

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

VALERIA LOPES DE ASSIS

**Ensaio Farmacológico Pré-clínico no
Trato Digestório com um Produto
Fitoterápico**

**JOÃO PESSOA – PB
2012**

VALERIA LOPES DE ASSIS

**Ensaio Farmacológico Pré-clínico no
Trato Digestório com um Produto
Fitoterápico**

Dissertação apresentada ao
**Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos
Bioativos** do Centro de Ciências da
Saúde, da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de
**MESTRE EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS**. Área de concentração:
FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

**JOÃO PESSOA – PB
2012**

A848e Assis, Valeria Lopes de.

Ensaio farmacológico pré-clínico no trato digestório com um produto fitoterápico / Valeria Lopes de Assis.-- João Pessoa, 2012.

100f. : il.

Orientador: Isac Almeida de Medeiros

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

1. Produtos Naturais. 2. Produto Fitoterápico. 3. Laxante. 4. Trato gastrointestinal. 5. Antiespasmódico.

VALERIA LOPES DE ASSIS

**Ensaio Farmacológico Pré-clínico no Trato
Digestório com um Produto Fitoterápico**

Aprovada em 13 de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
Universidade Federal da Paraíba
Orientador**

**Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno**

**Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo**

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que amo e são fundamentais em minha vida:

À Deus, que está diariamente iluminando o meu caminho e me dando forças suficientes pra que, mesmo na queda, eu me erga e continue a minha caminhada.

Aos meus queridos pais, Jailson e Salete, que me criaram e me ensinaram tudo o que eu sou hoje, sempre me apoiando e me guiando diante de todas as dificuldades da vida.

Aos meus irmãos Vinícius, Victor e Vagner, pelo imenso carinho, companherismo e confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu amado noivo Alexandre, que mesmo com toda turbulência em sua vida, nunca deixou de me dar apoio, amor e compreensão, os quais foram imprescindíveis para a execução e conclusão de mais esta vitória.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, meu pai misericordioso e bondoso, que derrama infinitas graças sobre mim, por todas as oportunidades que me foram dadas na vida, mas também por todas as dificuldades, que foram o alicerce do meu aprendizado.

Ao **Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros**, pela orientação, confiança e incentivo, os quais foram imprescindíveis para minha formação pessoal e profissional. Serei eternamente grata.

Ao **Prof. Dr. Robson Veras**, que com toda paciência e dedicação me acompanhou nessa caminhada e que sempre me apoiou nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, **Jailson e Maria da Salete**, sem os quais nada disso seria possível, sou-lhes eternamente grata por todo carinho, amor e dedicação. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Vinícius, Victor e Vagner**, por toda confiança e companherismo.

Ao meu noivo, **Alexandre**, por todo amor, carinho e palavras de incentivo que me conduziram a este momento.

À minha amiga, **Mônica Almeida**, que foi um anjo enviado por Deus para me ajudar, agradeço de coração pela ajuda na bancada e parceria na realização deste trabalho.

À minha amiga, a Prof^a. Dr^a. **Islânia Araújo**, pelo imprescindível apoio e ensinamentos valiosos.

Às queridas alunas de iniciação científica, **Priscilla Maciel (P1) e Priscilla Crispiniano (P2)**, pela amizade e dedicação a este trabalho.

À **Mari Alves**, querida amiga e companheira pelo incentivo e orações.

Aos colegas da **Comunidade Consolação Misericordiosa** pelos ensinamentos de perseverança e coragem, os quais foram essenciais para esta vitória.

À Prof^a. Msc. **Fabiola Fialho** e Prof^a. Dr^a. **Angélica Satyro** pelo companherismo e amizade.

A **Abraão, George e Milena**, companheiros de jornada com os quais sempre pude contar. Agradeço de todo o coração toda a ajuda e amizade compartilhada com vocês.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: alunos de doutorado (**Aurylene, Thaís Porto, Thaís Josy, Melissa, Maria do Socorro**,

Bruna, Thyago); alunos de mestrado (**Kívia, Leônidas, Natália, Mateus**) e, alunos de iniciação científica (**Walma, Laís, Thaís Amanda, Jaci, Marden, Rafael**), que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório da Prof^a. Dr^a. **Bagnólia Silva**, pelo apoio e disponibilidade sempre que precisei.

À **Coordenação, funcionários** e a todos os **professores** que compõem o Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência e seriedade.

À **minha turma de mestrado**, companheiros de tantas aventuras, pelo carinho e companheirismo.

A **José Crispim Duarte** pela ajuda importantíssima dada para o desenvolvimento deste trabalho.

A **Luís Cordeiro da Silva**, pelo trabalho realizado no Biotério e pela disponibilidade a todos os alunos.

Enfim, obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

“A nossa maior glória não reside no
fato de nunca cairmos, mas sim em
levantarmo-nos sempre depois de cada
queda.”

Confucio

Resumo e Abstract

RESUMO

O Produto Fitoterápico estudado é indicado no tratamento de cólicas intestinais e constipação, entretanto não apresenta dados científicos que comprovem sua eficácia. Assim, este estudo objetivou realizar ensaios farmacológicos pré-clínicos para avaliar sua ação laxante e sua ação espasmolítica, bem como elucidar seu provável mecanismo de ação. Para tal, realizaram-se ensaios farmacológicos *in vivo* para avaliar seu efeito estimulante sobre o trato gastrointestinal e ensaios *in vitro* com o intuito de avaliar sua atividade espasmolítica. O Produto Fitoterápico aumentou a motilidade do intestino delgado em camundongos machos, nas doses de 100mg/kg ($161,66 \pm 14,86\%$; n=6) e 200mg/kg ($151,04 \pm 17,17\%$, n=6) quando comparados ao controle ($100,00 \pm 10,49\%$; n=6). O trânsito intestinal de animais constipados por loperamida (3mg/kg/dia, três dias) foi reduzido a $66,25 \pm 7,49\%$ (n=8) em comparação ao grupo controle ($100 \pm 5,16\%$; n=8). Nos animais constipados e tratados com doses de 100 e 200mg/kg ($98,42 \pm 6,33\%$, n=7); ($99,32 \pm 8,47\%$; n=7), observou-se a normalização do trânsito intestinal. Resultados semelhantes foram encontrados na quantificação por 24 horas de fezes de ratos constipados por loperamida (3mg/kg/dia, três dias), em que o Produto Fitoterápico induziu o retorno da quantidade de fezes a níveis normais ($7,92 \pm 1,01\text{g}$; n=6) de animais constipados ($4,01 \pm 1,43\text{g}$; n=6), tanto na dose de 100mg/kg ($11,24 \pm 2,90\text{g}$; n=6) como na dose de 200mg/kg ($8,70 \pm 2,01\text{g}$; n=6). Estes resultados demonstram a ação estimulante da preparação estudada no intestino destes animais com potencial efeito laxante. A adição crescente e cumulativa (0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$) deste produto não alterou significativamente as contrações espontâneas em íleo de cobaia. Entretanto, sua adição (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) promoveu relaxamento neste órgão pré-contraído com carbacol 1 μM , $E_{\text{max}} = 67,61 \pm 6,25\%$; $CE_{50} = 269,77\mu\text{g/mL}$ (215,8–337,1); n=6, com histamina 1 μM , $E_{\text{max}} = 58,68 \pm 7,17\%$; $CE_{50} = 144,10\mu\text{g/mL}$ (86,65–239,70); n=6, ou com KCl 40mM, $E_{\text{max}} = 50,76 \pm 3,79\%$; $CE_{50} = 91,94\mu\text{g/mL}$ (57,97–145,80); n=7, não apresentando diferença estatística nas potências, o que sugere uma ação sobre uma etapa comum a estes três agentes. A ação relaxante desta preparação foi atenuada em íleo pré-contraído com KCl 60mM ($E_{\text{max}} = 39,28 \pm 1,95\%$; n=7) e sua eficácia e potência também foram significativamente atenuados na presença de bloqueadores de canais para K^+ , 5mM TEA, $E_{\text{max}} = 22,79 \pm 2,99\%$; $CE_{50} = 93,41\mu\text{g/mL}$ (54,89–159,00); n=5, e 5mM CsCl, $E_{\text{max}} = 29,44 \pm 6,24\%$; $CE_{50} = 112,60\mu\text{g/mL}$ (44,09–287,80); n=5, sugerindo participação destes canais em seu relaxamento. Em contrações induzidas por 300nM S(-)-BayK 8644, agonista de canais Ca_v , o efeito induzido pelo Produto Fitoterápico $E_{\text{max}} = 39,28 \pm 1,95\%$; $CE_{50} = 199,70\mu\text{g/mL}$ (120,50–239,00); n=8, foi significativamente menor, quando comparado ao carbacol, indicando a participação dos Ca_v em seu efeito. Em preparações pré-incubadas com 1 μM propranolol ($E_{\text{max}} = 34,45 \pm 4,97\%$; n=6), o E_{max} foi atenuado, sugerindo também a participação de receptores β -adrenérgicos no efeito induzido pela preparação. Assim, concluímos que o Produto Fitoterápico age estimulando o intestino de ratos e camundongos, principalmente em animais constipados e apresenta atividade espasmolítica em íleo de cobaia provavelmente pela abertura de canais para K^+ , inibição de canais para Ca^{2+} e ativação de β -adrenoceptores.

Palavras-chave: Laxante. Antiespasmódico. Trato gastrointestinal. Canais para K^+ . Bloqueador de canais para Ca^{2+} . Receptores β -adrenérgicos.

ABSTRACT

The studied Herbal Product is indicated for treatment of intestinal colic and constipation, though there are no scientific data, that prove its efficacy. Thus, this study aimed in preclinical pharmacologic trials to evaluate its laxative and spasmolytic action and elucidate its possible pathway. For this, pharmacological tests were carried out *in vivo* to evaluate its stimulating effect on the gastrointestinal tract and *in vitro* assays in order to evaluate its spasmodic activity. The Herbal Product increased small intestinal motility in male mice at doses of 100mg/kg ($161.66 \pm 14.86\%$, n=6) and 200mg/kg ($151.04 \pm 17.17\%$, n=6) compared to control ($100.00 \pm 10.49\%$, n=6). The intestinal transit of animals constipated by loperamide (3mg/kg/day, three days) was reduced to $66.25 \pm 7.49\%$ (n=8) compared to the control group ($100 \pm 5.16\%$, n=8). In the constipated animals treated with doses of 100 and 200mg/kg ($98.42 \pm 6.33\%$, n=7) ($99.32 \pm 8.47\%$, n=7) was observed the normalization of the traffic bowel. Similar results were observed for 24 hours in the quantification of rat feces constipated by loperamide (3mg/kg/day, three days). The herbal medicine induced return of quantity of feces normal levels ($7.92 \pm 1.01\text{g}$, n=6) in constipated animals ($4.01 \pm 1.43\text{g}$, n=6), at dose of 100mg/kg ($11.24 \pm 2.90\text{g}$, n=6) and 200mg/kg ($8.70 \pm 2.01\text{g}$, n=6). These results demonstrate the stimulating action of this preparation in the intestine of the animals with potential laxative effect. Adding increasing and cumulative (0.01-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of this product did not significantly alter spontaneous contractions in guinea pig ileum. However, its addition (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) caused a relaxation in this organ pre-contracted with 1 μM carbachol, $E_{\text{max}} = 67.61 \pm 6.25\%$; $EC_{50} = 269.77\mu\text{g}/\text{mL}$ (215.8 to 337.1), n=6; histamine 1 μM ($E_{\text{max}} = 58.68 \pm 7.17\%$, $EC_{50} = 144.10\mu\text{g}/\text{mL}$ (86.65 to 239.70), n=6, and 40mM KCl ($E_{\text{max}} = 50.76 \pm 3.79\%$; $EC_{50} = 91.94\mu\text{g}/\text{mL}$ (57.97 to 145.80), n=7, no significant difference in the powers, suggesting an action of this product on a step common to these three agents. The relaxing action of this preparation was attenuated in ileum pre-contracted with 60mM KCl ($E_{\text{max}} = 39.28 \pm 1.95\%$, n=7) and the efficacy and potency were also significantly attenuated in the presence of potassium channel blockers, 5mM TEA, $E_{\text{max}} = 22.79 \pm 2.99\%$; $EC_{50} = 93.41\mu\text{g}/\text{mL}$ (54.89 to 159.00), n=5; and 5mM CsCl; $E_{\text{max}} = 29.44 \pm 6.24\%$, $EC_{50} = 112,60\mu\text{g}/\text{mL}$ (44.09 to 287.80), n=5, suggesting the participation of these channels in relaxation. In contractions induced by 300nM S(-)BayK-8644, Ca_v channel agonist, the effect induced by phytomedicine, $E_{\text{max}} = 39.28 \pm 1.95\%$, $EC_{50} = 199.70\mu\text{g}/\text{mL}$ (120.50 to 239.00), n=8, was significantly lower when compared to carbachol, indicating the involvement of Ca_v in its effect. In preparations pre-incubated with 1 μM propranolol ($E_{\text{max}} = 34.45 \pm 4.97\%$, n=6), the E_{max} was attenuated, suggesting also the involvement of β -adrenergic receptors in the effect induced by preparation. Thus, we conclude that the Herbal Product acts stimulating the intestine of rats and mice, especially in constipated animals and has spasmolytic activity in guinea pig ileum probably due to opening of K^+ channels, inhibition of Ca^{2+} channels and activation of β -adrenoceptor.

Keywords: Laxative. Antispasmodic. Gastrointestinal tract. Potassium channels. Calcium channels blocker. β -adrenergic Receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	adenosina 5'- trifosfato
Ca _v	canais para cálcio sensíveis a voltagem
[Ca ²⁺] _c	concentração de Ca ²⁺ citosólico
CE ₅₀	concentração da substância que produz 50% do efeito máximo
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
DAG	diacilglicerol
E _{máx}	efeito máximo
e.p.m.	erro padrão da média
GPCR	receptor acoplado a proteína G
IP ₃	1,4,5 trisfosfato de inositol
i.g.	intragástrica
MLC	cadeia leve de miosina
MLCK	cinase da cadeia leve de miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve de miosina
n	tamanho da amostra
NANC	não adrenérgicos não colinérgicos
NO	óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	potencial hidrogeniônico
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PLC	fosfolipase C
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
ROC	canal para Ca ²⁺ operado por receptor
ROK	Rho-cinase
S(-)-Bay K 8644	1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster
SOC	canal para Ca ²⁺ operado por estoque

UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VIP	peptídeo intestinal vasoativo
vs	versus

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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática do mecanismo de ação dos receptores β -adrenérgicos. 32
- Figura 2:** Figura representativa das gaiolas metabólicas utilizadas nos experimentos. 43
- Figura 3:** Aparato utilizado para os experimentos com íleo isolado de cobaia 46
- Figura 4:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do Produto Fitoterápico (0,01 $\mu\text{g/mL}$ - 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre as contrações espontâneas em preparações de íleo isolado de cobaia. 47
- Figura 5:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade espasmolítica do Pruduto Fitoterápico (1 $\mu\text{g/mL}$ - 1000 $\mu\text{g/mL}$) frente a vários agentes contracturantes, em preparações de íleo isolado de cobaia. 48
- Figura 6:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia frente a solução despolarizante de KCl 60 mM. 49
- Figura 7:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia. 50
- Figura 8:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (300 nM) em meio parcialmente despolarizante de KCl 20 mM. 51
- Figura 9:** Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia, pré-contraídos com carbacol (1 μM). 52
- Figura 10:** Efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal de camundongos machos. Barras representativas da distância percorrida do intestino delgado pelo carvão ativado em camundongos machos, normalizadas pelo controle (em porcentagem), após tratamento por via intragástrica com solução salina (Controle), com o Produto Fitoterápico 100 ou 200 mg/kg.. 55
- Figura 11:** Produto Fitoterápico reverte o efeito inibitório induzido por loperamida sobre o trânsito intestinal de camundongos machos. Barras representativas da distância percorrida do intestinal delgado pelo carvão ativado em camundongos machos, normalizadas pelo grupo Controle (tratado apenas com solução salina, n = 8), após tratamento por via intragástrica com loperamida (3 mg/kg) + salina (n = 8),

com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (100 mg/kg, n = 7) ou com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (200 mg/kg, n = 7).....56

Figura 12: Indução da constipação em ratos pelo tratamento com loperamida. Barras representam a massa de fezes eliminada por ratos após tratamento com salina (Controle, n = 6) ou loperamida (3 mg/kg/dia, 3 dias, n = 18)..... 58

Figura 13: Efeito do Produto Fitoterápico (0,01 - 1000 µg/mL) sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia..... 60

Figura 14: Registros originais do relaxamento induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia pré-contraído com 1 µM de carbacol (A), 1µM de histamina (B) e 40 mM KCl (C).. 62

Figura 15: Efeito relaxante do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia pré-contraído com diversos agentes contracturantes. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com 1 µM histamina (●), KCl 40 mM (■) ou 1 µM carbacol (◆).. 63

Figura 16: Registro original da contração induzida por 1 µM carbacol antes e após a exposição com o Produto Fitoterápico. 63

Figura 17: Efeito miorelaxante do Produto Fitoterápico sobre contrações induzidas por solução despolarizante contendo diferentes concentrações de K⁺ extracelular em íleo de cobaia. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com KCl 40 mM (●) ou KCl 60 mM. 65

Figura 18: Efeito do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia na presença de bloqueadores de canais para K⁺. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 µM na ausência (●) e na presença de CsCl 5 mM (▲) ou TEA 5 mM (■), ambos inibidores inespecíficos de canais para K⁺. 66

Figura 19: Efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo de cobaia, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 µM (●) ou com 300 nM S(-)-Bay8644 (▼), um agonista dos canais para Ca²⁺ sensíveis a voltagem tipo-L..... 67

Figura 20: Efeito miorelaxante do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia na presença do propranolol. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 µM na ausência (●) e na presença de propranolol 1 µM (■), um antagonista dos receptores β-adrenérgicos. 68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais classes de laxantes e seus representantes.	28
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução de Krebs modificado para íleo.....	38
Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 20 mM.....	38
Tabela 3: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 40 mM.....	39
Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 60 mM.....	39
Tabela 5: Efeito da administração do Produto Fitoterápico em diversos parâmetros avaliados durante 24 horas em ratos. Variáveis obtidas de animais tratados com solução salina (Controle), Produto Fitoterápico 100 mg/kg ou 200 mg/kg por via intragástrica durante o período de 24 horas.....	57
Tabela 6: Efeito da administração do Produto Fitoterápico em diversos parâmetros avaliados durante 24 horas em ratos constipados. Variáveis obtidas de animais tratados com solução salina (Controle) e após tratamento com loperamida (3 mg/kg) + salina, com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (100 mg/kg) ou com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (200 mg/kg).....	59
Tabela 7: Percentual de contração em íleo isolado de cobaia, normalizadas pelo Controle (em porcentagem), antes (Controle) e após a exposição ao Produto Fitoterápico (Reversão).....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivos Gerais	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3 MATERIAL	36
3.1 Animais	36
3.2 Drogas Utilizadas	36
3.3 Preparação das soluções do Produto Fitoterápico	37
3.4 Soluções Fisiológicas	37
4 MÉTODOS	41
4.1 Estudos <i>in vivo</i>	41
4.1.1 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal de camundongos machos	41
4.1.2 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal de camundongos machos constipados por loperamida.....	42
4.1.3 Avaliação da influência do Produto Fitoterápico na determinação da eliminação de fezes por 24h em ratos.....	42
4.1.4 Avaliação da influência do Produto Fitoterápico na determinação da eliminação de fezes em 24h de ratos constipados por loperamida	44
4.2 Estudos <i>in vitro</i>	45
4.2.1 Ensaios farmacológicos utilizando íleo isolado de cobaia	45
4.2.2 Protocolo experimental utilizando íleo isolado de cobaia.....	46
4.2.2.1 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico sobre contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia.....	46
4.2.2.2 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, histamina ou KCl 40 mM em íleo isolado de cobaia.....	47
4.2.2.3 Influência de diferentes concentrações extracelulares de K ⁺ na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia	48

4.2.2.4 Influência de bloqueadores dos canais para K ⁺ na resposta induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia.....	49
4.2.2.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 em íleo isolado de cobaia	50
4.2.2.6 Influência dos receptores β-adrenérgicos no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia.....	51
4.3 Análise estatística	52
5 RESULTADOS	55
5.1 Ensaios <i>in vivo</i>.....	55
5.1.1 Efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal em camundongos machos	55
5.1.2 Efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal em camundongos machos constipados por loperamida	56
5.1.3 Efeito do Produto Fitoterápico sobre a eliminação de fezes por 24h em ratos saudáveis.....	57
5.1.4 Efeito do tratamento com loperamida sobre a eliminação das fezes de ratos em 24 horas.....	58
5.1.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre a eliminação de fezes em 24h por ratos constipados.....	59
5.2 Ensaios <i>in vitro</i>	60
5.2.1 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia	60
5.2.2 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, histamina ou KCl 40 mM em íleo isolado de cobaia.....	61
5.2.3 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações induzidas por diferentes concentrações de K ⁺ extracelular em íleo isolado de cobaia.....	64
5.2.4 Influência de bloqueadores dos canais para K ⁺ na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia	65
5.2.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)-Bay K 8644 em íleo isolado de cobaia	67
5.2.6 Influência do propranolol, um antagonista não seletivo dos receptores β-adrenérgicos na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia	68

6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO.....	81
8 PERSPECTIVAS	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS.....	97
ANEXO A – CERTIDÃO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL.....	98
ANEXO B – PROTOCOLO - TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL .	99

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as plantas medicinais têm sido a principal fonte para os cuidados primários de saúde e em algumas áreas do mundo cerca de 80% da população ainda é dependente desta terapia tradicional (TIWARI, 2008). Nos países em desenvolvimento, as plantas medicinais são, frequentemente, o único tratamento disponível, por serem de fácil acesso e terem baixo custo em relação aos medicamentos de origem sintética (WHO, 1999).

