



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA GERAL E ESPECÍFICA DO
EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Quassia*
amara L. (SIMAROUBACEAE) E EFEITO DOS COMPOSTOS
ISOLADOS NAS P-ATPASES DE MAMÍFEROS $H^{+}.K^{+}$ -ATPASE E
 CA^{2+} -ATPASE

JULIANA SIMPLÍCIO BARROS

MANAUS

2010



Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Mestrado em Biotecnologia

JULIANA SIMPLÍCIO BARROS

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA GERAL E ESPECÍFICA DO
EXTRATO AQUOSO E DA FRAÇÃO BUTANÓLICA DE *Quassia*
amara L. (SIMAROUBACEAE) E EFEITO DOS COMPOSTOS
ISOLADOS NAS P-ATPASES DE MAMÍFEROS $H^{+}.K^{+}$ -ATPASE E
 CA^{2+} -ATPASE

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia, área de
concentração Biotecnologia para a saúde

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa
Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Mirtes Midori Tanae

MANAUS

2010

JULIANA SIMPLÍCIO BARROS

Título: Atividade Farmacológica Geral e Específica do Extrato Aquoso e da Fração Butanólica de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) e Efeito dos Compostos Isolados nas P-ATPases de Mamíferos $H^+.K^+$ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia a Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde.

Data: Manaus, 29 de Novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr. Antonio Jose Lapa
Universidade do Federal do Amazonas – UFAM
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Prof. Dr. Elson Alves Costa
Universidade Federal de Goiás – UFG

Profa. Dra. Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

DEDICATÓRIAS

À minha querida mãe, Maria do Socorro Simplício Barros (in memoriam). Essa vitória é integralmente sua, por todo sacrifício para que eu chegasse até esse momento, por me ensinar a nunca desistir dos meus sonhos, por teres me educado e me tornado uma pessoa íntegra. Obrigada por toda força nas minhas escolhas, pelos mimos, pelas broncas, pela experiência de vida. Por ti. Por tudo.

Ao meu pai, José Dorneles Neves, que mesmo não tendo acompanhado esta árdua caminhada, me despertou desde cedo a curiosidade e o gosto pela leitura. Sei que a distância não impediu que torcesses por mim diariamente e nem diminui o nosso carinho e amizade.

Ao Dr. Antonio José Lapa pela amizade, pelo apoio, pela orientação, pela paciência, pela disposição, pelo privilégio das conversas, pelas puxadas de orelha, pela imensa sabedoria e pelo conhecimento adquirido. Todo o MUITO OBRIGADO será pouco diante do tamanho da minha real gratidão.

À minha querida co-orientadora Dra. Mirtes Midori Tanae. Sua total doação à nós mestrandos poderia ser definida pela conhecida frase de Saint Exupéry: “Tú te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”. Meu eterno obrigada pela amizade, principalmente porque quebrastes a barreira entre o orientador e o orientando tornando mais fácil desenvolver este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado força para não desistir no meio do caminho e por ter me mantido firme na fé.

Aos meus tios (Haroldo, Lourdes, Liberty, Lecy e Suzy), primos (Jr. e Paulo, Jefferson e Bruno), irmãos (Tarick, Andretti, Taís e Amithay), Conceição e vó Clarice por todo apoio e suporte. Porém, quero agradecer especialmente aos meus tios Ricardo Neves e Waldiza Barros Correa por terem me adotado, acolhido e nunca negado o ombro amigo.

Ao meu irmão Daniel que, assim como eu, soube seguir em frente após a perda de nossa mãe e construiu uma família linda na qual sou totalmente grata (Naiara, Luisa, Jaci e Milanês).

Ao Thiago M. dos Santos por todo amor, carinho, compreensão, amizade, consolo, respeito e por fazer com que tudo se tornasse mais fácil na minha vida. Você me fez voltar a sorrir. Te amo minha vida. Sou grata também à Gecilda, Eugênio e Gigi.

Aos meus melhores amigos Dayana Seelig, Afonso Brito, Swammy Mitoso, Paula Almeida, Marcos Rêgo e Ivone Leite pela força, amizade e carinho que tiveram para comigo, tanto nos momentos difíceis como nos alegres que sempre foram regados com uma cervejinha.

Aos queridos amigos Adriana Mari, Claudia Bezerra, Cleonice O. Neta, Fábio Régis e Sandra Sales que mesmo não fazendo mais parte do CBA não deixaram que nossa amizade fosse esquecida no tempo. Vocês continuarão sempre no meu coração.

A todos os colegas do curso de pós-graduação em Biotecnologia da UFAM, em especial à Karla Feitosa, Suzana Martins, Eliene Duarte, Thiago Mattos e Lucinei Maciel por compartilharem comigo as tensões, ansiedade e vitórias. We are the champions!!

As mestras Kaori Isla, Siglia Neves e Thaís Biondo, por toda ajuda nos experimentos, amizade, desabafos, enfim, por todo o companheirismo.

Aos colegas de laboratórios Alzemir, Andrezza, Daniel, Débora, Fabíola, Francianny, Jefferson, Carol, Marnyce, Ricardo, Suelen e Tânia, afinal nós somos uma grande família.

Aos técnicos Eudson Danilo, M^a.Geane, Tony José e Vânia Braz e à secretária Jackeline Silva por toda ajuda, amizade e boas risadas.

Aos bioteristas Antônio Batista, Celina, Cláudia, Leandro Maquiné, Rosângela e Stener, por mostrarem-se sempre dispostos a nos ajudar e por cuidarem muito bem da base das nossas experimentações.

Aos professores do Instituto de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, Dra. Caden Souccar, Dra. Maria Teresa Riggio de Lima-Landman, Dra. Valderez Bastos Lapchick e Dr. Afonso Caricatti e, da Universidade Federal de Santa Catarina, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima, por sempre que precisávamos vocês interrompiam todos os seus compromissos e vinham até nós transmitir conhecimento e ajudar no que fosse preciso.

Aos colegas, técnicos e aos responsáveis do Setor de Produtos Naturais do Instituto de Farmacologia da UNIFESP por sempre nos receberem de braços abertos e pelas colaborações nos experimentos. Em especial, à bióloga Marcela Nering.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade concedida, em especial, à Magnífica reitora Dr.^a Márcia Perales Mendes Silva.

Aos coordenadores da Pós-graduação em Biotecnologia, Dr. José Odair Pereira e Spartaco Astolfi filho, por se mostrarem sempre prestativos às nossas dúvidas, pela oportunidade e facilidades oferecidas.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia, em nome do Dr. Imar Araújo e Aline Cristina Reis Lauria, e a toda administração. Aqui vai o meu muito obrigada.

A todos os colegas do setor de Biologia Molecular do CBA, em especial ao Dr. Tetsuo Yamane.

A todos os colegas da Central Analítica do CBA, em especial ao Dr. Massayoshi Yoshida

A todos os colegas do Núcleo de produção de Extratos do CBA, em especial ao coordenador Dr. Alberto Cardoso Arruda e à Dra. Cláudia Regina Ferreira Carioca.

A todos os colegas do laboratório de Fitoquímica do CBA sob coordenação do Dr. José Augusto Cabral.

Ao Antônio Augusto Batista Santos, responsável pelo laboratório de lavagem de esterilização de materiais.

À fundação Djalma Batista, pelo suporte financeiro à realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de uma forma direta ou indireta para a confecção deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Há, para todas as coisas, um tempo determinado por Deus: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de colher o que se plantou; tempo de derribar e tempo de edificar; tempo de chorar e tempo de rir; tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar; tempo de buscar e tempo de perder; tempo de estar calado e tempo de falar; tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de paz (Eclesiastes 3:1-8)”.

SUMÁRIO

Resumo	I
Abstrat	II
Lista de Ilustrações	III
Lista de Tabelas	V
Lista de Abreviaturas	VI
1 Introdução	01
2. Objetivos	08
2.1 Objetivo Geral	09
2.2 Objetivos Específicos	09
3. Revisão Bibliográfica	09
3.1 <i>Quassia amara</i> L.	10
3.2 ATPases - Tipos e Função	14
3.2.1 P-ATPases no Plasmódio	16
4. Metodologia	19
4.1 Material	20
4.1.1 Material Botânico	20
4.1.2 Análise Fitoquímica	21
4.1.2.1 Obtenção do Extrato Aquoso (EA) e Fração Butanólica (Fbut) de <i>Quassia amara</i> L.	21
4.1.2.2 Purificação da Fração Butanólica (Fbut) de <i>Quassia amara</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep)	22
4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica (CLAE-analítica) e Padronização do Extrato Ativo	23
4.1.3 Teste Preliminar da Atividade Antimalárica da Fbut de <i>Q. amara</i>	25
4.1.4 Animais	26
4.1.5 Drogas, Reagentes e Solventes	27
4.1.6 Composição das Soluções Utilizadas	27
4.1.6.1 Solução Utilizada no Estudo <i>in vitro</i>	27
4.1.6.2 Soluções Utilizadas no Estudos <i>in vivo</i>	28
4.1.6.3 Soluções Utilizadas na Determinação da Atividade da Ca^{+2} -ATPase ..	28
4.1.6.4 Soluções Utilizadas na Determinação da Atividade da H^{+} - K^{+} -ATPase	28
4.2 Métodos	29
4.2.1 Métodos para Detecção de Ação no Sistema Nervoso Central	29
4.2.1.1 Atividade Geral – Teste de Irwin	29
4.2.1.2 Campo Aberto (“Open Field”)	30
4.2.1.3 Sono Barbitúrico	30
4.2.1.4 Sono induzido por éter	31
4.2.1.5 Teste da Suspensão pela Cauda	31
4.2.1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	31
4.2.2 Métodos para Avaliação da Atividade Antiinflamatória e/ou Antinociceptiva	32
4.2.2.1 Teste da Formalina 1,5%	32
4.2.2.2 Teste de “Tail-Flick” (Retirada da Cauda)	33
4.2.2.3 Contorção Abdominal	33

4.2.2.4 Edema de Pata Induzido por Carragenina 1,0%	34
4.2.2.5 Migração Celular	34
4.2.2.6 Edema de Pata Induzido por Dextrana 0,1%	35
4.2.3 Métodos para Detecção dos Efeitos no Sistema Gastrointestinal	35
4.2.3.1. Trânsito Intestinal	35
4.2.3.2 Atividade Anti-úlceras	36
4.2.3.2.1 Lesão Gástrica Induzida por Estresse	36
4.2.3.2.2 Lesão Gástrica Induzida por Etanol 75%	36
4.2.3.3 Avaliação do Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> na Secreção Ácida Gástrica	38
4.2.3.3.1 Método da Ligadura pilórica	38
4.2.4 Determinação da Atividade da $H^+-K^+-ATPase$ da Mucosa Gástrica de Porco	39
4.2.4.1 Caracterização da $H^+-K^+-ATPase$	40
4.2.5 Determinação da Atividade da $Ca^{+2}-ATPase$ (SERCA1)	40
4.2.5.1 Caracterização da $Ca^{+2}-ATPase$ (SERCA1)	41
4.2.6 Determinação do Teor de Proteína	42
4.2.7 Efeito da Fbut e Frações Purificadas no Músculo Diafragma de Camundongo sob Estímulo Elétrico Direto	42
4.2.8 Análises Estatísticas	43
5. Resultados	44
5.1. Efeito do Extrato Aquoso (EA) ou Fração Butanólica (Fbut) de <i>Q. amara</i> no Sistema Nervoso Central	45
5.1.1 Atividade Geral - Teste de Irwin	45
5.1.2 Campo Aberto (Teste do “Open Field”)	45
5.1.3 Sono Barbitúrico	47
5.1.4 Sono Induzido por Éter Etílico	49
5.1.5 Suspensão pela Cauda	50
5.1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	51
5.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória e/ou Antinociceptiva do Extrato aquoso (EA) de <i>Q. amara</i> L.	52
5.2.1 Teste da Formalina 1,5 %	52
5.2.2 Teste do “Tail-Flick” (Retirada da Cauda)	53
5.2.3 Contorção Abdominal	54
5.2.4 Edema de Pata induzido por Carragenina 1,0 %	55
5.2.5 Migração celular	57
5.2.6 Edema de pata induzido por dextrana 0,1 %	57
5.3 Efeito do Extrato Aquoso (EA) ou da Fração Butanólica (Fbut) de <i>Q. amara</i> L. no Sistema Gastrointestinal	59
5.3.1. Trânsito Intestinal	59
5.3.2 Atividade Anti-úlceras do Extrato Aquoso (EA) de <i>Q. amara</i> L.	60
5.3.2.1 Lesão Gástrica Induzida por Estresse	60
5.3.2.2 Lesão Gástrica Induzida por Etanol 75%	61
5.3.3 Avaliação da Atividade da Fração Butanólica (Fbut) de <i>Q. amara</i> na Secreção Ácida Gástrica	62
5.3.3.1 Método da Ligadura pilórica	62
5.4 Dosagem da Atividade Enzimática	66
5.4.1 Atividade da FBut e Frações Purificadas na $H^+-K^+-ATPase$	66
5.4.2 Atividade da FBut e Frações Purificadas na $Ca^{+2}-ATPase$ (SERCA1) ...	69
5.5 Efeitos da Fbut e Frações Purificadas no Músculo Diafragma de Camundongo sob Estímulo Elétrico Direto.....	72

6. Discussão	74
7. Sumário & Conclusão	95
8. Referências	100

RESUMO

A *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) é árvore de pequeno porte, de ampla distribuição amazônica, conhecida como pau-amargo; o chá das folhas e cascas é utilizado na medicina popular para distúrbios gástricos e na malária. Da planta foram isolados alcalóides indólicos e β -carbolínicos, esteróides e quassinóides (quassina e neoquassina) avaliados em modelos do parasitismo animal com resultados promissores, mas ainda iniciais. Estudos farmacológicos anteriores realizados com extratos apolares sem padronização, descrevem atividades sedativa, analgésica, anti-inflamatória, emoliente e anti-úlceras gástrica. Em vista da reputação da *Q. amara* na medicina popular e da pouca consistência científica dos resultados disponíveis na literatura, este trabalho retomou o estudo das ações sistêmicas do extrato aquoso padronizado da planta nativa coletada na região de Manaus. Da padronização química foram obtidos extratos semi-purificados e frações de alto grau de pureza, que serviram também ao estudo do mecanismo das ações detectadas experimentalmente. Nesses estudos, o uso popular na malária nos levou também a investigar as ações farmacológicas dos extratos purificados e frações nas H^+-K^+ -ATPase e Ca^{+2} -ATPase de mamíferos, P-ATPases essas que guardam elevada homologia estrutural com as isoenzimas do *Plasmodium* sp. essenciais à sua sobrevivência. A padronização química do EA da *Q. amara* foi obtida após partição em butanol dando origem à fração butanólica (FBut) de mesma atividade e 5 vezes mais concentrada. A purificação da FBut por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) originou 18 frações de elevado grau de pureza (F1 a F18) que encontram-se em processo de identificação. A triagem farmacológica do EA e da FBut mostrou ação pouco marcada no SNC. O EA mostrou ação anti-inflamatória, aparentemente associada à inibição dos mediadores pró-inflamatórios histamina e serotonina, mas não mostrou efeito analgésico. O EA aumentou a motilidade gastrointestinal e inibiu as úlceras gástricas induzidas por estresse e por etanol. A FBut, em doses 10 vezes menores, inibiu a secreção e a acidez gástrica *in vivo*, a dose intermediária inibiu a acidez total estimulada pela histamina, mas não alterou quando induzida por betanecol (agonista muscarínico), indicando provável ação seletiva na via da histamina/AMPC. A FBut e as frações isoladas em CLAE F10, F14 e F15 potenciaram a contração do músculo diafragma de rato sob estímulo elétrico direto. A FBut e frações F05, F06, F08, F09, F10, F13, F14, F15 e F16 inibiram a atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético; este efeito pode explicar a potenciação da contração do músculo diafragma. A FBut e as frações F11, F12, F13 e F16 inibiram a atividade da H^+-K^+ -ATPase da mucosa gástrica *in vitro*; este efeito pode explicar a atividade antissecretora ácida e a atividade anti-úlceras observadas *in vivo*, provavelmente relacionadas com o uso popular mais freqüente.

Palavras-Chave: *Quassia amara* L., P-ATPases, Anti-úlceras, Secreção ácida-gástrica

ABSTRACT

Quassia amara L. (Simaroubaceae) is a small tree, widely distributed in the Amazon, known as “pau-amargo”. The tea from its leaves and bark are used in popular medicine for gastric disorders and malaria. β -carboline and indolic alkaloids, steroids and quassinoids (quassin and neoquassin) were isolated from this plant and evaluated in animal models of malaria with promising results, but still preliminary. Previous pharmacological studies performed with non-standardized apolar extracts, reported sedative, analgesic, anti-inflammatory, emollient and anti-ulcer activities. In view of the reputation of *Q. amara* in folk medicine and scarce consistent results in the scientific literature, this work studied the systemic actions of the standardized extracts from the native plant collected in the region of Manaus. Semi-purified extracts and high purity fractions were obtained from the chemical standardization and were used to study the mechanisms of actions detected experimentally. In these studies, the popular use of *Q. amara* in malaria led us also to investigate the pharmacological actions of its extracts and purified fractions in mammalian P-ATPases (H^+-K^+ -ATPase and Ca^{+2} -ATPase) that have high structural homology with isoenzymes essential to the *Plasmodium* survival. The standardized extract was obtained by the partition of *Q. amara* AE in butanol originating the butanolic fraction (BuF) with the same pharmacological activity and fivefold more concentrated than AE. The purification of BuF by high performance liquid chromatography (HPLC) yielded 18 high purity fractions (F1 to F18), still in identification process. The pharmacological screening of AE and BuF did show remarkable action in the CNS. AE showed anti-inflammatory effect, apparently associated with the inhibition of pro-inflammatory mediators histamine and serotonin, but no analgesic action was observed. AE increased gastrointestinal motility and inhibited the gastric ulcers induced by stress and ethanol. BuF at tenfold lower doses inhibited the secretion and gastric acidity *in vivo* and the intermediate dose inhibited the total acidity stimulated by histamine, but did not when induced by bethanechol (muscarinic agonist), indicating a possible selective action in the histamine/cAMP pathway. The BuF and fractions isolated by HPLC F10, F14 and F15 potentiated the direct elicited twitches in the rat diaphragm muscle. In the Ca^{+2} -ATPase isolated from skeletal muscle, the BuF and fractions F05, F06, F08, F09, F10, F13, F14, F15, F16 inhibited its activity and this effect may explain the potentiation of the diaphragm contraction. The FBut and fractions F11, F12, F13 and F16 inhibited the H^+-K^+ -ATPase activity from the gastric mucosa *in vitro*; this effect may explain the anti-secretory and anti-ulcer activity observed *in vivo*, effects related to the mainly popular use of *Q. amara*.

