados para o registro de contrações: Aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (A), cuba de vidro (B), transdutor de força (C), microcomputador (D) e sistema de banho para órgão isolado (E).....	17
Figura 3 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A), 10^{-6} M de histamina (B) e 10^{-6} M de carbacol (C) em íleo isolado de cobaia.....	32
Figura 4 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 em íleo isolado de cobaia parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (10 minutos).....	36
Figura 5 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia	39
Figura 6 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 1 mM de TEA ⁺ em íleo isolado de cobaia.....	43
Figura 7 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 0,3 mM de 4-AP em íleo isolado de cobaia.....	45

Figura 8 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) ou em útero isolado de rata..... 50

Figura 9 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata 53

Figura 10 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 3×10^{-5} M de glibenclamida em útero isolado de rata 58

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito hemolítico do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato. NaCl + CaCl₂ (controle negativo) e TRITON X-100 (controle positivo) 27
- Gráfico 2** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao carbacol na ausência (controle) (●) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 27 (○); 81 (■); 243 (□); 500 (▲) e 750 µg/mL (△) em íleo isolado de cobaia 29
- Gráfico 3** – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (controle) (▼) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 9 (▽), 27 (◆); 81 (◇); 243 (●) e 500 µg/mL (⊗) em íleo isolado de cobaia 30
- Gráfico 4** – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM KCl (○), 10⁻⁶ M de carbacol (□) ou de histamina (■) em íleo isolado de cobaia..... 33
- Gráfico 5** – Valores da CE₅₀ do extrato SA-EtOH sobre a fase tônica das contrações induzidas por 40 mM KCl, 10⁻⁶ M de carbacol ou 10⁻⁶ M histamina, respectivamente, em íleo isolado de cobaia..... 33
- Gráfico 6** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ na ausência (◆) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 9 (◇), 27 (●), 81 (⊙), 243 (▼), 500 (⊠) e 750 µg/mL (▲), em íleo isolado de cobaia..... 35
- Gráfico 7** – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (○) e 3 x 10⁻⁷ M de S-(-)-Bay K8644 (♦) 37

Gráfico 8 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (◆) de 5 mM de CsCl, em íleo isolado de cobaia.....	40
Gráfico 9 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença, (▼) de 10^{-5} M de glibenclamida em íleo isolado de cobaia.....	42
Gráfico 10 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (●) de 100 nM de apamina, em íleo isolado de cobaia	42
Gráfico 11 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de TEA ⁺ , em íleo isolado de cobaia	44
Gráfico 12 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (▲) de 0,3 mM de 4-AP, em íleo isolado de cobaia	46
Gráfico 13 – Valores da CE ₅₀ (µg/mL) do extrato SA-EtOH na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de K ⁺ em íleo isolado de cobaia	46
Gráfico 14 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (controle) (■) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 27 (□); 81 (◆); 243 (◇); 500 (▲) e 750 µg/mL (△) em útero isolado de rata.....	48
Gráfico 15 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata	51

Gráfico 16 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl, em útero isolado de rata.....	54
Gráfico 17 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (●) de 3 mM de 4-AP, em útero isolado de rata.....	56
Gráfico 18 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (▲) de 1 mM de TEA ⁺ , em útero isolado de rata.....	56
Gráfico 19 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 100 nM de apamina, em útero isolado de rata.....	57
Gráfico 20 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (◆) de 3 x 10 ⁻⁵ M de glibenclamida, em útero isolado de rata.....	59
Gráfico 21 – Valores da CE ₅₀ (µg/mL) do extrato SA-EtOH na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de K ⁺ em útero isolado de rata	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado	14
Tabela 2 – Composição da solução de Locke-Ringer.....	14
Tabela 3 – Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) sem Ca^{2+}	15
Tabela 4 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) do carbacol na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia.....	29
Tabela 5 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) do carbacol na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia.....	30
Tabela 6 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) do CaCl_2 na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia	35
Tabela 7 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) da ocitocina na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em útero de rata.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP	4-aminopiridina
AMPc	monosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺ de grande condutância
[Ca²⁺]	concentração de Ca ²⁺
[Ca²⁺]_c	concentração de Ca ²⁺ citoplasmática
CaM	calmodulina
Ca_v	canais de cálcio dependentes de voltagem
Ca_v1	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
Ca_vL	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
CCh	carbacol
CE₅₀	concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo
CsCl	cloreto de cério
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
EDHFs	fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDRFs	fatores relaxantes derivados do endotélio
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
G_{αq}	subunidade α da proteína G _q
G_{12/13}	proteínas G heterotriméricas tipos 12 e 13

GC	cliclase de guanilil
GDP	difosfato de guanosina
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	receptores acoplados a proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_v	canais de potássio sensíveis à voltagem
LC20	cadeia leve da cabeça da miosina de 20 kDa
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
MYPT1	subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
<i>p</i>	probabilidade
PIP₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKA	proteína cinase A
PKG	proteína cinase G
PLC	fosfolipase C
RhoA	pequena proteína ligante de GTP
ROK	cinase dependente de RhoA
SA-EtOH	extrato etanólico bruto de <i>Solanum agrarium</i> Sentdner
S-(-)-Bay K 8644	1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster
RS	retículo sarcoplasmático
SK_{Ca}	canais de potássio ativados por Ca ²⁺ de pequena condutância

TEA⁺	íon tetraetilamônio
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
vs	<i>versus</i>

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material	12
3.1.1 Material botânico	12
3.1.2 Animais.....	12
3.1.3 Substâncias	13
3.1.4 Soluções nutritivas	13
3.1.5 Preparação do extrato para os ensaios farmacológicos.....	15
3.1.6 Aparentagem	15
3.2 MÉTODOS	18
3.2.1 Avaliação toxicológica: efeito do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato ...	18
3.2.2 Investigação do mecanismo de ação do extrato SA-ETOH em íleo isolado de cobaia.....	19
3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por carbacol ou por histamina.....	19

3.2.2.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina.....	20
3.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v)	20
3.2.2.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{+2}	20
3.2.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	21
3.2.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio	21
3.2.2.4.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)	21
3.2.2.4.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA^+) ou 4-aminopiridina (4-AP).....	22
3.2.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-ETOH em útero isolado de rata.....	23
3.2.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina	23
3.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	23
3.2.3.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio	24
3.2.3.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)	24

3.2.3.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA ⁺), apamina ou glibenclamida	25
3.2.4 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Avaliação toxicológica: efeito do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato	27
4.2 Investigação do mecanismo de ação do extrato SA-ETOH em íleo isolado de cobaia.....	28
4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por carbacol ou por histamina.....	28
4.2.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina.....	31
4.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (Ca _v)	34
4.2.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca ⁺²	34
4.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-BAY K8644	36
4.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio	38
4.2.4.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de cloreto de cézio (CsCl)	38

4.2.4.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA ⁺) ou 4-aminopiridina (4-AP).....	41
4.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-ETOH em útero isolado de rata.....	47
4.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina	47
4.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	49
4.3.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio	52
4.3.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)	52
4.3.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA ⁺), apamina ou glibenclamida	55
5 DISCUSSÃO	60
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS	77
ANEXO A- Certidão de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA/LTF)	95



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há uma estreita relação do homem e das plantas consideradas curativas desde o desenvolvimento das civilizações. Provavelmente a tendência de utilizar plantas para o tratamento de seus males é inato, tanto para o homem como para outros animais (VIEIRA, 2001).

A utilização das plantas medicinais na terapêutica tem em comum, tanto bases históricas, como químicas, sendo estas últimas fundamentadas na estrutura dos princípios ativos, independentemente da sua origem, natural ou semi-sintética. A maior parte dos fármacos empregados atualmente derivou direta ou indiretamente de princípios ativos isolados a partir de plantas (MONTEIRO, 2008).

As plantas medicinais têm sido uma fonte inesgotável para a obtenção de moléculas com potencial terapêutico, mas a utilização destas pela indústria farmacêutica é relativamente recente. Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Esse processo de descoberta de novos compostos tem estado em permanente evolução, devido ao aperfeiçoamento das técnicas que permitem o isolamento e a determinação estrutural dos compostos químicos (CALIXTO, 2000; COSTA; TEIXEIRA, 2007).

A importância da utilização das moléculas vegetais pela indústria farmacêutica repercute-se nos números dos medicamentos utilizados atualmente, sendo que cerca de 50% dos mesmos são de origem sintética e aproximadamente 25% de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese. Assim, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, em torno de 25% dos medicamentos prescritos, nos países industrializados, ainda são originados de plantas, oriundos de mais de 90 espécies (FOGLIO et al., 2006).

Nota-se que nas últimas décadas o interesse em trabalhar com fitoterapia tem ressurgido. Há registros de 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. São necessários de sete a dez anos para o desenvolvimento completo (FLISCHER; MONTARI, 1995; CALIXTO, 2000; SIXEL; PECINALLI, 2005).

O Brasil é um importante fornecedor de material botânico para o mercado farmacêutico nacional e internacional, devido à diversidade de plantas que apresenta, por exemplo, a pilocarpina obtida das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth, Rutaceae); alfa-bisabolol, obtido da madeira de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, Asteraceae) e rutina, obtida dos frutos da favela (*Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae) (BRANDÃO et al., 2008).

A região Nordeste do Brasil apresenta uma flora rica em várias famílias, entre elas, a Solanaceae uma das maiores e mais complexas das angiospermas (D'ARCY, 1991) e que compreende 106 gêneros e aproximadamente 2300 espécies (OLMSTEAD, 1999). Concentra de forma representativa espécies extremamente importantes para os seres humanos, incluindo desde espécies usadas na alimentação humana até as que produzem drogas potencialmente ativas. Dentre as espécies largamente cultivadas como alimento destacam-se a batatinha (*Solanum tuberosum* L.), o tomate (*Solanum lycopersicon* L.), a berinjela (*Solanum melongena* L.) e a pimenta malagueta (*Capsicum frutescens* L.) (AGRA, 1991), bem como produtoras de drogas de interesse farmacológico, por exemplo, a atropina (*Atropa belladonna* L.), a nicotina (*Nicotiana tabacum* L.), escopolamina (*Datura stramonium* L.) (AGRA, 2000).

O gênero *Solanum*, pertencente à família Solanaceae, é um dos mais amplos do reino vegetal com cerca de 1700 espécies (HUNZIKER, 2001). No Brasil, o gênero está representado nas regiões Sudeste com 193 espécies (CARVALHO; COSTA; DUARTE, 1996), Sul com 87 (MENTZ; OLIVEIRA, 2004) e Nordeste com 80 espécies, sendo as espécies desse gênero conhecidas principalmente como “jurubeba”, palavra original do Tupi-Guarani, *yu'beba* devido à presença de espinhos em algumas espécies (AGRA; BHATTACHARYYA, 1999).

Em relação às atividades biológicas apresentadas por espécies do gênero *Solanum* pode-se citar as atividades hipotensora, apresentada por *Solanum paniculatum* L., *Solanum stipulaceum* Roem. & Schult., *Solanum melongena* L e *Solanum sisymbirifolium* Lam. (ALMEIDA et al., 1985; RIBEIRO et al., 1986; SHUM; CHIU, 1991; IBARROLA et al., 2000; RIBEIRO et al, 2002); antitumoral, relatada

para *Solanum dulcamara* L. e *Solanum sodomaeum* L. (KUPCHAN et al., 1965; CHAM, 1994); depressora sobre o Sistema Nervoso Central, referida para *Solanum nigrum* L. (PEREZ et al., 1998); antimicrobiana, mencionada para *Solanum torvum* Sw. (CHAH; MUKO; OBOEGBULEM, 2000), moluscicida, apresentada por *Solanum aculeastrum* Dunal (WANYONYI et al., 2002) e atividade hemolítica, relatada para *Solanum rostratum* Dunal e *Solanum americanum* Mill. (HARDMAN; BACK; OWENSBY, 1983). Além dessas atividades, muitas espécies também apresentam efeito espasmolítico, como por exemplo, *Solanum dulcamara* L. (BOYD, 1928), *Solanum torvum* Sw (BHAKUNI et al., 1969), *Solanum indicum* L (ABRAHAM et al., 1986). *Solanum paraibanum* Agra (OLIVEIRA et al., 2001, SILVA, 2007), *Solanum jabrense* Agra; Nee (CAVALCANTE, 2001; CLAUDINO, 2003), *Solanum megalonyx* Sendtn e *Solanum asterophorum* Mart. (OLIVEIRA et al., 2006a,b), *Solanum paniculatum* L. (SILVA, et al., 2006), *Solanum asperum* Rich (COSTA, 2006; CORREIA, 2007; GARCIA, 2007) e *Solanum paludosum* Moric. (ATAÍDE, 1982; SILVA et al., 2002; DUARTE et al., 2003; SILVA, 2005; SANTOS, 2006; MONTEIRO, 2009).

A espécie *Solanum agrarium* Sendtner (Figura 1) é conhecida popularmente por “babá”, “gogóia” e “melancia da praia”, mede em torno de 50 a 90 centímetros de altura, apresentando características de uma erva a subarbusto, tendo uma vasta distribuição geográfica, ocorrendo na Colômbia, Venezuela, Ilhas do Caribe e no Brasil (Bahia, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio de Janeiro) (AGRA, 1991). Popularmente, essa espécie é empregada para o tratamento de cólicas e diarreia (www.plantamed.com.br) e o decocto da raiz é empregado como abortivo (AGRA, 2000). Há referências ao uso da infusão das folhas no tratamento de doenças venéreas (LEWIS et al., 1977).

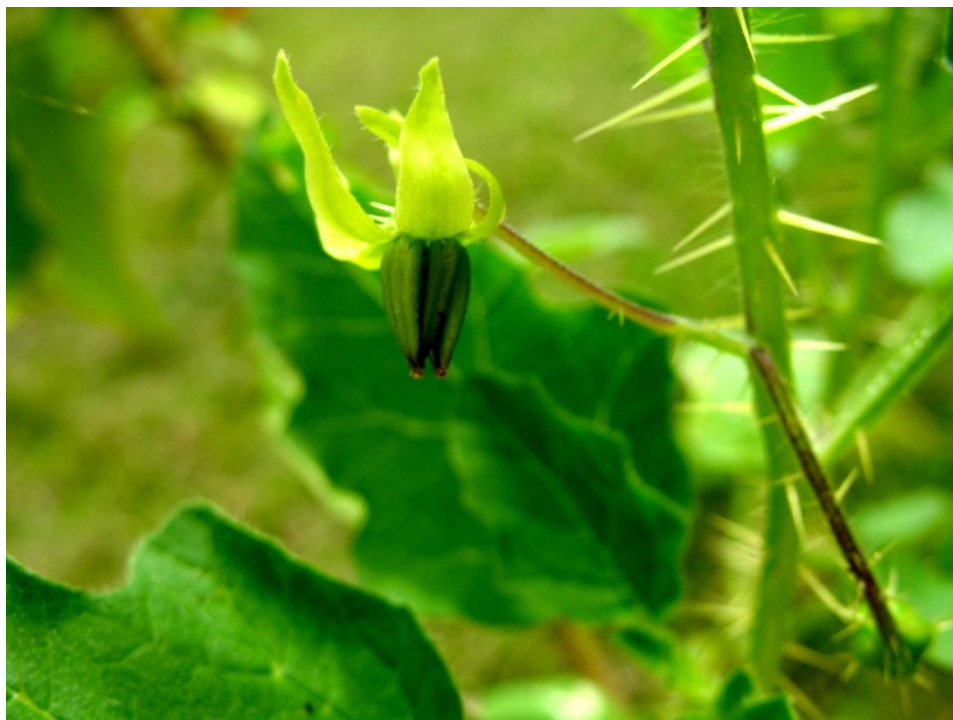


Figura 1 – Fotografia de *Solanum agrarium* Sendtner (Foto: AGRA, M. F.)

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado no Chemical Abstract, NAPRALERT (NATural PRoducts ALERT), teses, dissertações e vários sites de busca, *Solanum agrarium* vem sendo estudada do ponto de vista, botânico, químico e farmacológico. Quimicamente foi relatada a presença dos flavonóides 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona (kanferol) (SILVA et al., 2003) e 3,3',7-O-tri-metil-miricetina, este que em estudos farmacológicos apresentou atividade seqüestradora do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) (NASCIMENTO, 2006). O extrato etanólico obtido das partes aéreas da mesma espécie apresentou atividade espasmolítica em íleo de cobaia e útero de rata (SANTOS et al., 2003).

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

No músculo liso um aumento na concentração de cálcio citoplasmático $[Ca^{2+}]_c$ é a causa primária para a produção da contração e está igualmente envolvida na proliferação celular no músculo liso (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação

funcional da $[Ca^{2+}]_c$, para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do potencial de membrana (V_m) (REMBOLD, 1996).

Na busca por substâncias que interfiram na sinalização do Ca^{2+} , o músculo liso se tornou uma alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem essa investigação (KARAKI et al., 1997). O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel necessário a uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose, e a coordenação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI, 2002). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} através dos canais na membrana plasmática, e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam Ca^{2+} para o citosol (PAN; MA, 2003).

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

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração incluem (1) aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista ao receptor ativando o sistema efetor proteína $G_{q/11}$ -fosfolipase C (PLC). O IP_3 liga-se a um receptor de IP_3 permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que favorece a formação do complexo Ca^{2+}_4 -calmodulina (CaM), disparando o início do mecanismo contrátil (REMBOLD, 1996); (2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do Ca_v1 por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana e (3) liberação do Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} através de receptores de rianodina (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do RS (KOMORI et al., 1995).

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

A modulação da MLCP é uma via alternativa que contribui para a contração no músculo liso. O equilíbrio entre a MLCK e a MLCP age como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integram a contração no músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A MLCP consiste de 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A inibição da MLCP é iniciada pela ativação da pequena proteína ligante de GTP (RhoA), dependente de $\text{G}_{12/13}$. A RhoA-GTP estimula a sua cinase associada (ROK) (KIMURA et al., 1996; KARAKI et al., 1997; HORI; KARAKI, 1998) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, liberando ácido fosfatídico que é desfosforilado a diacilglicerol (DAG) levando a ativação sustentada da proteína cinase C (PKC) (EXTON, 1997). A ativação desta cinase pode resultar da ativação, dependente de G_q , da fosfolipase C (PLC) que forma DAG a partir da hidrólise do 4,5-bifosfato de inositol (PIP_2). A ROK e a PKC agem isolada ou cooperativamente para inibir a atividade da MLCP (SOMLYO; SOMLYO, 2000). Embora a ROK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos Thr696 e Thr853 da MYPT1 humana. A ROK pode também fosforilar o resíduo Thr38 da proteína inibitória endógena CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a MLCP por mais de 1000 vezes (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

O relaxamento do músculo liso pode ocorrer pelo mecanismo eletromecânico, por hiperpolarização. Este evento pode ocorrer diretamente, pela abertura de canais K^+ na membrana celular, que pode ser produzida por drogas (por exemplo: cromacalina, levocromacalina e nicorandil) ou pelos fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHFs) (NAGAO; VANHOUTTE, 1993; CAMPBELL et al., 1996; VANHEEL; VAN DE VOORDE, 2000; MEDHORA et al.,

2001; ARCHER et al., 2003), aumentando o efluxo de K^+ da célula (EDWARDS; WESTON, 1990; GURNEY, 1994), e/ou indiretamente, em função da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs), como o óxido nítrico (NO) (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), ou a prostaciclina (PGI_2) (DUSTING; MONCADA; VANE, 1977). O NO ativa a ciclase de guanilil (GC) solúvel, produzindo monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento na [GMPc] ativa a proteína cinase G (PKG). Enquanto que a ligação da PGI_2 ao seu receptor ativa diretamente uma ciclase de adenilil (AC) particulada, resultando na formação do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), que ativa a proteína cinase A (PKA), e em altas concentrações ativa a PKG. Em ambos os casos, o resultado é a ativação de canais de K^+ por essas cinases (LINCOLN et al., 2000). Dessa maneira, a hiperpolarização reduz o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 , diminuindo portanto a $[Ca^{2+}]_c$, a fosforilação da miosina e, consequentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Os mecanismos de relaxamento envolvidos no acoplamento fármaco-mecânico incluem: (1) Aumento na atividade da enzima Ca^{2+} – ATPase (bomba de Ca^{2+}), tanto do RS como da membrana plasmática, através da fosforilação pela PKG e/ou PKA, levando a um aumento do seqüestro e da extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo assim a $[Ca^{2+}]_c$; (2) Diminuição da formação do IP_3 e consequente diminuição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares sensíveis ao IP_3 ; (3) Redução da $[Ca^{2+}]_c$ via GMPc/PKG ou AMPc/PKA por diminuir o influxo de Ca^{2+} indiretamente, por hiperpolarização, ou por agir diretamente nos Ca_v1 inativando-os e finalmente (4) Diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} na membrana plasmática (BLAUSTEIN, 1989).