Apesar do amplo uso em todo o mundo, há uma grande carência em pesquisas nesta área, em que apenas 17% destas plantas foram estudadas de alguma forma quanto ao seu emprego medicinal (SOEJARTO, 1996) e, na maioria dos casos, sem maiores aprofundamentos em seus aspectos fitoquímicos e farmacológicos (FERNANDES, 2004).

Os fitoterápicos e os produtos naturais derivados de plantas destacam-se por conter diversos compostos biologicamente ativos, os quais podem ser utilizados *in natura* ou servir de base para produtos da indústria farmacêutica (PALOMBO, 2006), o que lhes confere considerável importância para a medicina moderna, uma vez que diversos compostos comercializados hoje, como os alcalóides da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp., dificilmente seriam obtidos por meio de síntese química (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996).

Ao considerar o mercado industrial, representado pelas grandes indústrias farmacêuticas nacionais e multinacionais, tem-se observado a ampliação da fabricação de medicamentos naturais, movido, principalmente, pela valorização da natureza. Estas empresas movimentam bilhões de dólares por ano e têm buscado no Brasil, ou em países com capacidade produtiva semelhante, princípios ativos, essências e formulações para a obtenção de medicamentos e vacinas (AGRIANUAL, 2002).

Os fitoterápicos apresentam uma parcela significativa no mercado de medicamentos, o qual movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano, tendo uma taxa de crescimento anual de mais de 15%, fato este que torna o mercado de fitoterápicos extremamente atrativo, principalmente quando comparado as vendas dos medicamentos sintéticos, que

crecem em um ritmo de 4% ao ano. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (FEBRAFARMA, 2007).

Além do fator financeiro, deve-se também levar em consideração que o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta aliada a uma grande diversidade cultural e que o uso de plantas medicinais vinculando o saber popular e a validação de seu uso é fundamental para garantir a segurança e a eficácia de sua utilização como terapia complementar, resgatando e potencializando o conhecimento tradicional (BRITO et al., 2006).

Diante de sua grande importância, o uso de plantas medicinais e fitoterápicos passou a ser estimulado por iniciativas do Ministério da Saúde, que em 2006, através da PORTARIA GM nº 971, publicada em Diário Oficial da União, foi proposta a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), incluindo plantas medicinais e fitoterapia, homeopatia, entre outras, como opções terapêuticas no Sistema Único de Saúde (BRITO et al., 2006).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por sua vez, vêm elaborando normas de regulamentação dos medicamentos fitoterápicos no Brasil desde 1995, quando a Portaria nº. 06 estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados sobre a eficácia e segurança destes medicamentos. Esta legislação sofreu modificações ao longo dos anos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2010) e hoje, vigora a Resolução RDC nº. 14 de 31 de março de 2010 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil.

Assim, de acordo com a legislação atualmente em vigor, os fitoterápicos são definidos como medicamentos obtidos exclusivamente dos derivados de droga vegetal como extratos, tinturas, óleos, ceras, exsudatos, sucos e outros. Não são considerados medicamentos fitoterápicos as substâncias ativas isoladas, nem as suas associações (BRASIL, 2010a).

A eficácia e a segurança dos fitoterápicos são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de sua utilização, documentação técnico científica em publicações ou ensaios clínicos de eficácia terapêutica (BRASIL, 2010a). O Ministério da Saúde vincula a comprovação científica destes parâmetros, em animais e seres humanos, para a concessão do registro de tais medicamentos (NETTO et al., 2006).

Embora os fitoterápicos tenham demonstrado grande eficácia no tratamento das mais variadas doenças, a maioria destas substâncias carece de estudos

científicos que elucidem seu mecanismo de ação e a segurança do seu uso (NETTO et al., 2006), visto que o conhecimento sobre os componentes de tais medicamentos e os seus efeitos sobre os seres humanos ainda é extremamente limitado (CHAN, 1997).

Devido à natureza heterogênea destes medicamentos, há a necessidade de contínua monitorização da segurança desses produtos vegetais e um rigoroso controle de qualidade (TUROLLA; NASCIMENTO, 2010). Ensaio pré-clínicos e clínicos controlados devem ser realizados com o intuito de confirmar se estes medicamentos são realmente seguros para uso a curto, médio e longo prazo (SPRIT; DUPIN-SPRIT; SIMON, 1994).

Esta política já vem sendo adotada mundialmente, de forma que inúmeras organizações e instituições têm executado tais estudos, divulgando seus resultados para assegurar o uso correto, a eficácia e a segurança dos fitoterápicos (OMS, 2006). Dentre estes estudos, destacam-se aqueles sobre produtos de origem natural que agem no combate a distúrbios do trato gastrointestinal, uma vez que estes distúrbios são considerados um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo, afetando cerca de 70% da população em geral (PALOMBO, 2006; MEHMOOD et al., 2011).

Os distúrbios funcionais do trato digestivo são caracterizados por uma variedade de sinais e sintomas que podem interferir significativamente com a qualidade de vida dos indivíduos. As doenças digestivas funcionais mais frequentes são a dispepsia crônica, a síndrome do intestino irritável e a constipação idiopática crônica. Atualmente, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tais distúrbios ainda não são completamente compreendidos (FORNAI et al., 2008).

A atividade intestinal é modulada ou regulada por muitos fatores, como o sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico, hormônios intestinais, fatores mecânicos e o meio local neuro-humoral. O sistema nervoso entérico, por sua vez, é formado por uma rede de fibras nervosas, composto principalmente de neurônios inibitórios e neurônios excitatórios localizados nos plexos mioentérico e submucoso (NAGAO et al., 2011).

O controle neuronal entérico da motilidade gastrointestinal é mediada através da neurotransmissão excitatória (principalmente colinérgica) e inibitória. Além dos neurônios adrenérgicos e colinérgicos, também estão presentes os nervos não-noradrenérgico não-colinérgico (NANC) que liberam neurotransmissores

inibitórios, como exemplo o óxido nítrico (NO), a adenosina 5'- trifosfato (ATP) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (MITOLO-CHIEPPA et al., 1998; MATSUDA; MILLER, 2010).

O ato da evacuação, que é decorrente de estímulos autonômicos e somáticos, ocorre pela combinação de diversos movimentos, coordenados ou não, que envolve diferentes estruturas neuromusculares, as quais obedecem as seguintes etapas: (1) contrações propulsivas colo-retais, de rápida duração e alta amplitude que podem ser sentidas como a “dor abdominal” que precede a evacuação; (2) distensão do reto pelas fezes, que promove a sensação de necessidade para evacuar; (3) relaxamento reflexo do esfíncter anal interno; (4) relaxamento voluntário do esfíncter anal externo e (5) aumento da pressão intra abdominal, durante a manobra de valsalva, e uma quase retificação do reto com o canal anal, por uma adequada musculatura perineal (AMBROGINI JUNIOR; MISZPUTEN, 2002).

A interrupção desta sequência pode ser realizada de forma consciente e voluntária por meio do comando de não relaxamento do esfíncter anal externo, ocasionando o retorno da massa fecal do reto para o sigmóide. Qualquer disfunção que comprometa esta coordenação de movimentos pode ter como consequência a constipação (AMBROGINI JUNIOR; MISZPUTEN, 2002).

A constipação é uma desordem funcional do sistema gastrointestinal de elevada prevalência que afeta cerca de 27% da população em geral, acometendo principalmente mulheres (CHENG; BIAN; WU, 2009). Os sinais de constipação se caracterizam quando há menos de três movimentações intestinais por semana, menos de 35 g de fezes por dia, a quantidade de água nas fezes é menor que 70% e o tempo de trânsito gastrintestinal é superior a cinco dias (KLASCHIK; NAUCK; OSTGATHE, 2003). Há também uma diminuição da produção de mucina e diminuição da passagem de fluidos através do intestino (JEON; CHOI, 2010).

Esta disfunção tem um impacto substancial na morbidade e na qualidade de vida, que pode ser caracterizada por dor abdominal inexplicada, desconforto e gases associados com hábitos intestinais alterados (WINTOLA; SUNMONU; AFOLAYAN, 2010). Além disso, estudos têm demonstrado que a constipação é um dos fatores de risco para o câncer colo-retal (JEON; CHOI, 2010), podendo também contribuir para o desenvolvimento de outras doenças como hemorroidas e síndrome do intestino irritável (KULKARNI, 2001).

As causas da constipação são amplas, como por exemplo a utilização de alguns medicamentos, hábitos alimentares não saudáveis e estresse psicológico (KAKINO, et al., 2010). Estas podem ser resumidas em duas principais categorias, as causas somáticas e as funcionais. A constipação somática pode ser o resultado de doenças como a verticulite, tumores cancerígenos, processos inflamatórios na área anal, doenças neurológicas, doenças endócrinas, doenças retal-anal e alterações no metabolismo. Funcionalmente, a constipação pode ser devido a uma prolongada passagem no cólon, desordem na defecação, alimentação pobre em fibras e em líquidos, fatores situacionais como o estilo de vida e privação de exercícios (KLASCHIK; NAUCK; OSTGATHE, 2003).

O uso de certos medicamentos como antiácidos a base de alumínio, antibióticos, anticolinérgicos, alguns antihipertensivos, anticonvulsivantes, medicamentos anti-parkinsonianos, diuréticos, uso excessivo de laxantes, relaxantes musculares, neurolépticos, opióides e muitos outros também podem levar ao desenvolvimento da constipação (KLASCHIK; NAUCK; OSTGATHE, 2003).

As medidas iniciais na terapia da constipação crônica consistem em mudanças na dieta e no estilo de vida dos pacientes. A segunda escolha de tratamento é o uso de laxantes, estes, entretanto, não são considerados seguros para o uso prolongado (MEHMOOD et al., 2011). Os laxantes químicos são frequentemente utilizados tanto pela prescrição médica como pela automedicação (JEON; CHOI, 2010) e são caracterizados como substâncias que aceleram a defecação, tendo um impacto na transferência de água e eletrólitos na mucosa do intestino delgado e grosso (KLASCHIK; NAUCK; OSTGATHE, 2003).

As principais classes de laxantes baseado em seus mecanismos de ação estão discriminadas abaixo. Em seguida, o Quadro 1 resume estas principais classes e alguns de seus representantes (SIEGEL; Di PALMA, 2005):

- **Laxantes estimulantes:** exercem seus efeitos primários através da alteração do transporte de eletrólitos pela mucosa intestinal e estimulam a motilidade intestinal;
- **Laxantes formadores de volume:** absorvem água para o lúmen do cólon e aumentam a massa fecal, que estimula a motilidade e reduz o tempo de trânsito do cólon;
- **Laxantes osmóticos:** são preparações osmóticas mal/não absorvidas que levam a uma maior secreção de água no intestino para manter isotonicidade com o plasma;

- **Laxantes lubrificantes:** emulsificam a massa fecal, revestem o reto e fornecem lubrificação.

Laxantes	Exemplos
Laxantes de volume	- Fibras dietéticas, psyllium, poliacarbófilo, metilcelulose, carboximetilcelulose
Laxantes osmóticos	- Laxantes salinos: magnésio, sulfato de potássio, e sais de fosfato - Açúcares mal absorvidos: lactulose, sorbitol, manitol, lactose, supositórios de glicerina - Polietileno glicol (PEG): PEG 3350
Laxantes estimulantes	- Tensoativos: docusato, sais biliares - Derivados de difenilmetano: fenolftaleína, picossulfato de sódio - Ácido ricinoléico: óleo de rícino - Antraquinonas: presentes em plantas como senna, cáscara sagrada, aloe e ruibarbo
Laxantes lubrificantes	- Óleo mineral
Agentes neuromusculares	- Agonistas 5-HT ₄ : cisaprida, norcisapride, prucaloprida - Colchicina - Agente de prostaglandinas: misoprostol - Agentes colinérgicos: betanecol, neostigmina - Antagonistas de opiáceos: naloxona, naltrexona
Agentes de investigação	- Fator recombinante metionil neurotrófico derivado do cérebro humano (r-met Hu BDNF), neurotrofina-3

Quadro 1: Principais classes de laxantes e seus representantes. Fonte: SIEGEL; Di PALMA, 2005.

Apesar do amplo número de substâncias laxantes existentes no mercado farmacêutico e seu efeito benéfico nos mais variados tipos de constipação, o uso prolongado destas substâncias pode levar ao desenvolvimento de diversos efeitos

adversos e colaterais, os quais incluem reações alérgicas, depleção de eletrólitos, morte das células epiteliais do cólon, tumores colo-retal e fortes dores abdominais (SIEGEL; Di PALMA, 2005; KLASCHIK; NAUCK; OSTGATHE, 2003).

Desta forma, terapias que diminuam ou que não apresentem efeitos adversos e colaterais e que ainda tratem sintomas desagradáveis que acompanham a constipação como constante sensação de inchaço e dor abdominal combinada com flatulência, podem representar importantes alternativas terapêuticas para os distúrbios gastrointestinais, principalmente aqueles caracterizados por constipação e disfunções espasmódicas (HÜBNER; ALKEN, 2004).

Drogas antiespasmódicas ou espasmolíticas são usadas para aliviar ou prevenir espasmos do músculo liso através da redução da sua hipercontratibilidade. Estas drogas permitem que o músculo liso gastrintestinal retorne ao seu tônus próprio, reduzindo muito as dores e sintomas abdominais. O tratamento para desordens espasmódicas continua sendo desafiador, uma vez que opções terapêuticas permanecem limitadas devido, em parte, a falta de conhecimento da patofisiologia e significância destas desordens (FATEHI; FARIFTEH; FATEHI-HASSANABAD, 2004).

As principais terapias antiespasmódicas são constituídas por compostos antimuscarínicos e bloqueadores de canais para Ca^{2+} . O uso de drogas espasmolíticas pode estar associado com o aparecimento de efeitos colaterais indesejados como boca seca e retenção urinária por drogas antimuscarínicas, dor de cabeça, náusea, vômito e constipação por bloqueadores de Ca^{2+} (BORRELLI et al., 2009).

Em inúmeros estudos realizados anteriormente foi demonstrado que a atividade antiespasmódica induzida por diversos extratos de plantas medicinais foi usualmente mediada pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} ou pela abertura dos canais para K^+ , em que ambas as ações resultam em relaxamento do músculo liso intestinal (CÂMARA et al., 2003; MEHMOOD et al., 2010; LIS-BALCHIN; HART; LO, 2002; CHEN et al., 2009; VENTURA-MARTÍNEZ et al., 2011).

Estes canais iônicos são os componentes essenciais que controlam o fluxo de íons para dentro e para fora das células. Eles são incorporados na membrana plasmática e, em sua maioria, consistem em uma ou mais proteínas com um poro aquoso central, que se abre devido a uma mudança conformacional (NEHER; SAKMANN, 1992). O estímulo para a sua abertura é específico para cada canal

iônico e pode ser induzido pela tensão, por estímulos químicos ou mecânicos (BARRETT-JOLLEY et al., 2010).

Os canais para K^+ exercem importante função na musculatura lisa. Eles são proteínas integrais de membrana que participam de numerosas funções em células excitáveis e não excitáveis (KNAUS et al., 1994), além disso, os mesmos desempenham um papel fundamental em muitos eventos de sinalização celular, incluindo a regulação do tônus no músculo liso. Estes canais são classificados, de acordo com a nomenclatura da União Internacional de Farmacologia - subcomissão de canais para K^+ , em quatro subgrupos: canais sensíveis a voltagem (K_v), canais ativados por Ca^{2+} (K_{Ca}), canais de dois poros (K_{2P}) e canais retificadores de entrada (K_{ir}) (HADDY; VANHOUTTE; FELETOU, 2006).

Os íons K^+ desempenham um papel dominante no controle do potencial de repouso da maioria das células excitáveis. Agentes que bloqueiam canais para K^+ tendem a produzir despolarização da membrana (ROBERTSON; STEINBERG, 1990). Já agentes que promovem a abertura dos canais para K^+ levam ao aumento no efluxo deste cátion, causando repolarização ou hiperpolarização do potencial de membrana. Estes eventos culminam com o fechamento dos canais para Ca^{2+} , podendo levar ao relaxamento muscular (THORNELOE; NELSON, 2005).

O Ca^{2+} , por sua vez, é um segundo mensageiro que desempenha um importante papel em diversos processos biológicos, desde a expressão gênica, como também o transporte de proteínas, proliferação celular e a regulação do acoplamento excitação-contração muscular (CARAFOLI, 2002; MAKHLOUF, 1994). Nas células do músculo liso, o aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático é o primeiro estímulo para a contração, que é geralmente resultado da liberação dos estoques de Ca^{2+} intracelular e do influxo de Ca^{2+} extracelular. A principal via para a entrada de Ca^{2+} extracelular dentro das células do músculo liso intestinal é através dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (Ca_v) (HU et al., 2010).

Os Ca_v são classificados em três subfamílias distintas: canais Ca_v 1 ou tipo-L (Ca_v 1.1 – 1.4), que são sensíveis a di-hidropiridinas e ativados por alta voltagem; canais Ca_v 2 (2.1 – 2.3), que são insensíveis a di-hidropiridinas e ativados por alta voltagem e os canais Ca_v 3 (Ca_v 3.1 - 3.3), que são ativados por baixa voltagem. No íleo, os principais canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem presentes na membrana plasmática são os Ca_v tipo-L (TOMITA, 1981; CRIBBS, 2006).

O influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular não envolve apenas Ca_v , mas também canais para Ca^{2+} independentes de voltagem, como canais para Ca^{2+} operado por receptor (ROC) e canais para Ca^{2+} operado por estoque (SOC) (HISHINUMA; SHOJI, 2011). Além da participação dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana, a concentração livre de Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) é regulada por bombas, compartimentos e tampões intracelulares para se adequar à exigência contrátil das células musculares (RATZ et al., 2005).

O Ca^{2+} é o principal sinal responsável pela ativação de proteínas contráteis da musculatura lisa, no entanto, o Ca^{2+} não ativa diretamente proteínas motoras do músculo liso (RATZ et al., 2005). O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ leva a formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina o qual promove aumento da atividade da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), que por sua vez fosforila a cadeia leve de miosina (MLC), levando a contração muscular. O nível de fosforilação dependente de Ca^{2+} é determinado pela relação entre a atividade da MLCK e a atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), em que uma maior atividade da relação MLCK/MLCP resulta em contração (SUGURO et al., 2010).

Alguns mecanismos podem aumentar a contração independentemente do aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ por um fenômeno chamado de sensibilização ao Ca^{2+} . A principal via que leva a sensibilização ao Ca^{2+} ocorre através de Rho-cinase (ROK) e da proteína cinase C (PKC), as quais reduzem a atividade da MLCP, resultando em reforço da contração muscular (SUGURO et al., 2010).

No músculo liso intestinal, agonistas como a acetilcolina ativam receptores acoplados à proteína G facilitando a mobilização de Ca^{2+} intracelular e produzindo aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que pode atuar no desenvolvimento da contração ou no estabelecimento do tônus da musculatura lisa intestinal (SUGURO et al., 2010; HISHINUMA; SHOJI, 2011). Por outro lado, o sistema nervoso simpático exerce uma potente ação inibitória sobre a motilidade gastrointestinal, cujo efeito é principalmente decorrente da ativação de β -adrenoceptores presentes na parede intestinal (SHABALINA et al., 2002; ENDALE et al., 2010).

O β -adrenoceptor é um clássico GPCR (receptor acoplado a proteína G) que abrange sete regiões transmembranares, três alças extracelulares e três alças intracelulares, um domínio extracelular N-terminal e um intracelular C-terminal. A terceira alça intracelular é importante para a ligação do receptor às proteínas G_s (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005). Agonistas β -adrenérgicos não seletivos

medeiam o relaxamento em íleo de cobaia através da ativação dos subtipos β_1 , β_2 e β_3 adrenoreceptores, havendo entretanto uma maior expressão do subtipo β_3 -adrenoceptor (ROBERTS et al., 1999; MANARA; CROCI; LANDI, 2009). Sua ativação promove relaxamento por vias de sinalização cujos mecanismos podem ser dependentes e independentes de AMPc (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005).