Keywords: *Quassia amara* L., P-ATPases, Anti-ulcer, Gastric acid secretion

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – <i>Quassia amara</i> L. <i>in situ</i> .	11
Figura 02 – Quassinóides isolados do extrato de folhas de <i>Quassia amara</i> L.	12
Figura 03 – Resumo dos diferentes tipos de ATPases de transporte.	15
Figura 04 – Ca^{2+} -ATPase do parasita da malária	18
Figura 05 – Local da coleta do material vegetal.	20
Figura 06 - Fluxograma de extração e fracionamento da fração butanólica de <i>Quassia amara</i> por CLAE-preparativa.	23
Figura 07 – Perfil cromatográfico da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> em CLAE analítico.	24
Figura 08 – Perfis cromatográficos das frações isoladas a partir da fração butanólica de <i>Q. amara</i> em CLAE analítico.	24
Figura 09 - Teste da atividade antimalárica da fração butanólica (FBut) de <i>Q. amara</i> .	26
Figura 10 - Efeito da fração butanólica de <i>Q. amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no número de levantares no teste do campo aberto	46
Figura 11 -. Efeito do extrato aquoso de <i>Q. amara</i> (EA 0,05; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no teste do sono induzido por pentobarbital sódico.	47
Figura 12 - Efeito da fração butanólica de <i>Q. amara</i> (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no teste do sono induzido por pentobarbital sódico.	48
Figura 13 - Efeito do extrato aquoso de <i>Q. amara</i> (EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no teste do sono induzido por éter etílico	49
Figura 14 - Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no teste da suspensão pela cauda.	50
Figura 15 - Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no tempo de permanência nos braços abertos do LCE.	51
Figura 16 - Efeito do EA de <i>Q. Amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) sobre o tempo de reação da lambida de pata induzido por formalina 1,5%.	52
Figura 17 –Efeito do EA de <i>Q. Amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na resposta à imersão da cauda de ratos em água aquecida à 50°C no teste do “Tail Flick”.	53
Figura 18 – Efeito do EA de <i>Q. Amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o) no número de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético a 1 %.	54
Figura 19 – Efeito do EA de <i>Q. amara</i> (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) na variação do volume (Δ mL) do edema de pata induzida por carragenina 1,0 % .	56
Figura 20 – Efeito do EA de <i>Q. amara</i> (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) no teste da migração celular induzida por carragenina 1,0 % (i.p.).	57
Figura 21 - Efeito do EA de <i>Q. amara</i> (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) na variação do volume do edema de pata (Δ mL) induzido por dextrana 0,1 %.	58
Figura 22 - Efeito do EA de <i>Q. amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no trânsito intestinal.	59
Figura 23 - Efeito do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de <i>Q. amara</i> no número de úlceras e no índice de lesão induzidos pelo estresse por imobilização à 4°C.	60
Figura 24 – Efeito do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de <i>Q. amara</i> no número de úlceras e índice de lesão induzidos por etanol 75%.	61
Figura 25 – Efeito da FBut (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg) de <i>Q. amara</i> no volume, no pH luminal e na acidez total da secreção gástrica, em ligadura pilórica de 4 h.	63
Figura 26 – - Efeito da FBut (0,03 g/kg, i.d.) de <i>Q. amara</i> no volume do suco	64

gástrico, no pH luminal e na acidez total estimulada pelo secretagogo histamina (40 mg/kg) em ligadura pilórica de 4 h.	
Figura 27 Efeito da FBut (0,03 g/kg, i.d.) de <i>Q. amara</i> no volume do suco gástrico, no pH luminal e na acidez total estimulada pelo secretagogo betanecol (20 mg/kg) em ligadura pilórica de 4 h.	65
Figura 28 - Efeito do SCH 28080 (3 a 1000 μ M) (A) e FBut (1,0 a 100 μ g/mL) de <i>Q. amara</i> (B) na atividade da H^+-K^+ -ATPase isolada da mucosa gástrica de porco.	67
Figura 29 – Efeito das frações purificadas da FBut de <i>Q. amara</i> F01a F05 (A) e F06 a F10 (B) na atividade da H^+-K^+ -ATPase de mucosa gástrica de suíno.	67
Figura 30 - Efeito das frações purificadas da FBut de <i>Q. amara</i> na atividade da H^+-K^+ -ATPase de mucosa gástrica de suíno.	68
Figura 31 - Efeito da FBut de <i>Q. amara</i> na atividade da Ca^{+2} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho.	69
Figura 32 - Efeito das frações F1, F2, F3, F4, F7, F11 e F12 (0,3; 1,0; 3,0 e 10 μ g/mL) de <i>Q. amara</i> na atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho.	70
Figura 33 - Efeito das frações purificadas da FBut de <i>Q. amara</i> na atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho	71
Figura 34 – Efeitos da FBut de <i>Q. amara</i> (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) na contração do músculo do diafragma de camundongo.	73
Figura 35 - Efeito das frações purificadas de <i>Q. amara</i> na contração do músculo diafragma de camundongo.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontuação atribuída às lesões gástricas produzidas no estômago de roedores por estresse a frio e etanol 75%	37
Tabela 2 - Efeito do tratamento com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) da <i>Q. amara</i> no teste do campo aberto em camundongos.	46
Tabela 03 – Efeito do tratamento com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), em camundongos, no labirinto em cruz elevado (LCE).	51
Tabela 04 – Efeito do tratamento com o extrato aquoso (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na resposta à imersão da cauda de ratos em água a 50° C (teste do “Tail-Flick”).	53
Tabela 05 – Efeito do tratamento com o extrato aquoso (EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no número de contorções induzidas pela administração de ácido acético a 1 % (i.p.), em camundongos.	55
Tabela 06 – Efeito do tratamento com extrato aquoso de <i>Q. amara</i> (EA 0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) no volume do edema de pata induzido por carragenina 1,0 % (i.pl.) em ratos.	56
Tabela 07 – Efeito do tratamento com o EA de <i>Q. amara</i> (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) no volume de pata induzido por dextrana 0,1% (i.pl.) em ratos.	58
Tabela 08 – Efeito da FBut (0,1 a 100 µg/mL) de <i>Q. amara</i> e frações purificadas (0,3 a 10 µg/mL) na atividade da H ⁺ -K ⁺ -ATPase da mucosa gástrica de suíno após 30 minutos de incubação à 37°C.	81
Tabela 09 – Efeito da FBut (0,1 a 100 µg/mL) de <i>Q. amara</i> e frações purificadas (0,3 a 10 µg/mL) na atividade da Ca ⁺² -ATPase de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação à 37°C.	84

LISTA DE ABREVIATURA

^{13}C RNM – Resonância Magnética Nuclear de Carbono 13
 ^1H RNM - Resonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
 Abs - absorbância
 ACh - acetilcolina
 ADP – Adenosina 5'- difosfato
 ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 ATP - Adenosina 5' - trifosfato
 ATPase - Adenosina trifosfatase
 C - controle
 CaCl_2 - cloreto de cálcio
 CBA - Centro de Biotecnologia da Amazônia
 CEP - comitê de ética em pesquisa
 CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
 CLAE-prep - cromatografia líquida de alta eficiência preparativa
 Cox-2 - ciclooxigenase 2
 DAG - Diacilglicerol
 D-tc - d-tubocurarina
 DZP - Diazepam
 EA - extrato aquoso
 EC_{50} - concentração efetiva de 50%
 EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
 EGTA - ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético
 FA - fração aquosa
 FBut - fração butanólica
 G – Giros
 Hex - hexano
 IC_{50} - concentração inibitória de 50%
 I.d - intraduodenal
 I. pl. - via intra-plantar
 I.p. - via intraperitoneal
 IP_3 – Inositol 1,4,5 - trifosfato
 IL-1 β - interleucina do tipo 1 β
 INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
 KCl - cloreto de potássio
 LCE - labirinto em cruz elevado
 MgCl_2 - cloreto de magnésio
 Na_2HPO_4 - fosfato dissódico
 NaCl - cloreto de sódio
 NaH_2PO_4 – dihidrogeno fosfato monossódico
 NaHCO_3 - bicarbonato de sódio
 NaOH - hidróxido de sódio
 NF- κB - fator nuclear kappa B
p - valor de prova
 Pi - fosfato inorgânico
 RE – Retículo Endoplasmático
 Rpm - rotações por minuto
 S.c - via subcutânea
 SNA - sistema nervoso autônomo

TCA - ácido tricloroacético

TNF α - fator de necrose tumoral α

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UV - ultravioleta

V.o. - via oral

WHO – World Health Organization



I. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para o tratamento de enfermidades é documentado desde as primeiras civilizações e, por vezes, ainda hoje, é o único recurso acessível a comunidades menos desenvolvidas. Ao lado desse uso imediato, comunidades desenvolvidas passaram a utilizá-las como fontes de produtos curativos, mais tarde moléculas inovadoras com potenciais efeitos terapêuticos que vieram auxiliar na identificação de alvos farmacológicos (PHILLIPSON *et al.*, 2001; PUPO *et al.*, 2007).

A WHO definiu planta medicinal como "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" (WHO, 1998).

No Brasil, das 60 mil espécies de plantas superiores catalogadas, apenas 8 % foram estudadas na pesquisa de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas quanto a suas propriedades medicinais (GUERRA; NODARI, 2001).

As plantas vasculares da Floresta Amazônica sempre foram as mais estudadas, mas poucas áreas foram exploradas botanicamente, o que dificulta o conhecimento das espécies presentes e suas relações filogenéticas (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A identificação taxonômica, embora seja essencial, não é garantia de obtenção de compostos ativos, pois, além das influências macro do ecossistema como luz, água, calor e fertilidade do solo, microorganismos endofíticos parecem modular a expressão gênica dos metabólitos secundários na planta hospedeira, principalmente se a sua ação for propiciada por aqueles fatores físicos, químicos e biológicos do ecossistema (STROBEL *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 1999).

Uma das principais razões para o estudo de extratos vegetais é o fato de muitos medicamentos disponíveis no mercado serem de origem natural, ou terem sido sintetizados a partir de compostos naturais. Na atualidade, técnicas químicas modernas têm permitido o acesso rápido a novas moléculas biologicamente ativas e facilitado seu estudo como

protótipos para a síntese de novos fármacos (TULP *et al.*, 2002; CECHINEL FILHO *et al.*, 1995).

Diante dessa potencialidade científica e dos benefícios sócio-econômicos advindos com medicamentos fitoterápicos, esforços estão se intensificando no Brasil e no mundo, para harmonizar sua caracterização científica de tal forma a unificar a legislação dos órgãos governamentais e exigências legais para inserção dos fitoterápicos na Saúde Pública.

No Brasil essa normatização foi importante para a aproximação das empresas aos centros de pesquisas acadêmicos, possibilitando a realização de parcerias para a execução de alguns desses estudos (ALVES *et al.*, 2004). Por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução nº 89/2004 (BRASIL, 2004a), publicou uma lista de fitoterápicos de registro simplificado e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos e o limite diário para seu consumo. O registro de plantas que não constam desta lista, exigirá avaliação prévia segundo as normas da Resolução nº 48 de 16 de março de 2004, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004b). Em resumo, será necessário apresentar comprovação da segurança de uso (toxicologia pré-clínica e toxicologia clínica) e da eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica e farmacologia clínica) do pretense medicamento. Outras regulamentações específicas para medicamentos fitoterápicos deverão também ser atendidas, entre elas a Resolução nº 90/2004 - um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica - e a Resolução nº 91/04 - um guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro (BRASIL, 2004c; BRASIL, 2004d). Portanto, novos fitoterápicos e outros medicamentos originados de planta deverão ser avaliados com recursos modernos que demonstrem sua eficácia e a segurança do uso terapêutico.

No entanto, plantas medicinais ainda são utilizadas com base na crença popular, o que faz com que poucas delas sejam avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos para produção em escala (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

É o caso especial das populações que vivem em áreas endêmicas de malária: além de usarem redes e mosquiteiros impregnados de inseticidas e dos medicamentos disponibilizados pelos serviços de saúde, os caboclos utilizam também plantas medicinais para prevenir ou tratar a doença; a *Chinchona spp.* foi o sucesso da medicina popular da América do Sul, como a *Artemisia annua* foi na China. Desses exemplos clássicos, foram extraídos a quinina e artemisinina, respectivamente (WHITE *et al.*, 1999), que deram origem a quase todos os análogos hoje utilizados no controle da doença.

No entanto, com a viabilização da síntese dos primeiros antimaláricos e com a obtenção de análogos mais seguros, a demanda terapêutica por produtos naturais foi muito reduzida. Muitas outras plantas utilizadas para tratar malária deixaram de ser estudadas. Recentemente, quase um século depois, a malária recrudescceu nos trópicos porque os parasitas desenvolveram tolerância progressiva à maioria daqueles compostos sintéticos. As dificuldades no desenvolvimento de vacinas eficazes e na síntese de novos antimaláricos reacenderam o interesse pelas plantas utilizadas nas áreas endêmicas (WHO, 2008; CRAVO *et al.*, 2001; ALMEIDA, 2007).

A malária é uma doença infecciosa causada por várias espécies de *Plasmodium*, um protozoário transmitido ao homem por picada de mosquito do gênero *Anopheles*. Nas áreas endêmicas do Brasil foram estimados cerca de 1,4 milhões de infectados em 2006, mais de 350.000 casos na Amazônia Legal entre 2001–2007, com um pico máximo superior a 600.000 em 2005 (WHO, 2008).

Como mencionado, a resistência desenvolvida pelos parasitas às drogas antimaláricas atuais tornou-se a razão primordial das pesquisas que buscam novos medicamentos para

substituí-los. As causas da resistência parasitária são múltiplas e de difícil controle; por exemplo, pode ser devida ao uso inadequado da medicação, ao nível de imunidade do hospedeiro, à farmacogenética e à má nutrição (WHO, 2008; CRAVO *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 1990).

Frente à gravidade da endemia e aos poucos recursos terapêuticos disponíveis, a pesquisa de novos medicamentos foi acelerada e mesmo a indústria farmacêutica internacional passou a investir fortemente na descoberta de novas moléculas. A GlaxoSmithKline, por exemplo, avaliou com técnicas *high throughput screening* em culturas de *Plasmodium falciparum*, mais de 2 milhões de compostos. Cerca de 13 mil deles foram considerados promissores, porém a avaliação da farmacodinâmica e da segurança para o uso clínico ainda não foi iniciada (GAMO *et al.*, 2010).

Apesar de ser mais lenta e dispendiosa, a investigação sistemática de compostos de origem natural também tem sido estimulada. Por exemplo, a simalicalactona D, presente em *Q. amara* L., inibiu o crescimento de *P. falciparum in vitro* em concentrações nanomolares e foi ativa por via oral (0.7 a 18 mg/kg/dia) contra parasitas de roedores (PHILLIPSON *et al.*, 1993; KUO *et al.*, 2004; MUHAMMAD *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram que terpenos e compostos fenólicos comuns a muitas plantas possuem atividade antiparasitária, porém, não existem outros estudos farmacológicos que possibilitem os ensaios éticos na espécie humana, etapa decisiva que eliminaria relatos controversos de atividade *in vitro* frequentemente associados a material vegetal não padronizado e testes pouco específicos (KAYSER *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O genoma do *Plasmodium falciparum* é um dos mais estudados entre os eucarióticos tanto pela sua virulência como por a sua plasticidade genômica, que resulta na sua capacidade de adaptação tornando-se resistente a praticamente todos os antimaláricos desenvolvidos apartir dos anos 40 (SILVA; OLIVEIRA, 2002).

A investigação genômica permitiu a identificação de novos alvos moleculares e estimulou a pesquisa de drogas que possam interferir com a homeostase do parasita (CONWAY *et al.*, 2007), inibindo, por exemplo, o metabolismo energético e a cadeia respiratória, ou a síntese protéica, ou ainda, bloquear alvos membranares e enzimas do vacúolo parasitóforo (ROSENTHAL *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostraram que a Ca^{+2} -ATPase de *Plasmodium falciparum* envolvida no transporte de cálcio (PfATPase4 e PfATPase6) seria alvo da ação da artemisinina, à semelhança da ação da tapsigargina, reconhecido inibidor da Ca^{+2} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) de mamíferos (ECKSTEIN-LUDWIG *et al.*, 2003).

Aparentemente, apesar das PfATPases guardarem baixa homologia à Ca^{+2} -ATPase dos vertebrados (46-48%), existem regiões conservadas e resíduos peptídicos semelhantes, que são importantes para a funcionalidade da enzima, ainda que não guardem identidade molecular absoluta (KIMURA *et al.*, 1993).

A *Quassia amara*, Simaroubaceae, é conhecida popularmente como pau-amargo, murubá, marupá, quina-de-caiena, quássia, simaruba e quina (CORRÊA, 1984; BERG *et al.*, 1983). Cascas do tronco são tradicionalmente utilizadas como antimicrobiana, antianêmica, antimalárica e no tratamento de distúrbios gastrintestinais. Suas folhas são usadas na forma de chá e alcoolato como febrífugo, tônico, digestivo, no tratamento dos males do estômago e da vesícula (MACEDO *et al.*, 2005).

A planta é rica em diversos compostos como os quassinóides e os alcalóides beta-carbolina e cantin-6, com atividade antiplasmódio, fago-repelente e antifertilidade (AJAIYEOBA *et al.*, 1999).

O chá da casca de *Q. amara* é utilizado para o tratamento da dor, talvez um “narcótico” (DUKE *et al.*, 1992). De fato, foi sugerido que a espécie possa conter componentes analgésicos (TOMA *et al.*, 2002).

Este trabalho tem como interesse primário não o estudo da atividade antimalárica, mas a avaliação dos efeitos sistêmicos desencadeados pela administração oral do extrato utilizado na medicina popular, assim como, a biodisponibilidade dos princípios ativos da planta e a segurança farmacológica do seu uso. Além dessa bioprospecção horizontal, o trabalho foi orientado para explicar os mecanismos moleculares responsáveis por esses efeitos colaterais em mamíferos, investindo na possibilidade desses mecanismos serem comuns com a hipotética atividade antiparasitária.



II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar a atividade farmacológica do extrato padronizado e frações purificadas de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) e esclarecer os prováveis mecanismos de ação.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o extrato aquoso obtido da planta coletada, previamente identificada, no município de Manacapuru, próximo à região de Manaus (Amazonas).
- Estudar o espectro farmacológico, *in vivo* e *in vitro*, do extrato padronizado e frações purificadas.
- Estudar o mecanismo de ação dos efeitos sistêmicos mais notáveis.
- Investigar a ação das substâncias purificadas do extrato ativo nas atividades das P-ATPases ($H^+-K^+-ATPase$ e $Ca^{+2}-ATPase$), enzimas essenciais para a sobrevivência celular.



III. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Quassia amara* L.

A *Quassia amara* L. (Figura 01) é uma angiosperma pertencente à família das Simaroubaceae. Esta família é composta por 25 gêneros e 200 espécies, com centro de diversidade na região neotropical (RIBEIRO *et al.*, 1999).



Figura 01 - *Quassia amara* L. *in situ* (Comun. Nova Esperança, Manacapuru, AM). Foto: Sandra Sales.

A quássia é uma árvoreta de 4 - 7 m de altura, com folhas compostas, com cinco folíolos, imparipinadas, ráquis e pecíolos alados, folíolos oblanceolados, ápice abruptamente acuminado e base atenuada (MACEDO *et al.*, 2005).

Muitos compostos já foram isolados das folhas, caule e seiva de *Q. amara* L. como os alcalóides β -carbolina (1-vinil-4,8-dimetoxi- β -carbolina, 1-metoxycarbonil- β -carbolina e *N*-metoxi-1-vinil- β -carbolina), alcalóides indólicos (3-metilcantin-2,6-diona, 5-hidroxi-3-metil-4-metoxicantin-2,6-diona, 3-metilcantin-5,6-diona, 2-metoxicantin-6-ona, 3-*N*-óxido de 5-hidroxi-4-metoxicantin-6-ona e 5-hidroxi-4-metoxicantin-6-ona), esteróides (β -sitosterol,

stigmasterol e campesterol) e os quassinóides (quassina, neoquassina, simalicalactona D e E, picrassins B, H, I e J). Este último grupo (Figura 02), geralmente é descrito como o grupo mais característico desta planta (BARBETTI *et al.*, 1987, BARBETTI *et al.*, 1990, BARBETTI *et al.*, 1993, BARBETTI *et al.*, 1990, NJAR *et al.*, 1993; FURLAN *et al.*, 1994).