Uma vez que a espécie *Solanum agrarium* Sendtner apresentou, em estudos preliminares, efeito espasmolítico muito potente comparado a outras espécies de *Solanum* que vêm sendo estudada em nosso laboratório, decidiu-se investigar o possível mecanismo de ação espasmolítica do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Solanum agrarium* (SA-EtOH) dando continuidade aos resultados obtidos por Santos et al. (2003).



Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir com o estudo farmacológico da família Solanaceae, fornecendo conhecimento relativo às atividades farmacológicas da espécie *Solanum agrarium* Sendtner com a finalidade posterior de descobrir drogas com maior potencial terapêutico ou que possam ser utilizadas como ferramentas farmacológicas para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvendo a musculatura lisa.

2.2 Específicos

Avaliar o potencial citotóxico do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato.

Caracterizar, em nível funcional, o mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia e útero de rata, investigando assim:

1. o envolvimento dos receptores muscarínicos, histaminérgicos e os da ocitocina;
2. a participação dos canais de cálcio;
3. a participação dos canais de potássio.

Material e Métodos



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material Botânico

A espécie *Solanum agrarium* Sendtner foi coletada no município de Vieirópolis-PB no ano de 2000. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF). Uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) sob o código de identificação Agra 2120.

3.1.2 Animais

Eram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g, ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200-300 g e ratas Wistar virgens pesando entre 150-250 g, todos provenientes do Biotério Prof. Thomas George do LTF/UFPB.

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

Todos os animais eram eutanasiados seguindo os princípios de cuidados com animais e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF (CEPA/LTF), certidão número 0605/09.

3.1.3 Substâncias

O cloreto de cálcio diidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de magnésio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), o cloreto de potássio (KCl), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) foram obtidos da VETEC (Brasil).

O fosfato monossódico 1-hidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o sulfato de magnésio monohidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e o ácido clorídrico (HCl P.A.) foram obtidos da Nuclear (Brasil).

O cloreto de sódio (NaCl) foi obtido da Dinâmica (Brasil). O cloridrato de carbamilcolina (CCh) foi obtido da Merck.

O dietilestilbestrol, o cloridrato de histamina, apamina, S-(-)-Bay K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster), cloreto de tetraetilamônio (TEA^+), cloridrato de glibenclamida, óleo de castor (cremophor[®]), cloreto de cézio (CsCl) e TRITON X-100 foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

A 4-aminopiridina (4-AP) foi obtida da Fluka and Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha).

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

Todas as substâncias foram mantidas em um “freezer” à temperatura de 0 °C, exceto o TRITON X-100 que foi mantido em temperatura ambiente, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto S-(-)-Bay K8644, o dietilestilbestrol e a glibenclamida que foram dissolvidos em etanol absoluto.

3.1.4 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados foram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4), todas aeradas com carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantidas a 37 °C para íleo de cobaia e a 32 °C para útero de rata, cujas composições estão descritas nas tabelas a seguir.

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs modificado (SUN; BENISHIN, 1994).

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

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

Substância	Concentração (mM)
NaCl	154,0
KCl	5,6
CaCl ₂	2,2
MgCl ₂	2,1
NaHCO ₃	6,0
Glicose	5,6

Tabela 3 – Composição da solução de Krebs modificado despolarizante (KCl 70 mM) sem Ca^{2+} .

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

3.1.5 Preparação do extrato para os ensaios farmacológicos

O extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Solanum agrarium* (SA-EtOH) foi cedido pela Profa. Dra. Tânia Maria Sarmiento da Silva e foi solubilizado em cremofor (3 v/v) e diluído em água destilada até a concentração de 10 mg/mL (solução estoque), conservada a 0 °C. No momento da realização dos protocolos experimentais a solução estoque era diluída em água destilada de acordo com a necessidade de cada protocolo experimental.

3.1.6 Aparelhagem

Para a determinação da atividade hemolítica, as soluções contendo eritrócitos de rato eram centrifugadas em centrífuga modelo 206 (FANEM, Brasil) e as leituras realizadas em espectrofotômetro DU-640 (BECKMAN, USA).

Para o registro das contrações isotônicas os órgãos eram suspensos em cubas de 5 mL (Figura 2B) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição

frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil) (Figura 2A). As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força isométricos FORT-10 (Figura C) conectados a um amplificador modelo TMB4M, ambos da World Precision Instruments (EUA), os quais estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital (BioData, Brasil) (Figura 2D) instalada em um computador contendo o programa BioMed[®] versão Rv2 (Figura 2E).

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

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



Figura 2 – Aparelhos utilizados para o registro de contrações: Aparato para registro das contrações isotônicas com cilindro esfumado de um quimógrafo (A), cuba de vidro (B), transdutor de força (C), microcomputador (D) e sistema de banho para órgão isolado (E).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Avaliação toxicológica: efeito do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato

A avaliação do potencial citotóxico do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato seguiu a metodologia descrita por Rangel et al. (1997) em que os ratos eram mantidos em jejum por um período de 12 horas, tendo acesso à água *ad libitum* antes do início dos experimentos. Após este período, os ratos eram eutanasiados por deslocamento cervical e uma amostra de sangue foi coletada através do plexo braquial e imediatamente misturada com uma solução (pH = 7,4) de NaCl (0,9%) e CaCl₂ (10 mM) na proporção de 1:30 sob agitação lenta e constante para evitar coagulação e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento era repetido e o sedimento da última centrifugação era ressuspenso a 0,4% em solução de NaCl (0,9%) e CaCl₂ (10 mM). Separadamente, o extrato SA-EtOH era adicionado a 4 mL da suspensão de eritrócitos, sendo diluído de uma solução estoque de 10 mg/mL, em preparações diferentes, para que na suspensão atingisse as concentrações de 81, 243 e 500 µg/mL. O controle negativo era preparado com suspensão de eritrócitos mais NaCl e CaCl₂ (0% de hemólise) e o controle positivo com suspensão de eritrócitos mais 100 µL de Triton X-100 1% (100% de hemólise). As amostras eram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo, eram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria a 540 nm e expressa em percentagem. Quando a hemólise foi quantificada em até 20% esta foi considerada uma baixa atividade hemolítica, entre 20 e 50% foi considerada uma atividade hemolítica moderada, acima disto a hemólise foi considerada alta. (PROKOF'EVA et al., 2004).

3.2.2 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia

3.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por carbacol ou por histamina

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

Após cuidadosa dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro de 5 mL e deixados em repouso por 30 minutos sob tensão de 1 g, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Após o período de estabilização duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares ao carbacol ou à histamina eram obtidas. Em seguida, na ausência do carbacol ou da histamina, o extrato SA-EtOH era incubado por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença do extrato SA-EtOH, uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao carbacol ou à histamina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do extrato SA-EtOH com àquela obtida pela amplitude média das curvas controle (na ausência do extrato SA-EtOH). O tipo de antagonismo exercido pelo extrato SA-EtOH foi avaliado com base na análise dos valores da concentração de uma substância que produza 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) e dos valores do efeito máximo (E_{max}) do carbacol ou da histamina calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH.

3.2.2.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina

O íleo era montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital era obtida com 40 mM de KCl, para verificação da funcionalidade do órgão e durante a fase tônica sustentada (8 – 10 min) de uma segunda contração induzida por 40 mM de KCl, 10^{-6} M de CCh ou de histamina, o extrato SA-EtOH era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato SA-EtOH foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelos agentes contráteis. Os valores de CE_{50} foram expressos como a média $\pm$ e.p.m. dos valores individuais da CE_{50} , calculados pelo uso da regressão não linear.

3.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v)

3.2.2.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.1. Após um período de estabilização do órgão por 30 minutos a solução de Krebs modificado era substituída pela solução despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} , por um período de 45 minutos. Eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa ao $CaCl_2$, em seguida o extrato SA-EtOH era incubado na ausência de $CaCl_2$ por 15 minutos e após esse período uma terceira curva cumulativa ao $CaCl_2$ era obtida na presença do extrato SA-EtOH. O tipo de antagonismo exercido pelo extrato SA-EtOH foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e do E_{max} do $CaCl_2$ calculado a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH.

3.2.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

Estudos anteriores mostram que as respostas contráteis aos ativadores de Ca_v1 , S-(-)-Bay K8644 e FPL 64176, são potencializadas pelo aumento moderado (8-20 mM) da $[\text{K}]_e$, concentrações estas superiores às da solução de Krebs modificado (WEI et al., 1986; CONTE-CAMERINO et al., 1987; ZHENG; RAMPE; TRIGGLE, 1991; USOWICZ et al., 1995). Portanto, após a estabilização por 30 minutos em solução de Krebs modificado, o íleo era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos e em sua presença era induzida uma contração com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v do tipo L ou Ca_v1 (FERRANTE et al., 1989). Durante a estabilização da fase tônica dessa contração o extrato SA-EtOH era adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644. A CE_{50} foi obtida por análise de regressão não-linear.

3.2.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

3.2.2.4.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com KCl 40 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-6} M de histamina, e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o extrato SA-EtOH de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento era adicionada à cuba 5 mM de CsCl , que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (LATORRE et al., 1989), e após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração com 10^{-6} M de histamina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o SA-EtOH de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pelo SA-EtOH foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50}

do SA-EtOH foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do bloqueador.

3.2.2.4.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA⁺) ou 4-aminopiridida (4-AP)

O íleo era montado como descrito no item 3.2.2.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com KCl 40 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-6} M de histamina e sob o componenteônico dessa contração era adicionado o extrato SA-EtOH de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento o tecido era incubado por 20 minutos com 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (SUN; BENISHN, 1994), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo de canais de K⁺ de pequena condutância ativados pelo Ca²⁺ (SK_{Ca}) (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; VAN DER STAAY et al., 1999), 1 mM de TEA⁺, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais de K⁺ de grande condutância ativados por Ca²⁺ (BK_{Ca}) (KNOT, BRAYDEN, NELSON, 1996) ou 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio sensíveis a voltagem (K_v) (ROBERTSON; NELSON, 1994), em preparações diferentes e ainda na presença dos bloqueadores, uma contração com 10^{-6} M de histamina era obtida. Em seguida o SA-EtOH era adicionado cumulativamente sob o componenteônico da contração.

O relaxamento produzido pelo SA-EtOH e os valores de CE₅₀ do SA-EtOH foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença dos bloqueadores.

3.2.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em útero isolado de rata

3.2.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina

As ratas eram tratadas 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg) por via subcutânea, para indução do estro. Decorrido este tempo, as ratas eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais. Após abertura da 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 (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, neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 10 minutos. Após o período de estabilização, duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à ocitocina eram obtidas. Em seguida, na ausência da ocitocina, o extrato SA-EtOH foi incubado por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença do extrato SA-EtOH, uma nova curva concentração-resposta cumulativa à ocitocina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do extrato SA-EtOH com aquela obtida pela amplitude média das curvas controle na ausência do mesmo. O tipo de antagonismo exercido pelo extrato SA-EtOH foi avaliado com base na análise dos valores de CE_{50} e dos valores do E_{max} da ocitocina calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH.

3.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O útero era montado como descrito no item 3.2.3.1. O tecido permanecia em repouso por 40 minutos em contato com a solução de Locke-Ringer. Após o período de estabilização, eram obtidas duas curvas concentrações-resposta

de amplitude similares induzidas por 60 mM de KCl ou 10^{-2} UI/mL de ocitocina, de amplitudes similares, em preparações diferentes, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, o extrato SA-EtOH era adicionado cumulativamente à cuba.

O relaxamento produzido foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. A CE_{50} foi obtida por análise de regressão não-linear como descrito anteriormente.

3.2.3.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

3.2.3.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O útero era montado como descrito no item 3.2.3.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com KCl 60 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o extrato SA-EtOH de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento era adicionada à cuba 5 mM de CsCl, que nessa concentração é um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (LATORRE et al., 1989), e após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o SA-EtOH de forma cumulativa.

O relaxamento produzido pelo SA-EtOH e os valores de CE_{50} do SA-EtOH foram determinados como descrito anteriormente.

3.2.3.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA⁺), apamina ou glibenclamida

O útero era montado como descrito no item 3.2.3.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com KCl 60 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o extrato SA-EtOH de forma cumulativa (curva controle). Em outro experimento o tecido era incubado por 20 minutos com 3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais de potássio operados por voltagem (K_V) (AARONSON et al., 2006), 1 mM de TEA⁺, bloqueador dos canais de potássio de larga condutância ativados pelo Ca²⁺ (BK_{Ca}) (HUANG, 1998, MURRAY et al., 1991), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo de canais de K⁺ de pequena condutância ativados pelo Ca²⁺ (SK_{Ca}) (TSAI et al., 1998) ou 3×10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997), em preparações diferentes e ainda na presença dos bloqueadores, uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina era obtida. Em seguida o SA-EtOH era adicionado cumulativamente sob o componente tônico da contração.

O relaxamento produzido pelo SA-EtOH e os valores de CE₅₀ do SA-EtOH foram determinados como descrito anteriormente.

3.2.4 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média, e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se o teste *t* (não-pareado) ou análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni, onde para valores de $p < 0,05$, as diferenças entre as médias foram consideradas significantes. Os valores de CE₅₀ foram calculados por regressão não-linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).



Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação toxicológica: efeito do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato

Na avaliação da citotoxicidade em eritrócitos de rato, o extrato SA-EtOH não induziu hemólise na concentração de 81 µg/mL. No entanto, apresentou uma atividade hemolítica moderada nas concentrações de 243 e 500 µg/mL ($E_{\max} = 21,2 \pm 3,2\%$) (Gráfico 1, $n = 3$).

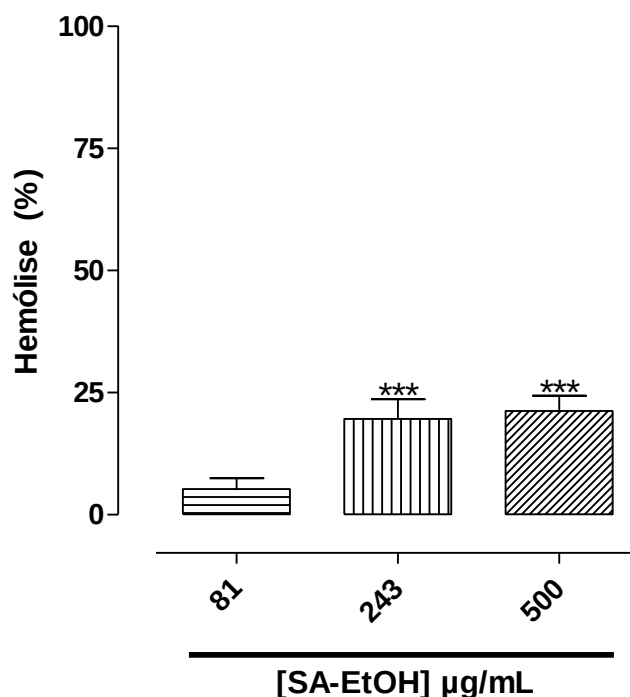


Gráfico 1 – Efeito hemolítico do extrato SA-EtOH em eritrócitos de rato ($n = 3$). NaCl + CaCl₂ (controle negativo) e TRITON X-100 (controle positivo). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni, *** $p < 0,001$ (controle negativo vs. SA-EtOH).

4.2 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia

4.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por carbacol ou por histamina

O extrato SA-EtOH inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por concentrações crescentes de carbacol (Gráfico 2) ou histamina (Gráfico 3). As curvas cumulativas ao carbacol foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $89,5 \pm 4,5$; $69,3 \pm 4,6$; $49,6 \pm 6,0$; $30,7 \pm 5,2$ e $12,6 \pm 5,8\%$, respectivamente (Gráfico 2). Os valores de CE_{50} do carbacol passaram de $0,3 \pm 0,01 \times 10^{-7}$ M (controle) para $0,8 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,2$; $2,4 \pm 0,9$; $4,0 \pm 1,3$ e $9,3 \pm 1,2 \times 10^{-7}$ M, respectivamente (Tabela 4).

Da mesma forma, as curvas cumulativas à histamina foram desviadas para a direita de forma não paralela (Gráfico 3) e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $92,5 \pm 4,7$; $80,4 \pm 4,5$; $58,4 \pm 5,2$; $28,0 \pm 4,2$ e $6,0 \pm 2,5\%$, respectivamente (Tabela 5). Os valores de CE_{50} da histamina passaram de $1,9 \pm 0,3 \times 10^{-7}$ M (controle) para $3,2 \pm 0,6$; $3,9 \pm 0,7$; $2,8 \pm 0,5$; $3,7 \pm 0,9$ e $7,9 \pm 4,0 \times 10^{-7}$ M, respectivamente (Tabela 5).

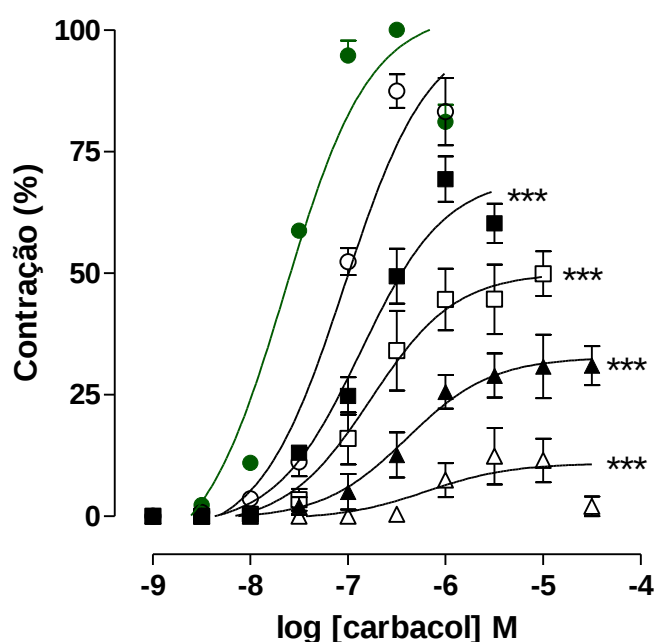


Gráfico 2 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao carbacol na ausência (controle) (●) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 27 (○); 81 (■); 243 (□); 500 (▲) e 750 µg/mL (△) em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni, ****p* < 0,001 (controle vs. extrato SA-EtOH).

Tabela 4 – Valores de CE₅₀ (M) e de E_{max} (%) do carbacol na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia (n = 5).

SA-EtOH (µg/mL)	CE ₅₀ (M)	E _{max} (%)
Controle	0,3 ± 0,01 × 10 ⁻⁷	100
27	0,8 ± 0,1 × 10 ⁻⁷ ***	89,5 ± 4,5 *
81	1,5 ± 0,2 × 10 ⁻⁷ ***	69,3 ± 4,6 ***
243	2,4 ± 0,9 × 10 ⁻⁷ *	49,6 ± 6,0 ***
500	4,0 ± 1,3 × 10 ⁻⁷ *	30,7 ± 5,2 ***
750	9,3 ± 1,2 × 10 ⁻⁷ ***	12,6 ± 5,8 ***

Teste *t*; **p* < 0,05 e ****p* < 0,001 (controle vs. extrato SA-EtOH).