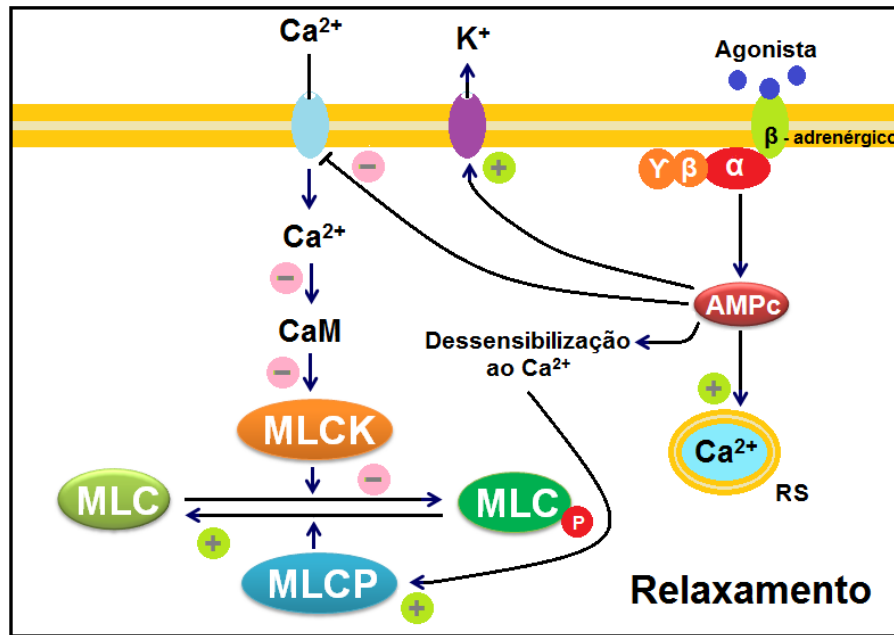


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de ação dos β -adrenoreceptores. Fonte: Adaptado de PUETZ, LUBOMIROV; PFITZER, 2009.

O mecanismo mediado pelo aumento de AMPc é considerado a chave para elucidar o efeito relaxante induzido pelo β -adrenoceptor. No músculo liso intestinal, o aumento intracelular deste nucleotídeo cíclico promove a ativação da proteína cinase A (PKA), que fosforila diversos alvos intracelulares, resultando em ativação de canais para K^+ e inativação dos Ca_v presentes na membrana plasmática, os quais levam a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$, culminando em relaxamento muscular (Figura 1) (TANAKA; HORINOUCI; KOIKE, 2005). O mecanismo relaxante independente de AMPc na musculatura lisa do trato gastrointestinal é substancial no efeito mediado pelo β_3 -adrenoceptor, o qual pode envolver a participação de subtipos específicos de canais para K^+ , entretanto seu mecanismo ainda é desconhecido e deve ser melhor caracterizado (HORINOUCI; TANAKA; KOIKE, 2003).

Diante de todo o exposto, ficou clara a importância do estudo de substâncias que possam atuar em canais e receptores presentes no sistema digestório para o tratamento de distúrbios funcionais como a constipação e alterações espasmódicas. Neste contexto, os produtos de origem natural e os medicamentos fitoterápicos vêm adquirindo grande importância, sendo evidenciada pelo aumento de pesquisas na área, na qual estes produtos apresentam atividade benéfica no trato gastrointestinal e pelo grande potencial terapêutico a ser explorado destas terapias tradicionais.

Desta forma, este estudo foi desenvolvido com o intuito de realizar ensaios farmacológicos pré-clínicos para demonstrar a eficácia de um determinado produto fitoterápico produzido para combater cólicas intestinais e constipação, visto que ainda não há conhecimento sobre o seu mecanismo de ação ou comprovação científica de sua eficácia, assim, os ensaios farmacológicos pré-clínicos realizados neste trabalho são de extrema importância para elucidar tais parâmetros, os quais podem contribuir para o registro desta preparação junto às autoridades competentes no Brasil e para a implantação de mais um fitoterápico genuinamente brasileiro no mercado de medicamentos.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a atividade laxante e espasmolítica de um determinado Produto Fitoterápico e o mecanismo envolvido na atividade espasmolítica.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a ação do Produto Fitoterápico na motilidade intestinal de camundongos machos constipados e não constipados;
- Caracterizar o efeito do Produto Fitoterápico sobre a eliminação de fezes em ratos constipados e não constipados;
- Investigar a atividade espasmolítica do Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia;
- Avaliar a participação dos canais para K^+ e para Ca^{2+} nos efeitos induzidos pelo referido Produto;

Material

3 MATERIAL

3.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*), camundongos *Swiss* machos (*Mus musculus*) e cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, todos provenientes do Biotério “Prof. George Thomas” da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Os animais foram mantidos em iguais condições de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), ao ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e à ração balanceada (ração do tipo “pellets”, Purina[®]), conforme recomendações internacionais (WOLFENSOHN; LLOYD, 2003). Todos os protocolos experimentais, bem como a eutanásia dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFPB, certidão número 0406/11 (Anexo A).

3.2 Drogas Utilizadas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: o Produto Fitoterápico em estudo, cloridrato de carbamilcolina (carbacol, Merck), diidrocloridrato de histamina (Sigma-Aldrich), S(-)-Bay K 8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster) (Sigma-Aldrich), cloridrato de loperamida (Janssen-Cilag), etanol absoluto (Dinâmica), cloreto de tetraetilamônio (TEA) (Sigma-Aldrich), cloreto de céσιο (Sigma-Aldrich), cloreto de propranolol (Galena), HCl (Nuclear). Todas estas substâncias eram mantidas sob refrigeração ($- 20^\circ\text{C}$) em um *freezer*, até o momento de sua utilização.

A solução estoque de S(-)-Bay K 8644 foi preparado em etanol absoluto e diluído em água destilada, até obter a concentração desejada. As demais drogas foram dissolvidas em água destilada.

3.3 Preparação das soluções do Produto Fitoterápico

Neste estudo, foram realizados testes farmacológicos pré-clínicos para a comprovação científica da eficácia e do mecanismo de ação referentes a um determinado Produto Fitoterápico, os quais possam contribuir para o registro deste produto junto às autoridades competentes no Brasil. Dessa forma, como este produto ainda não possui registro junto a ANVISA, optou-se por não revelar seu nome comercial e os de seus constituintes.

O Produto Fitoterápico em estudo é produzido sob a forma de pó, o qual foi adicionado a solução salina, para os procedimentos experimentais *in vivo* e para os protocolos experimentais *in vitro*, este produto foi adicionado a solução de Krebs modificado para íleo. Todas as soluções utilizadas do Produto Fitoterápico foram preparadas antes de cada experimento, de forma a serem obtidas as concentrações desejadas para cada protocolo experimental.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram fabricadas em novembro de 2010, com data de validade prevista para novembro de 2012 e provenientes de um mesmo lote.

3.4 Soluções Fisiológicas

Para a preparação das soluções fisiológicas necessárias aos experimentos, foram utilizados os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl) (MERCK), cloreto de potássio (KCl) (MERCK), cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (MERCK), sulfato de magnésio anidro (MgSO_4) (MERCK), fosfato monossódico 1-hidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (MERCK), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (MERCK) e bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (VETEC).

Em todas as soluções fisiológicas, antes da realização dos procedimentos experimentais, o pH era ajustado para o valor de 7,4. Todas as soluções eram preparadas extemporaneamente antes de cada protocolo experimental. As tabelas a seguir demonstram as composições de todas as soluções nutritivas utilizadas:

Tabela 1: Composição da solução de Krebs modificado para íleo.

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

Fonte: SUN; BENISHIN, 1994.

Nas soluções de Krebs com concentrações de KCl de 20, 40 e 60 mM, houve a substituição equimolar do Na⁺ pelo K⁺, para o ajuste isosmótico das soluções (DELAEY et al., 2007; CHOKRI et al., 2010), conforme tabelas abaixo:

Tabela 2: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 20 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	101,7
KCl	20
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25
Glicose	11

Tabela 3: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 40 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	81,7
KCl	40
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25
Glicose	11

Tabela 4: Composição da solução despolarizante de Krebs modificado com KCl a 60 mM.

Substância	Concentração (mM)
NaCl	61,7
KCl	60
MgSO ₄	1,3
NaH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
NaHCO ₃	25
Glicose	11

Métodos

4 MÉTODOS

Foram utilizados dois tipos de abordagens experimentais, uma com protocolos experimentais *in vivo*, em que foram utilizados ratos e camundongos; e uma abordagem experimental *in vitro*, em que se utilizou o íleo isolado de cobaia.

4.1 Estudos *in vivo*

4.1.1 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal de camundongos machos

Para avaliação do efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando cerca de 30 ± 5 g. Durante o desenvolvimento deste protocolo, os animais foram pesados e tratados individualmente por via intragástrica (i.g., gavagem) com o auxílio de uma sonda rígida, quando necessário.

Os animais foram divididos em grupos experimentais, com cerca de 6 animais em cada grupo, de acordo com o método descrito por Stickney e Northup (1959) com modificações. Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados três grupos amostrais, o grupo 1 corresponde aos animais que receberam solução de cloreto de sódio 0,9 % (salina), sendo considerado o controle, o grupo 2 recebeu o Produto Fitoterápico na dose de 100 mg/kg e o grupo 3 recebeu o Produto Fitoterápico na dose de 200 mg/kg. Em cada grupo de animais foi padronizado a administração por via intragástrica de 10 mL/kg das respectivas soluções.

Após 30 minutos da administração do produto em estudo ou da solução salina (controle), os animais receberam por via intragástrica uma suspensão de carvão ativado a 10% (10 mL/kg) e 30 minutos após a administração deste marcador, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta e o intestino delgado foi rapidamente removido, evitando esticá-lo. A medida do trânsito intestinal foi avaliada comparando a distância no intestino

delgado percorrida pelo marcador, desde o esfíncter piloro, com o comprimento total do intestino, medido desde o esfíncter piloro até a junção íleo-fecal.

4.1.2 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal de camundongos machos constipados por loperamida

A indução da constipação em camundongos foi realizada através da administração intragástrica de loperamida na dose de 3 mg/kg/dia do peso corporal, em solução salina (10 mL/kg), durante três dias, baseado em Bustos e colaboradores (1991), com modificações. A diminuição do trânsito intestinal nos animais tratados com loperamida em relação ao grupo que recebeu solução salina indicou a indução da constipação naqueles animais.

Para avaliar o efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal de camundongos constipados, foram utilizados quatro grupos experimentais. O grupo 1 (controle) recebeu solução salina por três dias, enquanto que os grupos 2, 3 e 4 receberam loperamida na dose de 3 mg/kg/dia (três dias). Após o tratamento com o agonista opióide ou com solução salina, o grupo 1 (grupo controle) e o grupo 2 (loperamida 3 mg/kg) receberam solução salina, enquanto que o grupo 3 recebeu o Produto Fitoterápico na dose de 100 mg/kg e o grupo 4 recebeu o Produto Fitoterápico na dose de 200 mg/kg. É válido salientar que no terceiro dia de tratamento, loperamida ou salina foi administrada 30 minutos antes da administração do Produto Fitoterápico ou da solução salina, e em seguida o experimento foi realizado conforme descrito no item anterior (4.1.1).

4.1.3 Avaliação da influência do Produto Fitoterápico na determinação da eliminação de fezes por 24h em ratos

Para avaliação do efeito do Produto Fitoterápico na eliminação de fezes em ratos no período de 24 horas, foram utilizados 6 ratos albinos *Wistar* para cada grupo experimental, pesando entre 250–300 g. Foram utilizados três grupos

amostrais, o primeiro corresponde aos animais que receberam apenas solução salina, sendo considerado o grupo controle, o segundo e o terceiro grupo receberam o Produto Fitoterápico na dose de 100 e de 200 mg/kg, respectivamente. O método utilizado neste teste foi descrito por Awouters e colaboradores (1975), com modificações.

Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas, as quais permitiram medidas do consumo de água, da ração e da quantidade de fezes eliminadas (Figura 2). Após um período de aclimatização às condições experimentais, os animais foram pesados individualmente e receberam por via intragástrica às 9:00 horas, com o auxílio de uma sonda rígida, a solução salina e as soluções do Produto Fitoterápico de 100 mg/kg ou 200 mg/kg, respeitando o volume de administração de 10 mL/kg.



Figura 2: Figura representativa das gaiolas metabólicas utilizadas nos experimentos. Fonte: insightltda.com.br

Inicialmente, os animais foram inspecionados (por um mesmo observador) durante as duas primeiras horas após a supracitada administração e a seguir, passaram a ser observados a cada hora até que se completassem 8 horas desde o início do experimento. Durante este período, foi verificado nas gaiolas individuais se houve a formação de pelotas fecais sem forma contendo água e a ocorrência de

alteração de parâmetros comportamentais como manifestação de sonolência, excitação e sinais de dor e/ou cólicas, utilizando para este fim a triagem farmacológica comportamental descrita por Almeida et al. (1999) e Almeida e Oliveira (2006) (Anexo B), que é uma metodologia preliminar para avaliar o possível efeito de uma droga no SNC.

Após 24 horas do tratamento dos animais, cada um deles foi avaliado individualmente, tendo sido mensurados o peso corporal, quantidade de fezes eliminadas e a quantidade de água e ração consumidos.

4.1.4 Avaliação da influência do Produto Fitoterápico na determinação da eliminação de fezes em 24h de ratos constipados por loperamida

Com o intuito de avaliar a ação laxante do Produto Fitoterápico em ratos constipados, inicialmente foi administrado (por via intragástrica) loperamida em solução de cloreto de sódio 0,9% (10 mL/kg) na dose de 3 mg/kg/dia do peso corporal por três dias, para indução da constipação nestes animais, de acordo com Bustos e colaboradores (1991). A diminuição da quantidade de fezes eliminadas indicou a constipação nos animais tratados com loperamida, quando comparados ao grupo de animais que recebeu apenas a solução salina.

Para a realização do protocolo experimental da eliminação de fezes por ratos em 24h, utilizando o modelo de constipação induzido por loperamida, foram utilizados quatro grupos experimentais. O grupo 1 (controle) recebeu solução salina por três dias, enquanto que os grupos 2, 3 e 4 receberam loperamida na dose de 3mg/kg/dia. Após o tratamento com loperamida ou salina e indicação da constipação nos grupos tratados com loperamida, o grupo 1 e o grupo 2 (loperamida 3 mg/kg) receberam solução salina, enquanto que o grupo 3 e 4 receberam o Produto Fitoterápico nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. A seguir, foi realizado o protocolo experimental para medida da eliminação de fezes em 24 horas, conforme descrito no item anterior (4.1.3).

4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Ensaio farmacológico utilizando íleo isolado de cobaia

Foram utilizados cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 400 - 500g. Os cobaias foram mantidos em jejum por um período de 18h, tendo livre acesso a água. Após o jejum, os animais foram eutanasiados e através de uma incisão do abdômen tiveram o segmento de íleo com cerca de 13 cm de comprimento retirado e posto imediatamente em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado para íleo e aerado com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % CO₂).

Em seguida, o íleo foi dissecado e seccionado em fragmentos de 2 a 3 cm de comprimento, os quais foram colocados em cubas de 20 mL para órgão isolado, contendo solução de Krebs modificado (Tabela 1) com pH 7,4; sendo constantemente aerada com mistura carbogênica (95 % O₂ e 5 % CO₂) e mantidos a 37°C. Nas cubas, os fragmentos de íleo foram suspensos por linhas de algodão, a qual foi fixada a um transdutor de força (FORT 10, WPI, Sarasota, EUA) acoplado a um sistema de aquisição (Miobath-4, WPI, Sarasota, EUA) para obtenção do registro das tensões isométricas (Figura 3). Os segmentos de íleo foram submetidos a uma tensão de 1 g por um período de estabilização de trinta minutos (PESSOA et al., 2007), na qual a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos com o intuito de prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970) e a linha de base foi ajustada quando necessário.

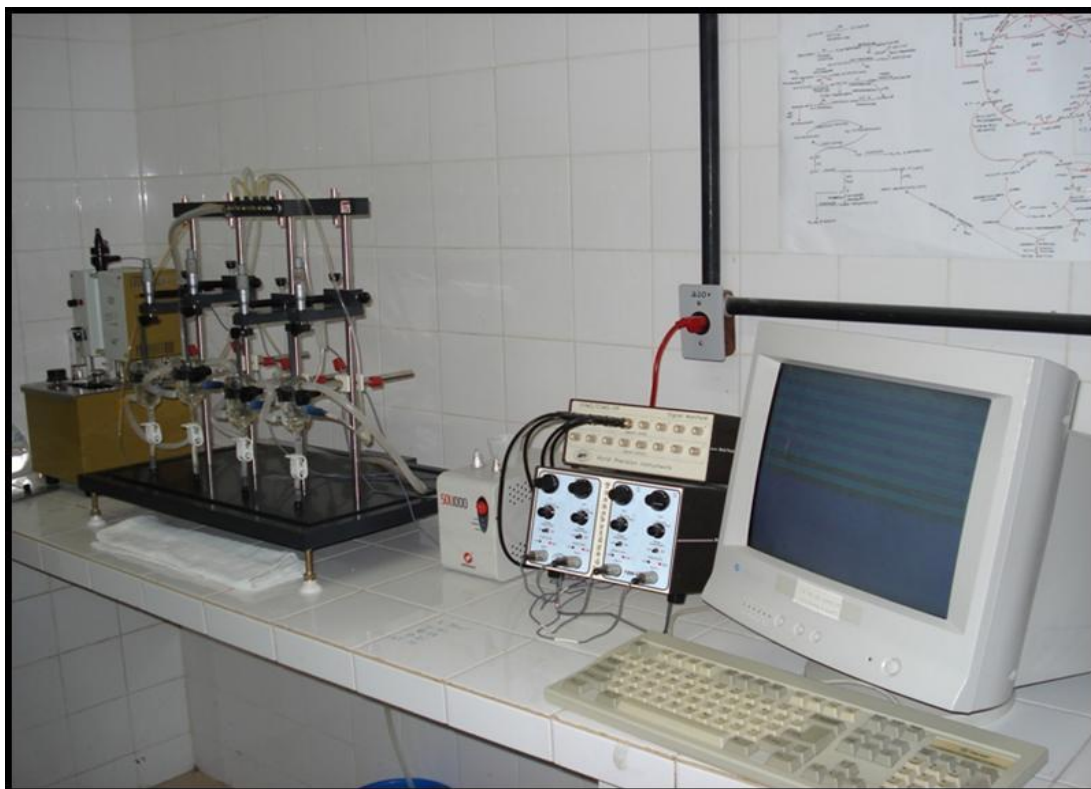


Figura 3: Aparato utilizado para os experimentos com íleo isolado de cobaia

4.2.2 Protocolo experimental utilizando íleo isolado de cobaia

4.2.2.1 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico sobre contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia

Preparações de íleo isolado de cobaia apresentam contrações espontâneas quando são montados em banho para tecidos isolados e submetidos a 1 grama de tensão (FATEHI; FARIFTEH; FATEHI-HASSANABAD, 2004), desse modo, as preparações de íleo foram montadas como descrito no item 4.2.1 e após o período de estabilização e comprovação da viabilidade do tecido, por meio de uma contração induzida por KCl 40 mM (Tabela 3), os tecidos foram lavados e estabilizados sob uma tensão de 1 grama e, a seguir, foram adicionados às preparações concentrações crescentes e cumulativas do Produto Fitoterápico (0,01-1000 µg/mL)

com o intuito de avaliar seu efeito sobre as contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia (Figura 4).

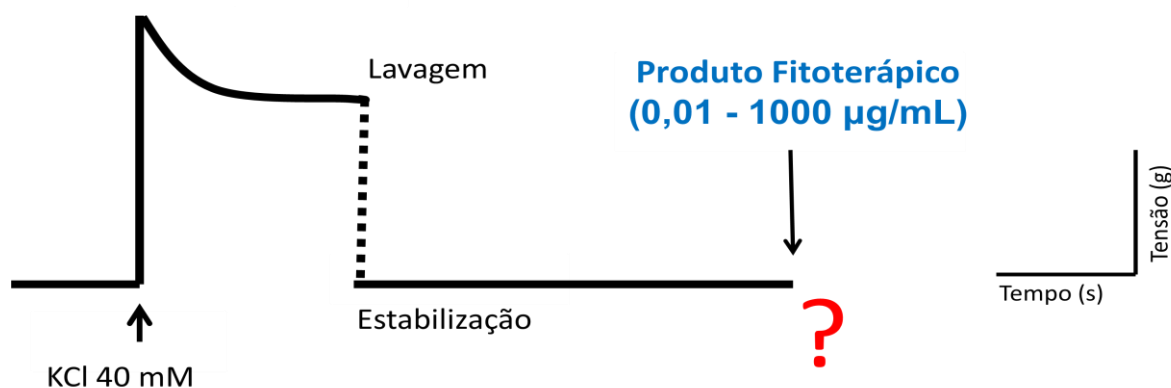


Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito do Produto Fitoterápico (0,01 µg/mL - 1000 µg/mL) sobre as contrações espontâneas em preparações de íleo isolado de cobaia.