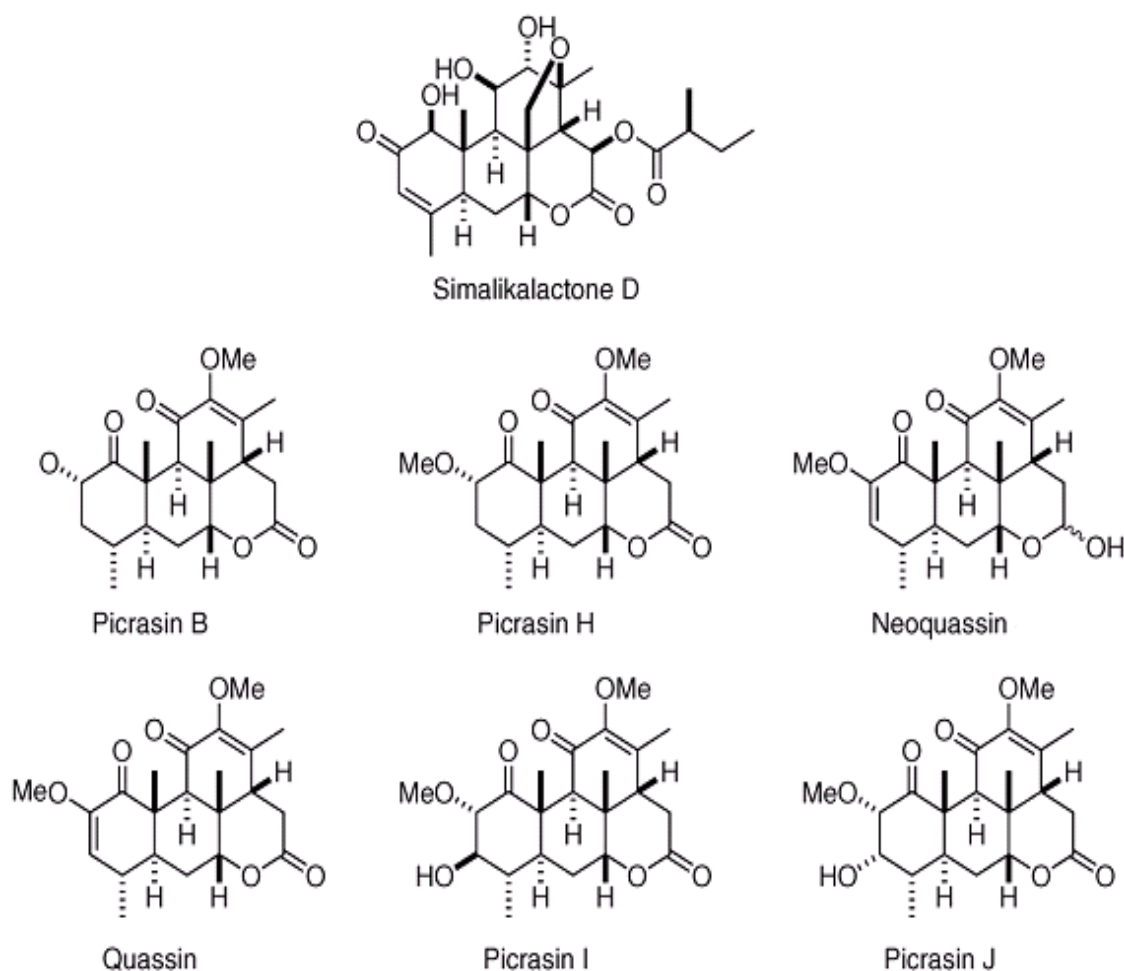


Figura 02 - Quassinóides isolados do extrato de folhas de *Quassia amara* L.

Estudos de toxicidade do extrato aquoso realizados em ratos e camundongos não demonstraram toxicidade oral em dosagens de até 1g/kg; e em camundongos o extrato aquoso nas doses 0,5 e 1,0 g/Kg, por via oral, aumentou a movimentação intestinal mensurada com carvão ativado (GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 1997; HOUEL *et al.*, 2009; CACHET *et al.*, 2009; TOMA *et al.*, 2002a).

A atividade antiácida e antiulcerogênica da *Quassia amara* L. foi comprovada em testes *in vivo*. Os quassinóides foram citados como os responsáveis por estes efeitos, pois a ação foi observada com extratos apolares. Os autores sugeriram que, provavelmente, os quassinóides podem estar influenciando no aumento da síntese de muco, fosfolípidos, bicarbonato e prostaglandinas ou podem estar inibindo a H^+-K^+ -ATPase gástrica (TOMA *et al.*, 2002a).

Em estudo feito por Toma e colaboradores (2002b), a fração apolar (HEX) de *Q. amara* mostrou atividade sedativa e antiedematogênica quando administrada intraperitonealmente. Os autores postulam que estes efeitos são produzidos por quassinóides (visto sua baixa polaridade).

A atividade antiinflamatória de *Q. amara* também foi avaliada por Verma e colaboradores (2009), que observaram a capacidade do extrato metanólico desta planta de inibir os mediadores pró-inflamatórios NO, COX-2, TNF- α , IL-1 β , NF- κ B em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS).

Entre os quassinóides pentacíclicos, quassiamarim e simalicalactona D são importantes alvos sintéticos, devido suas atividades *in vivo* contra células leucêmicas de linfócito P-388 em camundongos e *in vitro* contra carcinoma de nasofaringe em humanos (KUPCHAN *et al.*, 1976; SHING *et al.*, 1996.).

Estudos feitos na Índia demonstraram que a quassina possui atividade inseticida contra pulgões, ácaros e lagartas, incluindo mosquitos (STROLL *et al.*, 1986; EVANS; RAJ, 1988). O mecanismo de ação inseticida seria via inibição da tirosinase, uma enzima diretamente envolvida na esclerotização da cutícula (EVANS; KALEYSA, 1991).

Diversos quassinóides presentes em *Q. amara* L., como simalicalactona D, são capazes de inibir o crescimento do *Plasmodium falciparum* em cultura em concentrações nanomolares; a simalicalactona D é ativa oralmente, contra parasitas de roedores com doses

que variam de 0.7 a 18 mg/kg/dia (PHILLIPSON *et al.*, 1993; KUO *et al.*, 2004; MUHAMMAD *et al.*, 2004).

O extrato bruto ($CI_{50} = 0.0025 \mu\text{g/ml}$) e os quassinóides quassina ($CI_{50} = 0.06 \mu\text{g/ml}$, $0.15 \mu\text{M}$) e neoquassina ($CI_{50} = 0.04 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{M}$) foram avaliados quanto sua atividade antimalárica, *in vitro*, e mostraram eficiente atividade inibitória contra cepas resistentes (MRC-pf-303) e cepas sensíveis à cloroquina (MRC-pf-20) de *P. falciparum* (MISHRA, 2009). Provavelmente, o mecanismo de ação dos quassinóides é a inibição da síntese protéica dada pelo bloqueio da enzima peptidil-transferase ribossômica, impossibilitando o alongamento da cadeia de polipeptídeo, resultando, conseqüentemente, na morte do parasita (WRIGHT *et al.*, 2005; CACHET *et al.*, 2009).

3.2 ATPases – Tipos e funções

As ATPases são enzimas encontradas nos animais, plantas e bactérias e são classificadas em diferentes tipos como P, F, V e ABC (Figura 03). Possuem três características em comum: são encontradas nas membranas biológicas, hidrolizam ATP e transportam ativamente substâncias através de membranas biológicas a custa de ATP hidrolizado (PEDERSEN; CARAFOLI, 1987; PEDERSEN *et al.*, 2002; PEDERSEN *et al.*, 2005).

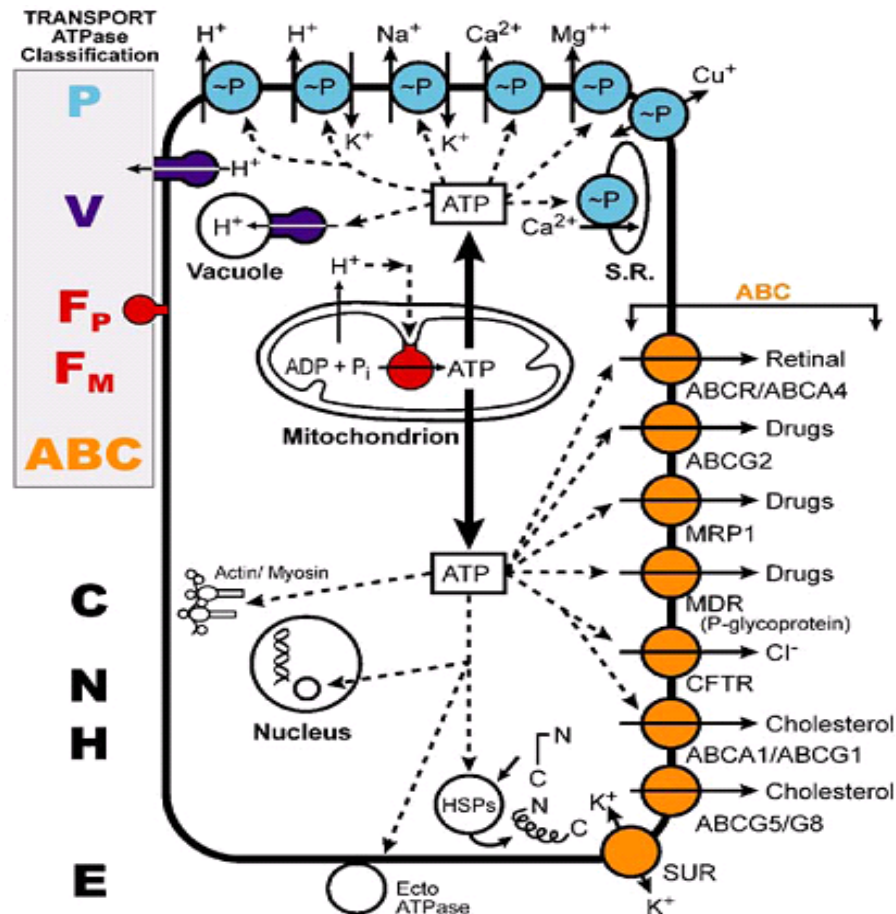


Figura 03 – Resumo dos diferentes tipos de ATPases de transporte (Modificado de Pedersen *et al.*, 2007).

As ATPases do tipo P ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase e $\text{H}^+\text{-K}^+$ -ATPase), um polipeptídeo de aproximadamente 100 kDa, são responsáveis pelo bombeamento de cátions através de membranas celulares e essa translocação é realizada pela fosforilação de um resíduo de aspartato (MOLLER *et al.*, 1996). Estão envolvidas em diferentes funções fisiológicas como absorção, secreção, sinalização, transmissão de impulso nervoso, acoplamento excitação-contração, crescimento e diferenciação celular (SCARBOROUGH *et al.*, 1999).

Na maioria das células aeróbicas as ATPases do tipo F funcionam não como uma ATPase, mas como ATP sintase (F₁F_o-ATPase sintase), produzindo ATP a partir de ADP e P_i na presença de Mg^{+2} em resposta a um gradiente eletroquímico de prótons gerado na cadeia de transporte de elétrons. São compostas por um complexo de subunidades hidrofóbicas

imersas na membrana, Fo, e um complexo F1 catalítico ligado a Fo que contém o canal de prótons (PEDERSEN *et al.*, 2005; STOCK *et al.*, 2000; BOYER *et al.*, 1997; WEBER; SENIOR, 1997).

As ATPases do tipo V são encontradas principalmente em vacúolos de células eucarióticas e em membranas de células especializadas tanto de eucariotos como de procariotos e são compostas de várias subunidades com similaridades de seqüências com as subunidades das F-ATPases. Outra homologia está relacionada à capacidade de sintetizar ATP. Estão envolvidas em vários processos vitais intra e intercelular, incluindo tráfego de proteínas, transporte ativo de metabólitos e liberação de neurotransmissor (WILKENS *et al.*, 2005; DRORY; NELSON, 2006).

O tipo ABC (ou transportadores ABC) é considerado a maior família de transportadores e são encontrados em todas as células eucarióticas. Cada proteína transportadora apresenta 2 (dois) domínios citosólicos de ligação a ATP e transportam pequenas moléculas orgânicas para fora da célula (unidirecional em eucariotos) ou do citosol para o interior de organelas (PEDERSEN *et al.*, 2007).

3.2.1 P-ATPases no Plasmódio

O parasita da malária não está livre dentro do eritrócito, mas envolto por uma membrana proveniente do eritrócito, chamada membrana do vacúolo parasitóforo (MVP). A MVP é invertida durante a invasão e, com isso, muitas das P-ATPases ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{+2}\text{-ATPase}$ e $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) de membrana passam a bombear íons do citoplasma para dentro deste invólucro, assegurando que o parasita esteja constantemente exposto a altas concentrações de íons, utilizando-os como sinalizadores, promovendo a sua sobrevivência dentro de uma outra célula (GARCIA, 2004).

A bomba de sódio (Na^+/K^+ -ATPase) é responsável pela manutenção do gradiente de concentração de Na^+ e K^+ da célula; porém, quando a célula está infectada pelas formas maduras do parasita, ocorre um desequilíbrio no gradiente iônico que apresenta níveis altos de Na^+ e diminuição dos níveis de K^+ . Isso ocorre principalmente em casos de malária severa, em idosos e em pacientes que apresentam alto grau de febre e vômito, estado nutricional, entre outros (EBELE *et al.*, 2010).

A Ca^{2+} -ATPase é uma proteína que utiliza energia proveniente do ATP para retirar cálcio de dentro das células, evitando, assim, que o acúmulo desse íon leve à morte celular por apoptose. Com a inversão da membrana, a Ca^{2+} -ATPase do MVP passou a bombear o cálcio do citoplasma para dentro desse pequeno espaço em volta do parasita. Através desse artifício, o parasita encontrou uma forma de ativar os mecanismos celulares necessários para sobreviver dentro da célula (GAZARINI, 2003). Estudos usando técnicas moleculares clássicas de bibliotecas genômicas, confirmaram a existência, no genoma de *P. falciparum*, de uma ATPase dependente de Ca^{+2} (KRISHNA *et al.*, 2002).

Evidências recentes indicam que o parasita induz a incorporação de uma H^+ -ATPase funcional também na membrana do eritrócito hospedeiro, com a função de manter a diferença do pH intracelular entre hospedeiro e parasita e, assim, assegurar a obtenção dos metabólitos e íons necessários (MARCHESINI *et al.*, 2005).

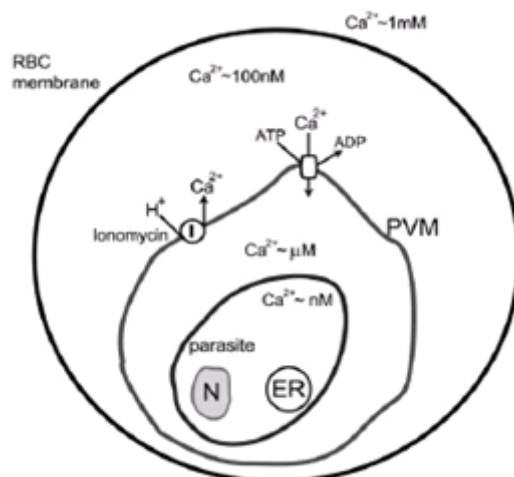


Figura 05 - Ca^{2+} -ATPase do parasita da malária. O *Plasmodium* infecta os eritrócitos que possui uma Ca^{2+} -ATPase, utilizada para retirar cálcio de dentro das células (Modificado de Gazzarini, 2003).

Alguns inibidores de P-ATPases já foram estabelecidos na prática clínica: os digitálicos, que inibem seletivamente a Na^{+} - K^{+} ATPase; a tapsigargina que inibe a Ca^{2+} -ATPase da SERCA e o omeprazol que inibe a H^{+} - K^{+} ATPases no estômago. Porém, há a necessidade de encontrar novas substâncias que venham interferir nas vias metabólicas do parasita, pois são estas que mantêm a sua capacidade invasiva e sobrevivência.

Tomando como base todas essas informações e evidências, a presente pesquisa tem como objetivo estudar as ações farmacológicas do extrato aquoso padronizado da *Quassia amara* L, das frações intermediárias e de seus compostos isolados, em mamíferos. As ações exuberantes na secreção gástrica e na musculatura esquelética foram correlacionadas com a inibição da H^{+} , K^{+} -ATPase (bomba de prótons) extraída de mucosa gástrica de porcos, e da Ca^{2+} -ATPase (bomba de cálcio) extraída do músculo da coxa de coelho.



IV. METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Material Botânico

A *Quassia amara* L. foi coletada na comunidade Nova Esperança (Coordenadas: W: 060°33'03.3";S: 03°18'19.6"), no km 60 do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil (Figura 06), com a orientação e ajuda do proprietário da gleba.



Figura 06 – Local da coleta do material vegetal (O balão vermelho indica a Comunidade Nova Esperança, Manacapuru, Amazonas). Fonte: <http://maps.google.com.br>. (Acesso em 20/02/2009).

Cerca de 600 gramas do material fresco coletado foram secos em local arejado, à temperatura ambiente. Após secagem, o material foi reduzido a 260 g de folhas secas que foram moídas em tela de 1 mm e armazenados ao abrigo da luz em sacos plásticos a vácuo e ao abrigo da luz e identificados com o codinome e data da coleta.

Para a confecção da exsicata, foram coletadas plantas que continham estruturas reprodutivas (flores e frutos), para facilitar a identificação. O material coletado foi prensado

em jornal e seco em estufa a 40° C. A exsicata seca foi depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas, INPA, sob o número 22481 e identificada por José Ferreira Ramos.

4.1.2 Análise Fitoquímica

4.1.2.1 Obtenção do extrato aquoso (EA) e fração butanólica (FBut) de *Quassia amara* L.

A extração e o processo de purificação do extrato aquoso foram orientados pela Profa. Dra. Mirtes M. Tanae da Disciplina de Farmacologia Celular da UNIFESP, SP.

O extrato aquoso (EA) de *Quassia amara* a 2,5% foi obtido por infusão das folhas secas em água destilada. O tempo de infusão a 50° C foi de 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, o material foi filtrado, concentrado até 20% do volume inicial em rotavapor e liofilizado. O rendimento do extrato aquoso (EA) liofilizado foi de 20%.

O EA liofilizado (5 g) foi dissolvido em 200 mL de água destilada e extraído em funil de separação com 200 mL de butanol, por 3 vezes, dando origem à fração butanólica (FBut) e fração aquosa (FA), com 40 % (1,4 g) e 60 % (3,0 g) de rendimento, respectivamente.

4.1.2.2 Purificação da Fração Butanólica (FBut) de *Quassia amara* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAE-Prep)

A FBut foi purificada pela Dra. Mirtes Midori Tanae no Setor de Farmacologia do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (Shimadzu – Japão) composto por coluna Shimpack Prep-ODS

(25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 μ m, 2 bombas injetoras (LC-8A), controlador (SCL-8A), integrador CR4A, coletor de frações (FCV-100B) e detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-6A), operando a 210 nm.

A FBut foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Nanopure Deionization System) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1,0 mL. A purificação foi realizada em 2 etapas: na primeira, a fase móvel consistiu em gradiente linear de água/acetonitrila de 10 a 60% em 30 min em fluxo constante de 10 mL/min, coletando-se 6 frações compostas. Na segunda, a fase móvel utilizada para eluir as 6 frações compostas consistiu em gradiente de água/acetonitrila 10 a 30% em 30 min, 30 a 50% de 30 a 45 min e 50 a 65% de 45 a 55 min, em fluxo constante de 7 mL/min, coletando-se 18 frações (Figura 07). Essas frações foram encaminhadas à Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e à Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP) para análises de ^{13}C RMN e ^1H RMN visando à identificação química.