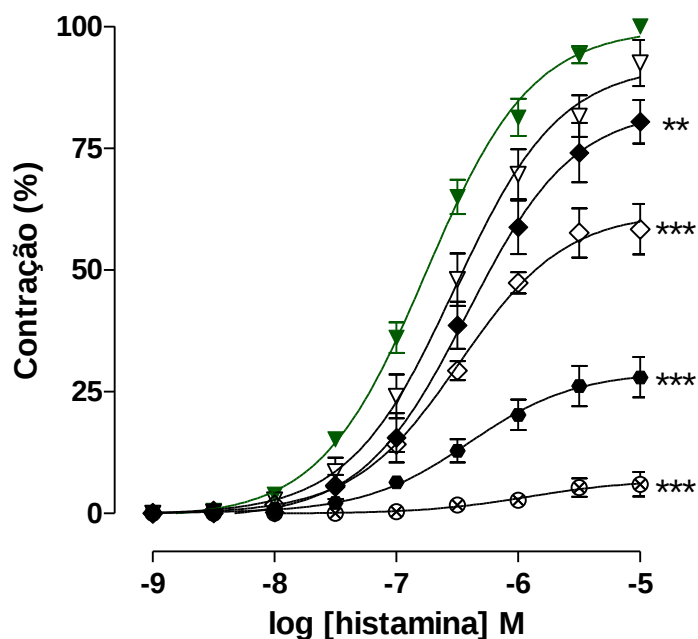


Gráfico 3 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (controle) (▼) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 9 (▽), 27 (◆); 81 (◇); 243 (●) e 500 µg/mL (⊗) em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA one-way seguido por Bonferroni, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. extrato SA-EtOH).

Tabela 5 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) da histamina na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia (n = 5).

SA-EtOH (µg/mL)	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-7}$	100
9	$3,2 \pm 0,6 \times 10^{-7}$	$92,5 \pm 4,7$
27	$3,9 \pm 0,7 \times 10^{-7} *$	$80,4 \pm 4,5 **$
81	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-7}$	$58,4 \pm 5,2 ***$
243	$3,7 \pm 0,9 \times 10^{-7}$	$28,0 \pm 4,2 ***$
500	$7,9 \pm 4,0 \times 10^{-7} *$	$6,0 \pm 2,5 ***$

Teste t; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. extrato SA-EtOH).

4.2.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina

O extrato SA-EtOH (0,1 – 750 µg/mL) relaxou de maneira dependente de concentração e significativa o íleo de cobaia (Figura 3) pré-contraído com 40 mM de KCl ($CE_{50} = 17,4 \pm 3,5$ µg/mL), ou com 10^{-6} M de carbacol ($CE_{50} = 119,4 \pm 24,3$ µg/mL) ou de histamina ($CE_{50} = 18,7 \pm 4,6$ µg/mL). Os valores de CE_{50} das contrações tônicas induzidas por KCl e histamina não apresentaram diferença significativa, no entanto, diferiram do valor de CE_{50} das contrações tônicas induzidas por carbacol, em que a potência relaxante do extrato SA-EtOH foi reduzida em 7 vezes. O E_{max} (100%) do extrato SA-EtOH foi atingido na concentração de 500 µg/mL quando a contração era induzida por KCl ou histamina e por 750 µg/mL quando a contração era induzida por carbacol (Gráficos 4 e 5). O tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir o seu E_{max} foi de $118,2 \pm 3,2$, $141,4 \pm 9,3$ e $105,0 \pm 5,7$ min. para preparações pré-contraídas com KCl, carbacol ou histamina, respectivamente. Até 2 horas da retirada do extrato SA-EtOH da cuba, os agentes contráteis não conseguiram reverter o efeito relaxante.

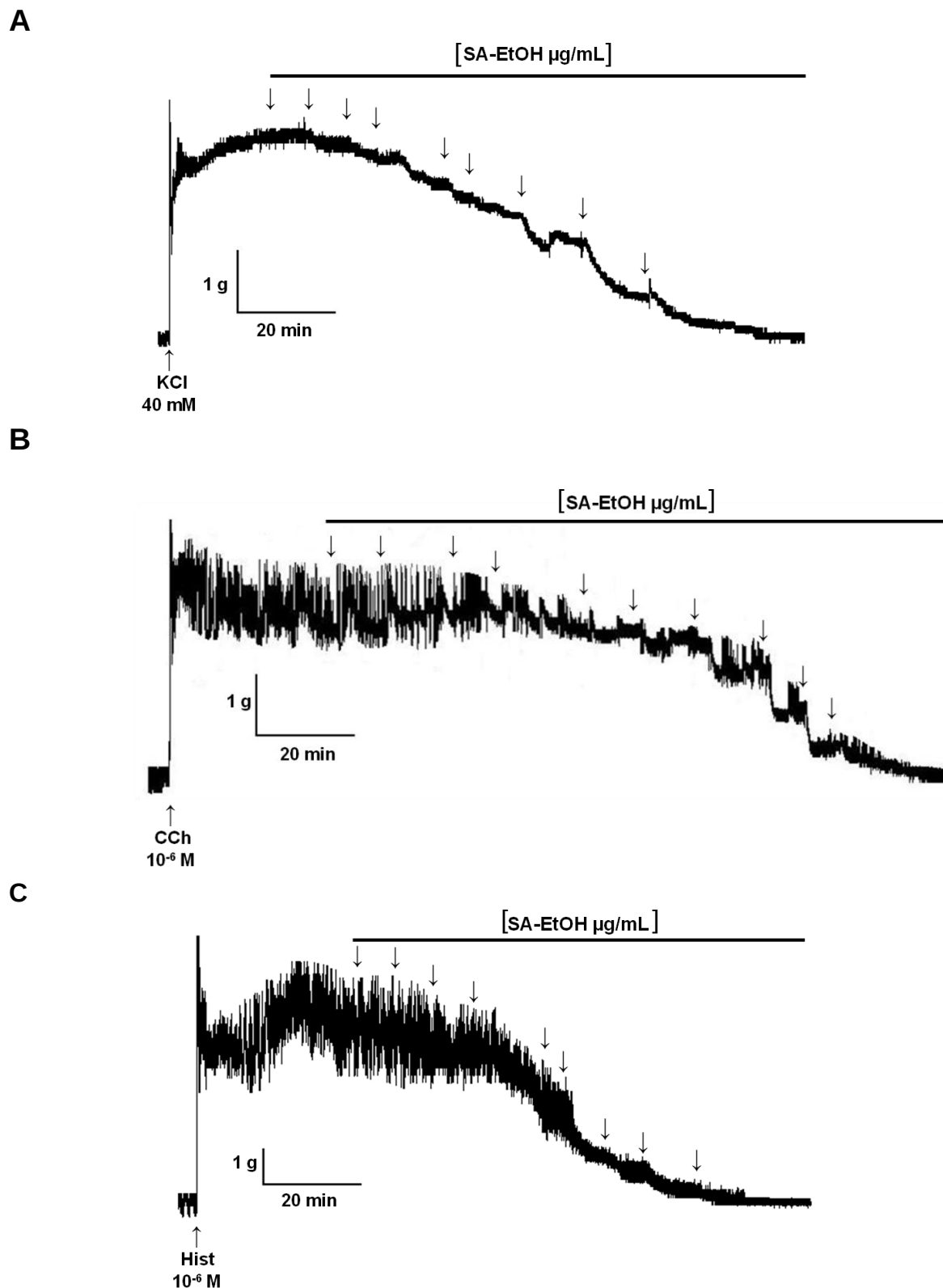


Figura 3 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**), 10^{-6} M de carbacol (**B**) e 10^{-6} M de histamina (**C**) em íleo isolado de cobraia. As setas representam as concentrações cumulativas (0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) do extrato SA-EtOH.

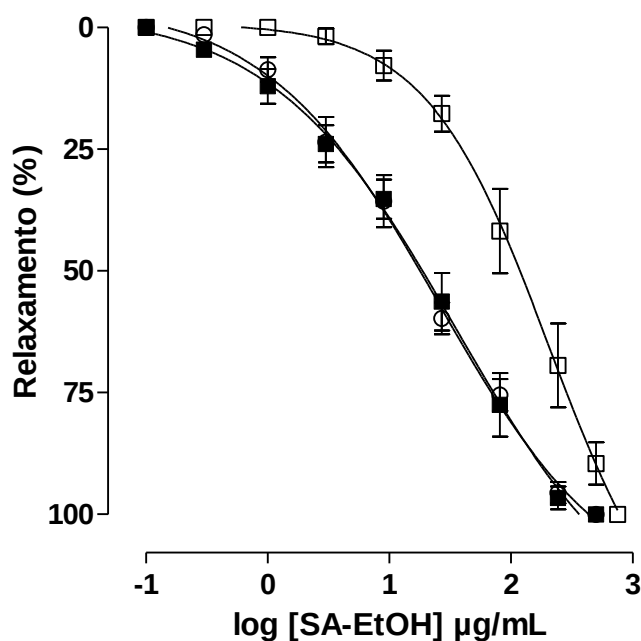


Gráfico 4 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM KCl (○), 10^{-6} M de carbacol (□) ou 10^{-6} M de histamina (■) em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

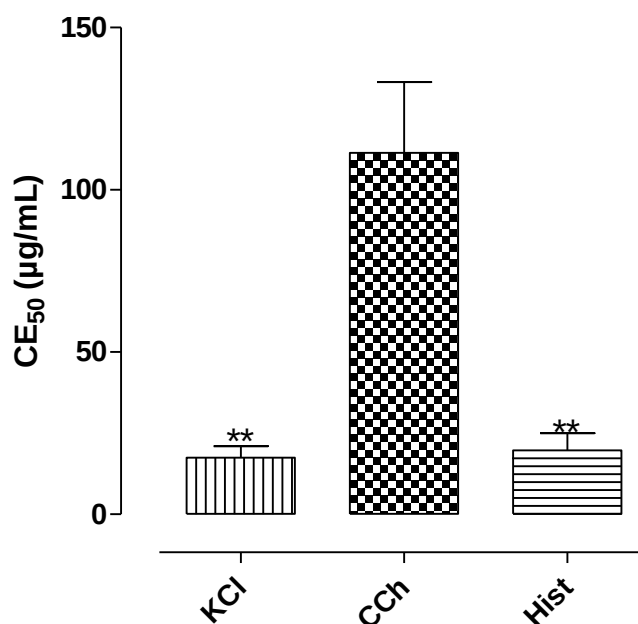


Gráfico 5 – Valores da CE₅₀ do extrato SA-EtOH sobre a fase tônica das contrações induzidas por 40 mM KCl, 10^{-6} M de carbacol ou 10^{-6} M de histamina, respectivamente, em íleo isolado de cobaia (n = 5). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, ***p* < 0,01 (CCh vs. KCl ou hist).

4.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v)

4.2.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O extrato SA-EtOH inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas pelo aumento na concentração extracelular de CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $86,7 \pm 5,5$; $68,3 \pm 5,7$; $65,1 \pm 4,6$; $57,1 \pm 6,6$; $30,1 \pm 6,8$ e $15,9 \pm 1,9\%$, respectivamente (Gráfico 6). Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $0,8 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M (controle) para $1,0 \pm 0,2$; $1,5 \pm 0,5$; $1,2 \pm 0,4$; $3,8 \pm 1,5$; $5,9 \pm 1,2$ e $7,3 \pm 1,5$ M, respectivamente (Tabela 6).

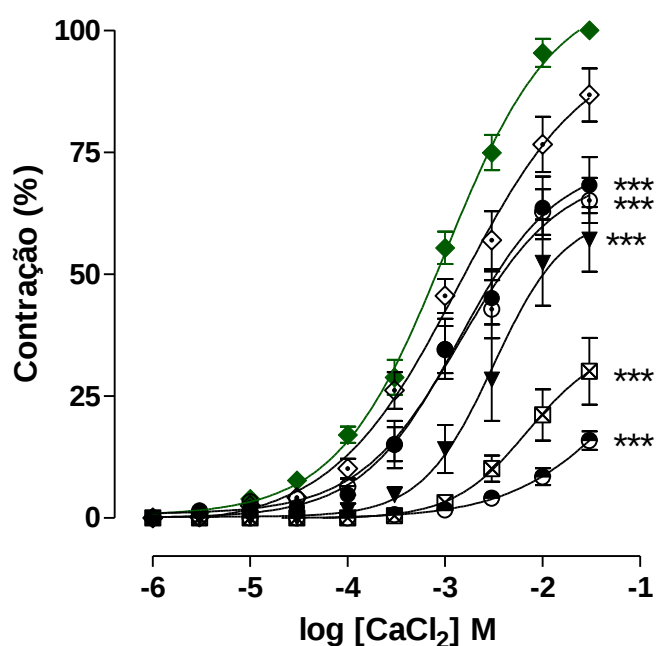


Gráfico 6 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (◆) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 9 (◇), 27 (●), 81 (⊙), 243 (▼), 500 (⊠) e 750 µg/mL (▲), em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA *one-way* seguido por Bonferroni; *** $p < 0,001$ (controle vs. extrato SA-EtOH).

Tabela 6 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) do CaCl_2 na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia (n = 5).

SA-EtOH (µg/mL)	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$0,8 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	100
9	$1,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	$86,7 \pm 5,5$ *
27	$1,5 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$68,3 \pm 5,7$ ***
81	$1,2 \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$65,1 \pm 4,6$ ***
243	$3,8 \pm 1,5 \times 10^{-3}$	$57,1 \pm 6,6$ ***
500	$5,9 \pm 1,2 \times 10^{-3}$ **	$30,1 \pm 6,8$ ***
750	$7,3 \pm 1,5 \times 10^{-3}$ **	$15,9 \pm 1,9$ ***

Teste *t*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. extrato SA-EtOH).

4.2.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O extrato SA-EtOH (0,1 – 750 µg/mL) relaxou de maneira dependente de concentração e significativa o íleo de cobaia pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista dos Ca_v , em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (Figura 4). O extrato SA-EtOH foi 11 vezes mais potente em relaxar o íleo pré-contraído por 40 mM de KCl ($\text{CE}_{50} = 17,4 \pm 3,5$ µg/mL) do que por S-(-)-Bay K8644 ($\text{CE}_{50} = 187,2 \pm 27,3$ µg/mL) (Gráfico 7).

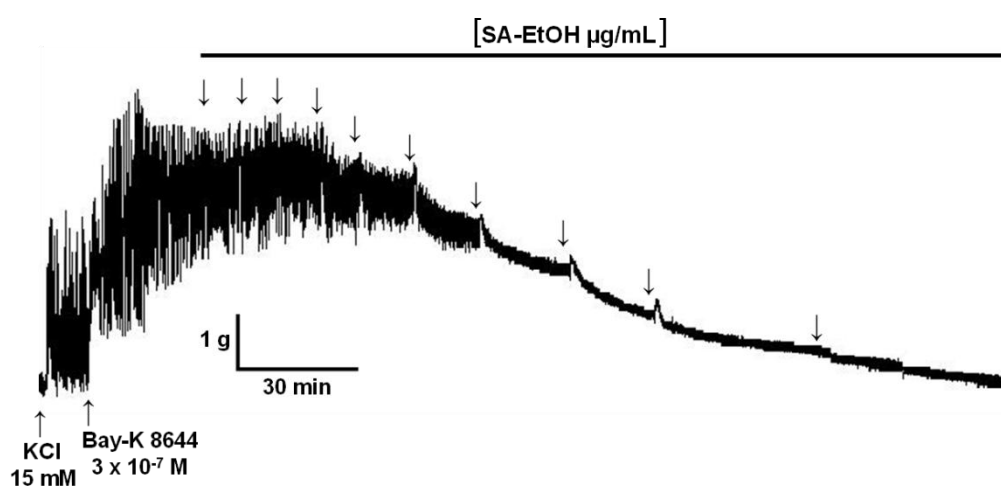


Figura 4 – Registro original do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 em íleo isolado de cobaia parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (10 minutos). As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500 e 750 µg/mL, respectivamente.

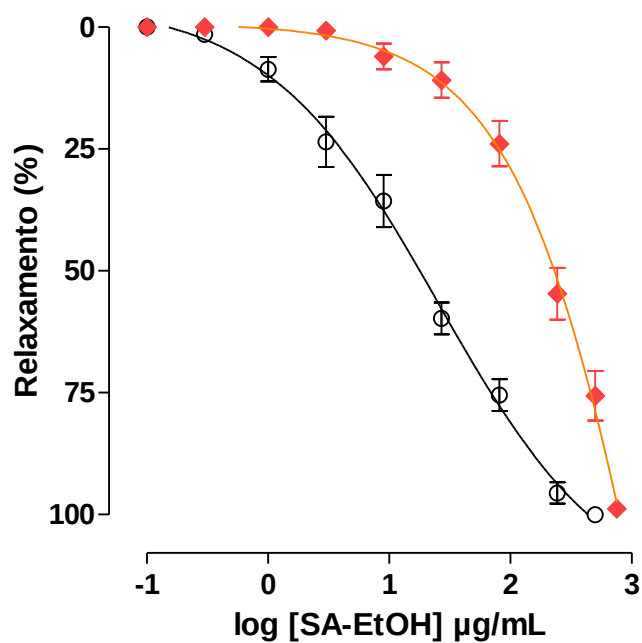


Gráfico 7 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (○) e 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (♦) (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

4.2.4.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O extrato SA-EtOH (0,1 – 750 $\mu\text{g/mL}$) relaxou o íleo isolado de cobaia pré-contraído com histamina na ausência ($\text{CE}_{50} = 18,7 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$) e na presença ($\text{CE}_{50} = 44,3 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 5). A potência relaxante do extrato SA-EtOH foi reduzida 2,4 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo extrato SA-EtOH na ausência de CsCl (Gráficos 8 e 13). O tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir o seu E_{max} aumentou para $132,0 \pm 6,4 \text{ min}$ na presença de CsCl.