4.2.2.2 Avaliação do efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, histamina ou KCl 40 mM em íleo isolado de cobaia

Após o período de estabilização de trinta minutos, foram induzidas duas contrações sub-máximas de magnitudes similares nas preparações de íleo isolado de cobaia, por meio do uso de agentes contracturantes, como a solução despolarizante de 40 mM de KCl (Tabela 3), carbacol (1µM) ou histamina (1µM), em preparações diferentes. No componente tônico da segunda contração foi adicionado concentrações do Produto Fitoterápico (1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 100 µg/mL, 300 µg/mL, 1000 µg/mL) à preparação de forma crescente e cumulativa para construção da curva dose-resposta (Figura 5). Após esse tratamento, a preparação foi lavada com solução nutritiva e uma nova contração com os agentes contracturantes foi induzida para se verificar a funcionalidade do tecido após o tratamento com o Produto Fitoterápico.

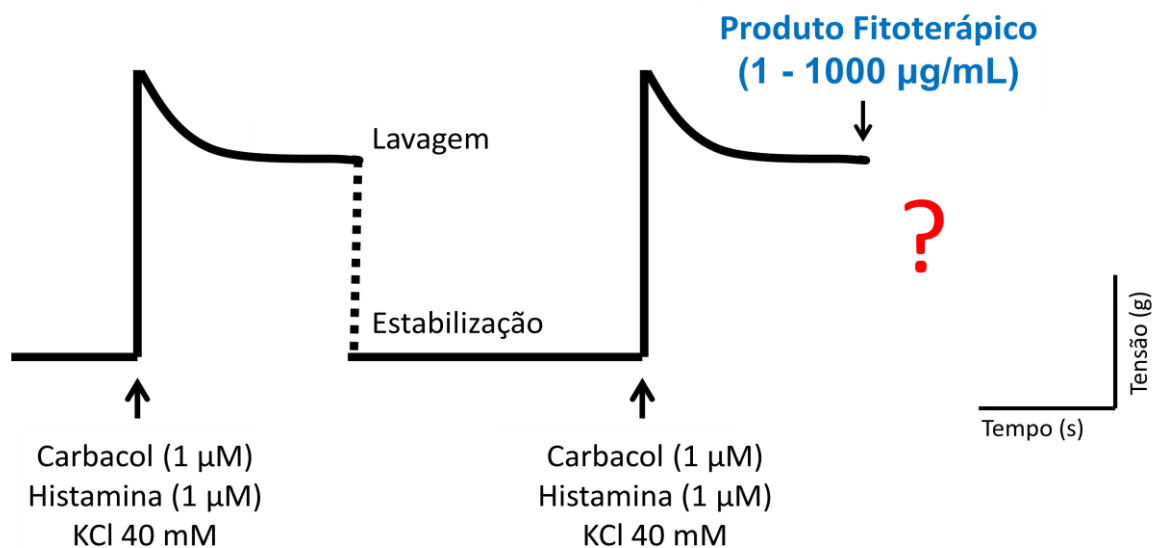


Figura 5: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da atividade espasmolítica do Produto Fitoterápico (1µg/mL - 1000 µg/mL) frente a vários agentes contracturantes, em preparações de íleo isolado de cobaia.

A porcentagem de relaxamento induzido pelo Produto Fitoterápico foi calculada pela comparação antes e após a sua adição, em que o tônus induzido pelos agentes contracturantes correspondem a 0 % de relaxamento e a tensão basal corresponde a 100 % do referido efeito. Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foram analisados os valores de CE_{50} e $E_{máx}$ (Efeito Máximo) das curvas individuais (descrito no tópico “análise estatística”).

Como foi demonstrado que a preparação em estudo promove efeito relaxante em preparações de íleo isolado de cobaia, passou-se a investigar o provável mecanismo de ação envolvido em seu efeito.

4.2.2.3 Influência de diferentes concentrações extracelulares de K^+ na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia

Para avaliar a resposta relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em outra solução despolarizante contendo diferente concentração extracelular de K^+ , além da solução de KCl 40 mM, descrita acima (CERON et al., 2001; CIMANGA et

al., 2010), foi verificada a integralidade do tecido, seguido por lavagem e nova estabilização (descritos no item 4.2.1), a seguir as preparações de íleo isolado de cobaia foram submetidas a uma contração com solução despolarizante de KCl 60 mM (Tabela 4). Após estabilização do componente tônico foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do Produto Fitoterápico e uma nova curva concentração-resposta foi obtida (Figura 6). As tensões desenvolvidas pelo KCl 60 mM e pelo estado de repouso correspondem a 0 % e 100 % de relaxamento, respectivamente. Os valores de E_{max} e CE_{50} foram calculados conforme citados anteriormente.

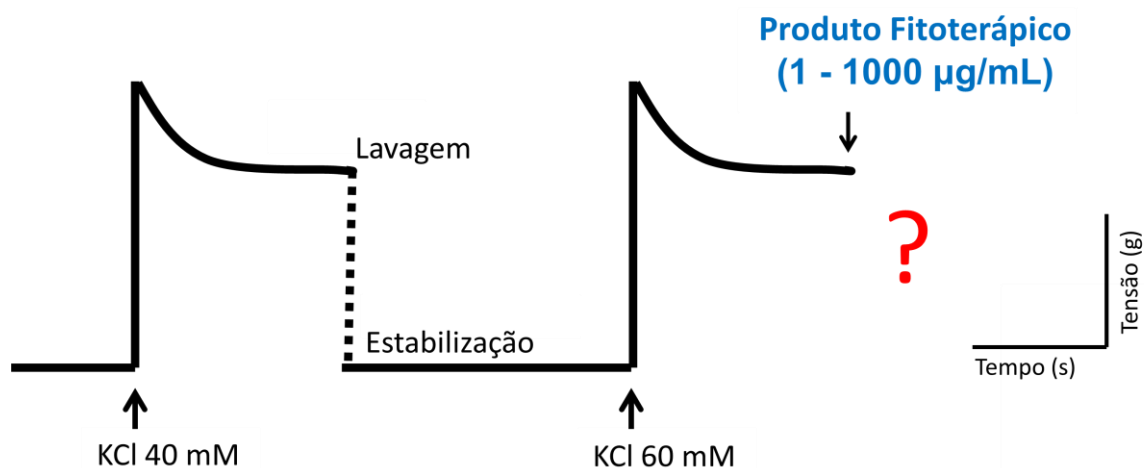


Figura 6: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia frente a solução despolarizante de KCl 60 mM.

4.2.2.4 Influência de bloqueadores dos canais para K^+ na resposta induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de avaliar a participação dos canais para K^+ no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico, preparações de íleo isolado de cobaia foram montadas como descrito anteriormente (item 4.2.1) e no período de estabilização, após a verificação da integralidade do tecido, os órgãos isolados em estudo foram

incubados por 20 minutos com bloqueadores não específicos dos canais para K^+ , TEA (5 mM) e CsCl (5 mM) (LATORRE et al., 1989), em preparações diferentes. Em seguida, no componente tônico da contração induzida por 1 μ M de carbacol foi adicionado o Produto Fitoterápico de forma crescente e cumulativa (Figura 7). A participação dos canais para K^+ no efeito induzido por esta preparação foi avaliada comparando os valores de CE_{50} e E_{max} na presença ou na ausência dos supracitados bloqueadores.

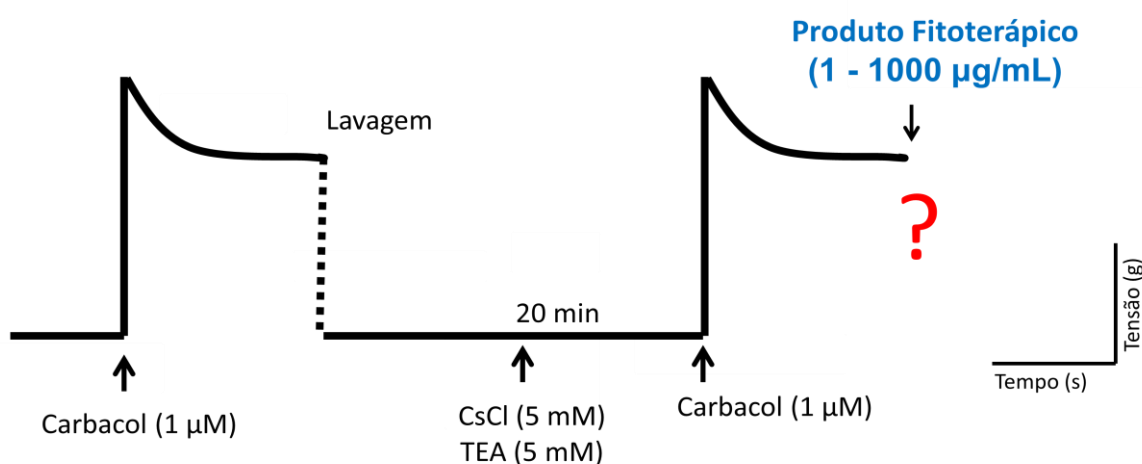


Figura 7: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da participação dos canais para K^+ no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia.

4.2.2.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)- Bay K 8644 em íleo isolado de cobaia

Para avaliar se o Produto Fitoterápico estaria promovendo ação sobre o influxo de cálcio através dos canais para cálcio do tipo-L em íleo isolado de cobaia, foi utilizado o S(-)- Bay K 8644, um ativador dos canais para Ca^{2+} sensíveis a diidropiridinas (FERRANTE et al., 1989; ADACHI-AKAHANES et al., 1999), cujo efeito é potencializado em preparações contendo 8 a 20 mM de KCl (SCHRAMM et al., 1983; ZHENG; RAMPE; TRIGGLE, 1991). Desse modo, o íleo isolado de cobaia

foi montado como descrito anteriormente (item 4.2.1) e passado o período de estabilização, as preparações de íleo foram incubadas em meio parcialmente despolarizante de KCl 20 mM (Tabela 2) durante o período de 20 minutos e logo a seguir foi adicionado o S(-)-Bay K 8644 (300 nM) para a indução da contração. Após a estabilização da fase tônica, concentrações do Produto Fitoterápico (1 µg/mL - 1000 µg/mL) foram adicionadas de forma crescente e cumulativa (Figura 8) e a sua resposta foi avaliada mediante CE_{50} e E_{max} obtidos.

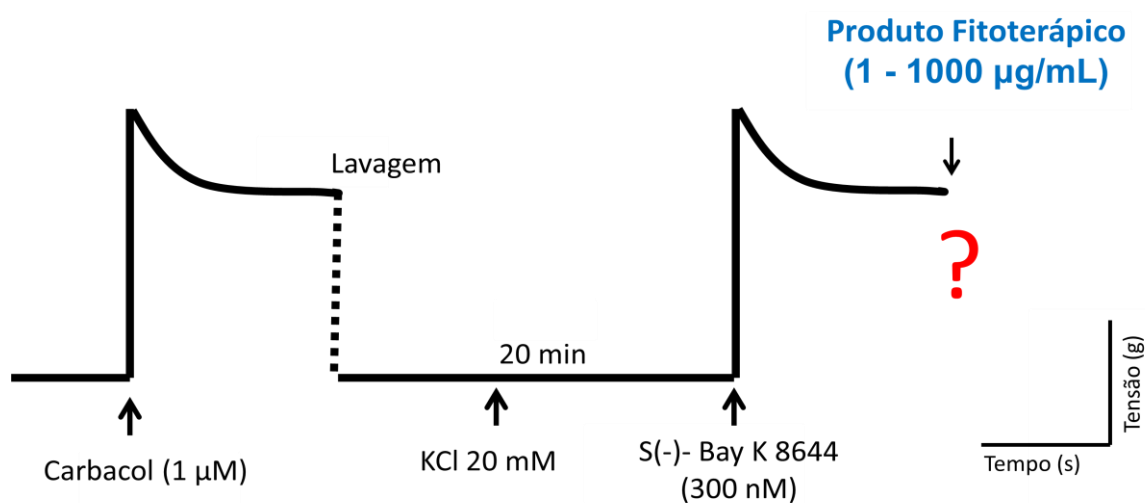


Figura 8: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação do efeito relaxante do Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644 (300 nM) em meio parcialmente despolarizante de KCl 20 mM.

4.2.2.6 Influência dos receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de investigar a participação dos receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia, as preparações deste órgão foram montadas conforme descrito no item 4.2.1 e após o período de estabilização e comprovada a integralidade do tecido, os fragmentos de íleo foram incubados por 20 minutos com propranolol (1 µM), um antagonista não

seletivo dos receptores β -adrenérgicos (NASERI; MOGHADDAM; BAHADORAM, 2007) e em seguida uma nova contração foi induzida por carbacol (1 μ M), onde no seu componente tônico foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do Produto Fitoterápico (1 – 1000 μ g/mL) (Figura 9). A influência do propranolol no efeito relaxante induzido por esta preparação foi avaliada por meio da comparação entre a CE_{50} e E_{max} obtidos na presença e na ausência deste bloqueador.

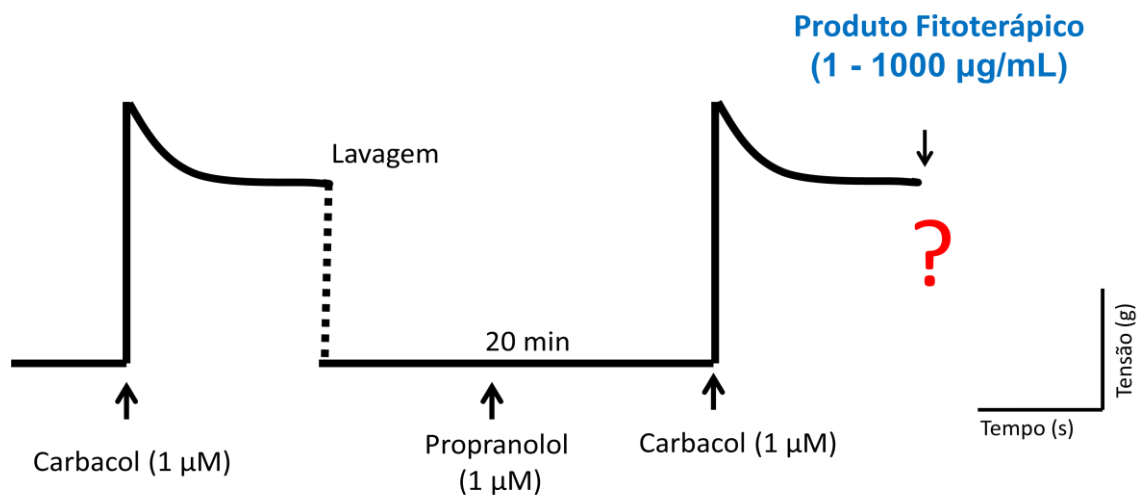


Figura 9: Representação esquemática do protocolo experimental para avaliação da influência dos receptores β -adrenérgicos no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em preparações de íleo isolado de cobaia, pré-contraídos com carbacol (1 μ M).

4.3 Análise estatística

Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m). As curvas concentração resposta foram ajustadas de acordo com a equação logística de quatro parâmetros ou equação de Hill descrita abaixo:

$$Y = Y_{\text{mínimo}} + \frac{Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}}}{1 + (10^{\log CE_{50}} / 10^X)^s}$$

Onde: Y é a variável dependente, que corresponde a percentagem (%) de relaxamento, $Y_{\text{mínimo}}$ é o valor de % de relaxamento mínimo, $Y_{\text{máximo}}$ é o valor de % de relaxamento máximo, $\log CE_{50}$ é o logaritmo da concentração de uma substância que induz 50 % do efeito máximo, X é a variável independente, correspondente a concentração do Produto Fitoterápico e s corresponde a inclinação de Hill.

Os valores de CE_{50} e E_{max} (resposta máximo induzida pelo Produto Fitoterápico) foram obtidos a partir das curvas concentração-resposta. Os valores de CE_{50} estão expressos como média (95 % de intervalo de confiança). Para a análise estatística foram utilizados os testes t de Student e análise de variância “oneway” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni, quando apropriado. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o $p < 0,05$.

Para estudar o efeito espasmolítico induzido por este produto, foram analisados dois parâmetros farmacológicos: a CE_{50} , para medida de potência farmacológica e o E_{max} para medida da potência farmacológica. Todos os dados foram analisados através do programa estatístico Graph PadPrism 5.0.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vivo*

5.1.1 Efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal em camundongos machos

Como observado na Figura 10, a administração intragástrica do Produto Fitoterápico aumentou significativamente a distância percorrida pelo marcador (carvão ativado) no intestino delgado de camundongos machos saudáveis, tanto na dose de 100 mg/kg ($161,66 \pm 14,86$ %; $n = 6$, $p < 0,05$) como na dose de 200 mg/kg ($151,04 \pm 17,17$ %, $n = 6$, $p < 0,05$) quando comparados aos valores do grupo controle ($100,00 \pm 10,49$ %; $n = 6$). Entretanto, não foi evidenciada diferença significativa entre as doses utilizadas.

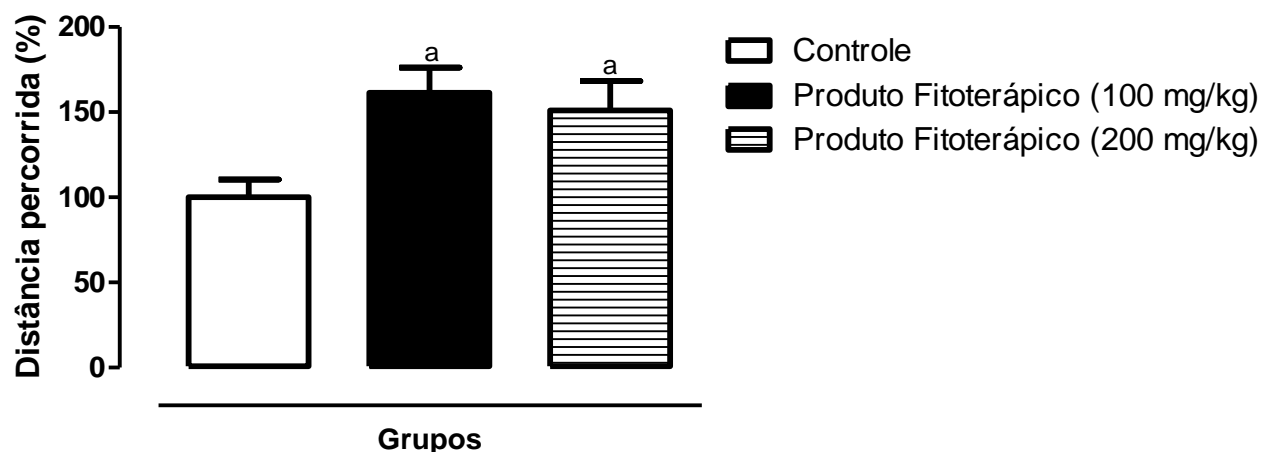


Figura 10: Efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal de camundongos machos. Barras representativas da distância percorrida do intestino delgado pelo carvão ativado em camundongos machos, normalizadas pelo controle (em porcentagem), após tratamento por via intragástrica com solução salina (Controle), com o Produto Fitoterápico 100 ou 200 mg/kg. Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos, análise de variância “oneway” (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni; ^a $p < 0,05$ vs Controle.

5.1.2 Efeito do Produto Fitoterápico no trânsito intestinal em camundongos machos constipados por loperamida

O tratamento com loperamida (3 mg/kg/dia) durante três dias promoveu uma diminuição da distância percorrida pelo carvão ativado no intestino delgado de camundongos machos de modo significativo (loperamida 3 mg/kg; $66,25 \pm 7,49$ %; $n = 8$, $p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (100 \pm 5,16 %; $n = 8$), o qual recebeu apenas solução salina. Interessantemente, o tratamento com o Produto Fitoterápico, tanto na dose de 100 mg/kg ($98,42 \pm 6,33$ %, $n = 7$, $p < 0,05$) como na dose de 200 mg/kg ($99,32 \pm 8,47$ %; $n = 7$, $p < 0,05$) reverteu de forma significativa o efeito inibitório induzido pelo tratamento com loperamida. Todavia, não houve diferença estatística entre o efeito induzido pelas duas doses utilizadas do Produto Fitoterápico entre si, como também entre as mesmas e o grupo controle que não recebeu o tratamento com loperamida (Figura 11).