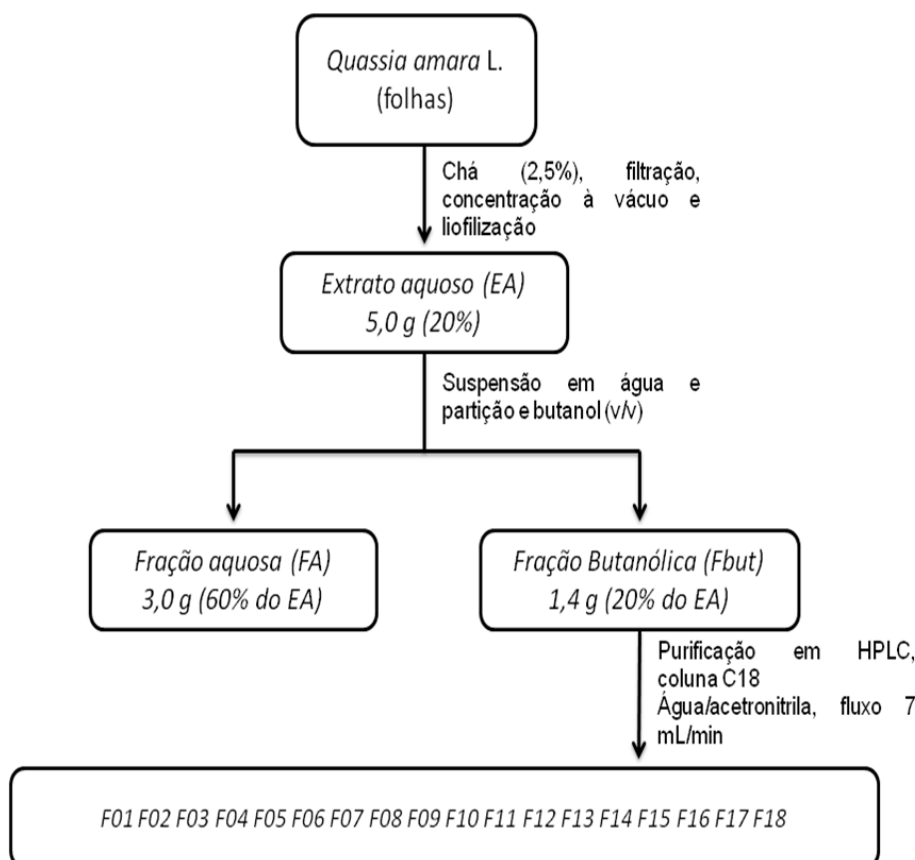


Figura 07 - Fluxograma de extração e fracionamento da fração butanólica de *Quassia amara* por CLAE-prep, utilizando coluna de fase reversa C18, eluída com gradiente de água/acetonitrila 10 a 30% em 30 min, 30 a 50% de 30 a 45 min, 50 a 65% de 45 a 55 min, fluxo de 7 mL/min e comprimento de onda de 210 nm.

4.1.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica (CLAE- analítica) e padronização do extrato ativo

A fração butanólica de *Q. amara* e as frações purificadas foram analisadas em um sistema de cromatografia líquida analítica (Shimadzu – Japão) composto por duas bombas analíticas LC–20AT, módulo de comunicação CBM-20A e detector UV-VIS SPD-10A, operando a 210 nm. O sistema estava acoplado a um computador, sendo operado por software Shimadzu LC solution, versão 1.21, SP1.

A fase móvel consistiu de gradiente linear de água/acetonitrila 15 a 60% em 30 min, em coluna analítica C18 (Phenomenex – USA), empacotada com partículas esféricas de 5 µm

e fluxo constante de 1,0 mL/min. A amostra foi dissolvida em água/acetonitrila 10%, filtrada em filtro de 0,22 μm (Millipore – USA) e injetada no cromatógrafo em alíquota de 20 μL (Figuras 08 e 09).

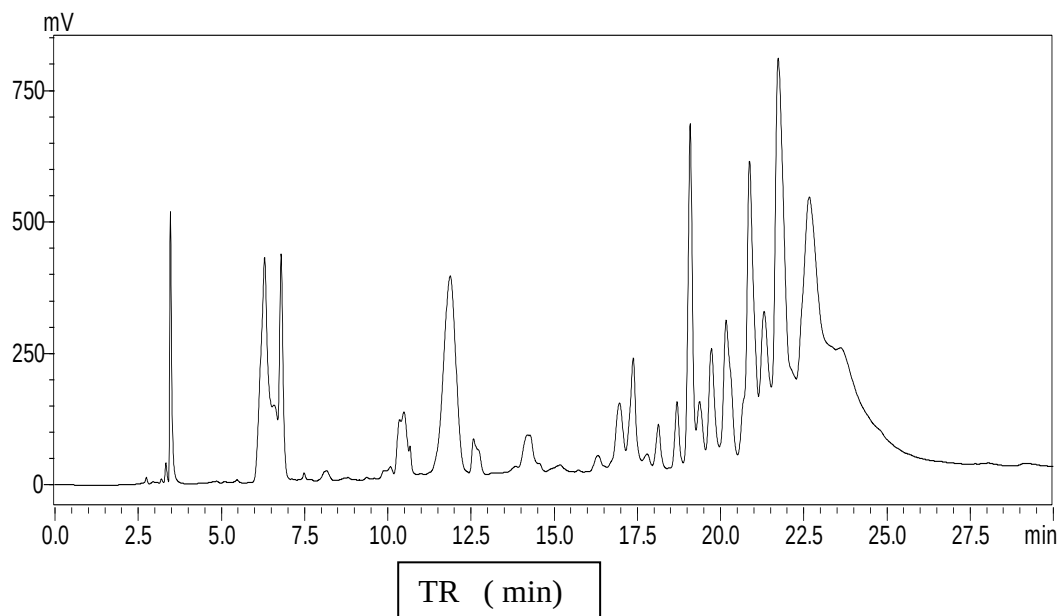


Figura 08 - Perfil cromatográfico da fração butanólica (FBut) de *Q. amara* em CLAE analítico, utilizando coluna C18, em gradiente de água/acetonitrila de 10 a 30 % em 30 min, 30 a 50 % de 30 a 45 min e 50 a 65 % de 45 a 55 min, em fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm. TR= tempo de retenção

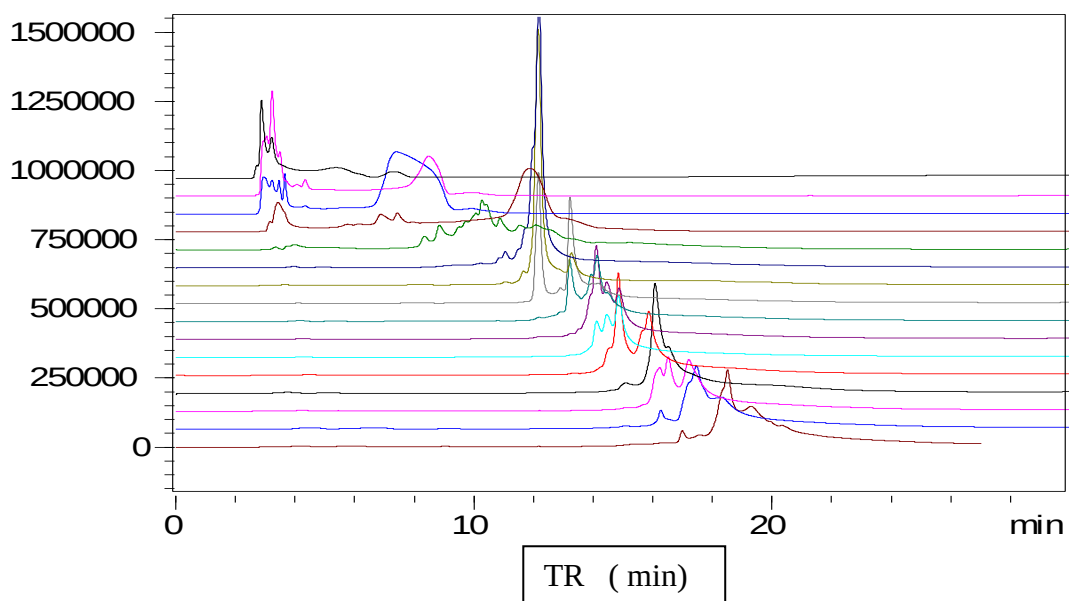


Figura 09 - Perfis cromatográficos das frações isoladas a partir da fração butanólica de *Q. amara* em CLAE analítico, utilizando coluna C18, em gradiente de água/acetonitrila de 10 a 30 % em 30 min, 30 a 50 % de 30 a 45 min e 50 a 65 % de 45 a 55 min, em fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV-Vis operando a 210 nm. TR=tempo de retenção

Denota-se no espectro em CLAE 6 picos majoritários com Tempos de Retenção (TR) de 6,3; 11,9; 19,0; 20,8; 21,7; 22,7 min e com áreas de 5,3; 8,2; 4,8; 7,5, 13,8 e 18,2%, do total do cromatograma, respectivamente. As experiências descritas nesta dissertação correspondem às atividades do extrato de *Quassia amara* com essa composição (Figura 08).

A recromatografia em CLAE analítica das frações de *Q. amara* obtidas em CLAE preparativa mostrou um bom perfil cromatográfico da maioria das frações. As mais puras foram enviadas para identificação química.

4.1.3 Teste Preliminar da Atividade Antimalárica da FBut de *Q. amara*

A caracterização da FBut padronizada quimicamente como descrito acima foi completada com o teste preliminar da atividade antiparasitária contra *Plasmodium chabaudi*. Esses testes foram realizados no Setor de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da UNIFESP, em São Paulo, pela Profa. Dra. Maria Teresa R. de Lima-Landman e pela bióloga Marcela B. Nering para subsidiar os resultados obtidos nos testes farmacodinâmicos desta dissertação.

Os resultados *in vitro* mostraram que a FBut (3 -100 µg/mL) incubada na cultura de *Plasmodium chabaudi* não alterou o número de hemácias parasitadas. O tratamento *in vivo* de camundongos com a FBut (100 mg/kg/dia) administrada por via oral durante 4 dias, não foi eficaz. Ao contrário, foi detectado um aumento da parasitemia durante o tratamento. Como controle do teste, o tratamento com cloroquina (10 mg/kg/dia, por 4 dias) durante o mesmo período interrompeu a progressão da infecção em camundongos infectados. Esses dados indicaram que a FBut da *Q. amara* não parece ter atividade tóxica contra *P. chabaudi* (Figura 10).

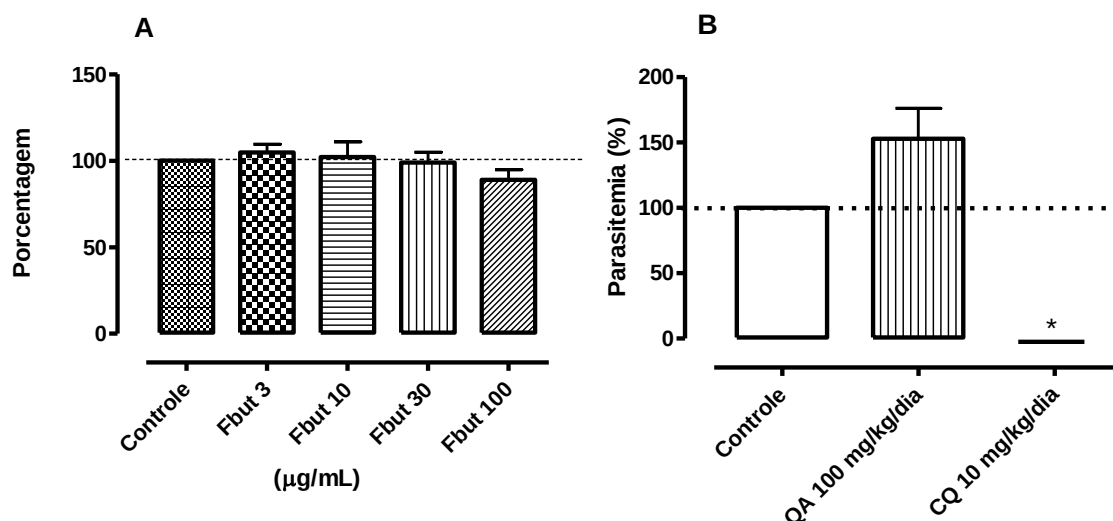


Figura 10 – Teste da atividade antimalárica da fração butanólica (FBut) de *Q.amara*. **A**- Teste *in vitro* em cultura de sangue parasitado com *Plasmodium chabaudi*- As colunas mostram a porcentagem de células infectadas após incubação com FBut (3 - 100 µg/mL) por 24 h (37 °C, 5% CO₂) determinada em citômetro de fluxo (FACSCalibur – Becton-Dickinson) utilizando acridina orange como corante. **B**- Teste *in vivo* - Porcentagem de células infectadas após inoculação intraperitoneal de *Plasmodium chabaudi* em camundongos Balb/C tratados com FBut (100 mg/kg/dia, *p.o.*, 4 dias). A parasitemia foi determinada por microscopia em lâminas coradas com Leishman. O dissulfato de cloroquina (10 mg/kg/dia, *v.o.*, 4 dias) foi utilizado como controle positivo.

4.1.4 Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos (3 meses) criados no Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) foram utilizados nas experiências. Os animais foram mantidos em salas com temperatura de $22 \pm 1^\circ$ C e ciclo de luz de 12/12 h, recebendo água e ração *ad libitum* até o momento da experimentação. Além destes animais, foram utilizados coelhos albinos adultos e porcos jovens adquiridos de fornecedores na cidade de Manaus.

Os ensaios foram realizados de acordo com as normas e protocolo experimental aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP / UNIFESP -0760/07).

4.1.5 Drogas, Reagentes e Solventes

O material seguinte foi adquirido comercialmente dos fornecedores indicados: clorofórmio (Synth), acetilcolina (Sigma), ácido acético glacial (Nuclear), ácido ascórbico (Vetec), ácido sulfúrico (Synth), ácido tricloroacético - TCA (Nuclear), albumina de soro bovino, álcool etílico (Synth), anti-histamínico ciproheptadina (Cobavital® Solvey Farma), ATP (Sigma), atropina (Sigma), betanecol (sigma), bicarbonato de sódio (Cromato), butanol (Synth), carragenina (Sigma), carvão ativado, cloreto de cálcio desidratado (Nuclear), cloreto de magnésio (Vetec), cloreto de potássio (Vetec), cloreto de sódio (Digilab), dextrana (Sigma), D-glicose anidra (Cromato), diazepam (Rambaxy), d-tubocurarina (Sigma), EDTA (Nuclear), EGTA (Sigma), éter etílico (Nuclear), extran, fenolftaleína (sigma), ficol (Sigma), formol (Bioquímica), fosfato monobásico de potássio (Ecibra), heparina (Hipolabor), histamina (Sigma), ionóforo calcimicina A23187 (Sigma), líquido de Türk, l-name (Sigma), manitol (Sigma), molibdato de amônia (Carlo Erba), monofosfato de sódio (Merck), MOPS (Sigma), noradrenalina (Sigma), oubaína (Sigma), pentobarbital (Sigma), pipes (Sigma), Sacarose (Qeel), Schering 28080 (Schering Plough), tapsigargina (Sigma), tris-maleato (Sigma), trizma-HCl (Sigma), uretana (Sigma)

4.1.6 Composição das Soluções Utilizadas

4.1.6.1 Soluções Utilizadas em Estudos *in vitro*

- Líquido Nutritivo Tyrode (mM) – NaCl 135; KCl 5,0; MgCl₂ 1,0 ; NaHCO₃ 15,0 ; NaH₂PO₄ 1,0 ; CaCl₂ 2,0 ; glicose 11,0.

4.1.6.2 Soluções Utilizadas em Estudos *in vivo*

- Salina (NaCl 0,9%)
- Líquido para pletismômetro: NaCl 0,1% + 8 gotas de Extran 10%

4.1.6.3 Soluções Utilizadas na Determinação da Atividade da Ca^{2+} -ATPase

- Solução I: MOPS 10 mM, sacarose 10%, EDTA 0,1 mM, pH 7,0 (1 L)
- Solução II: MOPS 10 mM, KCl 0,6 M, pH 7,0 (0,5 L)
- Solução III: MOPS 10 mM, sacarose 30%, pH 7,0 (0,5 L)
- Tampão para medidas da atividade da Ca^{2+} -ATPase: Tris-maleato 50 mM, pH 7,4; MgCl_2 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionóforo calcimicina (A23187) 10 μM (solução estoque 0,2 mM em etanol); CaCl_2 1,008 mM (Ca^{2+} livre = 17,5 μM). A mesma solução tampão é utilizada para determinar a atividade da Mg^{2+} -ATPase, mas excluindo o CaCl_2 .
- Solução ácida de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio + 23,8 mL de H_2SO_4) em 1 L de água destilada. O reagente de molibdato de amônio é preparado com 15 mL da solução ácida e 0,36 g de ácido ascórbico (Hosseini *et al*, 1993).

4.1.6.4 Soluções Utilizadas na Determinação da Atividade da H^+ - K^+ -ATPase

- Tampão para lavagem: manitol 120 mM, PIPES/Trizma 5 mM, Sacarose 40 mM, pH 6,7 , EDTA 1 mM.
- Tampão de homogeneização: PIPES/Trizma 4 mM, sacarose 30 mM, pH 7,4.
- Tampão para medida da atividade da H^+ - K^+ -ATPase: Tris-HCl 50 mM; MgCl_2 2,5 mM; KCl 20 mM e ATP 1 mM.

- Gradiente de Ficol (Ficol 400, v/v): Ficol 4% e 12% em Tampão PIPES/Trizma 4 mM contendo sacarose 30 mM.
- Solução ácida de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio + 23,8 mL de H₂SO₄) em 1 L de água destilada. O reagente de molibdato de amônio é preparado com 15 mL da solução ácida e 0,36 g de ácido ascórbico (Hosseini *et al*, 1993).

4.2 Métodos

4.2.1 Métodos para Detecção de Ação no Sistema Nervoso Central

Todos os experimentos foram realizados sempre no mesmo período do dia para minimizar alterações do ciclo circadiano/ultradiano. No dia de cada experimento os animais foram habituados às condições experimentais.

Os testes foram realizados segundo descrição do livro “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais” (LAPA *et al.*, 2003), com algumas adaptações realçadas quando necessário.

4.2.1.1 Atividade Geral – Teste de Irwin

Teste realizado para determinação de doses efetivas, vias de administração, comparação da biodisponibilidade, tempo de observação relativo e principais efeitos a serem comprovados em outros testes. Camundongos foram divididos em: grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou grupos tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) ou FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=3/grupo). Os animais foram colocados em caixas-moradia e seus comportamentos analisados nos tempos de 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 hs após o tratamento. Os

parâmetros observados foram: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, cromodocriorréia, secreção brônquica, convulsões, morte entre outros que compõem a tabela de requisitos da atividade proposta por Irwin (1961).

4.2.1.2 Campo Aberto (“Open Field”)

O campo-aberto consiste numa caixa quadrada de acrílico transparente (30 x 30 x 20 cm) empregada para avaliar a atividade exploratória dos animais. Uma hora após o tratamento do grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=8/grupo), os camundongos foram colocados no centro do *open field* e avaliados durante 5 min. Os parâmetros de avaliação foram: o número de estiramentos, de levantares e de cruzamentos, o tempo despendido no centro e na periferia, o tempo de auto-limpeza e, também, foi registrado o número de bolos fecais eliminados (ARCHER *et al.*, 1973).

4.2.1.3 Sono Barbitúrico

Camundongos foram divididos em grupos: controle (água 5 mL/kg, v.o.), tratados com extrato aquoso (EA 0,05; 0,3 e 1g/kg, v.o.) ou com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., n=8/grupo). Após 1 h dos tratamentos, foi administrado pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e mediram-se imediatamente os tempos para a perda do reflexo postural dos animais (tempo de latência para o sono) e o tempo para a recuperação do reflexo postural (tempo de duração do sonoi), durante 3 h consecutivas. O grupo controle positivo foi tratado, 30 min antes, com diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.) (CARLINI *et al.*, 1986).

4.2.1.4 Sono induzido por éter

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratado com extrato aquoso (EA 0,1; 0,3 e 1g/kg, v.o., n=8/grupo). Passado uma hora dos diferentes tratamentos, os animais foram colocados em uma câmara (30 cm x 20 cm de diâmetro) saturada com 5 mL de éter etílico, medindo-se o tempo de latência e duração do sono induzido pelo éter etílico (VIEIRA *et al.*, 2001). Após a perda do reflexo postural, esperou-se 60 s para retirar os animais da câmara de saturação, colocando-os em decúbito dorsal para medição do tempo de duração da hipnose.

4.2.1.5 Teste da Suspensão pela Cauda

Camundongos foram divididos em grupo controle (água 5 mL/kg, v.o.) ou grupo tratado com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., n=8/grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, os animais foram suspensos e tiveram a cauda fixada em anteparo elevado a 50 cm de altura e medidos os tempos de latência para o animal ficar imóvel e a duração da imobilidade de cada animal durante 5 minutos, quando os animais eram liberados (STÉRU *et al.*, 1985).