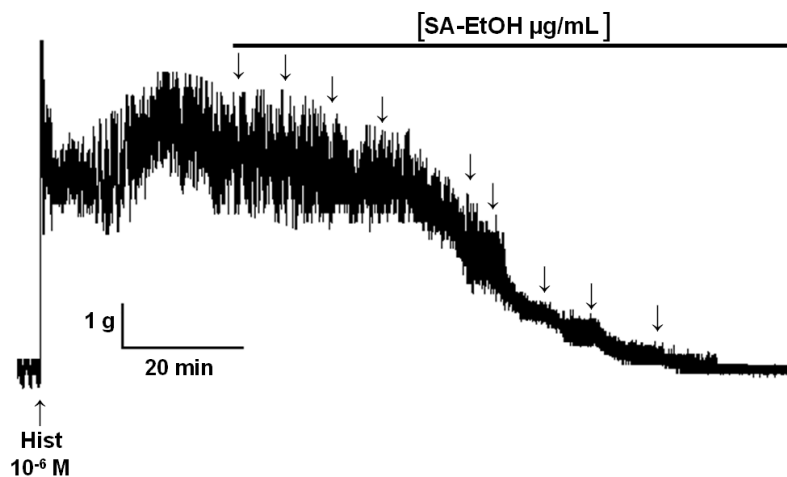
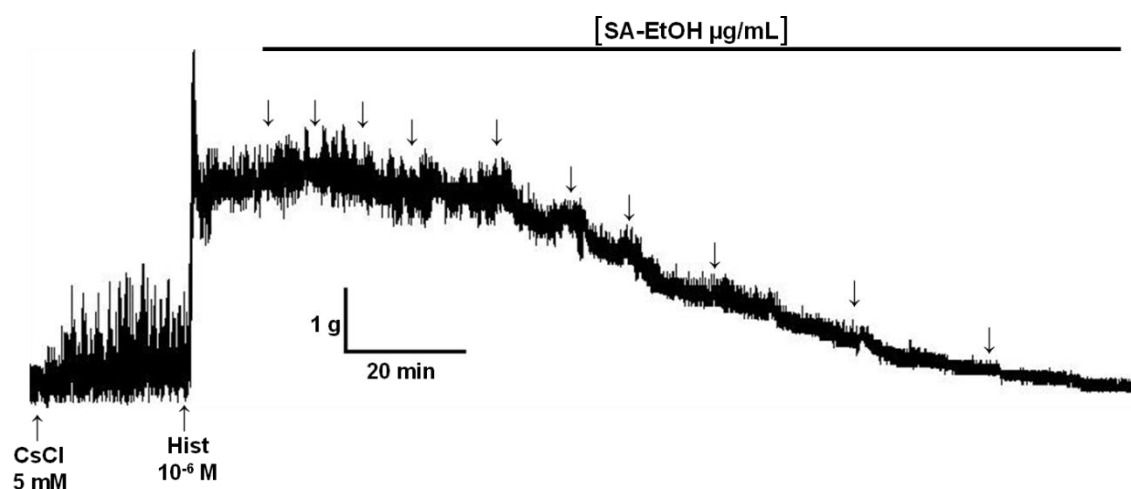
A**B**

Figura 5 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de histamina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 5 mM de CsCl em íleo isolado de cobaia. As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500; 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

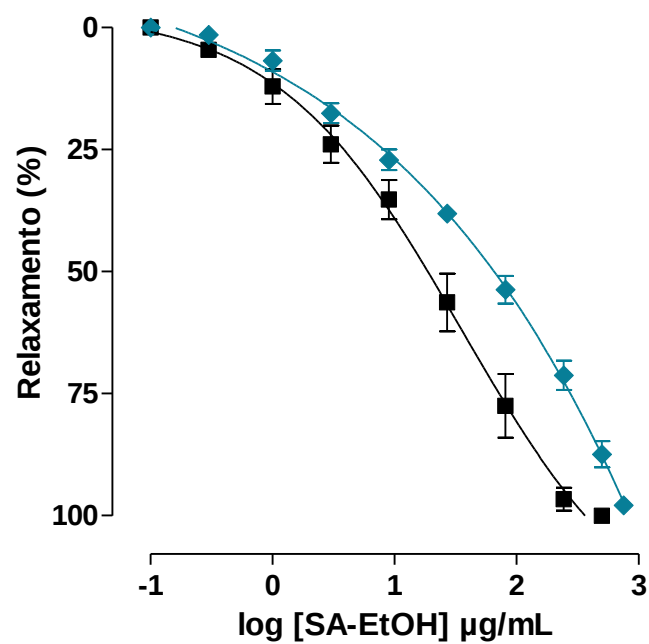


Gráfico 8 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (◆) de 5 mM de CsCl, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.2.4.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, na ausência e na presença de glibenclamida, apamina, tetraetilamônio (TEA⁺) ou 4-aminopiridida (4-AP)

A curva de relaxamento do extrato SA-EtOH ($n = 5$), com CE_{50} de $18,7 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$, não foi alterada na presença de 10^{-5} M de glibenclamida, bloqueador seletivo dos K_{ATP} ($CE_{50} = 19,8 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, Gráfico 9) e 100 nM de apamina, bloqueador seletivo dos SK_{Ca} ($CE_{50} = 21,3 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$, Gráfico 10). No entanto, foi deslocada para direita na presença de 1 mM de TEA⁺, nessa concentração um bloqueador seletivo ($CE_{50} = 37,7 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$, Figura 6 e Gráfico 11) e 0,3 mM de 4-AP, bloqueador seletivo dos K_V ($CE_{50} = 48,9 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$, Figura 7 e Gráfico 12). Em todas as situações o tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir seu E_{max} não alterou.

Analisando os valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$), pode-se verificar que a CE_{50} do extrato SA-EtOH na presença dos bloqueadores apamina e glibenclamida não foram alteradas quando comparada com o controle. Entretanto, na presença dos bloqueadores CsCl, TEA⁺ e 4-AP a potência relaxante foi reduzida cerca de 2,4; 2 e 2,6 vezes, respectivamente (Gráfico 13).

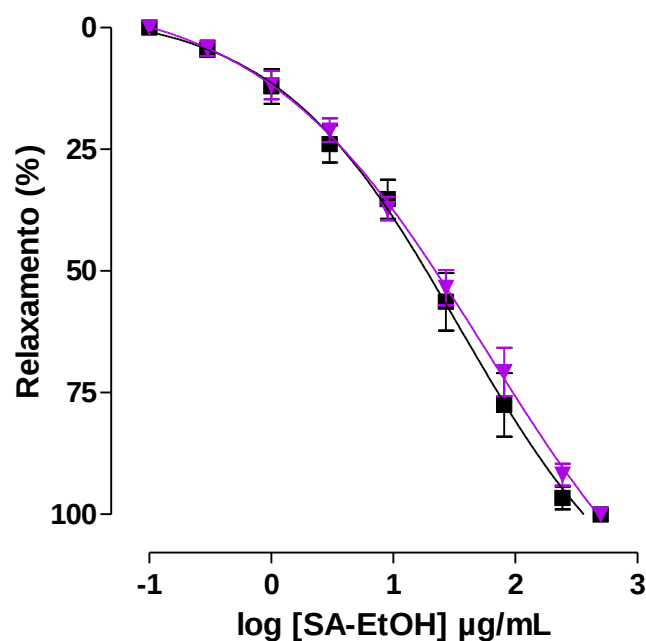


Gráfico 9 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (▼) de 10^{-5} M de glibenclamida, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

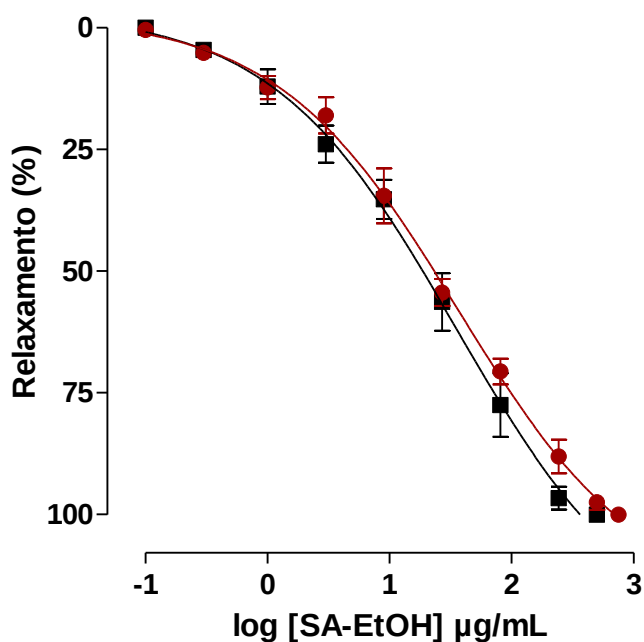


Gráfico 10 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (●) de 100 nM de apamina, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

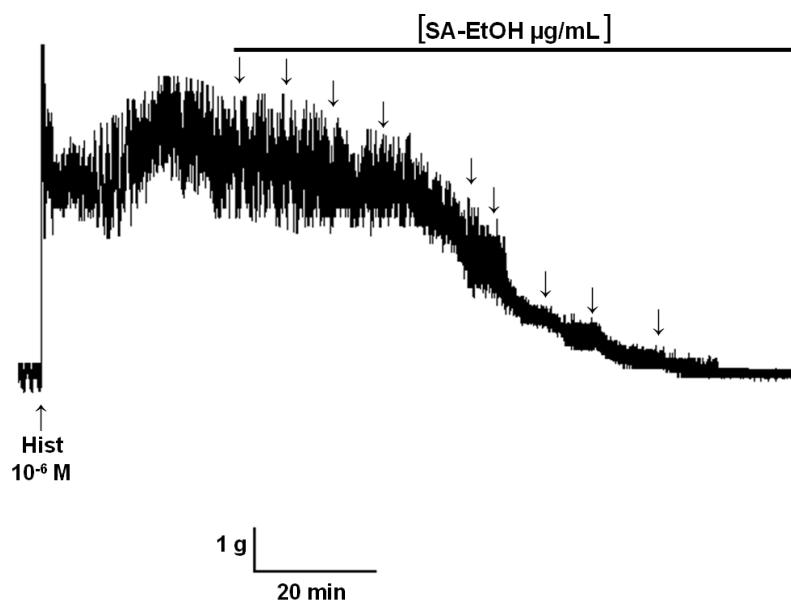
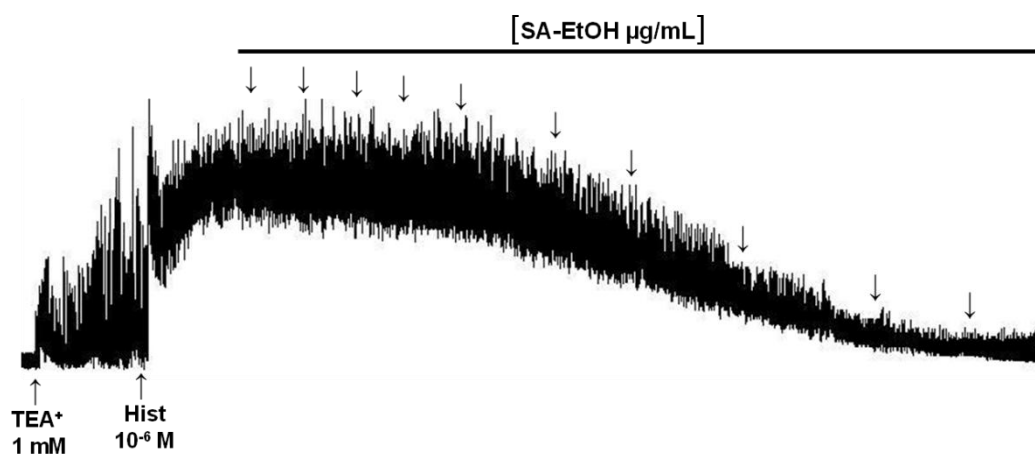
A**B**

Figura 6 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10⁻⁶ M de histamina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 1 mM de TEA⁺ em íleo isolado de cobraia. As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500; 750 µg/mL, respectivamente.

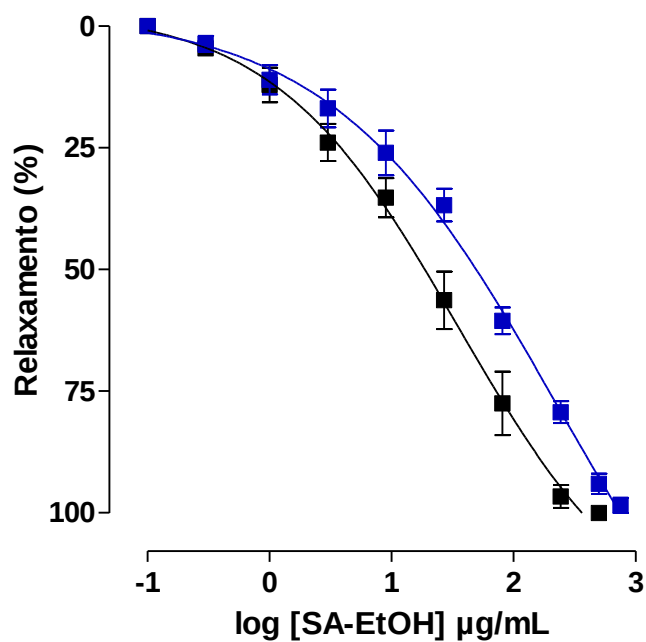


Gráfico 11 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (■) de 1 mM de TEA⁺, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

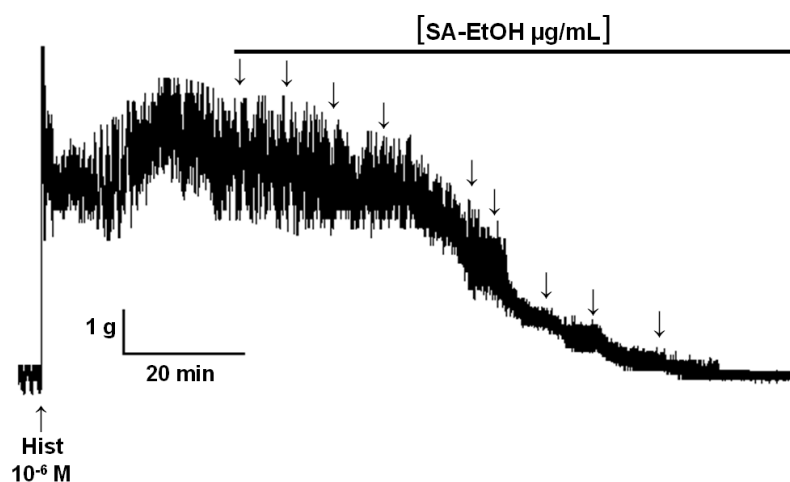
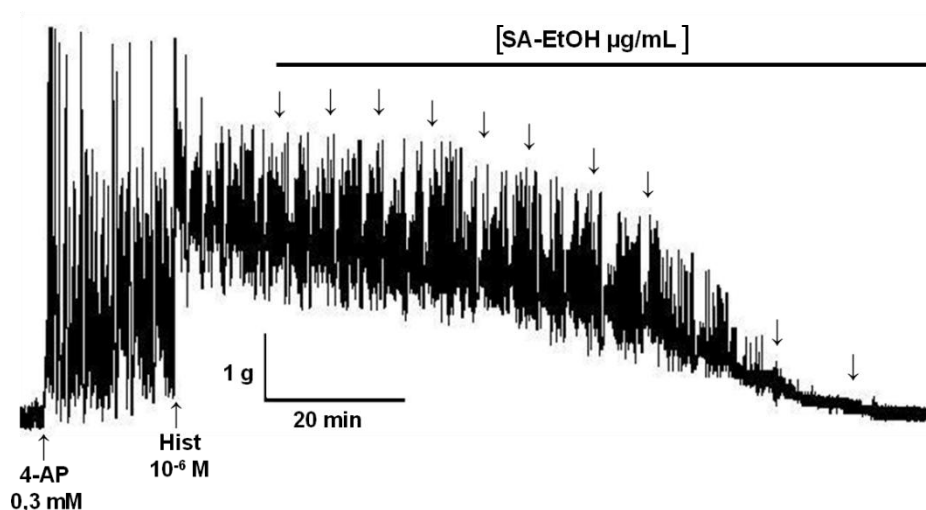
A**B**

Figura 7 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-6} M de histamina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 0,3 mM de 4-AP em íleo isolado de cobraia. As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500; 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

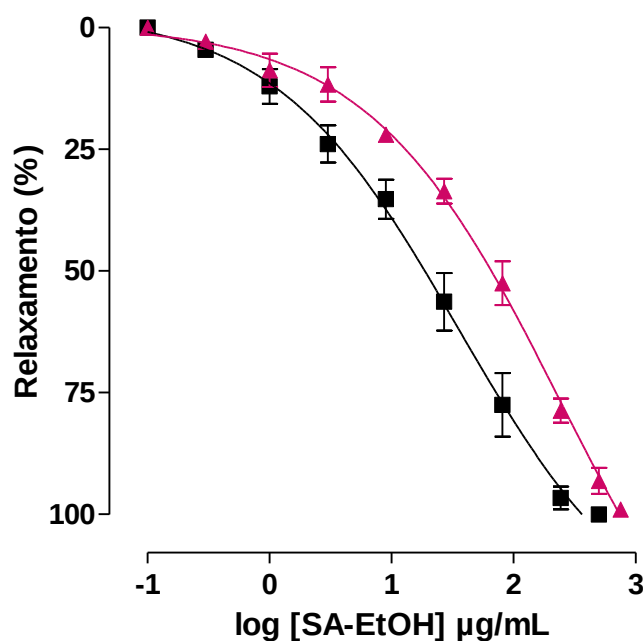


Gráfico 12 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência (■) e na presença (▲) de 0,3 mM de 4-AP, em íleo isolado de cobaia (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

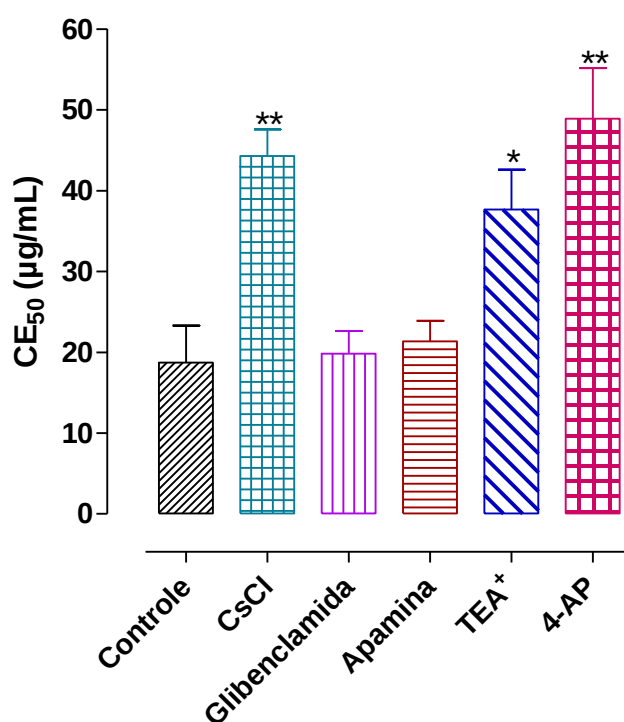


Gráfico 13 – Valores da CE₅₀ (µg/mL) do extrato SA-EtOH na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de K⁺ em íleo isolado de cobaia (n = 5). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste *t*, **p* < 0,05 e ***p* < 0,01 (controle vs. presença de bloqueadores).

4.3 Investigação do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em útero isolado de rata

4.3.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por ocitocina

O extrato SA-EtOH inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por concentrações crescentes de ocitocina (Gráfico 14). As curvas cumulativas à ocitocina foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do $E_{\max}$ de 100% (controle) para $81,6 \pm 4,3$; $72,4 \pm 8,6$; $55,2 \pm 4,5$; $25,6 \pm 3,0\%$, respectivamente (Gráfico 14). Os valores de CE_{50} da ocitocina passaram de $0,6 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M (controle) para $1,9 \pm 0,3$; $4,1 \pm 1,6$; $4,5 \pm 2,1$; $11,5 \pm 2,9$ e $18,4 \pm 5,9 \times 10^{-3}$ M, respectivamente (Tabela 7).

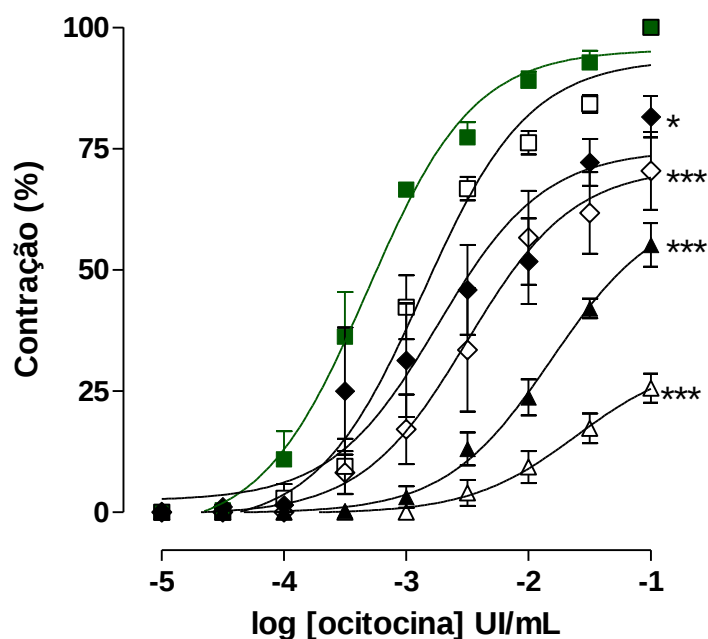


Gráfico 14 – Curvas concentrações-resposta cumulativas à ocitocina na ausência (controle) (■) e na presença do extrato SA-EtOH nas concentrações de 27 (□); 81 (◆); 243 (◇); 500 (▲) e 750 µg/mL (△) em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. ANOVA one-way seguido por Bonferroni, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. SA-EtOH).