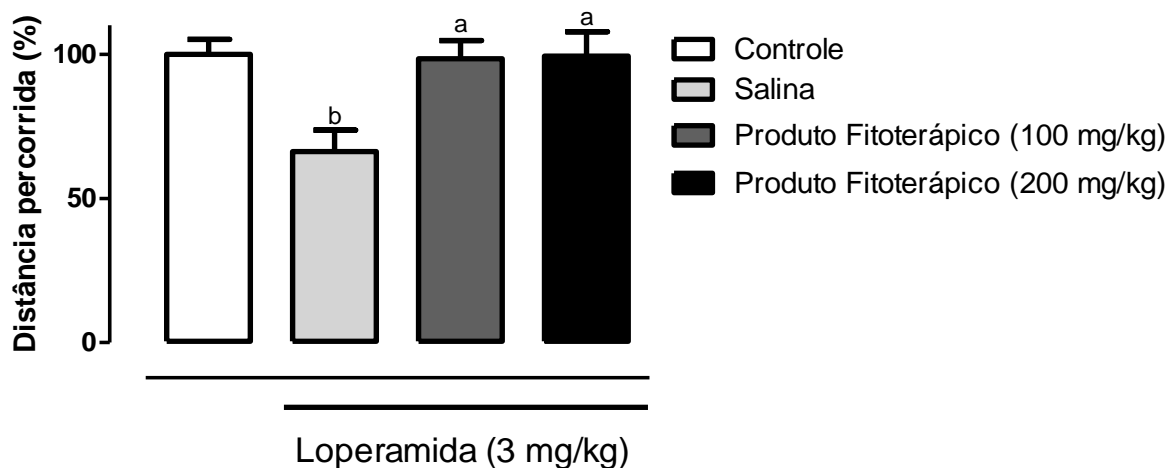


Figura 11: Produto Fitoterápico reverte o efeito inibitório induzido por loperamida sobre o trânsito intestinal de camundongos machos. Barras representativas da distância percorrida do intestinal delgado pelo carvão ativado em camundongos machos, normalizadas pelo grupo Controle (tratado apenas com solução salina, $n = 8$), após tratamento por via intragástrica com loperamida (3 mg/kg) + salina ($n = 8$), com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (100 mg/kg, $n = 7$) ou com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (200 mg/kg, $n = 7$). Os dados estão expressos como média \pm e.p.m., análise de variância “oneway” (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni; ^a $p < 0,05$ vs Loperamida (3 mg/kg), ^b $p < 0,05$ vs Controle.

5.1.3 Efeito do Produto Fitoterápico sobre a eliminação de fezes por 24h em ratos saudáveis

Ao observar a Tabela 5, percebe-se que não houve alteração significativa nos parâmetros analisados (variação de peso, ingestão de água, ingestão de ração e eliminação de fezes) referente aos animais não constipados tratados com o Produto Fitoterápico nas doses de 100 e 200 mg/kg quando comparados aos mesmos parâmetros observados nos animais que receberam apenas a solução salina, grupo controle. Além disso, não foram observados no decorrer dos experimentos sinais como: manifestação de sonolência, excitação ou alteração do estado de alerta, desidratação e sinais de dor e/ou cólicas, como também a presença de fezes líquidas ou diarreia.

Tabela 5: Efeito da administração do Produto Fitoterápico em diversos parâmetros avaliados durante 24 horas em ratos. Variáveis obtidas de animais tratados com solução salina (Controle), Produto Fitoterápico 100 mg/kg ou 200 mg/kg por via intragástrica durante o período de 24 horas.

Grupos	Variação do peso (g)	Ingesta de água (mL)	Ingesta de ração (g)	Eliminação de fezes (g)
Controle	0,97 ± 0,01	16,42 ± 3,23	10,18 ± 6,68	3,00 ± 1,47
Produto Fitoterápico (100 mg/kg)	0,98 ± 0,02	17,50 ± 5,90	16,32 ± 8,43	3,80 ± 1,79
Produto Fitoterápico (200 mg/kg)	0,95 ± 0,01	12,17 ± 3,38	15,78 ± 8,98	4,48 ± 2,71

São apresentados valores médios ± e.p.m. de 6 experimentos para cada grupo amostral. Foi utilizado análise de variância “oneway” (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Valor = ns.

5.1.4 Efeito do tratamento com loperamida sobre a eliminação das fezes de ratos em 24 horas

De acordo com a Figura 12, o tratamento com loperamida (3 mg/kg/dia) por via intragástrica durante três dias, diminuiu significativamente a quantidade de fezes eliminadas em ratos ($4,00 \pm 1,03$ g; $n = 18$, $p < 0,05$) durante 24 horas quando comparadas aos animais que receberam apenas a solução salina (grupo controle; $7,96 \pm 1,10$ g; $n = 6$), demonstrando assim que foi induzida a constipação nestes animais.

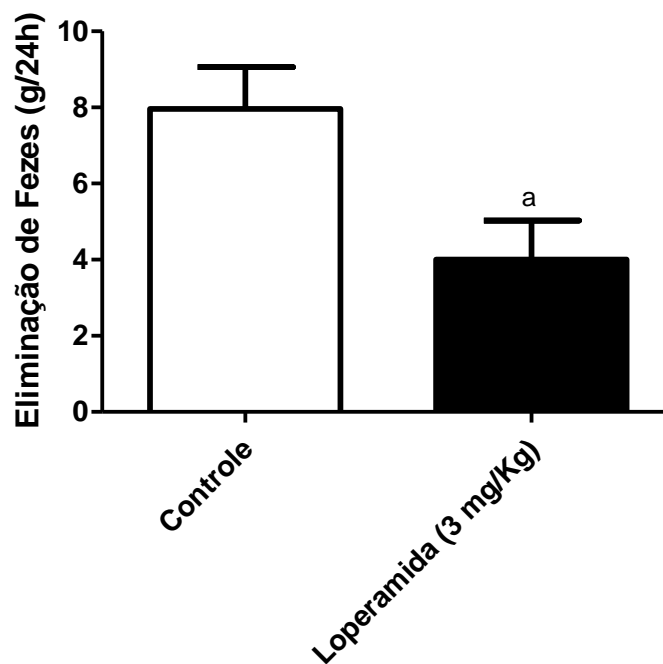


Figura 12: Indução da constipação em ratos pelo tratamento com loperamida. Barras representam a massa de fezes eliminada por ratos após tratamento com salina (Controle, $n = 6$) ou loperamida (3 mg/kg/dia, 3 dias, $n = 18$). São apresentados valores médios \pm e.p.m., foi utilizado o teste *t* de Student. ^a $p < 0,05$ vs Controle.

5.1.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre a eliminação de fezes em 24h por ratos constipados

Nos animais tratados com loperamida, o tratamento com o Produto Fitoterápico não promoveu alteração significativa nos parâmetros avaliados (variação de peso, ingesta de água e de ração). Entretanto, é importante ressaltar que a preparação em estudo reverteu a constipação induzida pela loperamida ($4,01 \pm 1,43$ g; $n = 6$), visto que estes animais aumentaram a eliminação de fezes de forma significativa, tanto nas doses de 100 mg/kg ($11,24 \pm 2,90$ g; $n = 6$, $p < 0,05$) como na dose de 200 mg/kg ($8,70 \pm 2,01$ g; $n = 6$, $p < 0,05$), voltando a ter a quantidade de fezes eliminadas semelhantes ao grupo controle ($7,92 \pm 1,01$ g; $n = 6$). A quantidade de fezes eliminadas pelos animais tratados com estas duas doses do Produto Fitoterápico não teve diferença significativa entre si e em relação a quantidade de fezes eliminadas pelos animais do grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da administração do Produto Fitoterápico em diversos parâmetros avaliados durante 24 horas em ratos constipados. Variáveis obtidas de animais tratados com solução salina (Controle) e após tratamento com loperamida (3 mg/kg) + salina, com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (100 mg/kg) ou com loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (200 mg/kg).

Grupos	Varição do peso (g)	Ingesta de água (mL)	Ingesta de ração (g)	Eliminação de fezes (g)
Controle	$1,45 \pm 3,01$	$28,00 \pm 4,89$	$18,28 \pm 4,20$	$7,92 \pm 1,01$
Loperamida (3 mg/kg)	$1,45 \pm 4,35$	$30,83 \pm 2,55$	$18,45 \pm 4,19$	$4,01 \pm 1,43^a$
Loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (100 mg/kg)	$-4,35 \pm 4,70$	$23,00 \pm 13,25$	$17,47 \pm 5,42$	$11,24 \pm 2,90^b$
Loperamida (3 mg/kg) + Produto Fitoterápico (200 mg/kg)	$-3,52 \pm 4,20$	$26,83 \pm 6,64$	$21,38 \pm 5,25$	$8,70 \pm 2,01^b$

São apresentados valores médios \pm e.p.m. de 6 experimentos, análise de variância "oneway" (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni para cada grupo amostral. ^a $p < 0,05$ vs Controle; ^b $p < 0,05$ vs Loperamida (3 mg/kg).

5.2 Ensaio *in vitro*

5.2.1 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de avaliar se o Produto Fitoterápico em estudo exerce efeito sobre o tônus basal e contrações espontâneas em íleo isolado de cobaia, foi adicionado às preparações de íleo estabilizadas em 1g concentrações crescentes e cumulativas deste produto (0,01-1000 $\mu\text{g/mL}$). Sua adição não promoveu alteração significativa sobre o tônus basal, nem causou modificação significativa nas contrações espontâneas deste órgão, apresentando, deste modo, nenhuma diferença significativa entre as concentrações estudadas (Figura 13).

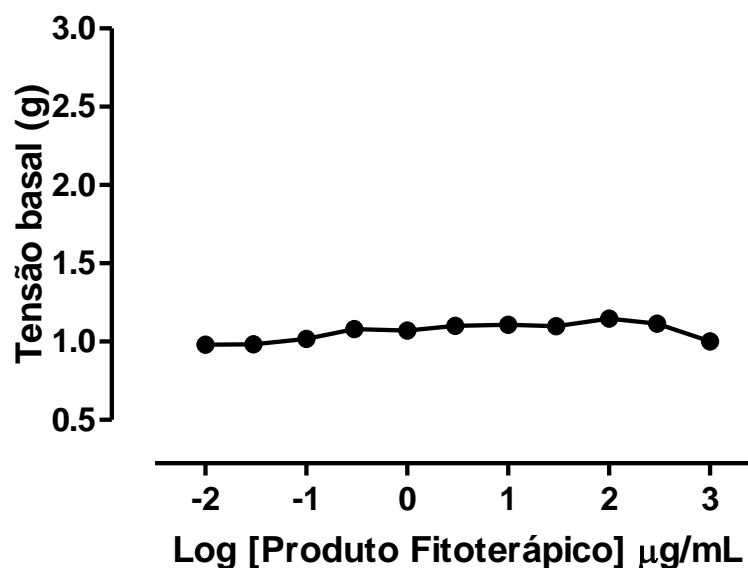


Figura 13: Efeito do Produto Fitoterápico (0,01 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre o tônus basal em íleo isolado de cobaia. Os valores estão expressos como média \pm e.p.m. de 6 experimentos.

5.2.2 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol, histamina ou KCl 40 mM em íleo isolado de cobaia

Neste modelo de atividade espasmolítica, o Produto Fitoterápico (1 – 1000 µg/mL) relaxou de maneira dependente de concentração as preparações de íleo isolado de cobaia, pré-contraídas com KCl 40 mM, $E_{max} = 50,76 \pm 3,79 \%$; $CE_{50} = 91,94 \mu\text{g/mL}$ (57,97 – 145,80); $n = 7$, com 1 µM de carbacol, $E_{max} = 67,61 \pm 6,25 \%$; $CE_{50} = 269,77 \mu\text{g/mL}$ (215,8 – 337,1); $n = 6$, ou com 1 µM de histamina, $E_{max} = 58,68 \pm 7,17 \%$; $CE_{50} = 144,10 \mu\text{g/mL}$ (86,65 – 239,70); $n = 6$. Embora haja diferença significativa ($p < 0,05$) no E_{max} quando comparamos o efeito do Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia pré-contraído com KCl 40 mM e 1 µM de carbacol, não houve diferença significativa na potência do Produto Fitoterápico diante destes três agentes contracturantes (Figuras 14 e 15).

O tempo necessário para que fossem obtidas as respostas máximas para cada concentração do Produto Fitoterápico foi cerca de 8 a 20 minutos. No final dos experimentos, a reversão do relaxamento produzido por esta preparação foi conseguida após sucessivas trocas da solução de banho (Krebs modificado para íleo – Tabela 1) e estabelecimento de uma nova tensão basal, a responsividade do tecido foi avaliada por uma nova contração induzida por carbacol (1 µM). A reversibilidade foi observada para assegurar que o relaxamento não foi devido a alterações na contractilidade e responsividade do tecido.

As contrações induzidas por carbacol tiveram magnitudes semelhantes antes ($1,67 \pm 0,11 \%$; $n = 6$) e após ($1,65 \pm 0,12 \%$; $n = 6$) o tratamento dos órgãos com o Produto Fitoterápico, não apresentando diferença significativa entre elas (Figuras 16 e Tabela 7). Como o relaxamento induzido pelo Produto Fitoterápico apresentou melhor E_{max} em íleo pré-contraído com carbacol, utilizou-se este contracturante para os demais experimentos, quando necessário.

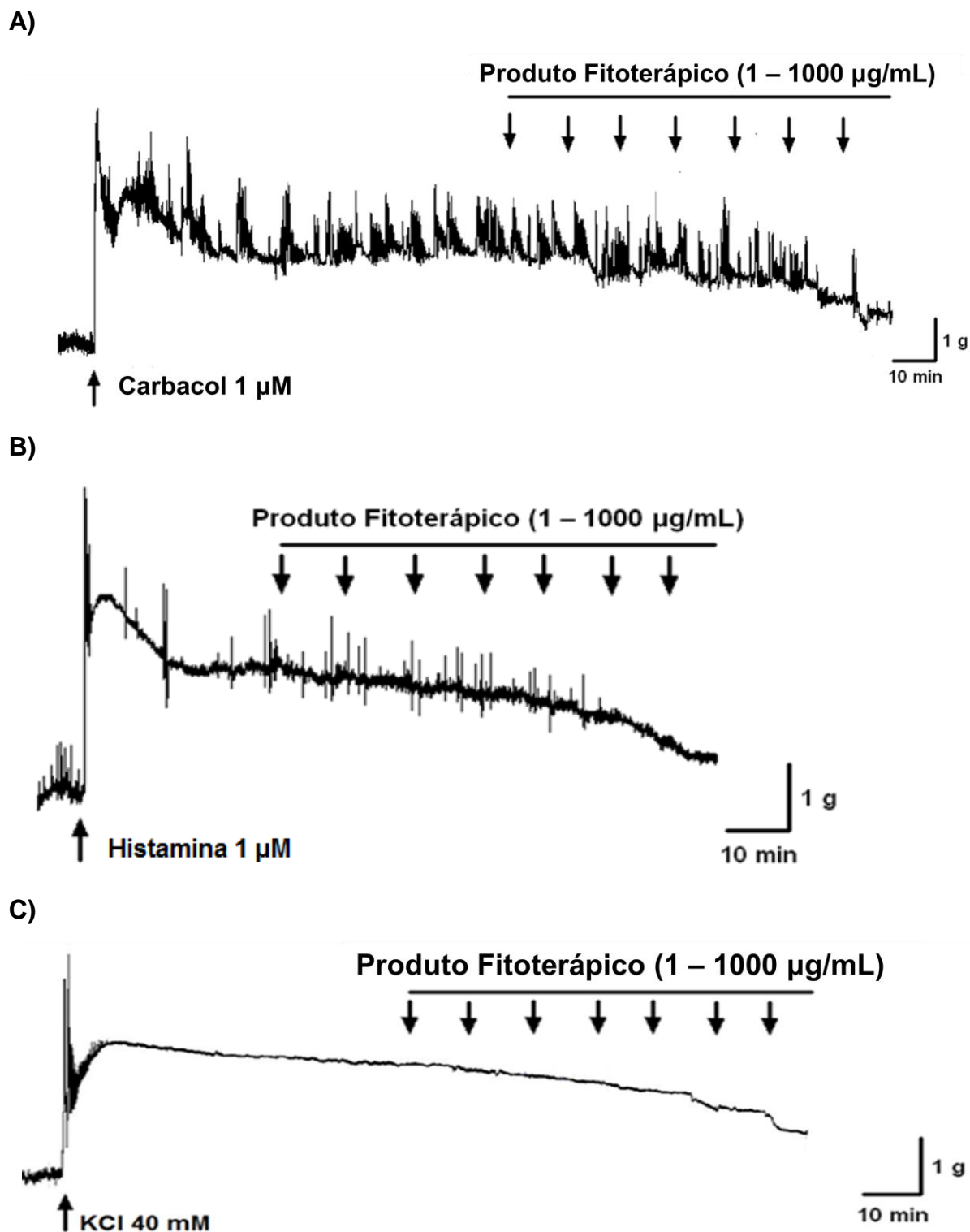


Figura 14: Registros originais do relaxamento induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia pré-contraído com 1 μM de carbacol (A), 1 μM de histamina (B) e 40 mM KCl (C). As setas representam as concentrações utilizadas deste produto (1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 $\mu\text{g/mL}$).

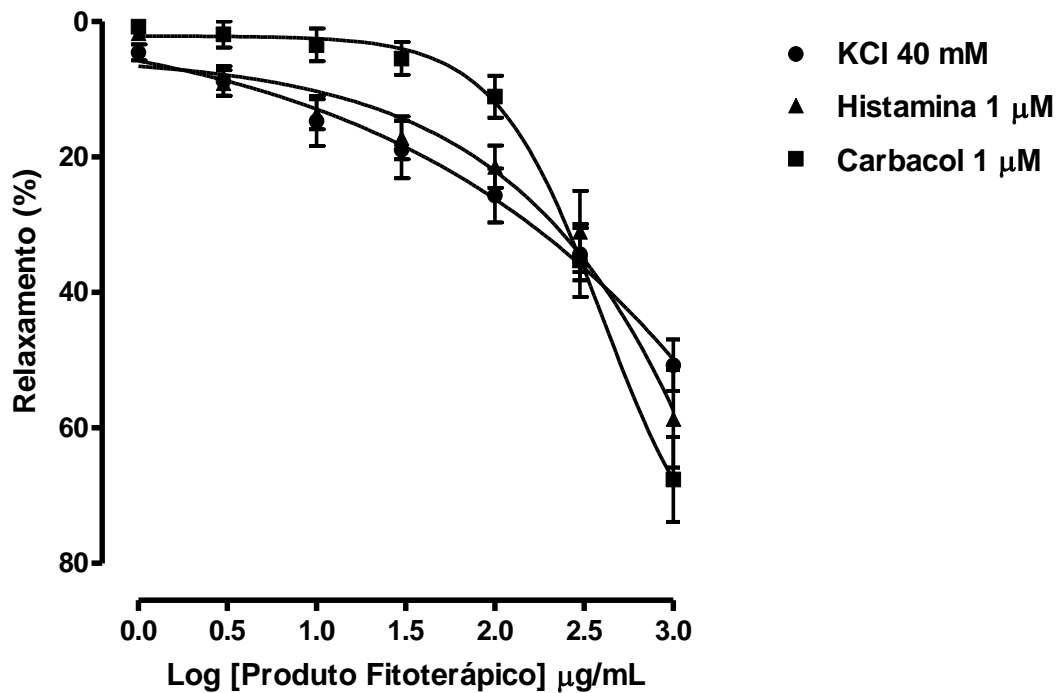


Figura 15: Efeito relaxante do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia pré-contraído com diversos agentes contracturantes. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com 1 µM histamina (●), KCl 40 mM (■) ou 1 µM carbacol (◆). Os pontos na figura representam a média dos experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. Foram realizados 6, 7 e 6 experimentos para cada protocolo, respectivamente.

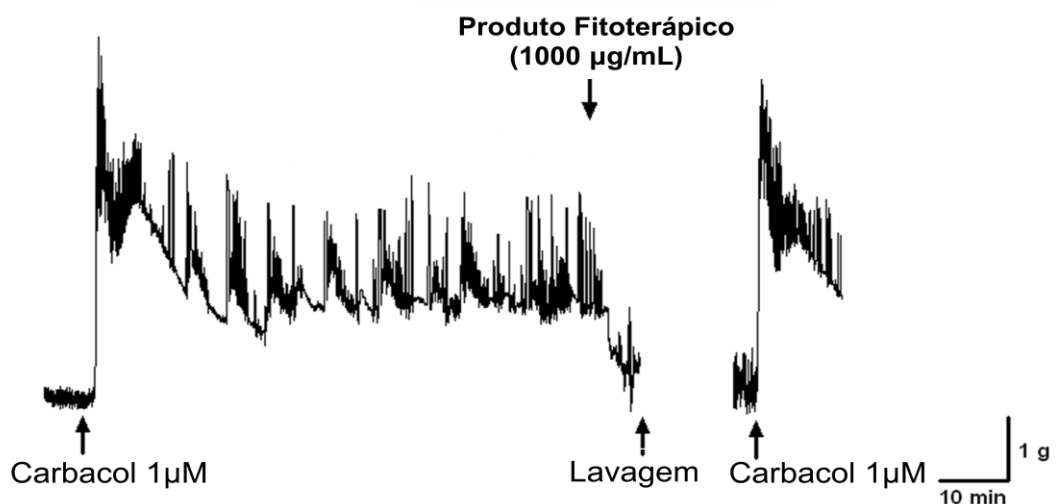


Figura 16: Registro original da contração induzida por 1 µM carbacol antes e após a exposição com o Produto Fitoterápico.