4.2.1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 x 25 cm) e dois fechados (30 x 5 x 25 cm), também opostos, em forma de cruz grega. Os braços

abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são confeccionadas em acrílico ou madeira. O aparelho fica posicionado a 45 cm do chão.

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e grupos tratados com FBut (0,1; 0,3 e 1g/kg, v.o., n=8/grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados por 5 min de observação (PELLOW *et al.*, 1985).

Os comportamentos avaliados no LCE foram: frequências de entradas e tempo despendido nos braços abertos e fechados. Foram também avaliados o número de imersões de cabeça e estiramento como medida do comportamento de “avaliação de risco” (RODGERS & COLE, 1993) e o número de bolos fecais (ARCHER *et al.*, 1973).

4.2.2 Métodos para Avaliação da Atividade Antiinflamatória e/ou

Antinociceptiva

4.2.2.1 Teste da Formalina 1,5%

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo). Após 50 minutos do tratamento, os animais foram colocados em caixas de acrílico espelhadas para ambientação antes do início do experimento. Imediatamente após a injeção de formalina 1,5% (30 µL/pata, i.pl.), 60 minutos após os tratamentos, os animais foram colocados novamente nas caixas espelhadas e iniciou-se a contagem do tempo de lambertura da pata injetada de cada animal. Os espelhos facilitam a observação. Esse teste tem como característico, uma resposta bifásica: a primeira etapa (fase da nocicepção) começa imediatamente após a injeção de formalina e perdura por 5 minutos. Esta fase é seguida por um período de quiescência (poucas lambeduras) de cerca de 5-10

minutos após o qual se desenvolve a segunda etapa (fase inflamatória) que é medida dos 15 minutos aos 30 min após a injeção (HUNSKAAR *et al.*, 1985).

4.2.2.2 Teste de “Tail-Flick” (Retirada da Cauda)

Esse teste consiste na imersão do terço inferior da cauda dos camundongos em água aquecida à 50° C, medindo-se o tempo para a retirada da cauda da água quente. Os camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo) e, 30 min após a leitura da reação basal, os animais receberam os diferentes tratamentos por via oral. As medições foram feitas durante 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. O máximo de exposição à água quente foi estipulado em 15 segundos.

4.2.2.3 Contorção Abdominal

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo). Uma hora após os tratamentos, o ácido acético 1% (0,1 mL/10 g) foi injetado intraperitonealmente, iniciando-se imediatamente a contagem do número de contorções a cada 5 minutos durante 30 minutos. Para representação e análise, as contorções nesse período foram acumuladas.

4.2.2.4 Edema de pata induzido por carragenina 1,0%

Ratos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o., n=6/grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, a pata direita foi injetada com carragenina 1,0% (300 µL/pata, i.pl.) e a pata esquerda com salina 0,9% (300 µL/pata, i.pl.). Antes e após os tratamentos, o volume das patas direita e esquerda dos animais foi medido, em triplicata, com o auxílio de um Pletismômetro digital® (Ugo Basile Instruments, modelo 7500). O volume das patas foi medido aos 30, 60, 90, 120, 180 e 240 min da carragenina e o valor do edema foi obtido pela subtração do volume da pata injetada com salina do volume da pata injetada com a carragenina.

4.2.2.5 Migração Celular

Ratos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o., n=6/grupo) e, uma hora após os diferentes tratamentos, foi injetada carragenina 1,0% (i.p). Após 6 hs da injeção de carragenina, os animais foram mortos por deslocamento cervical sob anestesia etérea. O peritônio dos animais foi lavado com 5 mL de PBS-hep seguida de massagem abdominal delicada durante 1 minuto. Após a laparotomia, o líquido peritonial foi coletado e o volume medido. Uma amostra do líquido coletado foi diluído em líquido de Türk (1:20) agitada durante 1 minuto para a contagem dos leucócitos em câmara de Neubauer.

4.2.2.6 Edema de pata induzido por dextrana 0,1%

Ratos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.), tratados com anti-histamínico (Ciproheptadina, 10 mg/kg, v.o) ou com EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o., n=6/grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, a dextrana 0,1% (300 µL/pata) foi injetada na região plantar da pata direita e salina 0,9% (300 µL/pata) na pata esquerda. O volume basal das patas direita e esquerda de todos os animais foi medido em triplicata antes e após a injeção, com o auxílio de um Pletismômetro digital (Ugo Basile Instruments®, modelo 7500). O volume das patas foi medido aos 30, 60 e 120 min da injeção, considerando-se o volume da pata injetada com salina menos o volume da pata injetada com dextrana.

4.2.3 Métodos para Detecção dos Efeitos no Sistema Gastrointestinal

4.2.3.1. Trânsito Intestinal

Os camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo) e mantidos em jejum de 16 horas. Decorridos 60 minutos dos tratamentos foi administrado uma suspensão de carvão ativado (10%, 0,1 mL/10g, v.o) em todos os animais. Após 30 minutos, os animais foram mortos sob anestesia etérea e o intestino delgado totalmente removido. A distância percorrida pelo carvão no grupo controle e nos grupos tratados com EA foi medida relativamente ao comprimento total do intestino delgado.

4.2.3.2 Atividade Anti-úlceras

4.2.3.2.1 Lesão gástrica induzida por estresse

Camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou tratados com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo) e mantidos em jejum de 16 h. Uma hora após os tratamentos, os animais foram imobilizados em contêntores individuais, e colocados em câmara fria a 4° C por 2 hs. Após este período, os animais foram mortos sob anestesia etérea, os estômagos retirados, lavados externamente e abertos ao longo da pequena curvatura. O conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi cuidadosamente lavada com salina 0,9% para a determinação do número de úlceras e índice de lesões gástricas segundo a pontuação das lesões gástricas da tabela 1.

4.2.3.2.2 Lesão gástrica induzida por etanol 75%

Os camundongos foram divididos em grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) ou EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=6/grupo) e, após 16 h em jejum, receberam os diferentes tratamentos. Decorridos 60 min, foi administrado etanol 75% (1 mL/100 g, v.o.). Após 1 h da administração do etanol, os animais foram sacrificados sob anestesia etérea. O estômago foi removido, lavado externamente, colocado em placa de Petri sobre gelo e aberto ao longo da pequena curvatura. O conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi cuidadosamente lavada com salina 0,9% para a determinação do número de úlceras e índice de lesões gástricas segundo a pontuação das lesões gástricas da tabela 1.

Tabela 1 - Pontuação atribuída às lesões gástricas produzidas no estômago de roedores por estresse a frio, etanol 75% ou indometacina.

a) coloração da mucosa	
- normal	0 ponto
- hiperêmica	1 ponto
- descorada	1 ponto
b) perda de pregas da mucosa	1 ponto
c) Petéquias	
- leve	1 ponto
- moderado	2 pontos
- intenso	3 pontos
d) Edema	
- leve	1 ponto
- moderado	2 pontos
- intenso	3 pontos
e) Hemorragia	
- leve	1 ponto
- moderada	2 pontos
- intensa	3 pontos
f) Perda de muco	
- leve	1 ponto
- moderada	2 pontos
- intensa	3 pontos
g) Lesões necro-hemorrágicas (Úlceras)	
- até 1 mm	1 ponto
- > 1 mm	1,5 pontos x mm
- perfuradas	5 pontos x mm

As avaliações foram realizadas por 1 técnicos treinado e sem conhecimento dos tratamentos (LAPA *et al.*, 2003).

4.2.3.3 Avaliação do efeito na Secreção Ácida Gástrica

4.2.3.3.1 Método da Ligadura pilórica

Ratos foram divididos em grupo controle (salina 0,9%) ou tratados com a fração butanólica (FBut 0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, i.d., n=6/grupo). Após 16 hs em jejum, os animais foram anestesiados com éter, fixados em decúbito dorsal a uma placa de cortiça e submetidos à cirurgia de ligadura pilórica. Após a oclusão do piloro, os diferentes tratamentos foram injetados na luz duodenal. Após 4 h da cirurgia, os animais foram mortos sob anestesia etérea. Para evitar perda do conteúdo gástrico, o esôfago foi pinçado antes de remover os estômagos. Estes foram lavados externamente com água destilada, secos com papel de filtro e mantidos sobre placa de gelo. Os estômagos foram seccionados ao longo da pequena curvatura e a mucosa foi lavada com 2 mL de água, recolhendo o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaio imersos em gelo. Após centrifugação dos tubos (1500 rpm, 30 min), o sobrenadante foi colhido para determinação do volume, pH e da acidez total. O volume foi medido e completado para 10 mL com água destilada. A determinação da acidez total foi feita através de titulação com NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína 2% como indicador ácido-base.

A secreção gástrica foi estimulada com a administração subcutânea de betanecol (20 mg/kg), um agonista de receptores muscarínicos ou histamina (40 mg/kg), um agonista dos receptores histaminérgicos.

4.2.4 Determinação da atividade da H^+-K^+ -ATPase da Mucosa Gástrica de Porco

As membranas contendo H^+-K^+ -ATPase foram obtidas da fração microssomal extraída da mucosa gástrica de suíno pelo método descrito por Rabon *et al.* (1988). O animal foi adquirido de fornecedor credenciado e sacrificado de acordo com as normas. O estômago foi removido, seccionado ao longo da curvatura menor, lavado com PBS gelado e transferido para um béquer contendo tampão de homogeneização. O fundo do estômago foi dissecado e estendido em placa de vidro sobre gelo, o muco foi removido e as glândulas gástricas foram isoladas. O material foi homogeneizado em homogeneizador de vidro contendo tampão de homogeneização (20 – 30 mL) a 3000 rpm. O homogenato foi centrifugado a 13000 *g* por 15 minutos, o *pellet* foi desprezado e o sobrenadante centrifugado a 100.000 *g* por 60 minutos. O *pellet* (fração microssomal) foi ressuspensão em tampão de homogeneização (18 mL), aplicado em gradiente de Ficol e sacarose (4% e 12%) e centrifugado a 24.000 rpm por 60 minutos. A fração contendo a H^+-K^+ -ATPase foi coletada na interface do Ficol 12%, ressuspensa em tampão de homogeneização (6 mL) contendo sacarose 30% e homogeneizada em homogeneizador de vidro. Os microssomas gástricos foram conservados em freezer -80 °C até a realização dos ensaios e o teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford.

4.2.4.1 Caracterização da H^+-K^+ -ATPase

Para as medidas da atividade da H^+-K^+ -ATPase gástrica, amostras microsossomais (0,9-1 μ g) foram incubadas em tampão Tris-HCl 50 mM, contendo ouabaína 1 mM (para eliminar a Na^+ -ATPase presente no homogenato) em volume final de 100 μ L. Foram usadas microplacas transparentes de 96 poços. A FBut foi testada em triplicata nas concentrações de 3 a 100 μ g/mL. A reação foi iniciada adicionando-se 20 μ L de ATP 5 mM e incubando-se a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 μ L de TCA 50% a 4°C. Adicionou-se às amostras 200 μ L de solução ácida de molibdato (0,36 g de ácido ascórbico para 15 mL de solução, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37°C por 10 minutos. Para controle positivo foi utilizado o antagonista específico da bomba H^+-K^+ -ATPase, SCH 28080 (3 a 1000 μ M).

A leitura das absorbâncias foi feita a 820 nm em leitor de placa (Spectramax M2 - Molecular Devices) e a atividade enzimática foi expressa em μ mol Pi/ mg proteína / min.

4.2.5 Determinação da Atividade da Ca^{+2} -ATPase (SERCA1)

A Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético (SERCA 1) foi extraída dos músculos da coxa de coelho (1,5-2 kg) pelo método descrito por Kosk-Kosicka (1999). Todas as etapas foram realizadas a 4°C. O animal foi submetido à eutanásia com altas doses de pentobarbital sódico de acordo com as normas do comitê de ética em pesquisa institucional. Os músculos das duas coxas foram removidos, transferidos para béquer contendo EDTA 0,1 mM, dissecados e lavados com água destilada gelada. Para 170 g de músculo foram adicionados 510 mL da solução I. Os músculos foram cortados e homeogeneizados em tampão MOPS (solução I), pH 7,0 por 5 min e o homogenato foi

centrifugado a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante foi filtrado em gaze e o filtrado foi centrifugado a 40.000 g por 90 min. O precipitado foi suspenso em solução II, homogeneizado em homogeneizador de vidro e mantido em câmara fria por 40 min. A suspensão foi posteriormente centrifugada a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante foi então centrifugado a 40.000 g por 90 min. O *pellet* resultante foi ressuspenso e homogeneizado em homogeneizador de vidro. O material foi conservado em freezer a -80°C até a realização dos ensaios de atividade enzimática. O teor de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976).

4.2.5.1 Caracterização da Ca^{+2} -ATPase (SERCA1)

Para os ensaios de medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase foram utilizadas microplacas transparentes de fundo chato de 96 poços. A velocidade de hidrólise enzimática do ATP foi determinada colorimetricamente por quantificação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP em função do tempo (MURAKAMI *et al.*, 1992). As amostras membranares contendo 0,6 µg de proteína preparadas em tampão Tris-maleato 50 mM foram incubadas na ausência e na presença de FBut (3 a 100 µg/mL) em volume final de 75 µL por poço. Iniciou-se a reação com a adição de 7,5 µL de ATP 30 mM e o tempo de reação foi de 10 minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 25 µL de TCA 50% gelado. Adicionou-se 200 µL de solução ácida de molibdato (15 mL para 0,36 g de ácido ascórbico, segundo HOSSEIN *et al.*, 1993), incubou-se a 37°C por 10 minutos. A tapsigargina (0,01 a 1 µM) foi usada como controle positivo

As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Spectra Max M2 Molecular Devices) a 820 nm. A atividade da Ca^{2+} -ATPase foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

4.2.6 Determinação do Teor de Proteína

A concentração de proteínas das amostras membranares foi determinada pelo método de Bradford (1976). O método baseia-se na mudança de coloração vermelha do corante ácido Coomassie Brilliant Blue G-250, presente no reagente de Bradford, para coloração azul após sua ligação à proteína das amostras. As determinações foram feitas em triplicata e as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro UV-1650 PC (Shimadzu) a 595 nm. A concentração de proteína foi determinada por interpolação da curva padrão obtida com albumina de soro bovino (1 a 8 µg/mL).

4.2.7 Efeito da Fração Butanólica (FBut) e Frações Purificadas (F5, F6 F8, F9, F10, F13, F14, F15 e F16) no Músculo Esquelético

4.2.7.1 Músculo Diafragma de Camundongo sob Estímulo Elétrico Direto

Ratos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Após incisão no gradeado costal o músculo diafragma foi removido e transferido para placa de Petri para a dissecação fina e colocação das amarras. O diafragma foi posicionado verticalmente em uma cuba de contração com capacidade para 5 mL, contendo líquido nutritivo Tyrode à 30°C carbogenado (O₂ 95% e CO₂ 5%) sob tensão de 1 g e pH 7,4. As contrações isométricas foram obtidas na presença de d-tubocurarina (10⁻⁵M) e por estímulo direto (2 ms; 0,1 Hz e voltagem supramáxima) através de eletrodos bipolares imersos na cuba. O registro das contrações foi realizado com um transdutor de força PowerLab (ADInstruments) conectado a um computador e operado por software Chart Pro 5. Os efeitos produzidos pela FBut (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL, n=3) ou frações purificadas (100 µg/mL), foram observados

durante 30 min de incubação em concentrações individuais, após a adição de d-tubocurarina (10^{-5} M).

4.2.8 Análises Estatísticas

Os resultados dos testes *in vivo* foram expressos como média $\pm$ erro padrão ou no caso das IC₅₀, como média geométrica e limites de confiança. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de ANOVA e Dunnett e consideradas significativas para $p < 0,05$. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do pós Teste de Dunnett.

Para análise estatística foi utilizado software Graphpad Prisma, versão 5. As Figuras e Tabelas foram confeccionadas utilizando-se o programa Microsoft Excel 2007. Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ serviram para caracterizar o grau de significância estatística (SNEDECOR, 1963).



V. RESULTADOS

5.1. Efeito do Extrato Aquoso (EA) ou Fração Butanólica (FBut) de *Q. amara* no Sistema Nervoso Central

5.1.1 Atividade Geral - Teste de Irwin

Esse teste teve a finalidade de avaliar os efeitos do EA e sua FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no comportamento animal, comparativamente ao grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.). As doses menores não induziram efeitos detectáveis nesta análise preliminar (n=3/grupo). Os grupos tratados com o EA ou com a FBut 1,0 g/kg, aumentaram a deambulação após 60 min. do tratamento; este efeito perdurou até os 120 min. quando o comportamento animal não se diferenciou dos animais controles. Não foram observados outros sinais de ação estimulante do SNC (hiperatividade, irritabilidade ao toque), ação depressora (hipnose, ptose, sedação) ou atividade autonômica (piloereção, diarreia, salivação, micção exagerada). Não houve morte.

5.1.2 Campo Aberto (Teste do “Open Field”)

O tratamento dos camundongos com a FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), 1 h antes do teste, não alterou o número de cruzamentos durante os 5 min. de observação, a movimentação na periferia e o comportamento de auto-limpeza, comparativamente ao grupo controle (5 mL/kg, v.o.) (n=8/grupo). As duas maiores doses diminuíram o número de levantares em 47% e 45%, respectivamente. O índice de emocionalidade, avaliado pelo número de bolos fecais, diminuiu em 64% no grupo tratado com a maior dose, em relação ao grupo controle (Figura 11) (Tabela 02).

Tabela 02 – Efeito do tratamento com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) da *Q. amara* no teste do campo aberto em camundongos.

Parâmetros de avaliação	Controle (água, 5mL/kg)	FBut 0,1 (g/kg)	FBut 0,3 (g/kg)	FBut 1,0 (g/kg)
No. de cruzamentos	57,4 ± 4,2	59 ± 3,6	47,5 ± 1,8	48,7 ± 1,1
No. de levantares	36,4 ± 5,1	34,8 ± 5,7	19,2 ± 2,1*	20 ± 2,5*
Tempo na periferia (s)	120,3±0,05	120,4±0,03	120,4±0,02	120,4±0,01
Tempo no centro (s)	16,7 ± 3,3	14,4 ± 2,4	7,6 ± 1,3*	7,4 ± 1,3*
Auto-limpeza (s)	13,1 ± 4,6	10,3 ± 3,3	10,3 ± 2,0	10,8 ± 0,6
No. de bolos fecais	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3	0,9 ± 0,3*

Valores apresentados como média ± erro padrão (n=8/grupo) dos parâmetros medidos durante 5 minutos no campo aberto, 1 hora após o tratamento.

* $p < 0,05$, diferente do controle

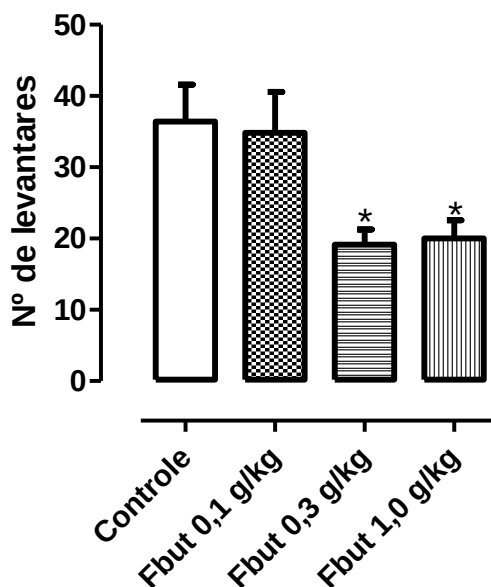


Figura 11 - Efeito da fração butanólica de *Q. amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento no número de levantares no teste do campo aberto, durante 5 minutos de observação em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média ± erro padrão (n=8/grupo). * $p < 0,05$, diferente do controle.