Tabela 7 – Valores de CE_{50} (M) e de E_{max} (%) da ocitocina na ausência (controle) e na presença do extrato SA-EtOH em útero de rata (n = 5).

SA-EtOH (µg/mL)	CE_{50} (M)	E_{max} (%)
Controle	$0,6 \pm 0,1 \times 10^{-3}$	100
27	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-3**}$	100
81	$4,1 \pm 1,6 \times 10^{-3*}$	$81,6 \pm 4,3^{**}$
243	$4,5 \pm 2,1 \times 10^{-3}$	$72,4 \pm 8,6^{*}$
500	$11,5 \pm 2,9 \times 10^{-3**}$	$55,2 \pm 4,5^{***}$
750	$18,4 \pm 5,9 \times 10^{-3*}$	$25,6 \pm 3,0^{***}$

Teste t; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (controle vs. extrato SA-EtOH).

4.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O extrato SA-EtOH (243 e 500 $\mu\text{g/mL}$) não foi eficaz em antagonizar as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em útero de rata, apresentando um $E_{\text{max}} = 10,5 \pm 5,0\%$ ($n = 3$) (Figura 8A). Por outro lado, o extrato SA-EtOH (0,1 - 500 $\mu\text{g/mL}$) relaxou as contrações tônicas induzidas com 10^{-2} UI/mL de ocitocina de maneira dependente de concentração e significativa ($CE_{50} = 56,3 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$) (Figura 8B e Gráfico 15). O tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir o seu E_{max} foi de $125,8 \pm 7,2$ min para as preparações pré-contraídas com ocitocina.

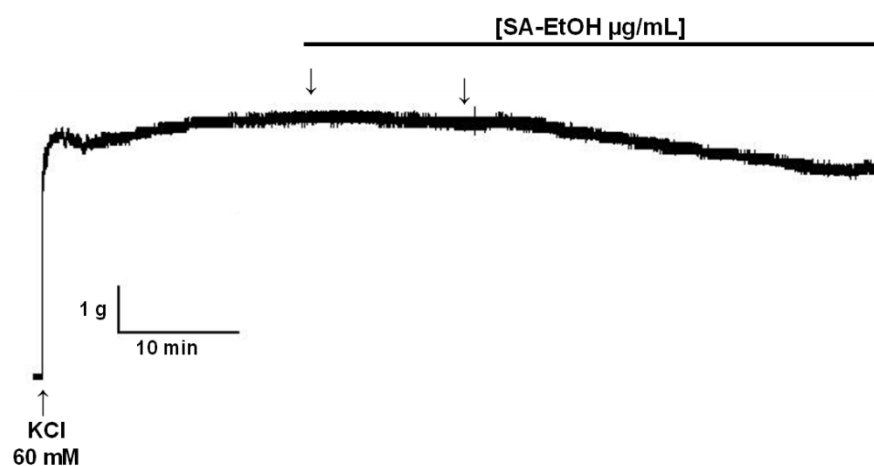
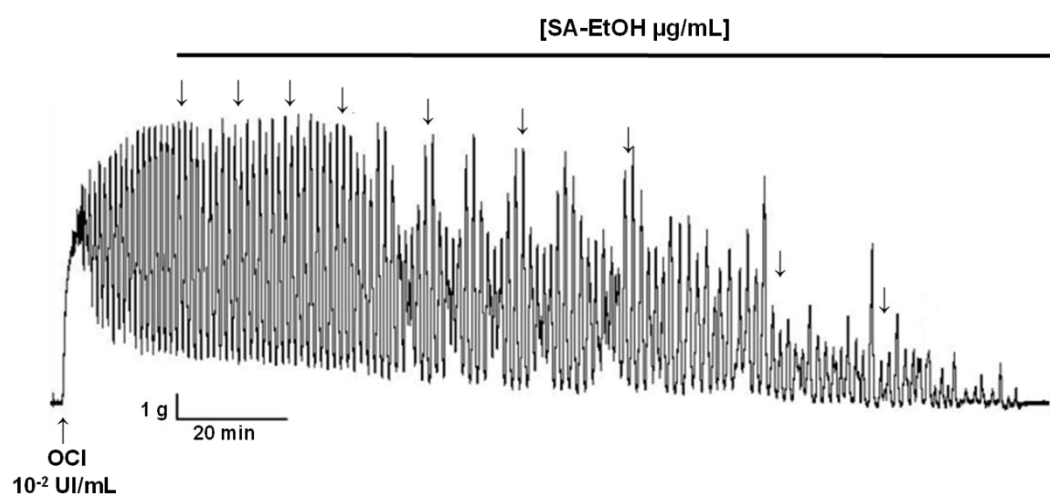
A**B**

Figura 8 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 10⁻² UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata. As setas representam as concentrações cumulativas 243 e 500 µg/mL (**A**) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 500 µg/mL (**B**) do extrato SA-EtOH.

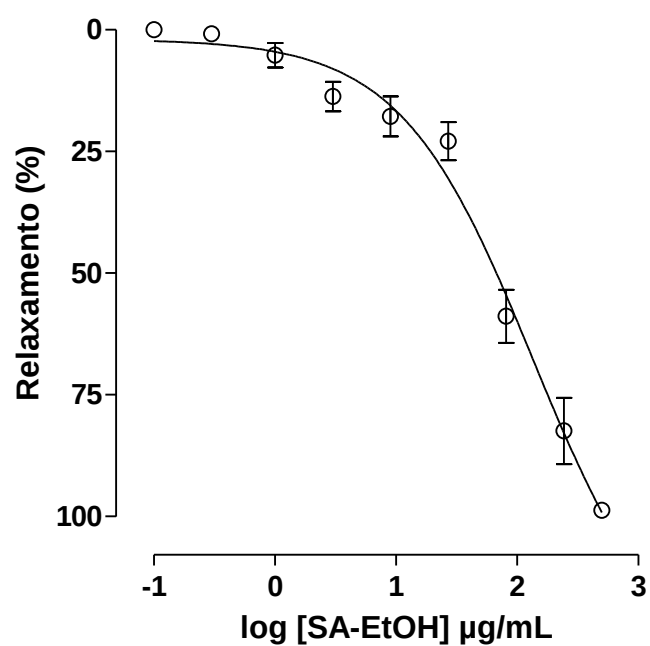


Gráfico 15 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.3.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio

4.3.3.1 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de cloreto de cério (CsCl)

O extrato SA-EtOH (0,1 - 750 $\mu\text{g/mL}$) relaxou o útero isolado de rata pré-contráído com ocitocina na ausência ($\text{CE}_{50} = 56,3 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$) e na presença ($\text{CE}_{50} = 109,2 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 9). A potência relaxante do extrato SA-EtOH foi reduzida 1,5 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo extrato SA-EtOH na ausência de CsCl (Gráficos 16 e 21). O tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir o seu E_{max} não alterou na presença de CsCl ($134,0 \pm 11,3 \text{ min}$).

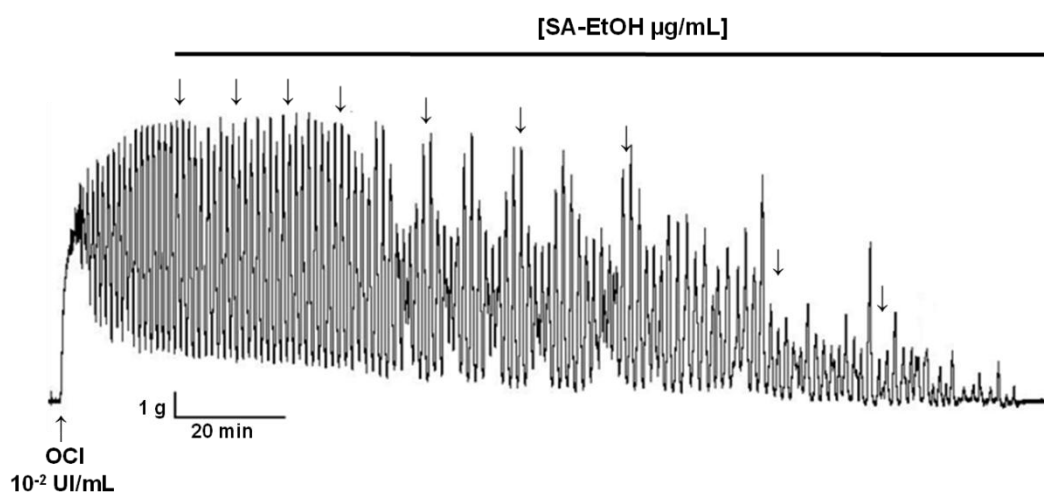
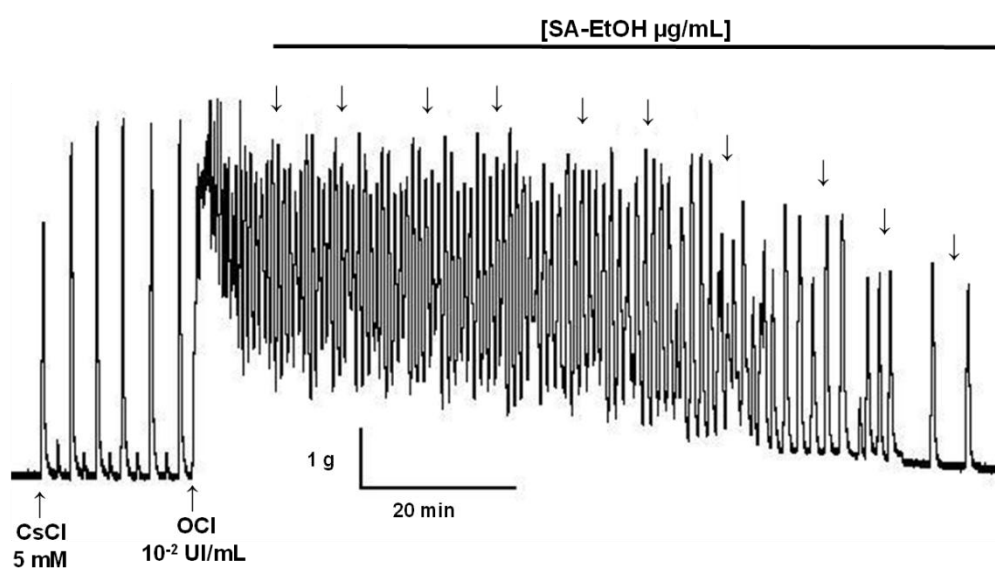
A**B**

Figura 9 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata. As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243; 500 e 750 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

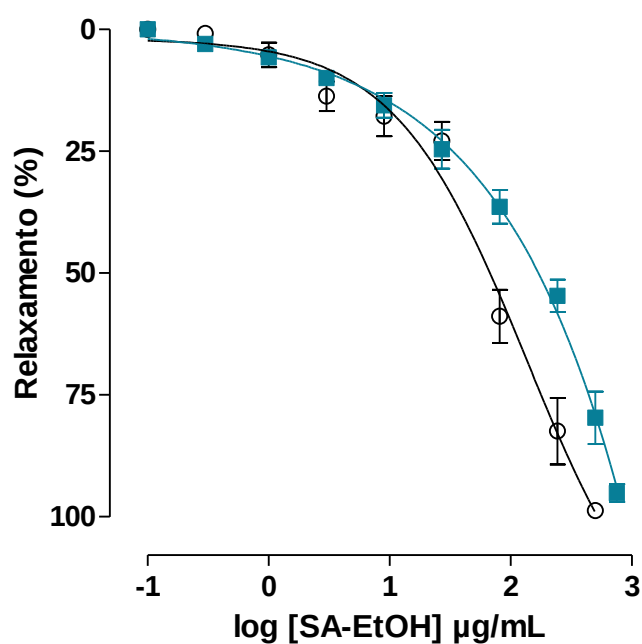


Gráfico 16 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

4.3.3.2 Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na ausência e na presença de 4-aminopiridina (4-AP), apamina, tetraetilamônio TEA⁺ ou glibenclamida

A curva de relaxamento do extrato SA-EtOH ($n = 5$), com CE_{50} de $56,3 \pm 8,2 \mu\text{g/mL}$, não foi alterada na presença de 3 mM de 4-AP, bloqueador seletivo dos K_V ($CE_{50} = 72,4 \pm 7,4 \mu\text{g/mL}$, Gráfico 17), 1 mM de TEA⁺, que nesta concentração é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} ($CE_{50} = 66,8 \pm 10,7 \mu\text{g/mL}$, Gráfico 18) e 100 nM de apamina, bloqueador seletivo dos SK_{Ca} ($CE_{50} = 73,2 \pm 10,9 \mu\text{g/mL}$, Gráfico 19). No entanto, foi deslocada para direita na presença de 3×10^{-5} M de glibenclamida, bloqueador seletivo dos K_{ATP} ($CE_{50} = 124,8 \pm 21,0 \mu\text{g/mL}$, Figura 10 e Gráfico 20). Em todas as situações o tempo médio para o extrato SA-EtOH atingir seu E_{max} não alterou.

Analisando os valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$), pode-se verificar que a CE_{50} do extrato SA-EtOH na presença dos bloqueadores 4-AP, TEA⁺ e apamina não foram alteradas quando comparada com o controle. No entanto, na presença dos bloqueadores CsCl e glibenclamida a potência relaxante foi reduzida cerca de 1,5; e 1,6 vezes, respectivamente (Gráfico 21).

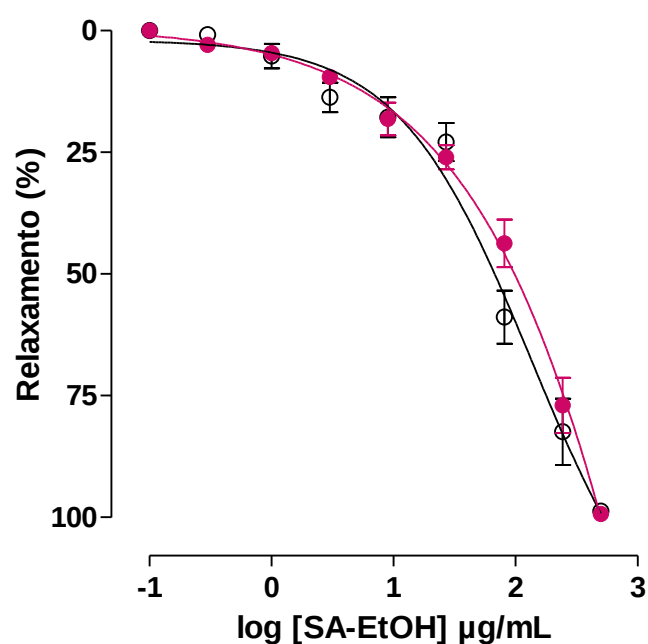


Gráfico 17 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (●) de 3 mM de 4-AP, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

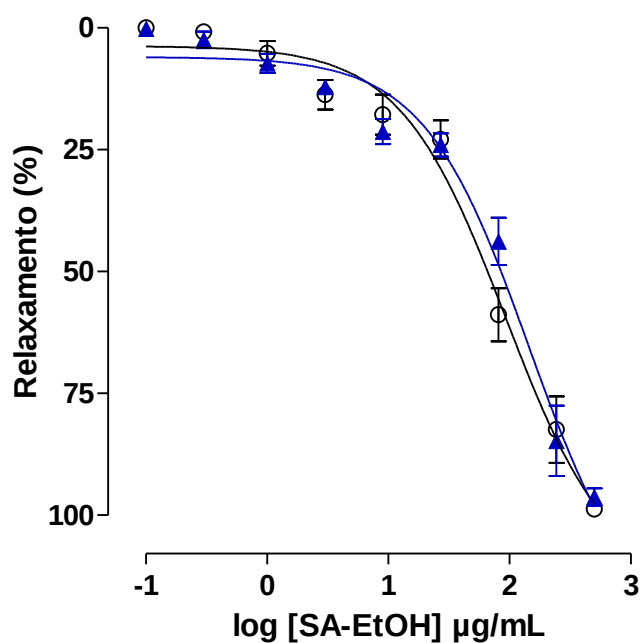


Gráfico 18 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (▲) de 1 mM de TEA⁺, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

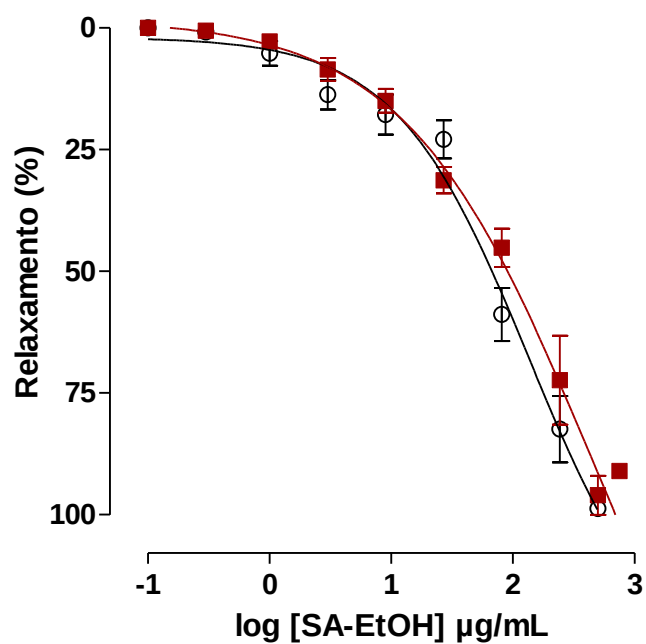
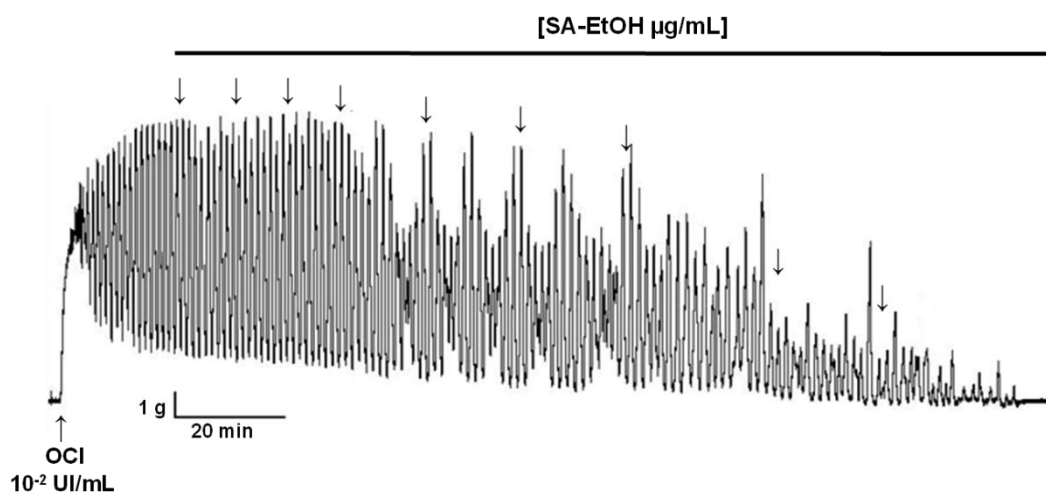


Gráfico 19 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 100 nM de apamina, em útero isolado de rata (n = 5). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

A



B

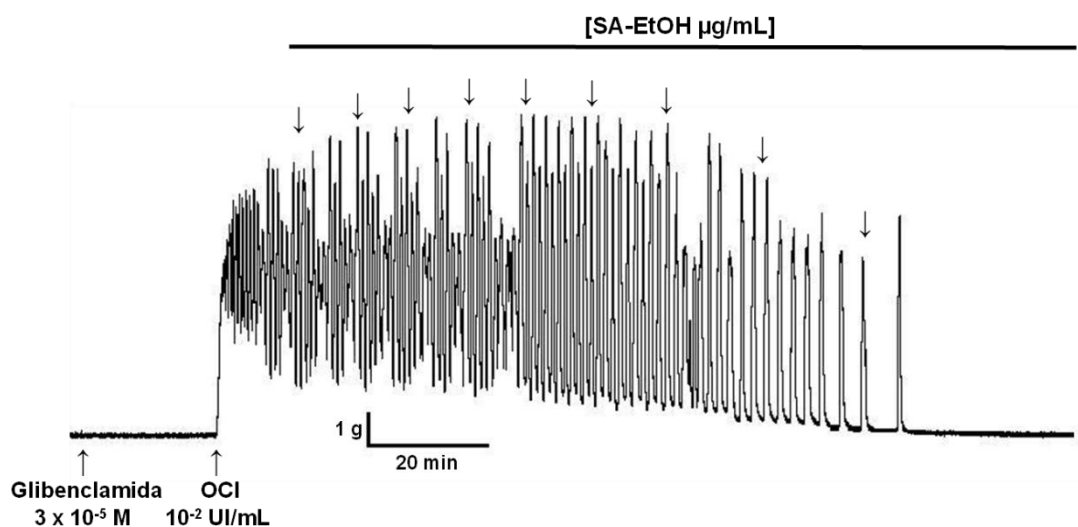


Figura 10 – Registros originais do efeito relaxante do extrato SA-EtOH sobre a contração tônica induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença de 3×10^{-5} M de glibenclamida (B) em útero isolado de rata. As setas representam a adição cumulativa do extrato SA-EtOH nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 500 μ g/mL, respectivamente.