Tabela 7: Percentual de contração em íleo isolado de cobaia, normalizadas pelo Controle (em porcentagem), antes (Controle) e após a exposição ao Produto Fitoterápico (Reversão).

	Antes da exposição ao Produto Fitoterápico	Após exposição ao Produto Fitoterápico
% de contração	1,67 ± 0,11 %	1,65 ± 0,12 %;

Os dados estão expressos como média ± e.p.m. de 6 experimentos.

5.2.3 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações induzidas por diferentes concentrações de K⁺ extracelular em íleo isolado de cobaia

Para avaliar o efeito miorelaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia pré-contraído com soluções despolarizantes contendo diferentes concentrações de K⁺ extracelular, além da solução despolarizante de KCl 40 mM, descrito acima, o produto foi adicionado de forma crescente e cumulativa em preparações de íleo pré-contraído com solução de KCl 60 mM (Tabela 4). O Produto Fitoterápico (1 - 1000 µg/mL) induziu relaxamento depende de concentração frente a contrações induzidas por KCl 60 mM, apresentando diminuição significativa de sua eficácia ($E_{max} = 39,28 \pm 1,95 \%$; $n = 7$, $p < 0,05$) sem alterações no valor de potência, $CE_{50} = 169,80 \mu\text{g/mL}$ (120 – 160); $n = 7$, quando comparado ao relaxamento induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo pré-contrádo com KCl 40 mM, $E_{max} = 50,76 \pm 3,79 \%$; $CE_{50} = 91,94 \mu\text{g/mL}$ (57,97 – 145,80); $n = 7$ (Figura 17).

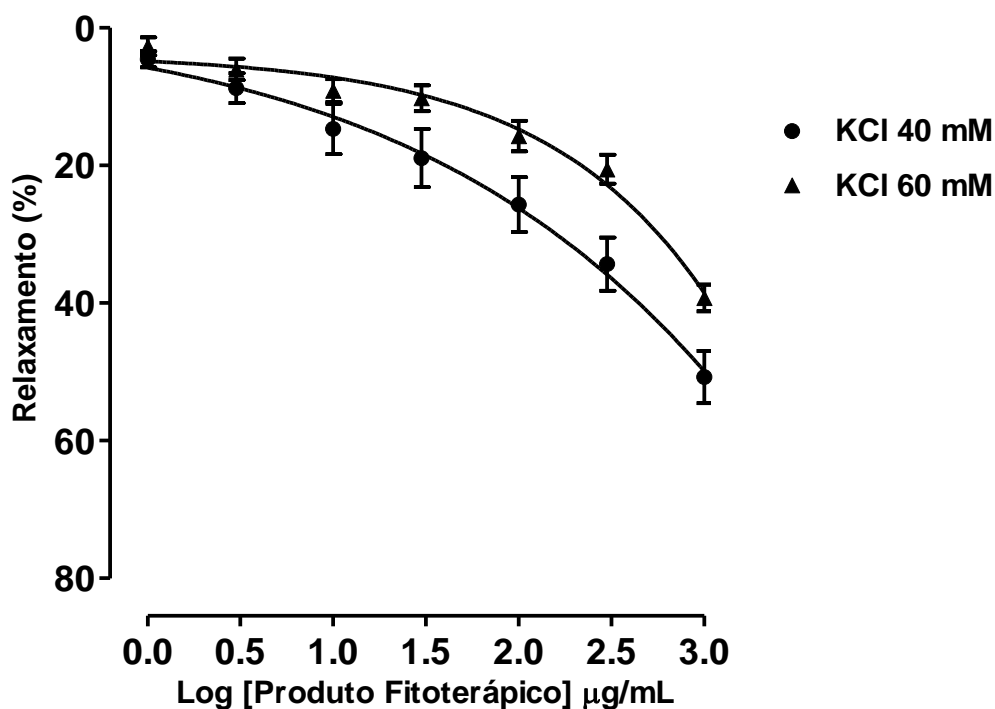


Figura 17: Efeito miorelaxante do Produto Fitoterápico sobre contrações induzidas por solução despolarizante contendo diferentes concentrações de K^+ extracelular em íleo de cobaia. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com KCl 40 mM (●) ou KCl 60 mM. Os pontos na figura representam a média dos experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. Foram realizados 7 e 8 experimentos, respectivamente.

5.2.4 Influência de bloqueadores dos canais para K^+ na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de reforçar a evidência funcional da participação dos canais para K^+ no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico, foram realizados experimentos na presença de TEA (5 mM) e CsCl (5 mM), em preparações diferentes, os quais são bloqueadores não específicos dos canais para K^+ (LATORRE et al., 1989). Nestas condições, a curva concentração-resposta referente a atividade antiespasmódica induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia foi deslocada para direita, com alterações significativas nos valores de $CE_{50} = 112,60 \mu\text{g/mL}$ (44,09 – 287,80; $p < 0,05$) e ($E_{\text{max}} = 29,44 \pm 6,24 \%$, $n = 5$; $p < 0,05$) na presença de TEA e $CE_{50} = 93,41 \mu\text{g/mL}$ (54,89 – 159,00; $p < 0,05$) e E_{max} (22,79

$\pm 2,99$ %; $n = 5$; $p < 0,05$) na presença de CsCl. É importante salientar que não houve diferença significativa dos parâmetros avaliados (CE_{50} e E_{max}) referentes às curvas concentração-resposta induzidas pelo Produto Fitoterápico entre estes dois bloqueadores (Figura 18).

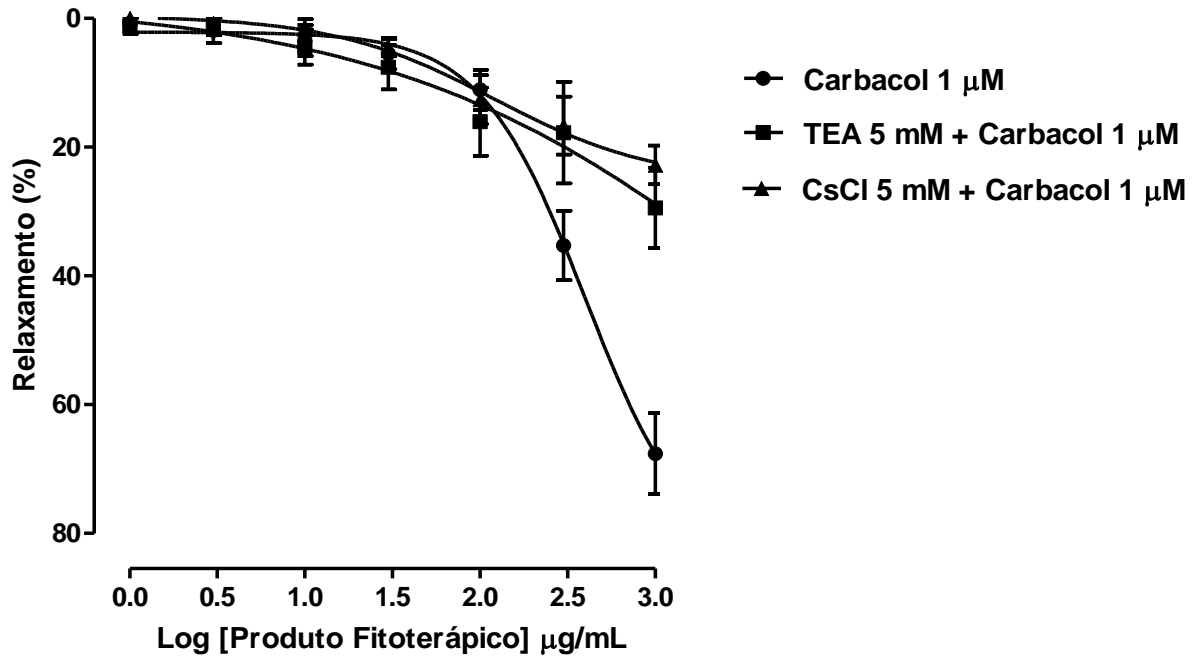


Figura 18: Efeito do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia na presença de bloqueadores de canais para K^+ . Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 µg/mL) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 µM na ausência (●) e na presença de CsCl 5 mM (▲) ou TEA 5 mM (■), ambos inibidores inespecíficos de canais para K^+ . Os pontos na figura representam a média dos experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. Foram realizados 6, 5 e 5 experimentos, respectivamente.

5.2.5 Efeito do Produto Fitoterápico sobre as contrações tônicas induzidas por S(-)- Bay K 8644 em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de avaliar se a atividade espasmolítica do Produto Fitoterápico estaria influenciando sobre o influxo de Ca^{2+} através dos canais para cálcio sensíveis a voltagem (Ca_v) tipo-L, foi induzida uma contração com S(-)- Bay K 8644, um ativador destes canais (SHI; LIAO; CHEN, 2001). Nestas preparações, o Produto Fitoterápico (1 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) promoveu um efeito relaxante em íleo isolado de cobaia de forma dependente de concentração, com alterações significativas no E_{max} ($39,28 \pm 1,95 \%$; $n = 8$, $p < 0,05$) e na $\text{CE}_{50} = 199,70 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($120,50 - 239,00$; $p < 0,05$), quando comparados ao íleo pré-contraídos com carbacol 1 μM , $E_{\text{max}} = 67,61 \pm 6,25 \%$; $\text{CE}_{50} 269,77 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($215,8 - 337,1$); $n= 6$ (Figura 19).

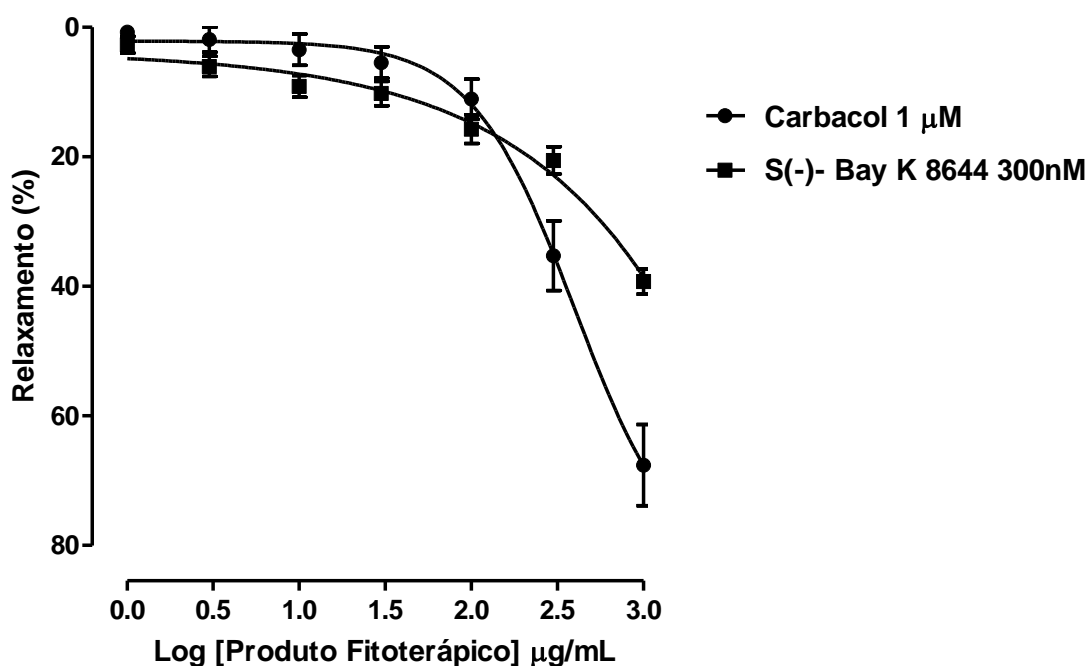


Figura 19: Efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo de cobaia, pré-contraídos com S(-)-Bay K 8644. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 μM (●) ou com 300 nM S(-)-Bay8644 (▼), um agonista dos canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem tipo-L. Os pontos na figura representam a média dos experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. Foram realizados 7 e 8 experimentos.

5.2.6 Influência do propranolol, um antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos na resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia

Com o intuito de avaliar se o propranolol, um bloqueador não seletivo dos β -adrenoceptores, promove alteração no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia, realizaram-se experimentos na presença deste bloqueador e nestas condições a ação espasmolítica induzida pelo Produto Fitoterápico foi atenuada significativamente ($E_{max} = 34,45 \pm 4,97\%$; $n = 6$; $p < 0,05$), havendo deslocamento da curva concentração-resposta para a direita, entretanto não foi observado diferença estatística na potência $CE_{50} = 329,10 \mu\text{g/mL}$ ($245,10 - 441,90$) (Figura 20).

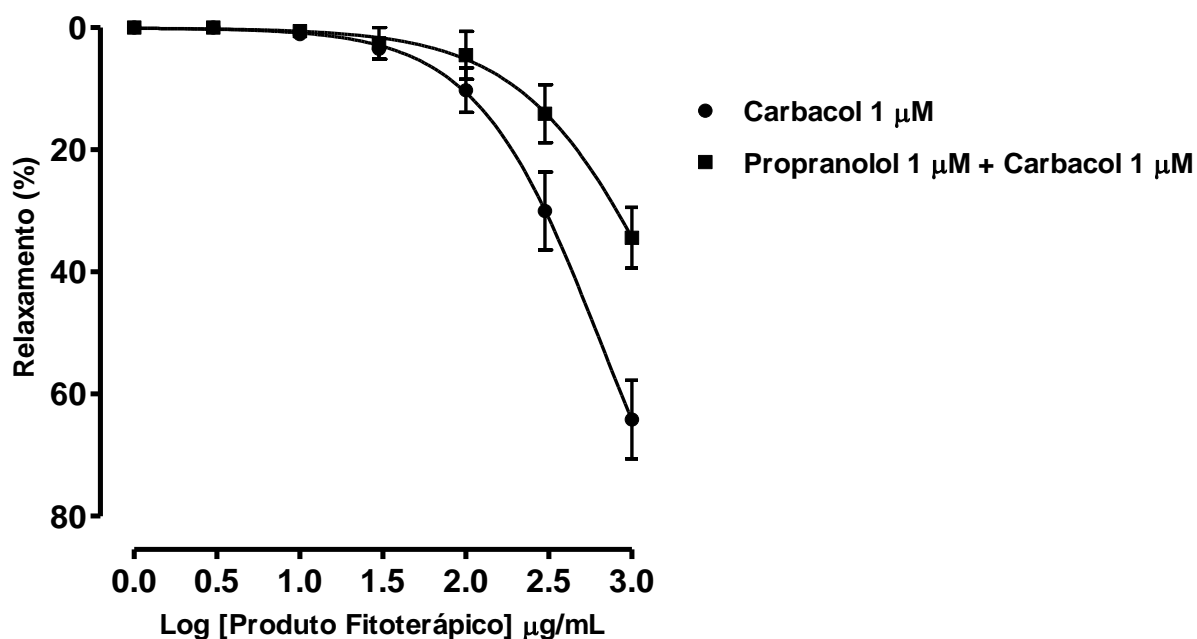


Figura 20: Efeito miorelaxante do Produto Fitoterápico em íleo de cobaia na presença do propranolol. Curva concentração-resposta para o Produto Fitoterápico (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) em íleo isolado de cobaia pré-contraído com carbacol 1 μM na ausência (●) e na presença de propranolol 1 μM (■), um antagonista dos receptores β -adrenérgicos. Os pontos na figura representam a média dos experimentos e as linhas verticais indicam o e.p.m.. Foram realizados 6 experimentos.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O Produto Fitoterápico em estudo é indicado na terapêutica como forma de combater cólicas intestinais e prisão de ventre. Ele é formado por extratos de partes de plantas que já são conhecidos popularmente por terem ação no trato gastrointestinal, os quais promovem aumento da motilidade intestinal e atividade espasmolítica. Como é comum para a maioria dos medicamentos usados tradicionalmente, especialmente as preparações contendo mais de um composto, há uma falta de dados científicos a cerca dos mesmos (HÜBNER; ALKEN, 2004).

Assim, o principal achado deste trabalho foi demonstrar os efeitos já relatados na terapêutica deste Produto Fitoterápico, realizando para este fim ensaios farmacológicos pré-clínicos, os quais foram condizentes com o seu uso popular. Além disso, estes achados também podem contribuir para a regulamentação deste produto farmacêutico junto a ANVISA, para então ser possível o seu registro como um medicamento fitoterápico.

Os ensaios pré-clínicos foram iniciados a partir da investigação do efeito do Produto Fitoterápico sobre o trânsito intestinal em camundongos. Numerosos estudos em animais demonstram a bioatividade e o efeito na função intestinal de diversas plantas utilizadas no tratamento das disfunções intestinais. O trânsito gastrointestinal é usualmente determinado pela medida percorrida por um marcador, neste caso o carvão ativado (PALOMBO, 2006).

O uso do Produto Fitoterápico aumentou de forma significativa a velocidade do trânsito intestinal tanto na dose de 100 quanto na dose de 200 mg/kg em camundongos machos, não havendo diferença significativa entre as doses estudadas (Figura 10). Estes dados demonstram que o Produto Fitoterápico, nestas doses, atua promovendo o aumento do peristaltismo e da motilidade intestinal, sendo esta uma indicação das suas propriedades laxantes. Efeitos semelhantes são observados em diversos laxantes estimulantes, como a aloina, um conhecido glicosídeo antranoide encontrado em diversas plantas que apresentam atividade laxante, a qual promove mudanças na motilidade intestinal e consequente aumento do trânsito intestinal (IZZO et al., 1999).

Uma vez demonstrado que o Produto Fitoterápico promoveu aumento da motilidade intestinal em camundongos não constipados, investigou-se o efeito desta

preparação no trânsito intestinal de camundongos constipados, para isso, utilizou-se um modelo de constipação bem documentado, que é induzido por loperamida (KAKINO et al., 2010). A loperamida promove um aumento do intervalo de tempo de evacuações em ratos e inibe o peristaltismo do cólon, sendo considerado um modelo de constipação espática (SHIMOTOYODOME et al., 2000). Esta inibição diminui o trânsito intestinal causando o retardo na eliminação de fezes (WINTOLA; SUNMONU; AFOLAYAN, 2010).

A ação da loperamida é predominantemente mediada pelos receptores μ -opióide e está restrita ao intestino, pois é fracamente absorvida e não tem efeito central, pois não permeia a barreira hemato-encefálica em concentrações necessárias para produzir analgesia. Os agonistas do receptor μ -opióide inibem o esvaziamento gástrico, aumentam o tônus do músculo do piloro, alteram a complexa migração mioelétrica, atrasam o trânsito através do intestino delgado e grosso e elevam a pressão do esfíncter anal. A interrupção da motilidade propulsora combinada com a inibição do transporte de fluidos e íons inibem o trânsito gastrointestinal. O contato prolongado do conteúdo intestinal com a mucosa e a interrupção de reflexos entéricos pró-secretórios, fazem com que os opióides atenuem a secreção de eletrólitos e água e facilitem a absorção de líquidos e fluidos. O resultado final de todos esses efeitos é a constipação (HOLZER, 2009).

Nos experimentos de trânsito intestinal, o efeito inibitório sobre o trânsito intestinal induzido por loperamida foi observada pela diminuição significativa da porcentagem do intestino percorrida pelo carvão ativado (marcador) quando comparada aos grupos controle. Nestas condições, a administração das doses de 100 e 200 mg/kg do Produto Fitoterápico reverteu o efeito constipante induzido pela loperamida, reestabelecendo a motilidade intestinal de forma semelhante ao grupo controle, demonstrando assim que este produto promove um retorno às condições normais de motilidade neste modelo de constipação (Figura 11). Efeitos semelhantes foram descritos por Wintola, Sunmonu e Afolayan (2010) em que o extrato de *Aloe ferox* Mill., planta tradicionalmente conhecida por sua atividade laxante, também reverteu o efeito constipante em animais constipados por loperamida.

Uma vez caracterizado o efeito do Produto Fitoterápico sobre a motilidade no intestino delgado, passou-se a investigar a ação desta preparação sobre todo o trânsito gastrointestinal através da avaliação da eliminação de fezes em um período

de 24 horas, que consiste numa maneira prática para estimar a atividade motora gastrointestinal completa (WANG et al., 2008).