5.1.3 Sono Barbitúrico

Nos camundongos do grupo controle, após 1 hora do tratamento com água (5 mL/kg, v.o.), a administração de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) produziu sono com latência para a perda do reflexo postural de $5,2 \pm 0,3$ min. e duração de $40,3 \pm 4,7$ min ($n=8$ /grupo).

O tratamento com o EA (0,05; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) reduziu o tempo de latência para o sono com as duas maiores doses ($4,0 \pm 0,2$ min. e $3,0 \pm 0,5$ min., respectivamente); a duração do sono foi aumentada apenas com a dose de 1,0 g/kg ($95,5 \pm 15,7$ min.). O controle positivo diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p., 30 min. antes) diminuiu o tempo de latência para $3,5 \pm 0,4$ min. e aumentou a duração do sono para $134,5 \pm 26,3$ min. (Figura 12).

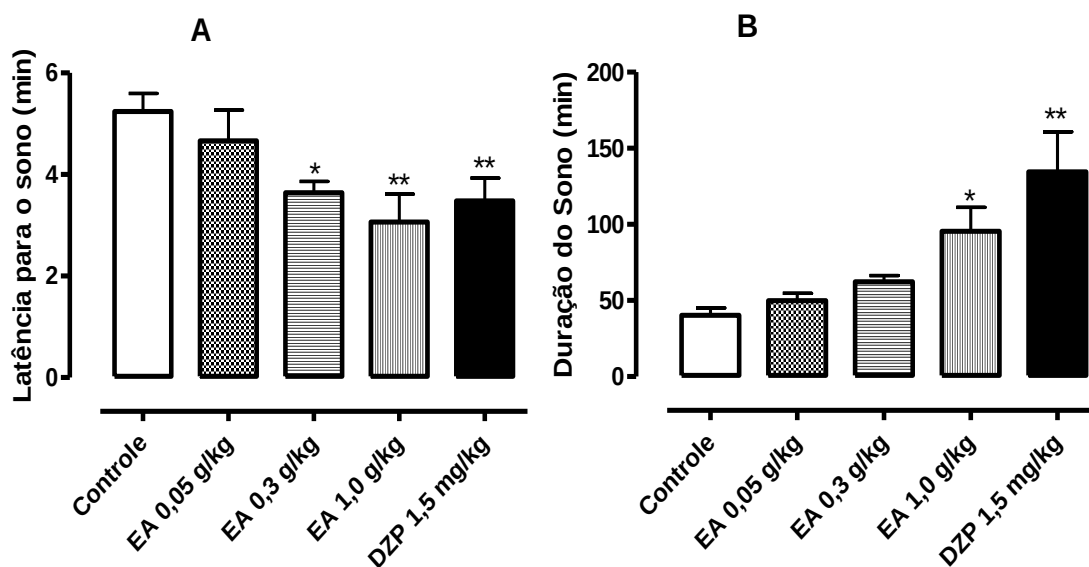


Figura 12 - Efeito do extrato aquoso de *Q. amara* (EA 0,05; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento na latência do sono (A) e na duração do sono (B) induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão ($n=8$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, diferente do controle.

Nos camundongos do grupo controle, após 1 hora do tratamento com água (5 mL/kg, v.o.), a administração de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) produziu sono com latência

para a perda do reflexo postural de $5,0 \pm 0,3$ min. e duração do sono de $44,4 \pm 4,2$ min ($n=8$ /grupo).

O tratamento com a FBut 1,0 g/kg (v.o.), 1 h antes da administração de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), não alterou a latência do sono. As doses de 0,1 e 0,3 g/kg (v.o.), reduziram a latência para a perda do reflexo postural em 28 % e 26 % ($3,6 \pm 0,2$ min. e $3,7 \pm 0,3$ min., respectivamente), em relação ao grupo controle. As doses testadas da FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) aumentaram a duração do sono induzido em 76 %, 76 % e 90,7 % ($78,2 \pm 6,6$; $78,2 \pm 5,7$ e $84,7 \pm 6$ min.), respectivamente, em relação ao grupo controle. Efeito semelhante ocorreu no grupo tratado 30 min. antes com o controle positivo diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.) que diminuiu o tempo de latência em 26 % ($4,0 \pm 0,3$ min.) e aumentou a duração do sono para 127,5 % ($101,0 \pm 15,5$ min.) (Figura 13).

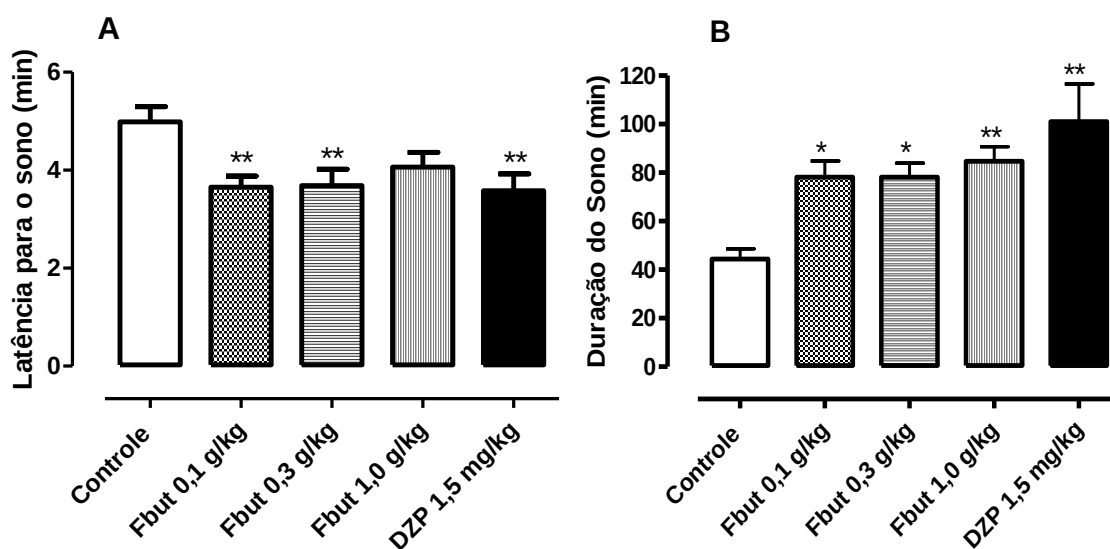
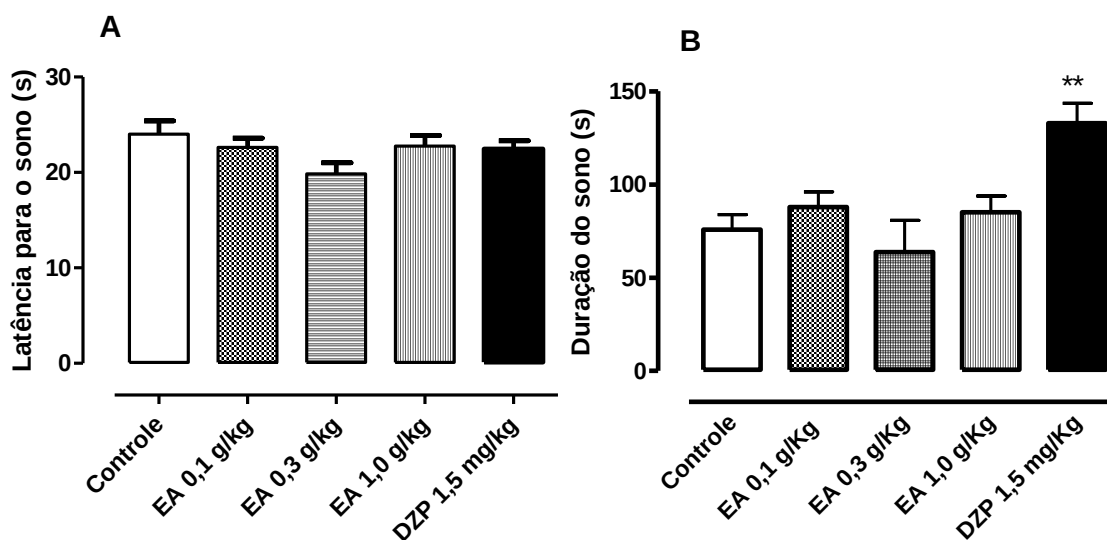


Figura 13 - Efeito da fração butanólica de *Q. amara* (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento na latência do sono (A) e na duração do sono (B) induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão ($n=8$ /grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, diferente do controle.

5.1.4 Sono Induzido por Éter Etílico

Nos camundongos do grupo controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.), o éter etílico (5 mL) induziu sono com latência para a perda do reflexo postural de $24,0 \pm 1,4$ s e duração do sono de $75,7 \pm 8,0$ s ($n=8$ /grupo).

O tratamento com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) não alterou o tempo de latência para o sono induzido pela exposição ao éter, assim como a duração do sono não foi diferenciada dos controles. No grupo tratado 30 min antes com o controle positivo diazepam (DZP 1,5 mg/kg, i.p.), apenas a duração do sono foi aumentada para $132,8 \pm 10,7$ s (Figura 14).



5.1.5 Suspensão pela Cauda

Após 1 hora dos tratamentos, os camundongos foram suspensos pela cauda e avaliados durante 5 min quanto ao tempo de latência para imobilidade e a duração da imobilidade. O tempo de latência do grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) foi de $74,9 \pm 10,2$ s e a duração da imobilidade foi de $34,3 \pm 5,1$ s ($n=8$ /grupo).

Dos grupos tratados com a FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), as maiores doses reduziram o tempo de latência para a primeira imobilidade em 37,6 % e 50 % ($46,7 \pm 6,6$ s e $37,3 \pm 3,5$ s, respectivamente), assim como, aumentaram o tempo de imobilidade em 135 % e 200 % ($80,6 \pm 14,5$ s e $103,1 \pm 10,8$ s, respectivamente), em relação ao grupo controle (Figura 15).

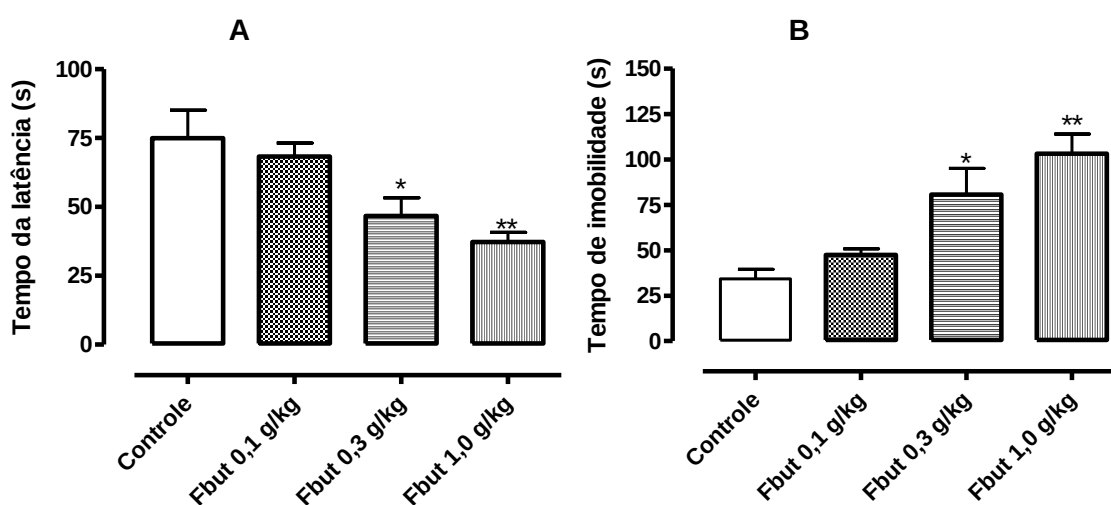


Figura 15 – Efeito da FBut de *Q. amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento no tempo de latência para a imobilidade (A) e na duração do tempo para imobilidade (B) avaliados durante 5 minutos no teste da suspensão pela cauda de camundongos. Grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão ($n=8$ /grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, diferente do controle.

5.1.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os camundongos do grupo controle, após 1 hora do tratamento com água (5 mL/kg, v.o.), permaneceram $0,6 \pm 0,6$ s nos braços abertos do LCE durante os 5 minutos de avaliação (Figura 16). Nos grupos tratados com a FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), apenas a dose intermediária aumentou o tempo de permanência dos camundongos para $13,6 \pm 3,4$ s nos braços abertos (n=8/grupo). Os demais parâmetros analisados não foram alterados, como mostra a Tabela 03.

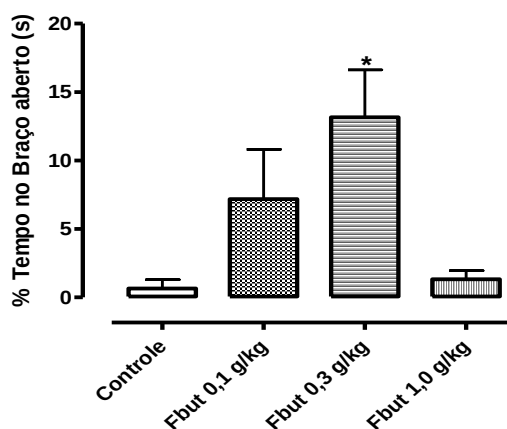


Figura 16 – Efeito da FBut de *Q. amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, durante 5 minutos, em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=8/grupo). * $p < 0,05$, diferente do controle.

Tabela 03 – Efeito do tratamento com a fração butanólica (FBut 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), em camundongos, no labirinto em cruz elevado (LCE).

Parâmetros de avaliação	Controle (água, 5mL/kg)	FBut 0,1 (g/kg)	FBut 0,3 (g/kg)	FBut 1,0 (g/kg)
No. Entrada braço aberto	$1,0 \pm 1,0$	$2,6 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,7$	$1,4 \pm 0,4$
Tempo braço aberto (s)	$0,6 \pm 0,6$	$7,8 \pm 3,6$	$13,6 \pm 3,4^*$	$1,3 \pm 0,6$
No. imersão de cabeça	$17 \pm 4,2$	$26,6 \pm 4,9$	$25,6 \pm 2,0$	$18 \pm 2,6$
No. de estiramento	$25 \pm 4,5$	$26,1 \pm 2,0$	$23,6 \pm 2,0$	$24 \pm 1,2$
No. de bolos fecais	$2,2 \pm 1,0$	$0,7 \pm 0,2$	$2 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,5$

Valores apresentados como média $\pm$ erro padrão (n=8/grupo) dos parâmetros avaliados durante 5 minutos no LCE 1 hora após o tratamento com FBut (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.). * $p < 0,05$, diferente do controle

5.2 Avaliação da Atividade Antiinflamatória e/ou Antinociceptiva do Extrato Aquoso (EA) de *Q. amara* L.

5.2.1 Teste da Formalina 1,5 %

A injeção de formalina 1,5% (300 μ L/pata, i.pl.) na pata posterior direita dos ratos do grupo controle, tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), promoveu uma resposta bifásica característica. Na primeira fase (0-5 min) o tempo de lambertura de pata foi de $80,7 \pm 5$ s e na segunda fase (15-30 min) foi de $150,9 \pm 12,4$ s (n=5/grupo).

O tratamento oral de ratos com o EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg diminuiu o tempo de lambertura da pata na primeira fase para $47,4 \pm 2,0$; $52,5 \pm 2,3$ e $40,0 \pm 6,7$ s, respectivamente, assim como diminuiu na segunda fase do teste para $67,4 \pm 4$; $81,5 \pm 7,5$ e $54,8 \pm 9,5$ s, respectivamente, porém não houve relação dose-efeito nos intervalo de doses (Figura 17).

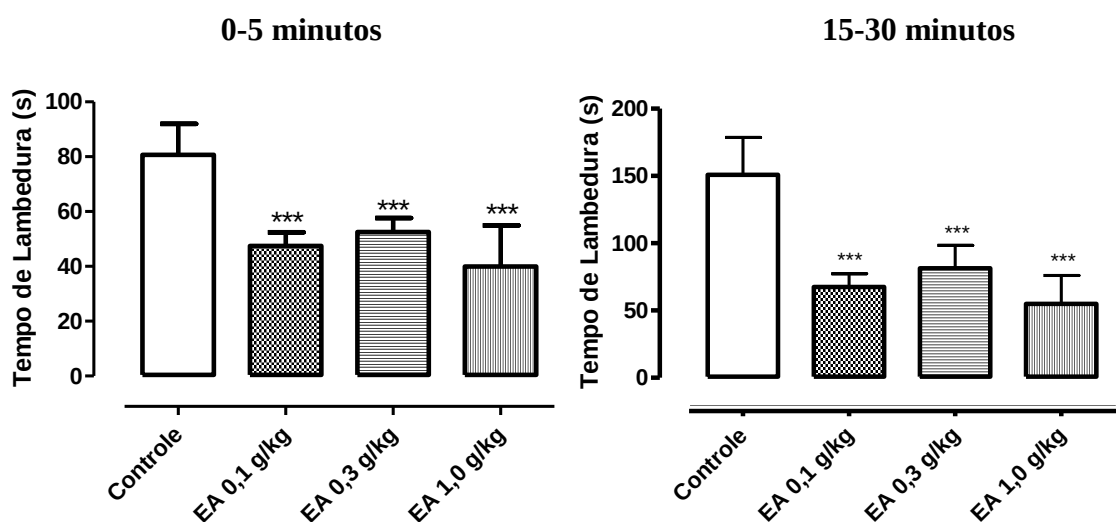


Figura 17 - Efeito do EA de *Q. Amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento sobre o tempo de reação da lambida de pata induzido por formalina 1,5%, em ratos. O gráfico à esquerda mostra o tempo da lambertura de pata da primeira fase e o gráfico à direita mostra o tempo de lambertura da segunda fase. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=5/grupo). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.2.2 Teste do “Tail-Flick”

O tempo de resposta dos ratos à imersão da cauda em água a 50° C antes dos tratamentos foi de $7,0 \pm 0,1$ s (n=24). O tratamento com água (5 mL/kg, v.o.) não alterou a resposta durante os 120 min de experiência. Da mesma forma, a resposta dos animais tratados 1 hora antes com o EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.), não foi alterada em relação ao grupo controle (Figura 19) (Tabela 05).

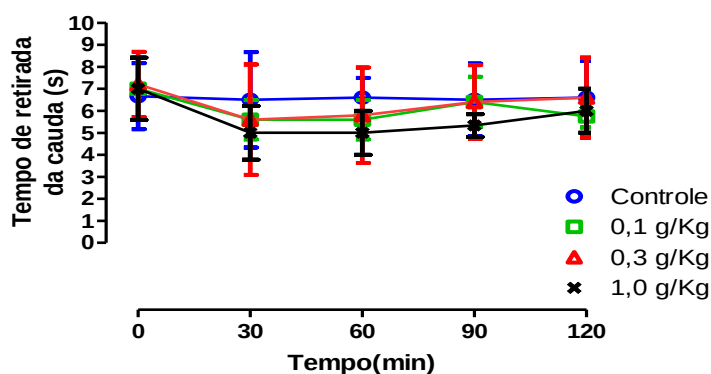


Figura 19- Efeito do EA de *Q. Amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento na resposta à imersão da cauda de ratos em água aquecida à 50°C no teste do “Tail Flick”. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n=6/grupo).

Tabela 05 – Efeito do tratamento com o extrato aquoso (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) na resposta à imersão da cauda de ratos em água a 50° C (teste do “Tail-Flick”).

Tempo (min)	Controle (água, 5 mL/kg)	EA 0,1 (g/kg)	EA 0,3 (g/kg)	EA 1,0 (g/kg)
0	$6,7 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,6$
30	$6,5 \pm 0,9$	$5,6 \pm 0,4$	$5,6 \pm 1,1$	$5,0 \pm 0,5$
60	$6,6 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,4$	$5,8 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,4$
90	$6,5 \pm 0,7$	$6,4 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,7$	$5,3 \pm 0,2$
120	$6,7 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,2$	$6,6 \pm 0,8$	$6,0 \pm 0,4$

Valores apresentados como médias $\pm$ erros padrão, 1 hora após o tratamento com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) nos tempos 30, 60, 90 e 120 min (n=6/grupo).