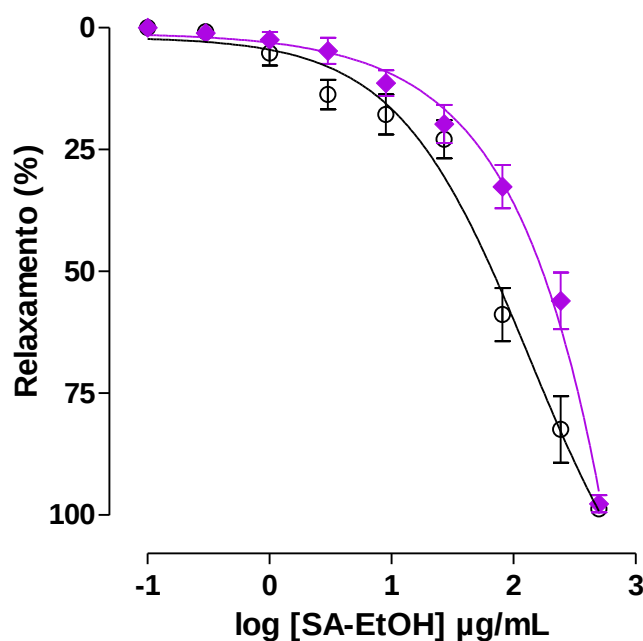


Gráfico 20 – Efeito do extrato SA-EtOH sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (○) e na presença (◆) de 3×10^{-5} M de glibenclamida, em útero isolado de rata ($n = 5$). Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente.

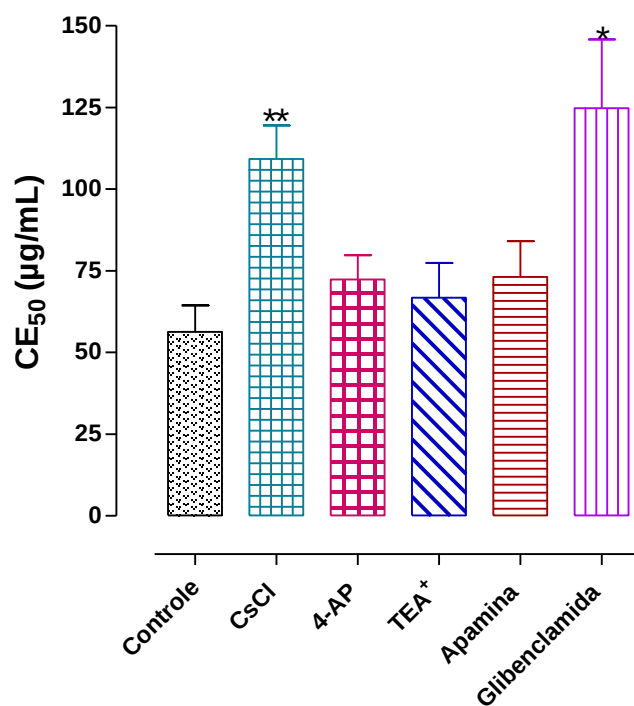


Gráfico 21 – Valores da CE₅₀ (µg/mL) do extrato SA-EtOH na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de K⁺ em útero isolado de rata ($n = 5$). As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente. Teste t , * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (controle vs. presença de bloqueadores).



Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram investigados os efeitos citotóxicos em eritrócitos de ratos e o mecanismo de ação espasmolítica sobre os músculos lisos (intestinal e uterino) utilizando o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *S. agrarium* Sendtner (SA-EtOH). Demonstra-se, pela primeira vez, que o extrato SA-EtOH apresenta atividade hemolítica moderada em eritrócitos de ratos apenas em altas concentrações (243 e 500 µg/mL) e o resultado mais relevante deste estudo é a proposição do possível mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH com ativação/modulação positiva dos canais de K⁺ ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}) e dos canais K⁺ ativados por voltagem (K_V) em íleo de cobaia, e dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) em útero de rata.

Alguns estudos apontam espécies de *Solanum* apresentando efeitos citotóxicos, como: *Solanum incanum* Chinese que possui atividade citotóxica em hepatócitos humanos (Hep3B) e em fibroblastos de pele normal (HSU et al., 1996; KUO et al., 2000), *Solanum rostratum* Dunal e *Solanum americanum* Mill. por apresentarem atividade hemolítica em eritrócitos humanos (HARDMAN; BECK, OWENSBY, 1983). E, recentemente, foi demonstrado que *Solanum asperum* Rich. e *Solanum asterophorum* Mart. apresentaram atividade hemolítica moderada e leve, respectivamente em eritrócitos de ratos (LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2009).

O eritrócito ou glóbulo vermelho sangüíneo é um tipo de célula que contém alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, oxigênio molecular e íons ferro no estado ligado (NIKI et al., 1991). Por essa razão, é esperado que a sua membrana tenha uma alta vulnerabilidade a reações envolvendo radicais livres e seja muito suscetível à hemólise (BRANDÃO et al., 2005). Os eritrócitos fornecem um modelo simples para estudar efeito protetor ou tóxico de uma grande variedade de substâncias ou situações associadas com estresse oxidativo (LEXIS; FASSETT; COOMBES, 2006; EISELE et al., 2006). Para tanto, a investigação da atividade hemolítica constitui um modelo experimental usando células sangüíneas vermelhas como membranas alvo para compreender melhor o mecanismo de substâncias.

Com base nessas premissas avaliou-se inicialmente o efeito citotóxico do extrato SA-EtOH nas concentrações de 81, 243 e 500 µg/mL em eritrócitos de ratos. Como o eritrócito é muito suscetível à hemólise, a ausência de atividade hemolítica na concentração de 81 µg/mL e atividade lítica moderada

($E_{\max} = 21,2 \pm 3,2\%$) apenas nas concentrações de 243 e 500 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 1), concentrações estas consideradas muito elevadas para experimentos *in vitro*, é sugestivo que o extrato SA-EtOH tenha baixa toxicidade em eritrócitos de ratos. Resultados semelhantes foram observados por Lima et al. (2009) utilizando o extrato metanólico das raízes de *Solanum asperum* Rich. Esse estudo preliminar permitiu uma escolha segura nas concentrações utilizadas nos protocolos experimentais realizados com o objetivo de investigar o possível mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH.

Santos et al. (2003) realizaram uma triagem farmacológica preliminar visando investigar o efeito espasmolítico do extrato etanólico das partes aéreas de *Solanum agrarium* (SA-EtOH) em vários músculos lisos isolados (aorta de rato, útero de rata, traquéia e íleo de cobaia) e verificaram que o extrato SA-EtOH apresentou efeito espasmolítico não seletivo em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata. Em íleo, o extrato inibiu as contrações fásicas induzidas por acetilcolina ou histamina, apresentando uma maior potência em inibir as contrações induzidas por acetilcolina, e em útero inibiu de maneira equipotente as contrações fásicas induzidas por carbacol ou ocitocina. Com o intuito de dar continuidade aos resultados obtidos por Santos et al. (2003), decidiu-se investigar o possível mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia e útero de rata.

Em íleo isolado de cobaia, levantou-se a hipótese do extrato SA-EtOH estar agindo nos receptores muscarínicos para promover sua atividade espasmolítica, uma vez que apresentou uma maior potência em inibir as contrações fásicas induzidas por acetilcolina. Para verificar essa hipótese, decidiu-se caracterizar o antagonismo exercido pelo extrato SA-EtOH frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas pelo carbacol (CCh), um agonista muscarínico não seletivo resistente à ação das colinesterases (BRUNTON; LAZON; PARKER, 2006). Foi observado um desvio das curvas cumulativas ao CCh para direita, de forma não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 2), sugerindo um antagonismo do tipo não-competitivo com o receptor muscarínico e que o extrato SA-EtOH pode estar agindo por um mecanismo de ação comum à via de sinalização dos agonistas testados anteriormente.

O íon cálcio (Ca^{2+}) é responsável por desencadear uma variedade de processos celulares nos neurônios, músculos e muitas células não-excitáveis e tem como função mais importante a sinalização celular quando do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). O Ca^{2+} , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é um sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982). A universalidade do Ca^{2+} como um mensageiro intracelular depende de sua enorme versatilidade. Esta versatilidade é utilizada para diversos processos além da contração muscular, tais como fertilização, proliferação, aprendizagem e memória, apoptose, necrose e secreção (BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000).

A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da concentração de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) e contração muscular, como pela ligação do agonista ao receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como a serotonina, o carbacol e a histamina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata de fosfoinositídeos, usualmente através da produção de IP_3 mediada pela proteína $\text{G}_{q/11}$, estimulando, assim a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através de receptores de rianodina 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).

Em íleo de cobaia, vários agentes contráteis, como os agonistas muscarínicos (TRIGGLE et al., 1989) e o KCl (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976; HURWITZ et al., 1980), causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 minutos e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (para

revisão ver TRIGGLE; TRIGGLE, 1976; VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1979; BOLTON, 1979; HURWITZ et al., 1980).

Em músculo liso de íleo de cobaia, tanto a contração fásica como a tônica induzida por CCh são dependes do Ca^{2+} extracelular, uma vez que ambas as contrações foram inibidas na ausência de Ca^{2+} extracelular (HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996). A remoção de íons Ca^{2+} do meio externo bloqueia totalmente a resposta contrátil tanto a agentes despolarizantes como a agonistas em poucos segundos, sugerindo que as fontes intracelulares de Ca^{2+} não contribuem significativamente para o nível de tensão atingido (NOUAILHETAS et al., 1985). No entanto, a influência do Ca^{2+} extracelular é relativamente maior na resposta contrátil tônica comparado com a fásica (TRIGGLE; SWAMY; TRIGGLE, 1979).

Assim passou-se a avaliar o efeito do extrato SA-EtOH sobre a fase tônica da contração induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e CCh ou histamina, que agem por acoplamento misto (BOLTON et al., 1981) em íleo de cobaia. E o observado foi que o extrato SA-EtOH inibiu de maneira dependente de concentração as contrações tônicas induzidas por todos os agentes contráteis utilizados, no entanto, curiosamente, diferente do observado frente às contrações fásicas, o extrato SA-EtOH apresentou uma maior potência relaxante quando o íleo era pré-contraído com histamina (Gráficos 4 e 5). Surgindo, dessa forma, um novo questionamento: será que o extrato SA-EtOH bloqueia os receptores histaminérgicos para promover seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia?

Para confirmar esta hipótese, avaliou-se o efeito do extrato SA-EtOH frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas pela histamina. Foi observado um desvio para direita, de forma não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 3), sugerindo um antagonismo do tipo não-competitivo. Descartando-se assim, a hipótese do bloqueio dos receptores histaminérgicos pelo extrato SA-EtOH para promover seu efeito espasmolítico e reforçando a hipótese de que esse efeito poderia ser pelo bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Como o íleo é um órgão totalmente dependente de variação do potencial de membrana (NOUAILHETAS et al., 1985) e como o componenteônico da contração induzida por agonistas de acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) como carbacol e histamina (UNNO; KOMORI; OHASHI, 1995; BOLTON et al., 1981) ou por um agente despolarizante (KCl) (acoplamento eletromecânico) é mantido quase que exclusivamente por influxo de Ca^{2+} através

dos Ca_v (BOLTON, 1979; REMBOLD, 1996; BOLTON, 2006), resolveu-se avaliar se o extrato SA-EtOH promoveria o relaxamento do íleo isolado de cobaia por bloquear o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Caso o extrato SA-EtOH estivesse realmente bloqueando os Ca_v , era esperado que o mesmo antagonizasse as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . Observou-se que as curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas para direita de forma não-paralela e com redução do E_{max} (Gráfico 6), o que é característico de antagonismo não-competitivo. Esses resultados reforçam a hipótese de que o extrato SA-EtOH estaria interferindo com o influxo de Ca^{+2} através dos Ca_v para exercer seu efeito espasmolítico.

Os Ca_v estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). Pelo menos 10 tipos diferentes de Ca_v foram até agora descritos e estão subdivididos em três grandes famílias: (1) sensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, Ca_v1 (tipo L); (2) insensíveis a di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, Ca_v2 (tipos N, P/Q e R); e (3) ativados por baixa voltagem, Ca_v3 (tipo T), (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

No músculo liso, os Ca_v1 (sensíveis às di-hidropiridinas) são melhores caracterizados e os maiores responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} , cujo sítio de ligação para seus bloqueadores está presente na subunidade α_1 , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2 α , 1 β e 1 γ) (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT et al., 1996). Os Ca_v mais expressos em íleo de cobaia são os do tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) (BOLTON, 1979; TOMITA, 1981), recentemente descritos como $\text{Ca}_v 1.2$ (CATERRAL et al., 2005). Os $\text{Ca}_v1.2$ são amplamente expressos no corpo humano (músculo cardíaco, músculo liso, células endócrinas e neurônios) (CATERRALL et al., 2005).

A subunidade α_1 dos Ca_v é a formadora de poros e fornece o sítio de ligação extracelular para praticamente todos os agonistas e antagonistas, como por exemplo os derivados di-hidropiridínicos, como o Bay K8644 (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Para avaliar se o tipo de Ca_v envolvido no efeito relaxante promovido pelo extrato SA-EtOH em íleo isolado de cobaia seria os Ca_v1 , analisou-se seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644, um

agonista dos Ca_v1 , que age por ligação direta na sua subunidade α_1 e não por despolarização (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). Verificou-se que o extrato SA-EtOH relaxou o íleo, de maneira dependente de concentração atingindo seu E_{max} . No entanto, quando estes dados foram comparados com o valor de potência relaxante do extrato SA-EtOH no íleo pré-contraído com KCl, observa-se que o extrato SA-EtOH foi cerca de 11 vezes mais potente em relaxar o íleo pré-contraído com KCl do que com o S-(-)-Bay K8644. Esses dados podem ser explicados pelo fato de que na contração induzida por KCl existe, além da despolarização, outros mecanismos de manutenção da contração tônica como a sensibilização ao Ca^{2+} envolvendo a translocação e ativação da RhoA cinase (RATZ et al., 2005). Esses dados sugerem que o extrato SA-EtOH esteja agindo por bloqueio do influxo de Ca^{2+} via os Ca_v1 . No entanto, outras vias estão envolvidas no mecanismo de ação espasmolítica.

Os canais de potássio desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ , levando a uma hiperpolarização/repolarização, e a diminuição da condutância ao K^+ , levando a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular e secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, Ca^{2+} ou por neurotransmissores e conseqüentemente as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O movimento dos íons K^+ através de canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005), dessa forma, criou-se a hipótese de que o extrato SA-EtOH poderia estar ativando os canais de K^+ e bloqueando, assim, indiretamente os canais Ca_v .

A associação entre o aumento da atividade dos canais de K^+ e o relaxamento do músculo liso vem sendo estudada em vários tecidos e com diversos canais de K^+ . Alguns autores apresentam evidências da participação de vários canais de K^+ na regulação do músculo liso, como por exemplo: K_v em íleo de cobaia (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008) e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007a); BK_{Ca} em íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), traquéia de cobaia (HIRAMATSU et al.,

1994, RIBEIRO et al., 2007b), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), traquéia de cão (WADE; SIMS, 1993), traquéia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al., 2009), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997) e no miométrio humano (ANWER et al., 1993, MEERA et al., 1995). SK_{Ca} em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996) e em aorta de rato (SILVA et al., 1994); K_{ATP} em íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008), traquéia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD, 1996) e de cobaia (SUN; BENISHIN, 1994) em uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999) e em traquéia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000).

Uma vez que os Ca_v podem ser bloqueados indiretamente por ativação dos canais de potássio, verificou-se a participação dos canais de K^+ no efeito relaxante induzido pelo extrato SA-EtOH em íleo de cobaia, utilizando bloqueadores de canais como ferramentas farmacológicas. O fato da curva de relaxamento do extrato SA-EtOH ter sido deslocada para direita na presença de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (LATORRE et al., 1989) (Gráfico 8), é sugestivo que os canais de K^+ estão envolvidos no efeito relaxante do extrato SA-EtOH.

Os K_{ATP} , que são seletivos para K^+ e ativados por uma diminuição na concentração interna de ATP, foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Posteriormente, os K_{ATP} com características semelhantes foram demonstrados em muitos outros tecidos, tais como, células β -pancreáticas, músculo esquelético, neurônios e músculos lisos (TERAMOTO, 2006).

Vários agonistas endógenos (como peptídio relacionado ao gene da calcitonina, adenosina, entre outros.) ativam os K_{ATP} produzindo hiperpolarização e relaxamento. Em contrapartida, vários neurotransmissores (noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), neuropeptídio Y, entre outros) e vasoconstritores (como angiotensina II e endotelina-1) inibem os K_{ATP} levando a despolarização e contração (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997). Esse canal tanto pode ser inibido por ATP intracelular como por 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, foram capazes de inibir as contrações tônicas induzidas por histamina ($0,5 \mu M$) ou KCl ($30 mM$).

Objetivando verificar se o extrato SA-EtOH estaria ativando os canais K_{ATP} , avaliou-se o efeito relaxante desse extrato na ausência e presença de glibenclamida, um bloqueador seletivo desses canais (SUN; BENISHIN, 1994). Como não houve diferença significativa entre a potência relaxante do extrato SA-EtOH na ausência e na presença de glibenclamida (Gráfico 9), sugere-se que o efeito relaxante do extrato SA-EtOH, em íleo isolado de cobaia, não envolve a ativação dos K_{ATP} .

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 suas condutância, cinética e farmacologia (SAH; FABER, 2002): 1) canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}), são bloqueados por apamina; 2) canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) bloqueados pelo clotrimazole, e 3) canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de grande condutância (BK_{Ca}) que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações de 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).

Os BK_{Ca} são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os SK_{Ca} são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os IK_{Ca} estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005).

Inicialmente, hipotetizou-se que os canais SK_{Ca} poderiam estar envolvidos no mecanismo de ação induzido pelo extrato SA-EtOH. Caso essa hipótese fosse verdadeira o relaxamento do íleo de cobaia induzido pelo extrato SA-EtOH deveria ser inibido na presença de apamina, um bloqueador dos SK_{Ca} . No entanto, como não houve diferença significativa entre a potência relaxante do extrato SA-EtOH na ausência e na presença de apamina (Gráfico 6), é sugestivo que o efeito relaxante pelo extrato SA-EtOH, em íleo isolado de cobaia, não envolva os SK_{Ca} .