O Produto Fitoterápico não alterou de maneira significativa os parâmetros analisados no protocolo experimental de eliminação de fezes em 24 horas, nas doses de 100 e 200 mg/kg em animais saudáveis, nem causou alterações na consistência das fezes (Tabela 5). Entretanto, o Produto Fitoterápico apresentou uma tendência em aumentar o número de fezes eliminadas nas duas doses estudadas, o que poderia se tornar significativo caso fosse aumentado o tempo de observação, desta forma futuros ensaios devem ser realizados para comprovar esta suspeita. Este produto, nas doses avaliadas, também não promoveu alteração de parâmetros comportamentais como sonolência, excitação e sinais de dor e cólicas, demonstrando que ele não possui efeito significativo nos parâmetros avaliados sobre o Sistema Nervoso Central de animais não constipados, nas doses estudadas.

Dessa forma, sabendo que o Produto Fitoterápico aumentou o trânsito intestinal no intestino delgado sem causar aumento da eliminação de fezes no período de 24 horas em animais saudáveis, passou-se a avaliar se essa preparação estaria alterando a eliminação de fezes em animais constipados, visto que algumas substâncias apresentam efeito melhor ou só possuem eficácia em estados patológicos (MACGREGOR et al., 1982).

Para avaliar a influência do Produto Fitoterápico em animais constipados, foi realizado um tratamento com loperamida por três dias, o qual promoveu a diminuição da quantidade de fezes eliminadas, indicando a indução da constipação em ratos (Figura 12). A indução de constipação por essa metodologia corrobora com os resultados de Koyuncuoglu e colaboradores (1984), os quais observaram a diminuição significativa da eliminação de fezes de ratos em modelo de constipação induzido por morfina.

Desse modo, o tratamento dos animais constipados com o Produto Fitoterápico promoveu a reversão da constipação nas duas doses estudadas deste produto, através do aumento da quantidade de fezes eliminadas em 24 horas. Esse efeito demonstrou novamente a ação desta preparação frente a animais constipados, sem, no entanto, causar alterações nos outros parâmetros avaliados, como ingestão de água e de ração e o peso dos animais. Estes achados são similares aos encontrados por outros laxantes já utilizados na terapêutica como os resultados

de Ewe, Ueberschaer e Press (1993) que demonstraram ação laxante de Senna (*Cassia Angustifolia*) em voluntários constipados por loperamida.

Todos os resultados observados, em conjunto, demonstram que o Produto Fitoterápico em estudo possui efeito laxante, evidenciado principalmente em modelos de constipação, corroborando com o seu uso na terapêutica e a ausência de diarreia neste período de observação foi registrada como um resultado positivo de proteção do trato gastrointestinal (IZZO et al., 1994).

O próximo passo deste estudo foi verificar se o Produto Fitoterápico possui ação em íleo isolado de cobaia, que é uma conhecida preparação estável, considerada adequada para a construção de curvas concentração-resposta (MEHMOOD; SIDDIQI; GILANI, 2011). Além disto, esta preparação é considerada útil para quantificar respostas contráteis de um agonista na presença de um inibidor, permitindo assim a exploração da natureza do efeito antiespasmódico (GILANI et al., 1997).

O tônus motor gastrointestinal é regulado através de inúmeros mediadores fisiológicos como acetilcolina, histamina, substância P, colecistocininas, prostaglandinas e 5-hidroxitriptamina (HOOGERWERF; PASRICHA, 2006). A liberação destes produtos químicos causam efeito estimulante no intestino mediado através do aumento final na $[Ca^{2+}]_c$ (BURKS, 1987). As contrações espontâneas do músculo liso intestinal são reguladas por ciclos de despolarização e repolarização, sendo originadas no pico de despolarização devido ao rápido fluxo de íons de Ca^{2+} através de Ca_v (WALSH; SINGER, 1980; BRADING, 1981; DEVI; SIM; ISMAIL, 2011). É relatado na literatura que substâncias que promovem o aumento do tônus e das contrações espontâneas são frequentemente utilizadas para combater a constipação intestinal (CIMANGA et al., 2010). Desse modo, passou-se a investigar os efeitos do Produto Fitoterápico sobre o tônus basal e sobre as contrações espontâneas de íleo isolado de cobaia.

A adição do Produto Fitoterápico de forma crescente e cumulativa em íleo isolado de cobaia não promoveu nenhuma alteração significativa no tônus basal, nem nas contrações espontâneas características desse tecido (Figura 13), sugerindo que esta preparação não altera a sequência de despolarização das células intestinais e que o mesmo pode estar promovendo o seu efeito estimulante sobre o trato gastrointestinal por mecanismos de ação independentes da estimulação das contrações espontâneas, como exemplo, por alterações no equilíbrio da absorção de

água do lúmen intestinal através do aumento do volume intraluminal, que induz ondas peristálticas e estimulam a atividade peristáltica local, entretanto futuros ensaios farmacológicos deverão ser realizados para confirmar a participação deste mecanismo de ação (FARR et al., 2002; IZZO et al., 1999).

Uma variedade de substâncias naturais de origem vegetal são conhecidas popularmente por exercerem ações benéficas dentro do trato digestivo, as quais apresentam efeitos laxantes e espasmolíticos, sendo principalmente utilizadas para o tratamento de constipação acompanhada de desordens espasmódicas (CHRUBASIK et al., 2005; WINDISCH et al., 2008; MERZOUKI; ED-DERFOUFI; MESA, 2000). Os agentes espasmolíticos, por sua vez, são empregados na terapêutica para o tratamento de dores resultantes de espasmos intestinais (CIMANGA et al., 2010).

Nos ensaios farmacológicos utilizados para avaliar a atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia, o produto estudado apresentou efeito relaxante dependente de concentração frente a contrações tônicas induzidas pela solução de Krebs despolarizante (contendo 40 mM de KCl) e pelos agonistas carbacol (1 μ M) e histamina (1 μ M), apresentando maior eficácia nas contrações induzidas por carbacol, quando comparado ao efeito induzido em preparações contraídas pelo KCl 40 mM, entretanto não houve alterações significativas em suas potências (Figura 15). Estes dados sugerem que esta preparação pode estar agindo em um passo comum da via de sinalização destes três agentes contracturantes ou em uma via paralela que leve ao mesmo resultado.

Após lavagens das preparações, uma nova contração foi induzida com carbacol (1 μ M), sendo essa similar àquela realizada antes da exposição do tecido ao Produto Fitoterápico (Figura 16), sugerindo que o efeito mediado por este produto não foi devido a alterações na contractilidade e responsividade em íleo isolado de cobaia, nas concentrações utilizadas (CHOKRI et al., 2010).

A ação demonstrada pelo Produto Fitoterápico embora pareça contraditória, por ser reconhecido na literatura que substâncias espasmolíticas são utilizadas no tratamento da diarreia e não para a constipação (CIMANGA et al., 2010), seu efeito é, pelo menos em parte, semelhante ao das antraquinonas, as principais drogas laxantes obtidas a partir de plantas medicinais, cujo um dos principais mecanismos de ação é atuar sobre a motilidade do intestino grosso por estimulação do

peristaltismo e ao mesmo tempo produzir inibição das contrações locais, resultando em trânsito acelerado no cólon (FARR et al., 2002).

Também deve ser lembrado que o Produto Fitoterápico é formulado a partir de quantidades ótimas de determinados ingredientes, provenientes de diferentes plantas medicinais, as quais podem levar ao desenvolvimento de diversos mecanismos de ação, culminando em vários efeitos biológicos, neste caso, produzindo ação laxante e atividade espasmolítica. Na literatura, são descritos outros medicamentos que também possuem esta mesma indicação e efeitos diferenciados, como o Eucarbon[®], que é classificado como um laxante estimulante com ação espasmolítica, que atua aliviando as dores intestinais por gases (HÜBNER; ALKEN, 2004).

Outros produtos de origem natural também podem ser citados por apresentarem efeitos diferenciados sobre o trato gastrointestinal, como a *Ipomoea cárnea* que apresenta efeitos relaxantes e contracturantes em íleo isolado de cobaia os quais são desencadeado por variados mecanismos de ação, provavelmente, devido a presença de diferentes compostos ativos em seu extrato (HORE et al., 2000), fato este que pode ajudar no entendimento dos efeitos demonstrados pelo produto Fitoterápico em estudo, o qual interessantemente apresenta atividade laxante e espasmolítica em íleo pré-contraído por diversos agentes contracturantes.

Os agentes contracturantes utilizados neste estudo, como os agentes despolarizantes e agonistas de receptores acoplados à proteína Gq, tais como receptores muscarínicos M₃ e receptores histaminérgicos H₁, presentes no trato gastrointestinal do homem e de animais, levam à ativação e inativação de inúmeros canais iônicos, os quais podem promover diversas ações intracelulares culminando na contração do músculo liso intestinal (HISHINUMA; SHOJI, 2011).

O carbacol é um agonista colinérgico resistente a ação da acetilcolinesterase, que se liga aos receptores M₃ presentes no íleo, enquanto que a histamina é um agonista dos receptores H₁. Esses receptores estão acoplados a proteína G_q que ativa a fosfolipase C promovendo a síntese de trifosfato de inositol (IP₃) que causa liberação de cálcio dos estoques de cálcio intracelular e o influxo de cálcio através de Ca_v, canais ativado por receptor (ROC) e canais ativado por depleção dos estoques intracelulares (SOC) (NASERI; MOGHADDAM; BAHADORAM, 2007; HISHINUMA; SHOJI, 2011). As soluções ricas em K⁺

promovem despolarização da membrana e assim abrem Ca_v , causando influxo de Ca^{2+} e contração muscular (GODFRAIND et al., 1986; GHAYUR; GILANI, 2004; CHOKRI et al., 2010).

Em estudos prévios, foi demonstrado que a atividade antiespasmódica de diversas plantas medicinais é usualmente mediada pelo bloqueio de canais para Ca^{2+} ou abertura de canais para K^+ (GILANE, et al.; 2005; CÂMARA et al., 2003; MEHMOOD et al., 2010; LIS-BALCHIN; HART; LO, 2002; CHEN et al., 2009; VENTURA-MARTÍNEZ et al., 2011).

Uma propriedade comum de drogas que promovem relaxamento no músculo liso através da ativação de canais para K^+ é que estas substâncias efetivamente relaxam contrações da musculatura produzida por um aumento moderado na concentração de K^+ extracelular (< 40 mM), porém estas substâncias não são eficazes quando a concentração extracelular de K^+ é alterada para níveis mais altos. Isto se deve ao fato de que em elevadas concentrações de K^+ , o potencial de equilíbrio deste íon está mais próximo ao potencial de membrana da célula muscular lisa, deixando a resultante do fluxo para o K^+ praticamente nula e, assim, a repolarização ou a hiperpolarização, necessários para o relaxamento muscular, são evitadas (GURNEY, 1994; NELSON; QUAYLE, 1995).

Dessa forma, para investigar a participação do efluxo de K^+ na resposta espasmolítica do Produto Fitoterápico, o efeito relaxante dessa preparação foi avaliado em contrações induzidas por solução de Krebs contendo uma maior $[K^+]$ extracelular (60 mM). A resposta relaxante induzida por esta preparação foi menor nas contrações induzidas por solução de Krebs contendo 60 mM de K^+ do que nas contrações induzidas por solução de Krebs contendo 40 mM de K^+ (Figura 17), sugerindo que a ação espasmolítica desse produto provavelmente envolve a modulação do efluxo deste íon.

Para confirmar a participação dos canais para K^+ , a resposta antiespasmódica de Produto Fitoterápico foi avaliada na presença de TEA (5 mM) e CsCl (5 mM), ambos bloqueadores não-seletivos de canais para K^+ . A resposta relaxante induzida pelo Produto Fitoterápico em íleo pré-contraído com carbacol foi significativamente atenuada com diminuição do efeito máximo na presença de ambos os bloqueadores, não havendo diferença significativa entre eles (Figura 18), sugerindo a participação de canais para K^+ no mecanismo miorelaxante do Produto Fitoterápico em íleo isolado de cobaia. Entretanto, o fato de ainda ter sido observado

efeito relaxante na presença desses bloqueadores sugere que há outros mecanismos envolvidos na resposta antiespasmódica desta formulação.

Por outro lado, contrações induzidas por solução de Krebs contendo altas concentrações para K^+ (> 30 mM) são conhecidas por promoverem a abertura de canais para Ca_v , permitindo o influxo de Ca^{2+} extracelular para exercer seu efeito contrátil (MEHMOOD et al., 2010). Dessa forma, a presença de relaxamento frente a contrações induzidas pelo KCl 40 e 60 mM sugerem que o efeito antiespasmódico induzido pelo Produto Fitoterápico pode envolver também o bloqueio de canais para Ca_v (GILANI et al., 2001), que passaram a ser descritos como $Ca_{v1.2}$ (CATERRAL et al., 2005).

Os íons Ca^{2+} desempenham um papel importante na contração muscular. A redução do Ca^{2+} intracelular pode levar ao relaxamento da musculatura lisa do trato gastrointestinal. Essa redução pode ser devido a uma diminuição da entrada de Ca^{2+} extracelular, que se dá principalmente através dos canais para Ca^{2+} do tipo $Ca_{v1.2}$ (BORRELLI et al., 2009),

Para confirmar a participação dos canais $Ca_{v1.2}$, o efeito miorelaxante do Produto Fitoterápico foi avaliado em contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644, um ativador destes canais. Esta preparação relaxou as contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644 de forma dependente de concentração (Figura 19), sugerindo que o mecanismo espasmolítico induzido pelo produto em estudo envolve a inibição do influxo de Ca^{2+} por canais $Ca_{v1.2}$. A menor eficácia observada nas contrações induzidas por S(-)- Bay K 8644 em relação ao relaxamento observado frente às contrações induzidas por carbacol, sugere que além do bloqueio do influxo de Ca^{2+} pelos canais $Ca_{v1.2}$, outras vias também estão envolvidas na resposta espasmolítica induzida pelo Produto Fitoterápico, como a ativação de canais para K^+ já descrito acima e a participação de outros mecanismos também não está descartada.

A ativação de canais para K^+ e o bloqueio de canais para Ca^{2+} para promover o efeito miorelaxante pode ocorrer direta ou indiretamente. Em íleo, a estimulação da via simpática gera a liberação de catecolaminas como a noradrenalina, que ativa receptores β -adrenérgicos, os quais estão acoplados a proteína G_s . A principal via de sinalização destes envolve a formação de AMPc e consequente ativação da PKA, que ativa os canais para K^+ e bloqueia os canais para Ca^{2+} , promovendo o relaxamento muscular. Dessa forma substâncias que ativam receptores β -adrenérgicos podem causar o relaxamento do íleo pré-contraído

com diversos agonistas, por meio de mecanismo de inibição farmacológica, ou seja, gerando efeito contrário por estimulação de uma via de sinalização (HORINOUCI; TSUJITANI; KOIKE, 1999).

Para avaliar se o Produto Fitoterápico estaria promovendo efeito miorelaxante por meio de ativação de receptores β -adrenérgicos, a resposta espasmolítica induzida por este produto foi observada na presença de propranolol, um bloqueador não seletivo desses receptores. O relaxamento induzido por este produto foi significativamente atenuado na presença deste antagonista (Figura 20), sugerindo, pelo menos em parte, a participação dos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos no efeito relaxante observado pelo produto em estudo. Estes dados podem também sugerir que a ativação destes receptores poderá ser seguida pela ativação de canais para K^+ e bloqueio de canais $Ca_{v1.2}$, dados estes demonstrados em resultados anteriores.

Entretanto, como o propranolol não possui muita afinidade pelos receptores β_3 -adrenérgicos (HORINOUCI; KOIKE, 2000), devem ser realizadas investigações futuras sobre este receptor específico, para caracterizar sua participação no efeito relaxante induzido pelo Produto Fitoterápico, uma vez que os β_3 -adrenoceptores são quantitativamente mais abundantes no íleo do que os clássicos β_1 e β_2 adrenérgicos (HORINOUCI; KOIKE, 2000). Esse resultado também sugere que outras vias podem estar envolvidas na resposta induzida pela referida preparação em íleo isolado de cobaia, sendo necessária a realização de estudos posteriores para melhor esclarecer a participação de outros possíveis mecanismos de ação.

A resposta antiespasmódica apresentada pelo Produto Fitoterápico em íleo de cobaia pode justificar sua utilização para o tratamento de cólicas intestinais, que são condições clínicas associadas com espasmos do músculo liso (KULKARNI et al., 2004). Este efeito antiespasmódico também pode, em parte, justificar sua utilização para o tratamento de constipação, uma vez que o mecanismo de ação da loperamida, substância utilizada para induzir constipação nos animais, envolve a indução de contrações tônico/segmentares ou espasmos por todo o intestino, sem contribuir com o peristaltismo propulsivo, causando conseqüentemente a interrupção do trânsito normal pelo trato intestinal (DE SCHEPPER et al., 2004).

Dessa forma, o Produto Fitoterápico pode atuar causando o relaxamento do músculo liso intestinal contraído, contribuindo para o retorno da função fisiológica intestinal. Mecanismo semelhante foi encontrado para outras substâncias utilizadas

na terapêutica da constipação, como o sulfato de magnésio, um conhecido laxante estimulante cujo relaxamento do músculo liso do cólon reduz a resistência ao fluxo intestinal e promove o movimento de material fecal ao longo do intestino (IZZO et al., 1994; GULLIKSON; BASS, 1984).

Assim, os resultados encontrados nesse trabalho, em conjunto, contribuíram para o estudo pré-clínico deste Produto Fitoterápico, com a caracterização de seus efeitos na motilidade intestinal e esclarecimento de sua atividade antiespasmódica, bem como de seu mecanismo de ação, os quais corroboram com a sua utilização para o tratamento de constipação e cólica intestinal e juntos podem servir de alicerce para o registro desta preparação junto às entidades competentes no Brasil.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

De acordo com os estudos desenvolvidos pode-se concluir que o Produto Fitoterápico em estudo apresentou:

- Efeito laxante, principalmente em modelos de animais constipados;
- Atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia;
- Ação espasmolítica que envolve ativação de canais para potássio e bloqueio de canais para cálcio, em parte pela ativação de receptores β -adrenérgicos;

Perspectivas

8 PERSPECTIVAS

Os ensaios farmacológicos pré-clínicos realizados neste trabalho foram de extrema importância para a comprovação científica da eficácia e do mecanismo de ação referentes ao Produto Fitoterápico estudado. Um próximo passo a ser realizado sobre suas propriedades biológicas seria a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos e ensaios clínicos em seres humanos, os quais possam contribuir para o registro deste produto junto às autoridades competentes no Brasil.

Referências

REFERÊNCIAS

ABIFITO. Uma legislação justa para os produtos de origem natural. 2006. Disponível em: <<http://www.abifito.com.br/introducao.asp>>, acesso em: 18 out. 2011.

ADACHI-AKAHANE, S.; CLEEMANN, L.; MORAD, M.; BAY, K. 8644 modifies Ca^{2+} cross signaling between DHP and ryanodine receptors in rat ventricular myocytes. **The American Journal of Physiology**, v. 276, p.H1178 – H1189, 1999.

AGRIANUAL. Pelo aproveitamento racional das plantas medicinais da Amazônia. **FNP Consultoria e Comércio**, p. 28-29, 2002.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.80, p. 72-76, 1999.

ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Drogas psicotrópicas. Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006. cap.1, p. 3-23.

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

AMBROGINI JÚNIOR, O.; MISZPUTEN, S. J. Constipação intestinal crônica. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 59, n. 12, p. 133-139, 2002.

AWOUTERS, F. C. J.; NIEMEGEREERS, J.; KUYPS, P.A. Janssen. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, p. 29-37, 1975.

BARRETT-JOLLEY, R.; LEVIS, R.; FALLMAN, R.; MOBASHERI, A. The emerging chondrocyte channelome. **Frontiers in Physiology**. v.1. Artigo 135, 2010.

BORRELLI, F.; BORBONE, N.; CAPASSO, R.; MONTESANO, D.; DE MARINO, S.; AVIELLO, G.; APREA, G.; MASONE S.; IZZO, A. A.. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatus* extract in the rat and human ileum. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 434–438, 2009.

BRADING, A.R. How do drugs initiate contraction in smooth muscle? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 2, p. 262–265, 1981.

BRASIL. **Resolução nº 48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília – DF, 18 mar. 2004^a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>>. Acesso em 25 dez. 2011.

BRASIL. **Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo, Brasília – DF, 05 abr. 2010^a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>>. Acesso em 25 dez. 2011.

BRITTO, V.L.M.Q.; RESENDE, R.F.; GOUVEIA, N.M. AMARAL, F. C., TEIXEIRA, E. H. M., PEREIRA, W. F., ESPÍNDOLA, F. E. Medicinal plants and phytotherapics in the context of academy, government and society organizations: exemple of popular initiatives in Uberlândia/MG. **II Encontro Nacional de Educação, Saúde e Cultura Populares**. 2006.

BURKS, T.F. Actions of drugs on gastrointestinal motility. In: Johnson, L.R. (Ed.), **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, Nova York: Ravan Press, 2^a ed. 1987.