5.2.3 Contorção Abdominal

A injeção de ácido acético 1% (5 mL/kg, i.p.) nos camundongos do grupo controle tratados 1 h antes com água (5 mL/kg, v.o.), produziu contorções abdominais crescentes com um máximo de $67,2 \pm 7,1$ aos 30 min. de avaliação (n=5/grupo).

O EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg) administrado 1 h antes da injeção do ácido acético diminuiu significativamente o número de contorções abdominais a partir dos 20 min. da injeção. Aos 30 min. as contorções foram 43 % e 38,7 % menores nos grupos tratados com EA 0,1 e 0,3 g/kg, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 18) (Tabela 04).

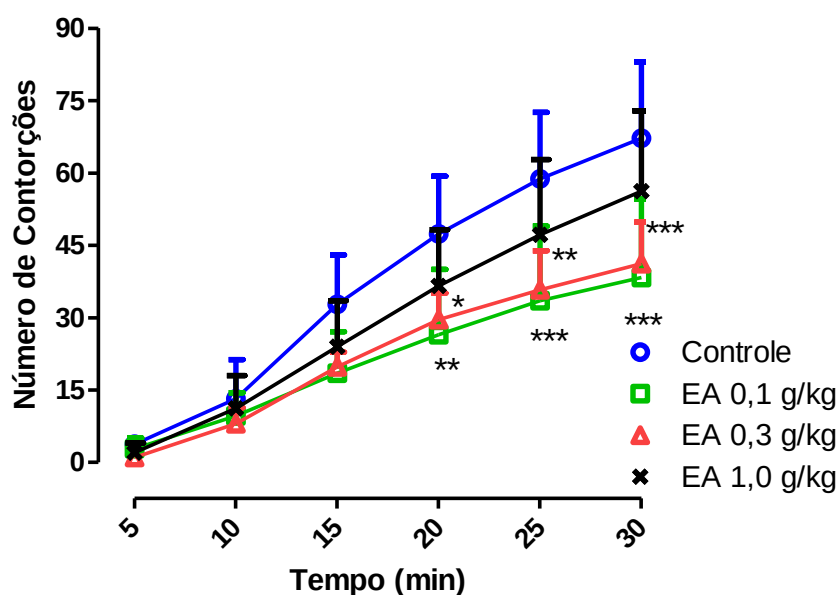


Figura 18 – Efeito do EA de *Q. Amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o) após 1 hora de tratamento no número de contorções abdominais induzidas pela administração de ácido acético a 1 % (5 mL/kg, i.p.), em camundongos. O número de contorções foi acumulado a cada 5 min. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o). Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n=5/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente do controle

Tabela 04 – Efeito do tratamento com o extrato aquoso (EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) no número de contorções induzidas pela administração de ácido acético a 1 % (i.p.), em camundongos.

Tempo (min)	Controle (água, 5 mL/kg)	EA 0,1 (g/kg)	EA 0,3 (g/kg)	EA 1,0 (g/kg)
5	3,8 ± 0,6	2,8 ± 1,0	1,0 ± 0,6	2,0 ± 0,9
10	13,2 ± 3,6	9,6 ± 2,0	8,0 ± 1,5	11,2 ± 3,0
15	32,8 ± 4,5	18,5 ± 3,5	19,8 ± 1,3	24,0 ± 4,3
20	47,4 ± 5,3	26,5 ± 5,5**	29,6 ± 2,4*	36,6 ± 5,2
25	58,8 ± 6,1	33,5 ± 6,3***	35,8 ± 3,6**	47,2 ± 7,0
30	67,2 ± 7,1	38,3 ± 6,6***	41,2 ± 3,8***	56,2 ± 7,5

Valores apresentados como média ± erro padrão do número de contorções produzidas pelo ácido acético 1 % 1 hora após o tratamento com EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., n=5/grupo).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente do controle

5.2.4 Edema de Pata Induzido por Carragenina 1,0 %

O edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina 1,0 % (300 µL/pata) na região intraplantar da pata direita de ratos. A pata esquerda, usada como controle, foi injetada com salina 0,9 % (300 µL/pata, i.pl.). O edema foi medido utilizando pletismômetro e os resultados foram expressos pela diferença entre os volumes deslocados pela pata direita e pela pata esquerda (Δ mL). Os resultados foram mostrados detalhadamente na tabela 06.

A carragenina produziu no grupo controle (5 mL/kg, v.o.) um aumento progressivo do volume da pata a partir dos 30 minutos, com o pico máximo do edema após 180 minutos (1,08 ± 0,05 mL) (n=6/grupo).

O tratamento com o EA (0,01 g/kg, v.o.) inibiu o edema em 81% após 30 minutos. Na leitura de 60 min todas as doses (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) diminuíram significativamente o volume do edema em 61 %, 50 % e 45,6 %, respectivamente. Aos 120 min, as doses 0,01 e 0,1 g/kg inibiram o volume em 31,7 % e 30,1 %, respectivamente. Aos 180 min, apenas a

maior dose do EA (0,1 g/kg) diminuiu em 30 % o volume do edema, quando comparado ao grupo controle (Figura 20).

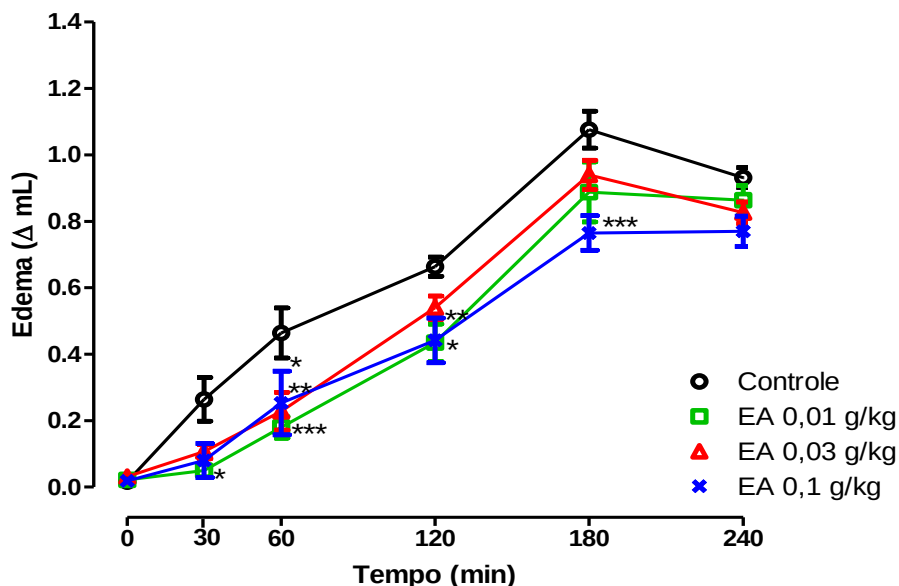


Figura 20 – Efeito do EA de *Q. amara* (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento na variação do volume do edema de pata (Δ mL) induzido por carragenina 1,0 % (i.pl.) em ratos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n=6/grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, diferente do controle

Tabela 06 – Efeito do tratamento com extrato aquoso de *Q. amara* (EA 0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) no volume do edema de pata induzido por carragenina 1,0 % (i.pl.) em ratos.

Tempo (min)	Controle (água, 5 mL/kg)	EA 0,01 (g/kg)	EA 0,03 (g/kg)	EA 0,1 (g/kg)
0	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
30	0,26 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,01*	0,1 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,05
60	0,46 $\pm$ 0,07	0,2 $\pm$ 0,03***	0,2 $\pm$ 0,05**	0,25 $\pm$ 0,1*
120	0,64 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,05*	0,54 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,07**
180	1,1 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,1	0,94 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,05***
240	0,1 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,03	0,77 $\pm$ 0,04

Valores apresentados como médias $\pm$ erros padrão (n=6/grupo) da variação do volume das patas (Δ mL) promovido pela administração intraplantar de carragenina 1 %, 1 hora após o tratamento com EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) nos tempos 30, 60, 120, 180 e 240 min de leitura.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, diferente do controle

5.2.5 Migração Celular

A carragenina 1,0 % foi injetada na cavidade intraperitoneal de ratos 1 hora após o tratamento oral com água (5 mL/kg) ou EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg). No grupo controle, o número de leucócitos totais no exsudato da pleurisia foi de $88,5 \pm 40,4$ (n=6/grupo). Nas doses estudadas, o EA não inibiu a migração de leucócitos em resposta ao agente inflamatório ($82,1 \pm 12,2$; $87,4 \pm 6,7$ e $80,6 \pm 10,0$, respectivamente) (Figura 21).

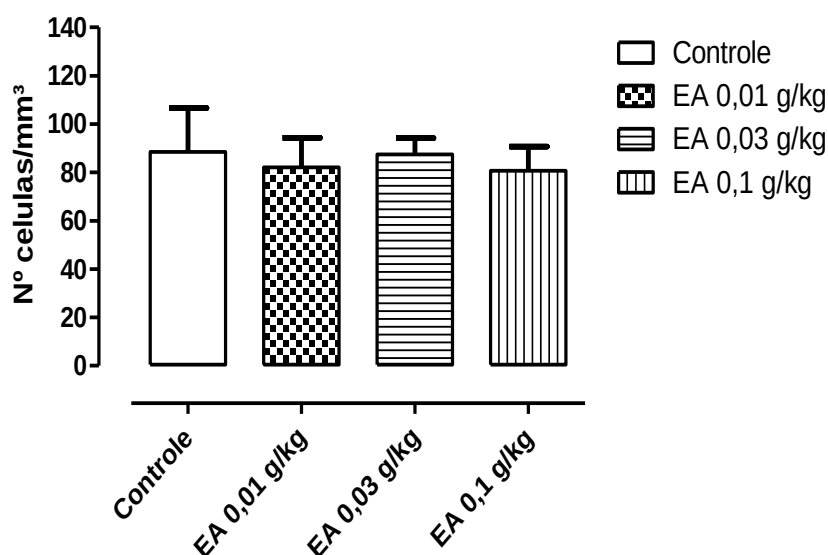


Figura 21 – Efeito do EA de *Q. amara* (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento no teste da migração celular induzida por carragenina 1,0 % (i.p.) em ratos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo).

5.2.6 Edema de Pata Induzido por Dextrana 0,1 %

A dextrana 0,1 % produziu no grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) um aumento progressivo do volume basal do edema da pata a partir da primeira medida, aos 30 minutos, de $0,06 \pm 0,01$ mL para $0,7 \pm 0,07$ mL. Após 60 minutos o volume da pata aumentou para $0,8 \pm 0,07$ mL, enquanto que na leitura de 120 minutos o volume diminuiu para $0,7 \pm 0,07$ mL (n=6/grupo), caracterizando o fim do processo inflamatório (Figura 22).

Todas as doses testadas do EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) inibiram o volume do edema de pata no primeiro tempo de leitura, 30 minutos, em 39 %; 47,5 % e 30 %, respectivamente, assim como a ciproeptadina (82,5 %), antagonista de histamina, quando comparado ao grupo controle. Os valores resultantes desta avaliação estão descritos na tabela abaixo (Tabela 07).

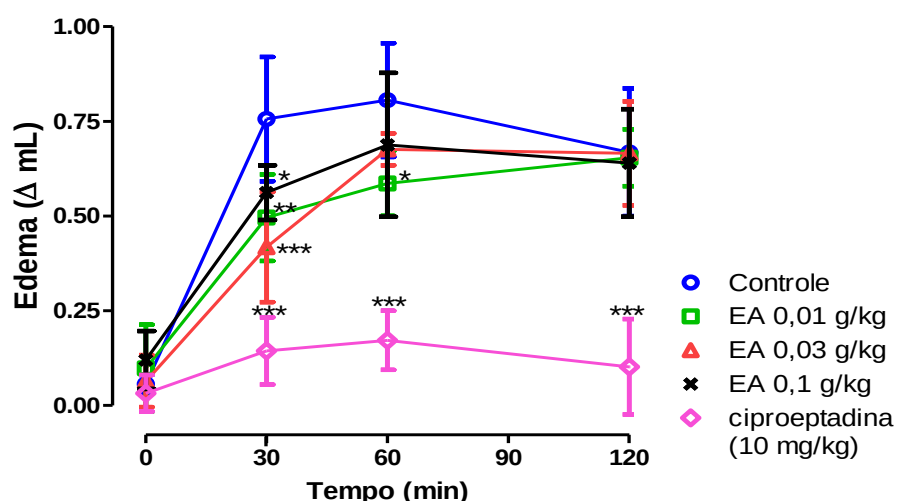


Figura 22 – Efeito do EA de *Q. amara* (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento na variação do volume do edema de pata (Δ mL) induzido por dextrana 0,1 % (i.pl.) em ratos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com ciproeptadina (10 mg/kg, s.c.). Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão ($n=6$ /grupo). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, diferente do controle.

Tabela 07 – Efeito do tratamento com o EA de *Q. amara* (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) no volume de pata induzido por dextrana 0,1% (i.pl.) em ratos.

Tempo (min)	Controle (água, 5 mL/kg)	EA 0,01 (g/kg)	EA 0,03 (g/kg)	EA 0,1 (g/kg)	ciproeptadina (10 mg/kg)
0	0,06 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,1	0,06 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,02
30	0,7 $\pm$ 0,07	0,5 $\pm$ 0,5**	0,4 $\pm$ 0,4***	0,6 $\pm$ 0,03*	0,1 $\pm$ 0,04***
60	0,8 $\pm$ 0,07	0,6 $\pm$ 0,6*	0,7 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,03***
120	0,7 $\pm$ 0,07	0,6 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,06	0,1 $\pm$ 0,06***

Valores apresentados como médias $\pm$ erros padrão ($n=6$ /grupo) da variação do volume das patas (Δ mL) promovido pela administração intraplantar de dextrana 0,1 % 1 hora após o tratamento com EA (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, v.o.) nos tempos 30, 60, 120, 180 e 240 min de leitura.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, diferente do controle

5.3 Efeito do Extrato Aquoso (EA) ou da Fração Butanólica (FBut) de *Q. amara* L. no Sistema Gastrointestinal

5.3.1. Trânsito Intestinal

A distância percorrida pelo carvão ativado (10 %, 0,1 mL/10 g, v.o.) no grupo controle (5 mL/kg, v.o.) foi de $38,4 \pm 3,6$ % (n=6/grupo) do comprimento total do intestino delgado. Os grupos de camundongos tratados 1 hora antes com EA 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg (v.o.) tiveram a distância percorrida aumentada em $55,0 \pm 2,4$ %; $52,0 \pm 2,6$ % e $67,5 \pm 4,0$ %, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 23).

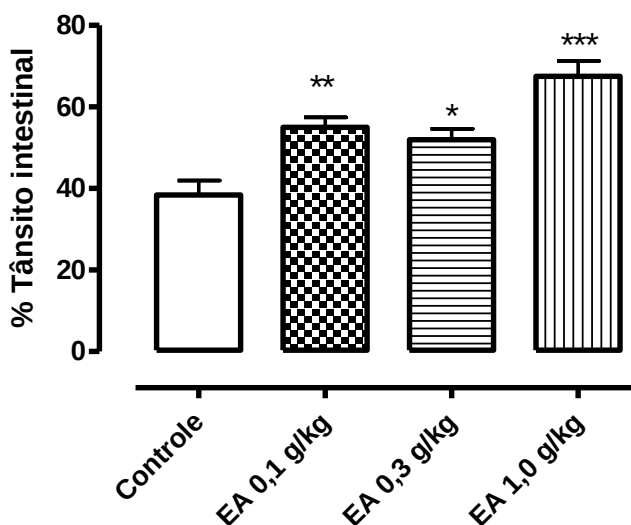


Figura 23 – Efeito do EA de *Q. amara* (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento no trânsito intestinal avaliado pela distância percorrida (%) pelo carvão ativado (10 %, 0,1 mL/10g, v.o.) em relação ao comprimento total do intestino de camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). As colunas e barras correspondem às médias $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente do controle

5.3.2 Atividade Anti-úlceras do Extrato Aquoso (EA) de *Q. amara* L.

5.3.2.1 Lesão Gástrica Induzida por Estresse

Nos camundongos do grupo controle tratados com água (5 mL/kg, v.o.) e submetidos ao estresse por imobilização (4°C/2 h), o número médio de úlceras foi de $8,0 \pm 1,5$ e o índice das demais lesões foi de $18,0 \pm 2,6$ (n=6/grupo). O EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) após 1 h de tratamento protegeu a mucosa gástrica dos animais contra a formação de úlceras gástricas, proporcionalmente às doses testadas ($3,7 \pm 1,5$; $0,8 \pm 0,8$ e $0,2 \pm 0,2$, respectivamente). As maiores doses promoveram a diminuição do índice de lesões gástricas para $9,4 \pm 1,2$ e $8,8 \pm 0,5$ (Figura 24).

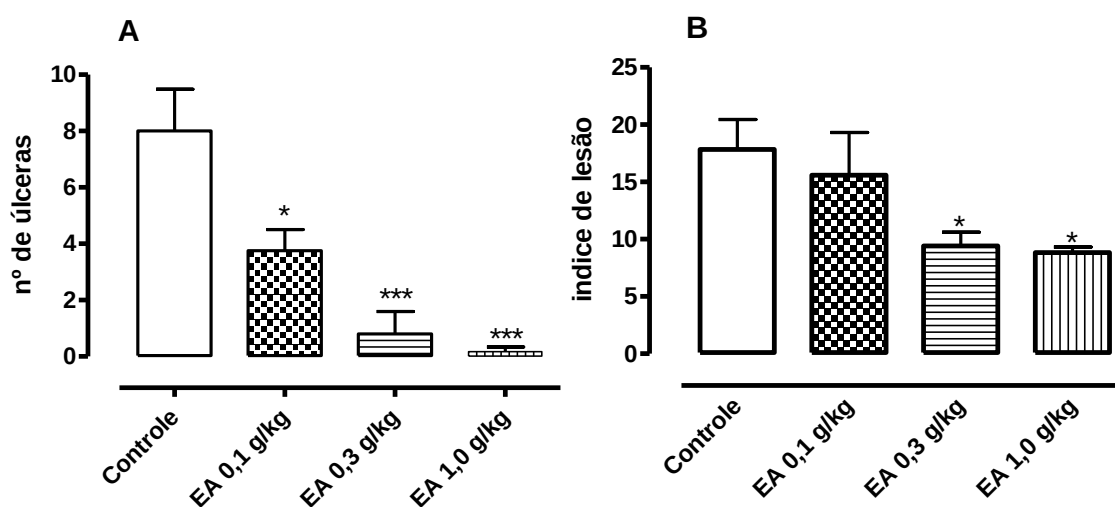


Figura 24 - Efeito do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de *Q. amara* após 1 h de tratamento no número de úlceras (A) e no índice de lesão (B) induzidos pelo estresse por imobilização à 4°C durante 2 horas em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente do controle

5.3.2.2 Lesão Gástrica Induzida por Etanol 75%

A administração oral de etanol 75% (1 mL/100 g) em camundongos tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), produziu lesões na mucosa gástrica com um número médio de úlceras de $11,0 \pm 1,7$ e índices das demais lesões de $18,0 \pm 2,2$ (n=6/grupo). O tratamento com o EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) 1 h antes da administração do etanol, diminuiu a formação de úlceras gástricas para $1,3 \pm 1,0$ e diminuiu o índice de lesões gástricas para $5,8 \pm 1,0$ com a maior dose testada (Figura 25).