Os BK_{Ca} possuem em sua estrutura quatro subunidades α formadoras do poro e subunidades β regulatórias. Cada subunidade tem sete domínios transmembranares (CHALMERS et al., 2007). As propriedades fisiológicas dos BK_{Ca}, incluindo a sensibilidade ao Ca²⁺, são moduladas pelas subunidades β acessórias. As estimativas da sua densidade média, em músculo liso variam entre 1 a 4 canais/ μm^2 (BENHAM; BOLTON, 1986; SINGER; WALSH JR. 1987; PEREZ et al., 1999).

Romero et al. (1998) utilizando a técnica de “patch-clamp” caracterizou uma população de canais BK_{Ca} que são indiretamente ativados pela angiotensina II, um agonista contrátil que induz dessensibilização do componente tônico da contração em íleo de cobaia. Posteriormente Silva, Nouailhetas e Aboulafia (1999) demonstraram que a dessensibilização do componente tônico induzida pela angiotensina II era devido à abertura dos BK_{Ca} levando a uma repolarização e conseqüentemente fechando os Ca_v responsáveis pelo influxo de Ca²⁺ que sustenta o componente tônico no íleo de cobaia. A hiperpolarização resultante do aumento da atividade destes canais, constitui desta forma, um importante mecanismo de “feedback” para regulação dos Ca_v. Os BK_{Ca} são sensíveis ao Ca²⁺ e a voltagem, desta forma a sua sensibilidade aparente ao Ca²⁺ é aumentada quando a membrana está despolarizada (McMANUS et al., 1995).

Dessa forma, passou-se a investigar se o extrato SA-EtOH estaria agindo sobre os canais BK_{Ca}, ativando-os e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que levaria a um bloqueio indireto dos Ca_v. Em presença de 1 mM de TEA⁺, uma concentração específica para bloquear apenas os BK_{Ca} (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), a curva de relaxamento do extrato SA-EtOH foi desviada para direita fornecendo uma CE₅₀ de $37,7 \pm 4,9 \mu\text{g/mL}$ (Gráfico 11) cerca de 2 vezes maior que na ausência deste bloqueador (CE₅₀ = $18,7 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$). Esses dados sugerem que a ativação/modulação positiva dos BK_{Ca} está envolvida no mecanismo de ação relaxante do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia.

Os K_v possuem uma grande importância na manutenção do potencial de repouso no íleo de cobaia e é bastante distribuído neste órgão (GORDIENKO; ZHOLOS; BOLTON, 1999). Até hoje, pelo menos doze diferentes subfamílias de subunidades- α de K_v têm sido relatadas e os genes que codificam essas

subunidades funcionais dos K_V já foram identificados tanto no genoma humano como de outros animais (YU; CATTERALL, 2004). Isso demonstra a grande diversidade e complexidade de ações que podem ser esperadas da ativação destes canais de K^+ na membrana.

Os K_V podem ser classificados de acordo com características biofísicas e farmacológicas em: K_A (Canal-A), K_{dr} (retificadores tardios), $K_{V(r)}$ (retificador tardio rápido), $K_{V(s)}$ (retificador tardio lento) e K_{SR} (canal do retículo sarcoplasmático) (ALEXANDER; PETERS, 1999).

Apesar da grande diversidade dos K_V , uma ferramenta farmacológica muito importante no estudo desses canais é a 4-aminopiridina (4-AP), que é conhecida por bloquear os K_V (ou pelo menos sua maioria), sendo assim usada para o estudo do mecanismo de ação de várias substâncias com atividade relaxante da musculatura lisa (SATAKE; SHIBATA; SHIBATA, 1997; HUANG et al., 1999; LI et al., 1999; PELAIA et al., 2002).

Diante disto passou-se a investigar a participação dos K_V , bloqueados pela 4-AP, no efeito relaxante do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia. O fato da curva da curva de relaxamento do extrato SA-EtOH ter sido deslocada para direita na presença de 4-AP e ter reduzido sua potência em torno de 2,6 vezes (Gráfico 12) é sugestivo de que o extrato SA-EtOH está promovendo seu efeito espasmolítico por ativação dos K_V .

Assim, pode-se concluir parcialmente que o mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia envolve a modulação positiva dos canais de K^+ do tipo BK_{Ca} e K_V , o que indiretamente bloqueia o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 .

Passou-se então a avaliação em útero isolado de rata iniciando-se com a seguinte indagação: será que em útero isolado de rata, o extrato SA-EtOH promoveria efeito espasmolítico pelo mesmo mecanismo de ação evidenciado em íleo de cobaia?

Os dados preliminares obtidos por Santos et al. (2003) mostraram que o extrato SA-EtOH inibiu de maneira equípote as contrações induzidas por ocitocina ou carbacol em útero isolado de rata. Como cada um dos agonistas testados tem o seu próprio sistema receptor específico era plausível sugerir que o mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em antagonizar as contrações induzidas pelos agonistas não se dava em nível de receptor. Para

confirmar esta hipótese, decidiu-se caracterizar o bloqueio exercido pelo extrato SA-EtOH frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por ocitocina. Foi observado um desvio das curvas para direita, de forma não paralela e com redução do $E_{\max}$ (Gráfico 14), sugerindo um antagonismo do tipo não-competitivo. Semelhante aos resultados observados com íleo isolado de cobaia, o extrato SA-EtOH não está exercendo seu efeito espasmolítico em nível de receptor de membrana plasmática.

Baseado no fato de que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica da contração são diferentes em relação aos da fase fásica em útero de rata (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se verificar se o extrato SA-EtOH promoveria o relaxamento do útero pré-contraído com KCl ou ocitocina.

Para verificar esta hipótese, avaliou-se o efeito do extrato SA-EtOH sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e por ocitocina, que age por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) em útero isolado de rata. Como mostra a Figura 8, o extrato SA-EtOH não foi eficaz ($E_{\max} = 10,5 \pm 5,0\%$) em relaxar o útero pré-contraído com KCl, entretanto relaxou com eficácia máxima ($E_{\max} = 100\%$) e de maneira dependente de concentração o útero pré-contraído com ocitocina (Gráfico 15). O fato do extrato não relaxar o útero pré-contraído com KCl 60 mM é sugestivo de que o mecanismo de ação espasmolítica do mesmo não envolva bloqueio dos Ca_v , podendo ser outro mecanismo de relaxamento do músculo liso uterino.

Uma vez que há relatos na literatura que ativadores de canais de potássio são praticamente ineficazes em induzir relaxamento de músculo liso pré-contraído com elevadas concentrações de K^+ no meio extracelular, devido à grande redução no gradiente eletroquímico para o K^+ (GURNEY, 1994; NIELSEN-KUDSK, 1996), levantou-se a hipótese que o extrato SA-EtOH está ativando os canais de K^+ .

O efluxo de potássio em células miométriais resulta em repolarização de membrana e este efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero (SMITH et al, 2007).

No músculo liso uterino, os mais abundantes e mais bem estudados canais de K^+ são: canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_v); canais de potássio ativados por cálcio e voltagem de larga condutância (BK_{Ca}); canais de K^+ ativados

por Ca^{2+} de pequena condutância (SK_{Ca}); canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}), entre outros (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

No presente estudo, a participação dos canais de K^+ no efeito relaxante do extrato SA-EtOH em útero isolado de rata foi investigada, utilizando-se bloqueadores de canais de K^+ como ferramentas farmacológicas. Uma vez que a potência relaxante do extrato SA-EtOH na presença de CsCl, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , foi reduzida em 1,5 vezes, ocorrendo um desvio da curva de relaxamento do extrato SA-EtOH para direita no útero pré-contráído com ocitocina é sugestivo de que haja a participação de canais de K^+ no mecanismo de ação tocolítica do extrato SA-EtOH em útero de rata (Gráfico 16).

Visto que os K_v são amplamente expressos em células musculares lisas uterinas e contribuem para o potencial de repouso nesta células, uma vez que em resposta a despolarização, o efluxo de K^+ através destes canais induz repolarização das células para restabelecer o potencial de repouso (SUZUKI; TAKIMOTO, 2005), levantou-se a hipótese de que o extrato SA-EtOH poderia estar induzindo o efeito tocolítico por ativação dos K_v que ao repolarizar a membrana levaria indiretamente ao bloqueio do influxo de Ca^{2+} via Ca_v e por fim ao relaxamento. Para tanto avaliou-se o efeito relaxante do extrato na presença e na ausência da 4-AP, um bloqueador dos K_v , e o observado foi que não há a participação dos K_v no mecanismo de ação espasmolítica do extrato, pois a 4-AP em nada alterou as curvas de relaxamento do extrato em útero pré-contráído com ocitocina (Gráfico 17).

Sabendo-se que os BK_{Ca} (também conhecidos como maxi-K) são um dos canais iônicos mais estudados no músculo liso do útero devido a sua abundância e significativa corrente de repolarização e que relativamente poucos canais BK_{Ca} precisam ser ativados para produzir relaxamento uterino; assim, estes canais podem ter efeitos profundos sobre a atividade miométrial, principalmente em úteros gravídicos, onde há uma maior expressão desses canais, impedindo assim as contrações uterinas e, conseqüentemente, o aborto. Diferente dos BK_{Ca} os canais SK_{Ca} são insensíveis à voltagem, mas geram correntes hiperpolarizantes em células excitáveis em conseqüência a geração de um potencial de ação, e portanto podem induzir relaxamento de músculos lisos (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Diante destas premissas passou-se a investigar se o extrato SA-EtOH estaria agindo sobre os canais BK_{Ca} e SK_{Ca} , ativando-os e conseqüentemente levando a uma repolarização de membrana que levaria a um bloqueio indireto dos Ca_v . Para tanto, utilizou-se 1 mM de TEA^+ , uma concentração específica para bloquear apenas os BK_{Ca} (LATORRE et al., 1989; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), como não houve diferença significativa entre a potência relaxante do extrato SA-EtOH na ausência e na presença de TEA^+ (Gráfico 18) é sugestivo que o efeito tocolítico desse extrato não envolva a abertura dos BK_{Ca} . Resultados similares foram obtidos quando da investigação da participação dos canais SK_{Ca} , utilizando-se como ferramenta farmacológica a apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (TSAI et al., 1998) (Gráfico 19).

Os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) estão presentes em vários tipos de músculos lisos. Como foi dito anteriormente, uma característica primária destes canais é a de ser inibido por concentrações basais de ATP intracelular, por sulfoniluréias e por baixas concentrações de Ba^{2+} (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). No entanto, hoje se sabe que existem subtipos de K_{ATP} que são relativamente insensíveis aos níveis basais de ATP, mas são bloqueados seletivamente pela glibenclamida do mesmo modo que os demais (MISHRA; AARONSON, 1999). As correntes através dos K_{ATP} não têm sido diretamente medidas em células miométriais, mas a ação delas esta implicada na função miometrial. Os ativadores dos K_{ATP} diminuem as contrações uterinas, no entanto, eles são mais potentes em miométrio humano grávido do que em não grávido (SANBORN, 2000).

Para avaliar se os K_{ATP} estariam participando do mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em útero isolado de rata, testou-se o efeito do extrato na presença de glibenclamida, inibidor destes canais, e observou-se que a curva de relaxamento induzida pelo extrato SA-EtOH no útero pré-contraído com ocitocina foi desviada para direita cerca de 2 vezes na presença de glibenclamida (Gráfico 20). Interessantemente, quando se compara os valores de CE_{50} do extrato SA-EtOH na presença do bloqueador inespecífico de canais de K^+ , CsCl ($109,2 \pm 10,2 \mu\text{g/mL}$) com aquela obtida na presença de glibenclamida ($124,8 \pm 21,0 \mu\text{g/mL}$) nota-se que estes valores não apresentam diferença estatística significativa entre si (Gráfico 21). Estes resultados demonstram claramente que o

mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em útero isolado de rata está associado à abertura dos canais K_{ATP} .

Com os dados apresentados neste trabalho pode-se afirmar que os objetivos propostos foram alcançados, uma vez que se presta uma grande contribuição à farmacologia do gênero *Solanum* em especial à espécie *Solanum agrarium* Sendtner, através da demonstração pela primeira vez que o extrato etanólico de suas partes aéreas apresenta atividade hemolítica moderada e que o mecanismo de ação espasmolítica em íleo de cobaia e útero de rata envolve a participação de diferentes canais de K^+ .



6 CONCLUSÕES

No estudo do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Solanum agrarium* Sendtner (SA-EtOH) para a investigação do potencial citotóxico em eritrócitos de ratos e do mecanismo de ação espasmolítica em íleo isolado de cobaia e útero isolado de rata, pode-se concluir que:

- ✓ O extrato SA-EtOH apresenta atividade hemolítica moderada sobre a membrana de eritrócitos de ratos;
- ✓ O extrato SA-EtOH não está agindo diretamente em nível de receptor farmacológico para produzir efeito espasmolítico em íleo de cobaia e útero de rata;
- ✓ Não há envolvimento dos canais de potássio do tipo SK_{Ca} e K_{ATP} na ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em íleo de cobaia;
- ✓ O mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH modula positivamente os canais de potássio do tipo BK_{Ca} e K_V , o que indiretamente bloquearia o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v1 com conseqüente relaxamento, em íleo de cobaia;
- ✓ Não há envolvimento dos canais de potássio do tipo K_V , BK_{Ca} e SK_{Ca} na ação espasmolítica do extrato SA-EtOH em útero de rata;
- ✓ O mecanismo de ação espasmolítica do extrato SA-EtOH, em útero de rata, envolve a modulação positiva dos canais de potássio do tipo K_{ATP} , o que indiretamente promoveria o relaxamento uterino;
- ✓ Não se podem descartar outros mecanismos não investigados neste estudo.



Referências

REFERÊNCIAS

- AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815 – 824, 2006.
- ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, p. 757 – 786, 1989.
- ABRAHAM, Z.; BHAKUNI, S. D.; GARG, H. S.; GOEL, A. K.; MEHROTRA, B. N.; PATNAIK, G. K. Screening of Indian plants for biological activity. Part XII. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 24, p. 48 – 68, 1986.
- AGRA, M. F. Estudo Taxonômico do Gênero *Solanum* (Solanaceae) no município de João Pessoa, Paraíba-Brasil. 1991. 243 f. **Dissertação (Mestrado)** – Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1991.
- AGRA, M. F.; BHATTACHARYYA, J. Ethnomedicinal and phytochemical investigation of the *Solanum* species in the northeast of Brazil. In: *Solanaceae* (M. Nee, D.E. Symon, R.N. Lester & J.P. Jessop, eds.) IV, **Royal Botanic Gardens**, p. 341-343, 1999.
- AGRA, M. F. – Revisão taxonômica de *Solanum* sect. *Erythrotrichum* Child (Solanaceae). 2000. **Tese (Doutorado)** Pós-Graduação em Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- 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.
- ALEXANDER, S. P. H.; PETERS, J. A. Receptor & ion channel nomenclature supplement. **Trends in Pharmacology Sciences**, 10th Ed., p. 95–96, 1999.
- ALMEIDA, E. R.; SANTOS, E. R.; BARRETO LINS, C. F.; MELLO, A. C.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. The presence of acetylcholine in fruits of *Solanum melongena* L. **Revista do Instituto da Universidade Federal Pernambuco, Recife** 22 ½, 1985.
- ANWER, K.; OBERTI, C.; PEREZ, G.J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J.K.; MONGA, M.; SANBORN, B.M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

- ARCHER, L. S.; GRAGASIN, F. S.; WU, X.; WANG, S.; McMURTRY, S.; KIM, D. H.; PLATONOV, M.; KOSHAL, A.; HASHIMOTO, K.; CAMPBELL, W. B.; FALCK, J. R.; MICHELAKIS, E. D. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary Artery Is 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BK_{Ca} Channels. **American Heart Association**, v. 107, p. 769-776, 2003.
- ATAÍDE, J. R. Atividade farmacológica dos extratos da jurubeba roxa, *Solanum paludosum* Moric. João Pessoa, 1982 **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1982.
- BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit, **The Journal of Physiology**, v. 381, p. 385 – 406, 1986.
- BERRIDGE, M. J ; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267 – 274, 1995.
- BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **The Journal of Physiology**, v. 499, p. 291 – 306, 1997.
- BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**. v. 395, p. 645 – 648, 1998.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Nature Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.
- BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. Screening of Indian plants for biological activity. Part II. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 7, p. 250 - 262, 1969.
- BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. In: Hoffman JF, Glebisch G (Eds). **Current Topics in Membranes and Transport**. Academic Press, Inc, San Diego, v. 34, p. 289 - 330, 1989.
- BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606 – 718, 1979.
- BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; LANG, R. J. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 320, p. 363 – 379, 1981.
- BOLTON, T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 5 – 11, 2006.
- BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca²⁺ signals. **Jouranl of Cell Science**, v. 114, p. 2213 – 2222, 2001.
- BOYD, L. J. Pharmacology of the homeopathic drugs. **Journal of the American Institute of Homeopathy**, v. 21, p. 209, 1928.

- BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 3, p. 332–339, 2007.
- BRANDÃO, R.; LARA, F. S.; PAGLIOSA, L. B.; SOARES, F. A.; ROCHA, J. B. T.; NOGUEIRA, C. W.; FARINA, M. Hemolytic effects of sodium selenite and mercuric chloride in human blood. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 28, p. 397–407, 2005.
- BRANDÃO, M. G. L.; ZANETTI, N. N. S.; OLIVEIRAA, P.; GRAEL, C. F. F.; SANTOSD, A. C. P.; MONTE-MÓRE, R. L. M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141–148, 2008.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics** 11 th ed. McGraw-Hill, 2006.
- 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.
- CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.
- CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P. F.; HARDER, D. R. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. **American Heart Association**, v. 78, p. 415-423, 1996.
- CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 99, p. 1115 - 1122. 2002.
- CARVALHO, L. A. F.; COSTA, L. H. P. D.; DUARTE, A. C. Diversidade taxonômica das solanáceas que ocorrem no sudeste brasileiro - listagem dos táxons. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 58, n. 1, p. 95 – 110, 1996.
- 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. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 411–425, 2005.
- CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). 2001. p. 81. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.
- CAVALCANTE, F. A. Investigação dos efeitos citotóxico e espasmolítico do lapachol e de seus derivados naturais e sintéticos: relação estrutura-atividade e mecanismo de ação. 2008. p. 177. **Tese (Doutorado)**. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008

- CHALMERS, S.; OLSON, M. L.; MacMILLAN, D.; RAINBOW, R. D.; McCARRON, J. G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. **Cell Calcium**, v. 42, p. 447 – 466, 2007.
- CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: preclinical and clinical studies. **Asia Pacific Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 113 – 118, 1994.
- CHAH, K. F.; MUKO, K. N.; OBOEGBULEM, S. I. Antimicrobial activity of methanolic extract of *Solanum torvum* fruit. **Fitoterapia**, v. 71, n. 2, p. 187-189, 2000.
- CLAUDINO, F. S. Atividade espasmolítica de extratos obtidos de *Solanum jabrense* Agra e Nee (SOLANACEAE). 2003. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.
- CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay k-8644, on guinea-pig ileum ant rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954 – 957, 1987.
- COSTA, V. C. O. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum asperum* Rich. e *Solanum paludosum* Moric.: um estudo comparativo. 2006. **Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biologia)** – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.
- COSTA, C.; TEIXEIRA, D. **Medicamentos e plantas**. Universidade de Évora, Departamento de Química, 2007. Disponível em <http://home.uevora.pt/~ueline/quimica_para_todos/medicamentos_e_plantas.pdf> Acessado em 7 de abril de 2009.
- CORREIA, A. C. C. Efeito comparativo entre os extratos obtidos das partes aéreas e dos frutos de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae) em músculo liso. 2007. **Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Farmácia)** - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.
- DAVIES, M. P.; McCURRIE, J. R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 3, p. 249 – 256, 1996.
- D'ARCY, W.G. The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. In: HAWKES, L., NEE & ESTRADA. Solanaceae III: taxonomy, chemistry evolution. ed. London: **Royal Botanic Gardens** Kew and Linnean Society of London, p. 75-137, 1991.
- DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R.E.; ADAMS, D.J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca²⁺-dependent K⁺ channels contribute to vascular tone. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n. 2, p. H1135 – H1141, 1994.