BUSTOS, D; OGAWA, K; PONS, S; SORIANO, E; BANJI, JC; BUSTOS, FL. Effect of loperamide and bisacodyl on intestinal transit time, fecal weight and short chain fatty acid excretion in the rat. **Acta Gastroenterol Latinoam**. v.21, p. 3-9, 1991.

CÂMARA, C. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; MACÊDO-FILHO, C. L.; ALMEIDA, F.B.S.; FONTELES, M. C. Antispasmodic Effect of the Essential Oil of *Plectranthus barbatus* and some Major Constituents on the Guinea-Pig Ileum. **Planta Medica**. v.69, n.12, p.1080-1085, 2003.

CARAFOLI, E. Calcium signaling a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.** v.99, p.1115-1122, 2002.

CATERRAL, 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 ver.** v.57, p.411 – 425, 2005.

CERON, P.I.B.; CREMONEZ, D.C.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C. The Relaxation Induced by S-Nitroso-Glutathione and SNitroso-N-Acetylcysteine in Rat Aorta Is Not Related to Nitric Oxide Production. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 298, n. 2, p.686–694, 2001.

CIMANGA, R.K.; MUKENYI, P. N. K.; KANBU, O. K.; TONA, G. L.; APERS, S.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. The spasmolytic activity of extracts and some isolated compounds from the leaves of *Morinda morindoides* (Baker) Milne-Redh. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, p. 215 – 220, 2010.

CHAN, T.Y. Monitoring the safety of herbal medicines. **Drug Safety: an International Journal of Medical Toxicology Drug and Experience**. v.17, p. 209-215, 1997.

CHEN, G.; ZHU, L.; LIU, Y.; ZHOU, Q. CHEN, H.; YANG, J. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, plays a dual role in regulating gastrointestinal motility *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**. v. 23, n.4, p. 498–506, 2009.

CHENG, C. W.; BIAN, Z.X.; WU, T.X. Systematic review of Chinese herbal medicine for functional constipation. **World Journal of Gastroenterology**. v.15, p.4886–4895, 2009.

CHOKRI, A.; DOUKALI, R.; ABIDA, E.; CHEIKH, B. Myorelaxant and Spasmolytic Effects of *Globularia alypum* L. Extract on Rabbit jejunum. **International Journal of Pharmacology**. v.6, n.5, p. 608 - 615, 2010.

CHRUBASIK, S., M. H. PITTLER, AND B. D. ROUFOGALIS. Zingiberis rhizome: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. **Phytomedicine**. v.12, p. 684–701, 2005.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. **Cell Calcium**, v.40, n.20, p.221 - 230, 2006.

DE SCHEPPER, H. U.; CREMONINI, F.; PARK, M. I.; KAMILLERI, M. Opioids and the gut: pharmacology and current clinical experience. **Neurogastroenterology & Motility**. v.16, p. 383–394, 2004.

DELAEY, C. K. the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in isolated bovine choroidal arteries. **Experimental Eye Research**. v.84, p.1067–1073, 2007.

DEVI, R.C.; SIM, S. M.; ISMAIL, R. Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cynopogon citratus* on isolated rabbit ileum. **Journal of Smooth Muscle Research**. v. 47, n.5, p. 143-156, 2011.

ENDALE, M.; SONG, J.C.; RHEE, M.H.; LIU, K.H.; KIM, T-K.; KWON, J.G.; PARK, K.S.; CHUNG, K.M.; KIM, T.W. Inhibitory effect of *Suaeda asparagoides* (Miq.)

extract on the motility of rat gastric antrum is mediated by β -adrenoceptor. **Laboratory Animal Research**. v. 27, n.4, p. 317–325, 2011.

EWE, K.; UEBERSCHAER, B.; PRESS, A.G. Influence of Senna, Fibre, and Fibre + Senna on Colonic Transit in Loperamide-Induced Constipation. **Pharmacology**. v. 47, p. 242-248, 1993.

FATEHI, M.; FARIFTEH, F.; FATEHI-HASSANABAD, Z. Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 91, p. 321–324, 2004.

FARR, CH.; MOSER, E.; FARR, L.; SCHÖNBORNBUCHHEIM, V. Therapy for chronic constipation with plant laxatives. **Modern Medicine**. 19: 54-60, 2002.

FEBRAFARMA 2007. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acessada em agosto de 2011.

FERNANDES, T.M. *Plantas Medicinais*: memória da ciência no Brasil. Rio de Janeiro: **Fiocruz**. p.260, 2004.

FERRANTE, J.; LUCHOWISK, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, (-) S Bay K 8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p.149 - 154, 1989.

FORNAI, M.; COLUCCI, R.; ANTONIOLI, L.; GHISU, N.; TUCCORI, M.; GORI, G.; BLANDIZZI, C.; DEL TACCA, M. Effects of a Bicarbonate–Alkaline Mineral Water on Digestive Motility in Experimental Models of Functional and Inflammatory Gastrointestinal Disorders. **Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology**. v.30, p.1-9, 2008.

GHAYUR, M. N.; GILANI A. H. Pharmacological basis for the medicinal use of ginger in gastrointestinal disorders. **Digestive Diseases and Sciences**. v.50, p.1889 – 1897, 2004.

GILANI, A.H.; SHAHEEN, F.; CHRISTOPOULOS, A.; MITCHELSON, F. Interaction of ebeinone, an alkaloid from *Fritillaria imperialis*, at two muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Life Sciences**. v.60, p.535–544, 1997.

- GILANI, A.H.; AZIZ, N.; KHURRAM, I.M.; CHAUDHARY, K.S.; IQBAL, A. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. **Journal of the Pakistan Medical Association**. v.51, p.115-120, 2001.
- GILANI, A.H.; BASHIR, S.; JAMBAZ, K.H.; SHAH, A.J. Presence of cholinergic and calcium channel blocking activities explains the traditional use of *Hibiscus rosasinensi*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.102, n.2, p. 289-94, 2005.
- GILANI, A. H.; KHAN, A-U.; JABEEN, Q. FAZAL SUBHAN, F. Rukhsana Ghafar Antispasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K⁺ channel activation. **Journal of Ethnopharmacology**. v.100, n. 3, p.14, 2005.
- GODFRAIND, T.; MILLER, R.; WIBO, M. Calcium antagonist and calcium entry blockade. **Pharmacological Reviews**. v.38, p.321- 416, 1986.
- GULLIKSON, G.W.; BASS, P.. Mechanism of action of laxative drugs. **Pharmacology of Intestinal Permeation II**. New York: Springer-Verlag, p. 419-459, 1984.
- GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilatation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, p.242 - 251, 1994.
- HADDY, F. J.; VANHOUTTE, P. M.; FELETOU, M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative, Comparative Physiology**. v.290, p. 546–552, 2006.
- HISHINUMA, S.; SHOJI, M. Desensitization of depolarization-mediated contractile pathways does not necessarily regulate receptor-mediated excitation–contraction coupling in longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.38, p. 233–238, 2011.
- HOLZER, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. **Regulatory Peptides**. v. 155, p.11–17, 2009.
- HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. Pharmacotherapy of gastric acidity, peptic ulcer and gastroesophageal reflux disease. Apud: Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. (Eds.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 11^aed, p.967–981, 2006.

HORE, S. K., OTTALWAR, R.; KOLEY, K.M.; PATHAK, A.K. Possible involvement of cholinergic and adrenergic mechanisms in changing contractility of guinea pig ileum by *Ipomoea carnea*. **Journal of Ethnopharmacology** v. 71 , p. 253–259, 2000.

HORINOUCI, T.; TSUJITANI, M.; KOIKE, K. Pharmacological analysis of atypical beta-adrenoceptors in the guinea pig gastrointestinal tissue systems. **Nihon Yakurigaku Zasshi**, v.114, n.1, p.118P-122P, 1999.

HORINOUCI, T.; TANAKA, Y.; KOIKE, K. Beta-adrenoceptor subtypes involved in relaxations of guinea-pig gastrointestinal smooth muscles: distribution and signaling pathway of beta 3-adrenoceptors. **Nihon Yakurigaku Zasshi**. v.122, p. 54P-56P, 2003.

HORINOUCI, T.; TKOIKE, K. Functional identification of β 3-adrenoceptors in the guinea-pig ileum using the non-selective β -adrenoceptor antagonist (\pm)-bupranolol. **Journal of Autonomic Pharmacology**. v. 20, n.4, p. 253–258, 2000.

HU, J; GAO, W-Y.; GAO, Y.; LING, N-S.; HUANG, L-Q.; LIU, C-X. M3 muscarinic receptor- and Ca²⁺ influx-mediated muscle contractions induced by croton oil in isolated rabbit jejunum. **Journal of Ethnopharmacology**. v.129, p. 377–380, 2010.

HÜBNER, W-D.; ALKEN, R-G. Treatment of Patients Suffering from Constipation with Eucarbon Tablets. **Modern Medicine**. v. 21, p. 36-40, 2004.

IZZO, A. A.; SAUTEBIN, L.; BORRELLI, F.; LONGO, R.; CAPASSO, F. The role of nitric oxide in aloe-induced diarrhoea in the rat. **European Journal of Pharmacology**. v.368, p.43–48, 1999.

IZZO, A.A; GAGINELLA, T.S.; MASCOLO, N.; CAPASSO, F. Nitric oxide as a mediator of the laxative action of magnesium sulphate. **British Journal of Pharmacology**. v.113, p. 228-232, 1994.

JEON, J. R.; CHOI, J. H. Lactic Acid Fermentation of Germinated Barley Fiber and Proliferative Function of Colonic Epithelial Cells in Loperamide-Induced Rats. **Journal of Medicinal Food**. v.13, n.4, p. 950–960, 2010.

KAKINO, M.; TAZAWA, S.; MARUYAMA, H.; TSURUMA, K.; ARAKI, Y.; SHIMAZAWA, M.; HARA, H. Laxative effects of agarwood on low-fiber diet-induced constipation in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n.68, p. 1-8, 2010.

KLASCHIK, E.; NAUCK, F.; OSTGATHE, C. Constipation—modern laxative therapy. **Support Care Cancer**. v. 11, p. 679–685, 2003.

KNAUS, H-G.; GARCIA-CALVO, M.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Subunit Composition of the High Conductance Calcium-activated Potassium Channel from Smooth Muscle, a Representative of the *mSlo* and *slowpoke* Family of Potassium Channel. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n.6, p. 3921-3924, 1994.

KOYUNCUOGLU, H.; BERKMAN, K.; SABUNCU, H. Feeding, drinking, urine osmolality in DI Brattleboro rats: changes by morphine, naloxone, D-amino acids, prolyl-leucyl-glycinamide (PLG). **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 20, n.9, p.29 – 33, 1984.

KULKARNI, K. S. A Clinical Trial of Herbolax in Constipation during Post-operative Period. **The Antiseptic**. v. 98, n.7, p.252-253, 2001.

KULKARNI, S.K.; PATIL, C.S.; JAIN, N.K.; SINGH A. Modulatory effect of diclofenac on antispasmodic effect of pitofenone in cholinergic spasm. **Indian Journal of Experimental Biology**. v.42, n.6, p.567-569, 2004.

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

LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; LO W. H. Jasmine absolute (*Jasminum grandiflora* L.) and its mode of action on guinea-pig ileum in vitro. **Phytotherapy Research**. v.16, n.5, p. 437–439, 2002.

MACGREGOR, G. A.; ROTELLAR, C.; MARKANDU, N. D.; SAGNELLA, G. A. Contrasting effects of nifedipine, captopril, and propranolol in normotensive and hypertensive subjects. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.4, p. S358-362, 1982.

MAKHLOUF, M.G.,. Neuromuscular function of the small intestine. Apud: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, p. 977–990, 1994.

MANARA, L.; CROCI, T.; LAND, M. β_3 -adrenoceptors and intestinal motility. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 9, n. 4, p. 332–342, 2009.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M. Non-adrenergic non-cholinergic inhibition of gastrointestinal smooth muscle and its intracellular mechanism(s). **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v.24, n. 3, p. 261–268, 2010.

MEHMOOD, M. H.; AZIZ, N.; GHAIUR, M. N.; GILANI, A-H. Pharmacological Basis for the Medicinal Use of Psyllium Husk (*Ispaghula*) in Constipation and Diarrhea. **Digestive Diseases and Sciences**. v.56, p.1460–1471, 2010.

MEHMOOD, M. H.; SIDDIQI, H. S.; GILANI, A. H. The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca^{2+} channels. **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, p.856–865, 2011.

MERZOUKI, A.; ED-DERFOUFI, F.; MESA, J.M. Contribution to the knowledge of Rifian traditional medicine. II: Folk medicine in Ksar Lakbir district. **Fitoterapia**. v. 71, p. 278 – 307, 2000.

MITOLO-CHIEPPA, D.; MANSI, G.; RINALDI, R.; MONTAGNANI, M.; POTENZA, M. A.; GENUALDO, M.; SERIO, M.; MITOLO, C. I.; RINALDI, M.; ALTOMARE, D. F.; MEMEO, V. Cholinergic Stimulation and Nonadrenergic, Noncholinergic Relaxation of Human Colonic Circular Muscle in Idiopathic Chronic Constipation. **Digestive Diseases and Sciences**. v.43, n.12, p. 2719 – 2726, 1998.

NAGAO, M.; LINDEN, D.R.; DUENES, J.A.; SARR, M. G. Mechanisms of action of the gasotransmitter hydrogen sulfide in modulating contractile activity of longitudinal muscle of rat ileum. **J Gastrointest Surg**. v.15, n.1, p.12–22, 2011.

NASERI, G.M.K.; MOGHADDAM, A.M.; BAHADORAM, S. Antispasmodic effect of *Tecoma stans* (L.) Juss leaf extract on rat ileum. **DARU**. v.15, n.3, p. 123 -128, 2007.

NEHER, E.; SAKMANN, B. The patch clamp technique. **Scientific American**. v.266, p. 44–51, 1992.

NELSON, M.T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial muscle. **American Journal of Physiology**. v.268, p.C799 - C822, 1995.

NETTO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A.C.B. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **Rev. Fitos**, v.1, n.3, p. 9-17, 2006. OMS. Nota Descritiva N° 312. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/_index.html>. Acesso em 25 dez. 2011.

PALOMBO, E. A. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. **Phytotherapy Research**. v. 20, p. 717–724, 2006.

PESSOA, H. L. F.; OLIVEIRA, R. C. M.; SILVA, J. L. V.; SANTOS R. F.; DUARTE, J.C.; COSTA, M. J. C.; SILVA, B. A. Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.1, p.76-84, 2007.

PUETZ, S.; LUBOMIROV, L.T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology**. v. 24, n. 6, p. 342-356. 2009.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calciumsensitizing stimulus. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. v. 288, p. C769–C783, 2005.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Willians & Wilkins, p.1-14, 1996.

ROBERTS, S.J.; PAPAIOANNOU, M.; EVANS B.A.; SUMMERS, R.J. Characterization of β -adrenoceptor mediated smooth muscle relaxation and the detection of mRNA for β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors in rat ileum. **British Journal of Pharmacology**. v.127, p.949 – 961, 1999.

ROBERTSON, D. W.; STEINBERG, M. I. Potassium Channel Modulators: Scientific Applications and Therapeutic Promise. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 33, n. 6, 1990.

ROERIG, J.L.; STEFFEN, K.J.; MITCHELL, J.E.; ZUNKER, C. Laxative abuse: epidemiology, diagnosis and management. **Drugs**. v.70, n.12, p.1487-1503, 2010.

SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R. et. al. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca^{2+} channels. **Nature**. v.303, p.535 – 537, 1983b.

SHABALINA, I.; WIKLUND, C.; BENGTSSON, T.; JACOBSSON, A.; CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Uncoupling protein-1: involvement in a novel pathway for α -adrenergic, cAMP-mediated intestinal relaxation. **American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**. v. 283, p. G1107–G1116, 2002.

SHI, C.C.; LIAO, J.F.; CHEN, C.F. Spasmolytic Effects of Three Harmala Alkaloids on Guinea-Pig Isolated Trachea. **Pharmacology & Toxicology**. v. 89, p. 259–264, 2001.

SHIMOTOYODOME, A.; MEGURO, S.; HASE, T.; TOKIMITSU, I.; SAKATA, T. Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** . v.126, p. 203–211, 2000.

SIEGEL, J. D.; DI PALMA, J. A. Medical Treatment of Constipation. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**. v. 18, n. 2, p. 76 - 80, 2005.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 51, p. 1-15, 1996.

SPRIET, A.; DUPIN-SPRIET, T.; SIMON, P. (Ed.). **Methodology of clinical drug trials**. 2nd ed. London: Karger.1994.

STICKNEY, J. C.; NORTHUP, D. W. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 1959.

SUCKOW, M.A.; WEISBROTH, S.H.; FRANKLIN, C.L. **The Laboratory Rat**. New York: Elsevier. 2006.

SUGURO, M.; MATSUYAMA, H.; TANAHASHI, Y.; UNNO, T.; KITAZAWA, T.; YAMADA, N.; KOMORI, S. Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Ca²⁺ Sensitization of Intestinal Smooth Muscle Contraction: Studies with Receptor Knockout Mice. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.72, n.4, p. 443–451, 2010.

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

TANAKA, Y.; HORINOUCI, T.; KOIKE, K. New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.32, n.7, p.503-514, 2005.

TIWARI, S. Plants: A Rich Source of Herbal Medicine. **Journal of Natural Products**, v.1, p.27-35, 2008.

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. Electrical Activity (Spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscle. **Smooth muscle: An assesment of current knowledge**. p. 127-156, 1981.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, n. 2, p. 290-291, 2006.

VENTURA-MARTÍNEZ, R.; RIVERO-OSORNO, O.; GÓMEZ, C.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M.E. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. **Journal of Ethnopharmacology**. p.1528-1532, 2011.

WALSH JR, J.V.; SINGER, J.J. Calcium action potentials in single freshly isolated smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**. v. 239, p. C162–C174, 1980.

WANG, X.; ZHANG, F.; LIU, ZX.; FENG, HZ.; YU, Z. B.; LUA, Y.Y.; ZHAI HH.; BAI, FB.; SHI, YQ.; LANA, M.; JIN, JP.; FAN, DM. Effects of essential oil from *Croton tiglium* L. on intestinal transit in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v.117, p. 102–107, 2008.

WINDISCH, W.; SCHEDULE, K .; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry1. **Journal of Animal Science**. v. 86, p. E140–E148, 2008.

WINTOLA, O. A.; SUNMONU, T. O.; AFOLAYAN, A. J. The effect of *Aloe ferox* Mill. in the treatment of loperamide-induced constipation in Wistar rats. **BMC Gastroenterology**. p.1-5, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Monographs on selected medicinal plants. Geneva, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional, Complementary and Alternative Medicines and Therapies. Washington DC, WHO Regional Office for the Americas/Pan American Health Organization (Working group OPS/OMS); 1999.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Ames,Iowa, USA: Blackwell Publishing Ltd. p.427, 2003.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D. J. Pharmacological, Radioligand binding, electrophysiological characteristics of FPL 64176, a novel nondihydropyridine Ca²⁺ channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology**. v. 40, p. 734-741, 1991.

Anexos

ANEXO A – CERTIDÃO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL**PgPNSB**Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL
CERTIDÃO**

João Pessoa, 31 de agosto de 2011

CEPA Nº. 0406/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Prof(a). Dr(a). ISAC ALMEIDA DE MEDEIROS E ROBSON
CAVALCANTE VERAS

Orientanda: VALÉRIA LOPES DE ASSIS

Departamento/Setor: LTF

Ref.: ENSAIOS FARMACOLÓGICOS E PRÉ-CLÍNICOS DE UM MEDICAMENTO
FITOTERÁPICO

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.

Número de animais: 50 camundongos e 25 cobaias.

Período: Até fevereiro de 2012.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB

ANEXO B – PROTOCOLO - TRIAGEM FARMACOLÓGICA COMPORTAMENTAL

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito aumentado, (++) efeito intenso				
	até 30'	1h	2h	3h	4h
1 – SNC					
a – Estimulante					
Hiperatividade					
Irritabilidade					
Agressividade					
Tremores					
Convulsões					
Piloereção					
Movimento intenso das vibrissas					
Outras _____					
b – Depressora					
Hipnose					
Ptose palpebral					
Sedação					
Anestesia					
Ataxia					
Reflexo do endireitamento					
Catatonía					
Analgesia					
Resposta ao toque diminuído					
Perda do reflexo corneal					
Perda do reflexo auricular					
c – Outros comportamentos					
Ambulação					
Bocejo excessivo					
Limpeza					
Levantar					
Escalar					
Vocalizar					
Sacudir a cabeça					
Contorções abdominais					
Abdução das patas do trem posterior					
Pedalar					
Estereotipia					
2 - SN AUTÔNOMO					
Diarréia					
Constipação					
Defecação					
Respiração forçada					
Lacrimejamento					
Micção					
Salivação					
Cianose					
Tono muscular					
Força para agarrar					
3 – MORTE					

Fonte: ALMEIDA et al., 1999.