- DUARTE, M. C.; SILVA, J. L. V.; CAVALCANTE, F. A.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A. Papel dos canais de Ca^{2+} e K^{+} na ação relaxante da fase acetato de etila de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2003, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2003.
- DUSTING, G. J.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostacyclin (PGX) is the endogeneous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. **Prostaglandins**, v. 13, n. 1, p. 3 – 15, 1977.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H. Potassium channel openers and vascular smooth muscle relaxation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 237 – 258, 1990.
- EISELE, K.; LANG, P. A.; KEMPE, D. S.; KLARL, B. A.; NIEMOLLER, O.; WIEDER, T.; HUBER, S. M.; DURANTON, C.; LANG, F. Stimulation of erythrocyte phosphatidylserine exposure by mercury ions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p. 116 – 122, 2006.
- 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.
- EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. **Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 25, p. 15579 - 15582, 1997.
- FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p. 149-154, 1989.
- 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.
- FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; FERREIRA, A. F. R. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar**. Universidade Estadual de Campinas, Divisão de Fitoquímica, Centro pluridisciplinar de pesquisas químicas, biológicas e agrícolas, 2006. Disponível em <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf> Acessado em 07 de abril de 2009.
- 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.

- GARCIA, F. M. Monitoração da Atividade Espasmolítica de Produtos obtidos de *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae). 2007. p. 81. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular aspects of cell biology**. Phyladelphia, Saunders, p. 1156 – 1179, 1995.
- GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V.; BOLTON, T. B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca^{2+} Signalling. **Journal of Microscopy**, v. 196, p. 305 – 316, 1999.
- GURNEY A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242 - 251, 1994.
- HARDMAN, J. T.; BECK, M. L.; OWENSBY, C. E. Range Forb Lectins. **Transfusion**, v. 23, n. 6, p. 519 – 522. 1983.
- HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi- K^+ channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 36, n. 5, p. G1087 – G1093, 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 and Physiology**, v. 21, n. 5, p. 367 – 375, 1994.
- HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957 – 961, 1996.
- HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science**, v. 62, p. 1689 – 1633, 1998.
- HSU, S. H.; TSAI, T. R.; LIN, C.N.; YEN, M. H.; KUO, K. W. Solamargine purified from *Solanum incanum* Chinese herb triggers gene expression of human TNFR I which may lead to cell apoptosis. **Biochemistry Biophysical Research Communications**, v. 299, n. 1, p. 1 – 5, 1996.
- HUANG, Y.; LAU, C. W.; CHAN, F. L.; YAO, X. Q. Contribution of nitric oxide and K^+ channel activation to vasorelaxation of isolated rat aorta induced by procaine. **European Journal of Pharmacology**, v. 367, n. 2-3, p. 231 – 237, 1999.
- HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K^+ channel blockers in rat aorta rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53 – 60, 1998.
- HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action *In vivo*. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 829 – 833. 1997.

- HUNZIKER, A. T. Genera solanacearum: The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system. **A. R. Gantner Verlag, Köenigstein** - Germany. 500p, 2001.
- HURWITZ, L.; MCGUFFEE, L. J.; LITTLE, S. A.; BLUMBERG, H. Evidence for two distinct types of potassium-activated calcium channels in an intestinal smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 214, p. 574 – 581, 1980.
- IBARROLA, D. A.; HELLIÓN-IBARROLA, M. C.; MONTALBETTI, Y.; HEINICHEN, O.; ALVARENGA, N.; FIGUEREDO, A.; FERRO, E. A. Isolation of hypotensive compounds from *Solanum sisymbirifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 301-307, 2000.
- ISHII, T. M.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 23195–23200, 1997.
- KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Science**, v. 56, n. 25, p. 2229 – 2238, 1995.
- KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.-I.; HARADA, K.-I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.-J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, p. 157 – 230, 1997.
- KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, p. 254 – 248, 1996.
- KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 – 18004, 1989.
- KOMORI, S.; ITAKAKI, M.; UNNO, T.; OHASHI, H. Caffeine and carbachol act on common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, n. 2-3, p.173 – 180, 1995.
- 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.
- KUME, H.; HALL, I.P.; WASHABAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M.I. β -Adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371 – 379, 1994.

- KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C. ; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine. **Biochemistry Pharmacology**, v. 60, n. 12, p. 1865 – 1873, 2000.
- KUPCHAN, S.M.; BARBOUTIS, S.J.; KNOX, J.R.; LAU, C.A. β -solamarine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. **Science**, v. 150, p. 1827 – 1828, 1965.
- 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.
- LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385 – 399, 1989.
- LEWIS, W.; ELEWIN-LEWIS, M. Medical Botany, Plants affecting human health. 2. ed. **John Wiley & Sons**, p. 832 , 1977.
- LEXIS, L. A.; FASSETT, R. G.; COOMBES, J. S. α -Tocopherol and α -lipoic acid enhance the erythrocyte antioxidant defence in cyclosporine Atreated rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 68 – 73, 2006.
- LI, L.; VAALI, K.; VAPAATALO, H.; KANKAANRANTA, H. Effects of K^+ channel inhibitors on relaxation induced by flufenamic and tolfenamic acids in guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p.169 – 176, 1999.
- LIMA, L. O.; SILVA, A. D. S.; SILVA, P. C. B.; CORREIA, A. C. C.; MACÊDO, C. L.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A.; CAVALCANTE, F. A. Evaluation of the Cytotoxic and Spasmolytic Activities of *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae). In: 8th International Symposium on Poisonous Plants, 2009, João Pessoa. Program and Abstracts, 2009. v. Único, p. 58.
- LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2'', 3'')-furanoflavona. Obtida de *Diploptropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. 2004. p. 107. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.
- LIMA, J. T. Caracterização do envolvimento dos BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. 2008. p. 146. **Tese (Doutorado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.
- LINCOLN, T. M.; KOMALAVILAS, P. Cyclic GMP-mediated signaling mechanisms in smooth muscle. In: Nitric Oxide, edited by Ignarro L. J. **New York: Academic**, p. 401 – 4425, 2000.

MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de potássio na ação espasmolítica do ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302), isolado de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. em íleo isolado de cobaia. 2008. p. 77. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

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

McMANUS, O. B.; HELMS, L. M. H.; PALLANCK, L.; GANETZKY, B.; SWANSON, R.; LEONARD, R. J. Functional role of the β subunit of high conductance calcium-activated potassium channels. **Neuron**, v. 14, p. 645-650, 1995.

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

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-Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. C312 – C317, 1995.

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

MISHRA, S. K.; AARONSON, P. I. A role for a glibenclamide-sensitive, relatively ATP-insensitive K^+ current in regulating membrane potential and current in rat aorta. **Cardiovascular Research**, v. 44, n. 2, p. 429-435, 1999.

MONTEIRO, A. R. M. Produtos à base de plantas dispensados em ervanárias para o emagrecimento: efeitos terapêuticos, toxicologia e legislação. 2008. p. 176. **Dissertação (Mestrado)** – Pós-Graduação em Ciências Médico Legais do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal, 2008.

MONTEIRO, F. S. Participação de receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcalóides totais obtida de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae). 2009. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca^{2+} transients. **Pflügers Archives**, v. 395, p. 75 – 77, 1982.

MURRAY, M. A.; BERRY, J. L.; COOK, S. J.; FOSTER, R. W.; GREEN, K. A.; SMALL, R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal $K(+)$ -channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1814 – 1818, 1991.

- NASCIMENTO, R. J. B. Estudo de espécies do gênero *Solanum* (Solanaceae): quimiotaxonomia e ensaios biológicos. 2006. p. 125. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.
- NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization factor and endothelium-dependent relaxations. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 1993.
- NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585–587, 1980.
- NIELSEN-KUDSK, J. E. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. **Danish Medical Bulletin**, v. 43, p. 429 – 447. 1996.
- NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597– 606, 2003.
- NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. S201 – S205, 1991.
- NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p. 147–148, 1983.
- NOUAILHETAS, V. L. A.; SHIMUTA, S. I.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the guinea-pig ileum agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 41 – 47, 1985.
- OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F. ; ALMEIDA, F. R. C. ; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK_{ca} in vasorelaxant effect of labdane-302. In: XXXVI Congresso brasileiro de farmacologia, 2004, Águas de Lindóia-SP. XXXV **Congresso Brasileiro de Farmacologia**. São Paulo-SP: SBFTE, 2004. v. UNICO. p. 268 – 269.
- OLIVEIRA, J. P.; SILVA, B. A.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, T. M. S.; CHAVES, M. C. O. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra (SOLANACEAE) e de *Piper caldense* C. DC. (PIPERACEAE). In: Encontro de Iniciação Científica da UFPB, 9., 2001, João Pessoa. **CD-ROM (Resumos)**. João Pessoa: UFPB, 2001. V.13.03.
- OLIVEIRA, R. C. M. ; MONTEIRO, F. S. ; SILVA, J. L. V. ; RIBEIRO, L. A. A. ; SANTOS, R. F. ; DUARTE, J. C. ; AGRA, M. F. ; SILVA, T. M. S. ; ALMEIDA, Fernanda Regina de Castro ; SILVA, B. A. . Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sedtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 146-151, 2006a.

- OLIVEIRA, R. C. M.; LIMA, J. T.; RIBEIRO, L. A. A.; SILVA, J. L. V.; MONTEIRO, F. S.; ASSIS, T. S.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, B. A. Spasmolytic Action of the Methanol Extract and Isojuripidine from *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae) Leaves in Guinea-Pig Ileum. **Zeitschrift für Naturforschung**, C, A Journal of Biosciences, Alemanha, v. 61c, p. 799-805, 2006b.
- OLMSTEAD, R. G. R.; SPRANGLER, E.; BOHS, L.; PALMER, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In Nee M, Symon DE (eds) Solanaceae IV. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 111-138, 1999.
- PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, p. 375 - 384, 2003.
- PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRALLA, A.; GREMBIALE, R. D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G. B.; MARSICO, S. A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Science**, v. 70, n. 9, p. 977 – 990, 2002.
- PEREZ, G. J.; BONEV, A. D.; PATLAK, J. B.; NELSON, M. T. Functional coupling of ryanodine receptors to K_{Ca} channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries, **The Journal of General Physiology**, v. 113, p. 229 – 238, 1999.
- PEREZ G. R. M.; PEREZ L. J. A.; GARCIA, D. L. M.; SOSSA M., H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 43 – 48, 1998.
- PROKOF'EVA, N. G.; UTKINA, N. K.; CHAIKINA, E. L.; MAKARCHENKO, A. E. Biological activities of marine sesquiterpenoid quinones: structure–activity relationships in cytotoxic and hemolytic assays. **Physiology of Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B: v. 139, p. 169 – 173, 2004.
- QUAYLE, J. M.; NELSON, M. T.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1165 – 1232, 1997.
- RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v. 35, n. 2, p. 305 – 309, 1997.
- RATZ, P. H.; BERG, K. M. ; URBAN, N. H. ; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 288, p. C769 – C783, 2005.
- REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of smooth 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.

- RIBEIRO, E. A. N.; BATITUCCI, M. C. P.; LIMA, J. A. T.; ARAÚJO, I. G. A.; MAUAD, H.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the aqueous fraction of the ethanol extract of the stem of *Solanum stipulaceum* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 34 – 35, 2002.
- RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. da. Vasorelaxant effect of 8(17),12E,14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302) in rat aorta involves K⁺ channels. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 2007a.
- RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 197 – 203, 2007b.
- RIBEIRO, R.; FIUZA DE MELO, M. M. R.; BARROS, F.; GOMES, C.; TROLIN, G. Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medical plants used in the state of São Paulo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, n. 3, p. 261-269, 1986.
- ROBERTSON, B. E.; NELSON, M. T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. C1589 – C1597, 1994.
- ROMERO, F.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Activation of Ca²⁺-activated K⁺ (maxi-K⁺) channel by angiotensin II in myocytes of the guinea-pig ileum. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. C983 – C991, 1998.
- 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 for 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, R. F.; SILVA, B. A.; CAVALCANTE, F. A.; CLAUDINO, F. S.; SOUSA, J. P.; MEDEIROS, A. F. D.; ALARCÓN, K. M.; SILVA, T. M. S. Estudo comparativo do efeito espasmolítico entre *Solanum agrarium* Sendtner e *Solanum stipulaceum* Roem & Schult. In: SOUZA, M. F. V. **Iniciados**. 9 ed. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2003. p. 98 – 114.
- SANTOS R. F. Ação espasmolítica de retusin, flavonóide isolado de *Solanum paludosum* Moric. e de seu derivado metilado em íleo isolado de cobaia. 2006. p. 77. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa Universidade Federal da Paraíba, 2006.

- SATAKE, N.; SHIBATA, M.; SHIBATA, S. The involvement of K_{Ca} , K_{ATP} and K_V channels in vasorelaxing responses to acetylcholine in rat aortic rings. **General Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 453 – 457, 1997.
- SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 1333 – 1355, 2002.
- SHIKADA, K.; TANAKA, S. K^+ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193 – 197, 1995.
- SHUM, O. L.; CHIU, K. W. Hypotensive action of *Solanum melongena* on normotensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 2, p. 76 – 81, 1991.
- SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi- K^+ channel. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 277, n. 4, p. C739 – C745, 1999.
- SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A.T.; PAIVA, A.C.M.; PAIVA, T.B. Role of Ca^{2+} -dependent K-channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 1022 – 1028, 1994.
- SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca^{2+} -dependent K^+ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**, v. 3, n. 4, p. 259-265, 1996.
- SILVA, P. C. B.; VASCONCELOS, M. A.; LIMA, L. C. G. C.; LIMA, L. O.; CORREIA, A. C. C.; MACÊDO, C. L.; PESSÔA, H. L. F.; SILVA, T. M. S.; SILVA, B. A.; CAVALCANTE, F. A. Hemolytic and Spasmolytic Assays of *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae). In: **8th International Symposium on Poisonous Plants**, 2009, João Pessoa. Program and Abstracts, 2009. v. Único, p. 150.
- SILVA, P. C. B. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paraibanum* Agra: um estudo comparativo. 2007. **Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia)** – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.
- SILVA, K. N. Estudo farmacobotânico de três espécies de *Solanum* L. (Solanaceae). E triagem farmacológica da atividade espasmolítica de *Solanum paniculatum* L. **Dissertação (Mestrado)**. Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da João Pessoa, Paraíba, 2006.
- SILVA, J. L. V. Monitoração da atividade vasorelaxante de produtos obtidos das partes aéreas de *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae), 2005. **Dissertação (Mestrado)** Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2005.

- SILVA, T. M. S., CARVALHO, M. G., BRAZ-FILHO, R., AGRA, M. F. Ocorrência de Flavonas, Flavonóis e seus Glicosídeos em Espécies do Gênero *Solanum* (Solanaceae) **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 517 – 522, 2003.
- SILVA, J. L. V.; SILVA, B. A.; CAVALCANTE, F. A.; MACÊDO, L. S. ; DUARTE, J. C.; SILVA, T. M. S. Investigação da atividade espasmolítica de *Solanum paludosum* Moric. (SOLANACEAE): estudo comparativo entre os extratos etanólico e metanólico. In: Maria de Fátima Vanderlei de Souza. (Org.). **Iniciados**. João Pessoa: Editora universitária/UFPB, 2002, v. 8, p. 223 – 237.
- SMITH, R. C.; MCCLURE, M. C.; SMITH, M. A.; ABEL, P. W.; BRADLEY, M. E. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 1 – 12, 2007.
- SINGER, J. J.; WALSH Jr., J. V. Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch-clamp technique. **Pflügers Archives**, v. 408, p. 98 – 111, 1987.
- SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características Farmacológicas Gerais Das Plantas Medicinais. **Infarma**, v.16, n. 13/14, p. 74-77, 2005.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 1325 – 1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, p. 177 – 185, 2000.
- SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129 – 145, 1968.
- SPEEDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacology Reviews**, v. 44, p. 363 – 376, 1992.
- 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 relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453 – 459, 1994.
- SUZUKI, T; TAKIMOTO, K - Differential expression of Kv4 pore-forming and KChIP auxiliary subunits in rat uterus during pregnancy. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 288, p. E335 – E341, 2005.
- TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K^+ channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, p. 617 – 624, 2006.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K^+ channels underlying levcromakalim-induced relaxation in pig urethra. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 291 – 300, 1999.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K^+ channels in cat thacheal myocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 625 – 635, 2000.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215 – 242, 2005.

TOMITA, T. Eletrical activity (spickes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. **Smooth Muscle: An assessment of currente knowledge**, p. 127 – 156, 1981.

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

TRAVASSOS, R. A.; MACEDO, C. L.; CORREIA, A. C. C.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Involvement of K^+ channels on tocolytic effect and investigation of hemolytic activity of labdane-302. In: **41º Congresso Brasileiro de Farmacologia**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

TRIGGLE, C. R.; SWAMY, V. C.; TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 804 – 818, 1979.

TRIGGLE, C. R.; TRIGGLE, D. J. An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea-pig ileal longitudinal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 254, p. 39 – 54, 1976.

TRIGGLE, D. J.; ZHENG, W.; HAWTHORN, M.; KWON, Y. W.; WEI, X. Y.; JOSLYN, A.; FERRANTE, J.; TRIGGLE, A. M. Calcium channels in smooth muscle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 560, p. 215 – 229, 1989.

TSAI, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by an Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p. 18 – 29, 1998.

UNNO, T.; KOMORI, S.; OHASHI, H. Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca^{2+} channel current in smooth muscle cells of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v 484, n. 3, p. 567 – 581, 1995.

USOWICZ, M. M.; GIGG, M.; JONES, L. M. E.; CHEUNG, C. W.; HARTLEY, S. A. Allosteric interactions at L-type calcium channels between FPL 641 76 and the enantiomers of the dihydropyridine Bay K 8644. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, p. 638 – 645, 1995.

- UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 565 – 572, 1993.
- VANHEEL, B.; VAN DE VOORDE, J. EDHF and residual NO: different factors. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 3, p. 370 – 375, 2000.
- VAN DER STAAY, F. J.; FANELLI, R. J.; BLOKLAND, A.; SCHMIDT, B. H. Behavioral effects of apamin, a selective inhibitor of the SK_{Ca} -channel, in mice and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1087 – 1110, 1999.
- VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 30, p. 167 – 208, 1979.
- VAN BREEMEN, C.; SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating $[\text{Ca}^{2+}]_i$ smooth muscle. **Annual Reviews of Physiology**, v. 51, p. 315 – 329, 1989.
- VIEIRA, R. A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 57 – 64. 2001.
- VOGALIS, F.; PUBLICOVER, N. G.; HUME, J. R.; SANDERS, K. M. Relationship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells **The American Journal Of Physiology**, v. 260, n. 1, p. C1012 – C1018, 1991.
- WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658 – C665, 1993.
- WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 1, p. 79-84, 2002.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289 – 298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances 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.
- WEI, X. Y.; LUCHOWSKI, E. M.; RUTLEDGE, A.; SU, C. M.; TRIGGLE, D. J. Pharmacologic and radioligand binding analysis of the actions of 1,4-dihydropyridine activator-antagonist pairs in smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 239, p. 144-153, 1986.

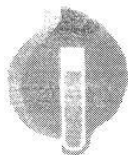
YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 14, n. 3, p. L338-L345, 1996.

YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-Chanome: A Protein Superfamily Specialized for Electrical Signaling and Ionic Homeostasis. **Science's stke**, v. 253, p. 1-17, 2004.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D. J. Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FPL 64176, a novel nondihydropyridine Ca^{2+} channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 734 – 741, 1991.



ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal (CEPA/LTF)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 29 de maio de 2009

CEPA N.º 0605/09

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Departamento/Setor: LTF/CCS-UFPB

Ref.: Projeto de Pesquisa: "Avaliação do Efeito Espasmódico de Solanum Agrarium Sendtner em Íleo de Cobaia e Útero de Rata".

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. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
Presidente em Exercício do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