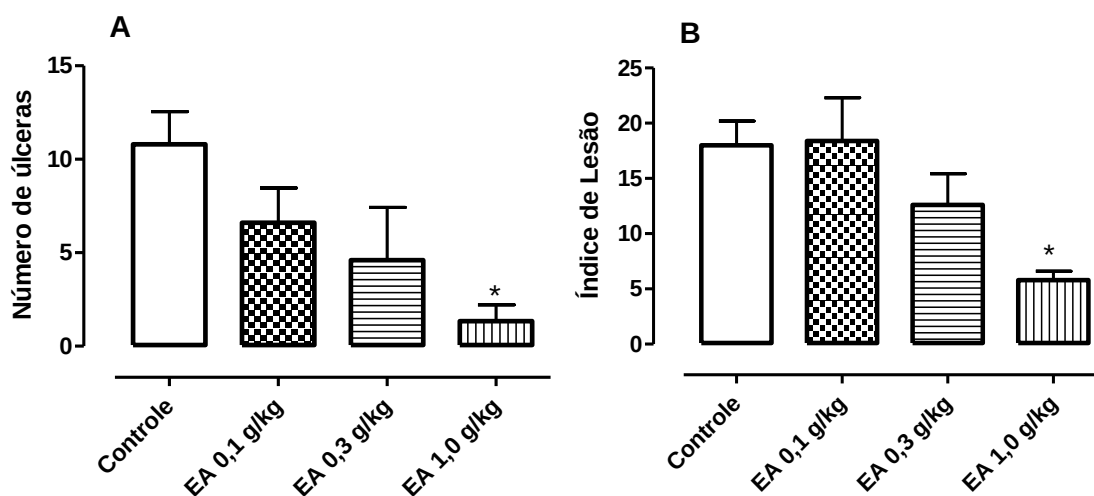


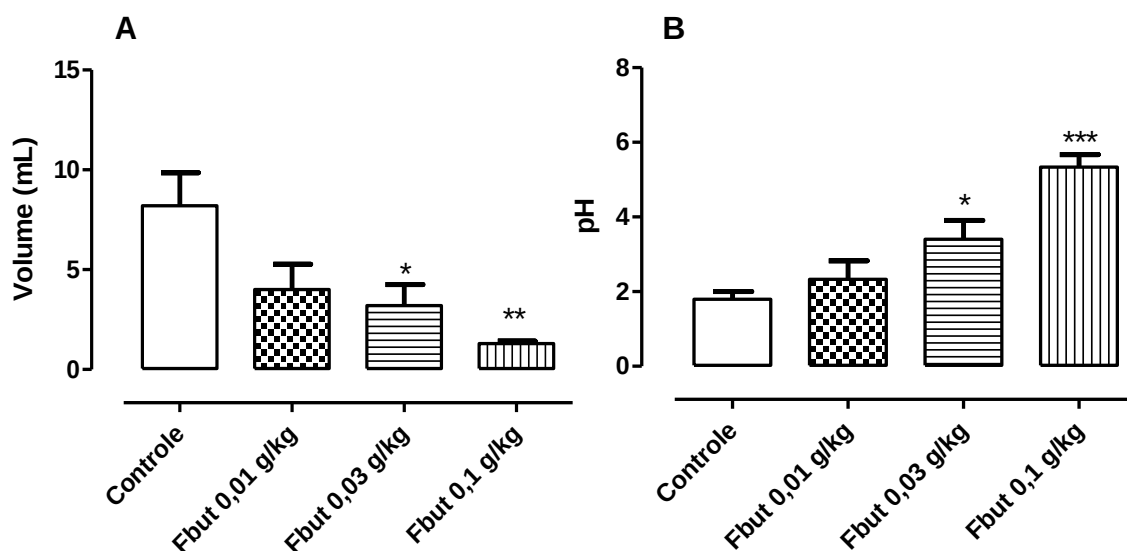
Figura 25 - Efeito do EA (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) de *Q. amara* após 1 h de tratamento no número de úlceras (A) e índice de lesão (B) induzidos por etanol 75% (1 mL/100 g, v.o.), em camundongos. O grupo controle foi tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). * $p<0,05$, diferente do controle

5.3.3 Avaliação da Atividade da Fração Butanólica (FBut) de *Q. amara* na Secreção Ácida Gástrica

5.3.3.1 Método da Ligadura Pilórica

Nos ratos do grupo controle tratados com salina 0,9% (5 mL/kg, i.d.), o volume da secreção gástrica acumulada após 4 horas de oclusão do piloro foi de $8,2 \pm 1,6$ mL, com pH igual a $2,0 \pm 0,2$ e acidez total de $9,1 \pm 2,0$ mEq[H⁺]/mL/4h (n=6/grupo).

A FBut 0,03 e 0,1 g/kg (i.d.) após 1 h de tratamento diminuiu o volume de suco gástrico para $3,2 \pm 1$ mL e $1,3 \pm 0,1$ mL e aumentou o pH luminal para $3,4 \pm 0,5$ e $5,3 \pm 0,3$, respectivamente. As doses de 0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, diminuíram a acidez total proporcionalmente às doses testadas em 59,3 %, 79 % e 95,6 % ($3,7 \pm 1,7$; $1,9 \pm 0,7$ e $0,4 \pm 0,02$ mEq[H⁺]/mL/4h), respectivamente (Figura 26).



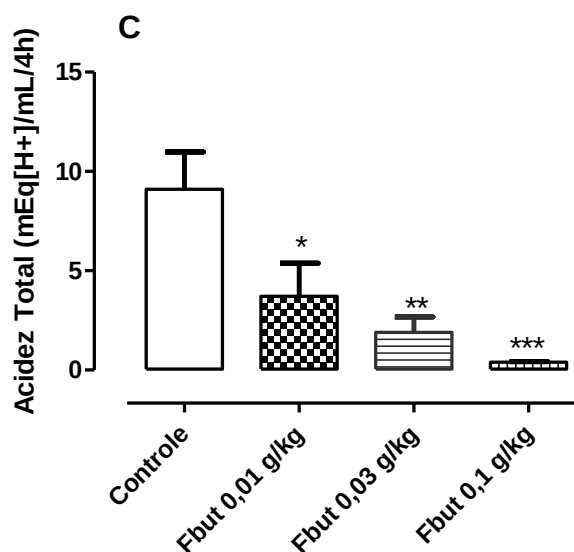


Figura 26 - Efeito da FBut (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg) de *Q. amara* injetada na luz duodenal no volume do suco gástrico (A), no pH luminal (B) e na acidez total (C) da secreção gástrica, em ratos submetidos à ligadura pilórica de 4 h. O grupo controle foi tratado com salina 0,9% (5 mL/kg, i.d.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, diferente do controle

Nos grupos de camundongos tratados previamente com o secretagogo histamina (40 mg/kg, s.c.), o volume da secreção gástrica acumulada após 4 horas de oclusão do piloro foi de $10,3 \pm 0,7$ mL, com pH igual a $1,1 \pm 0,1$ e acidez total de $7,8 \pm 1,4$ mEq[H⁺]/mL/4h (n=6/grupo).

A dose média da FBut (0,03 g/kg, i.d.), administrada 1 hora antes da histamina, diminuiu o volume de ácido secretado para $6,0 \pm 0,7$ mL, o pH aumentou para $2,2 \pm 0,6$ e a acidez total diminuiu para $5,7 \pm 1,6$ mEq[H⁺]/mL/4h, em relação ao grupo controle histamina (Figura 27).

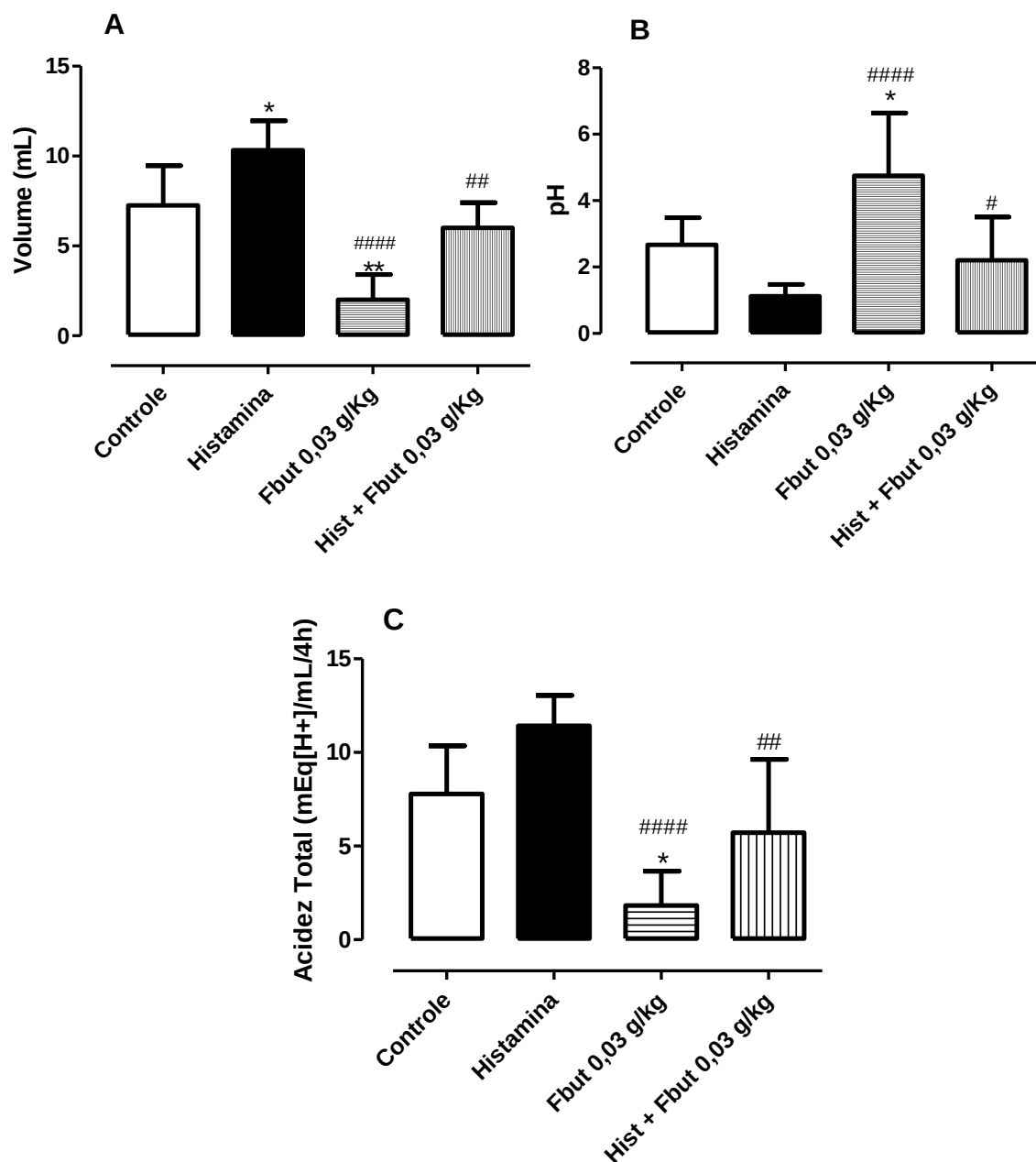


Figura 27 - Efeito da FBut (0,03 g/kg, i.d.) de *Q. amara* no volume do suco gástrico (A), no pH luminal (B) e na acidez total (C) estimulada pela administração subcutânea do secretagogo histamina (40 mg/kg) em ratos submetidos à ligadura pilórica de 4 h. O grupo controle foi tratado com salina 0,9 % (5 mL/kg, i.d.) e controle positivo foi tratado com histamina (40 mg/kg, s.c.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle e ## $p < 0,01$ e #### $p < 0,001$, quando comparado ao controle histamina.

Nos grupos de camundongos tratados previamente com o secretagogo betanecol (20 mg/kg, s.c.), o volume da secreção gástrica acumulada após 4 horas de oclusão do piloro foi de $8,05 \pm 0,9$ mL, com pH igual a $1,2 \pm 0,2$ e acidez total de $10,5 \pm 1,3$ mEq[H⁺]/mL/4h (n=6/grupo).

A dose média da FBut (0,03 g/kg, i.d.), administrada 1 hora antes do betanecol, não diminuiu o volume de ácido secretado ($5,5 \pm 0,5$ mL), não alterou o pH ($1,2 \pm 0,2$) e não reduziu a acidez total ($7,6 \pm 0,6$ mEq[H⁺]/mL/4h), em relação ao grupo controle betanecol (Figura 28).

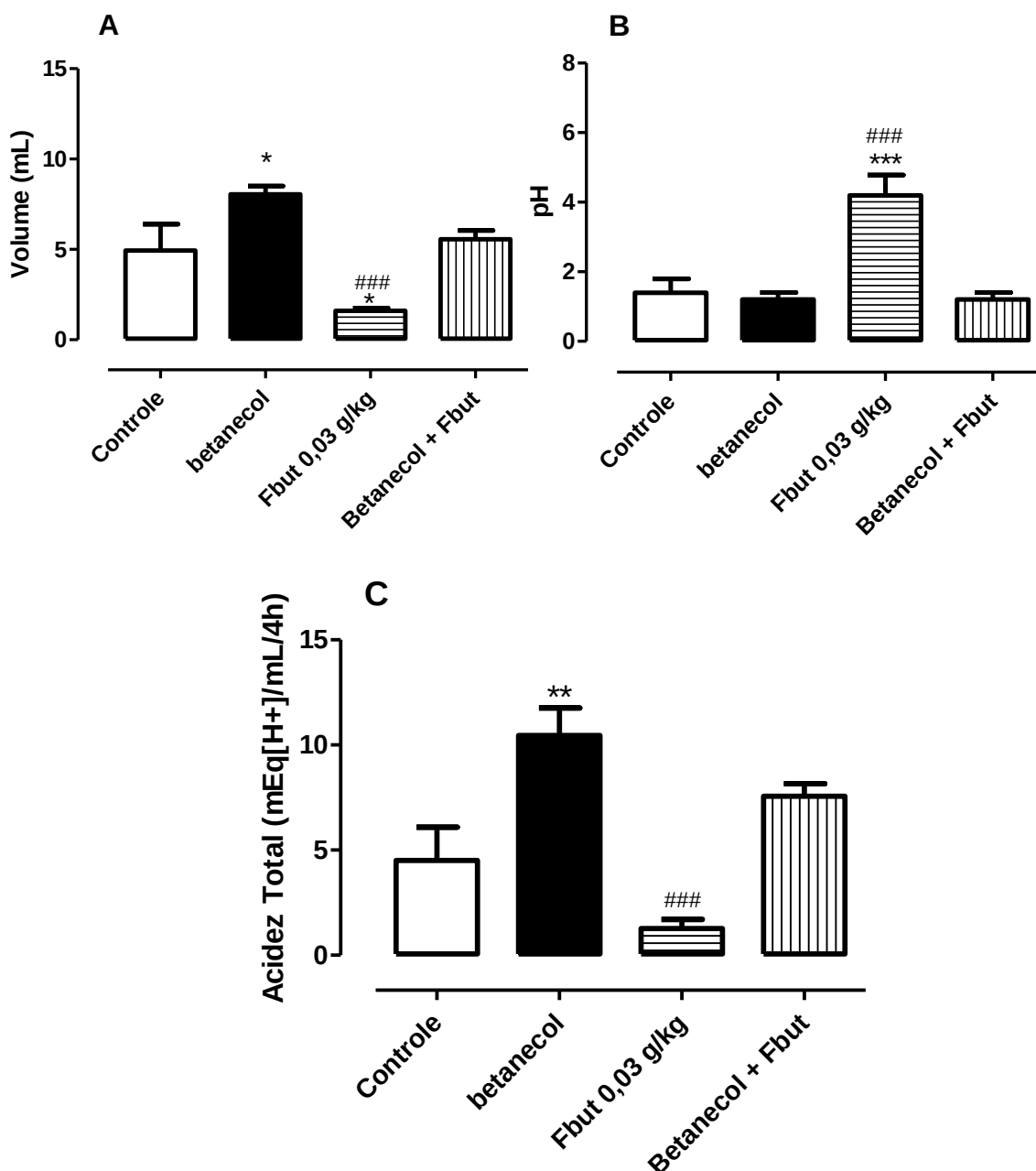


Figura 28 - Efeito da FBut (0,03 g/kg, i.d.) de *Q. amara* no volume do suco gástrico (A), no pH luminal (B) e na acidez total (C) estimulada pela administração subcutânea do secretagogo betanecol (20 mg/kg) em ratos submetidos à ligadura pilórica de 4 h. O grupo controle foi tratado com salina 0,9 % (5 mL/kg, i.d.) e o controle positivo foi tratado com betanecol (20 mg/kg, s.c.). Cada coluna representa a média $\pm$ erro padrão (n=6/grupo). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle e ### $p < 0,001$, quando comparado ao controle betanecol.

5.4 Dosagem da Atividade Enzimática

5.4.1 Atividade da Fbut e frações purificadas na Ca^{+2} -ATPase (SERCA1)

Ensaio preliminares realizados na presença de diferentes concentrações da enzima (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,4 μg), em diferentes tempos de reação (5, 10, 15 e 20 min) e quantidade fixa de ATP (5 mM) mostraram que a atividade ótima da Ca^{2+} -ATPase de microsomas isolados da musculatura esquelética (coxa) de coelhos foi obtida com 0,4 μg da enzima durante 10 minutos de incubação, a 37° C. Nessas condições, a atividade da Ca^{2+} -ATPase foi de 205,5 $\mu\text{mol Pi/mg proteína/min}$ (controle = 100 %, n = 3 em triplicata).

Para as medidas de inibição da atividade da enzima, a tapsigargina (THG 0,01 a 1,0 μM) foi utilizada como controle positivo e inibiu a Ca^{+2} -ATPase proporcionalmente às concentrações com CI_{50} igual a 0,11 μM (LC: 0,06 – 0,2 μM , n=3). A fração butanólica (FBut 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10; 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$), após incubação de 10 minutos, inibiu a atividade da Ca^{+2} -ATPase com CI_{50} igual a 6,0 $\mu\text{g/mL}$ (LC: 2.3 a 15 $\mu\text{g/mL}$, n=3 em triplicata) (Figura 36).

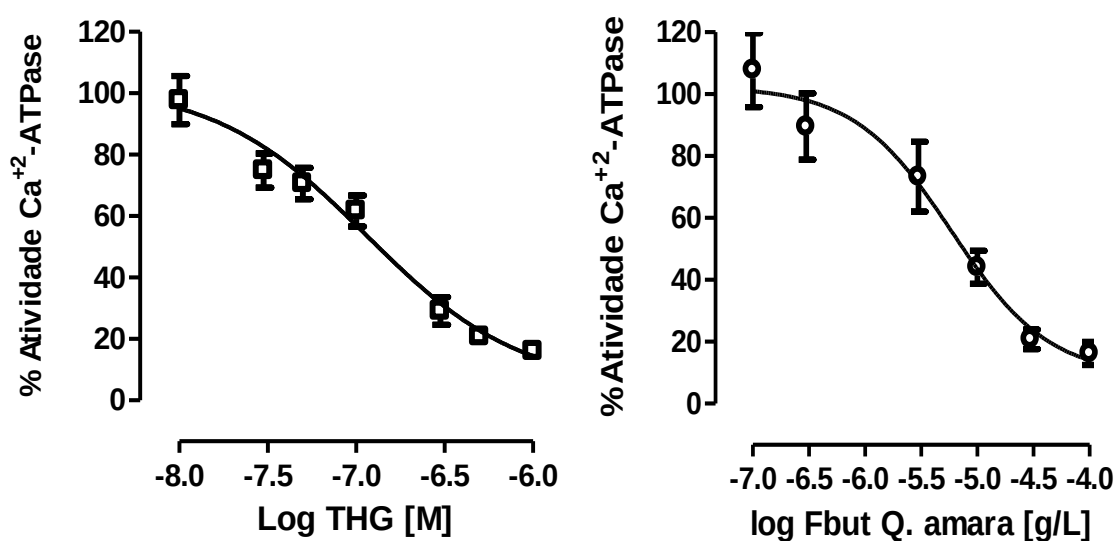


Figura 36 – Efeito da FBut de *Q. amara* na atividade da Ca^{+2} -ATPase isolada de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação à 37°C. A tapsigargina (THG), bloqueador específico da SERCA foi utilizada como controle positivo. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n=3 em triplicata).

As frações purificadas da FBut de *Q. amara* F1, F2, F3, F4, F7, F11 e F12 (1,0; 3,0; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$), incubadas durante 10 minutos à 37°C, não inibiram a atividade da enzima (Figura 37).

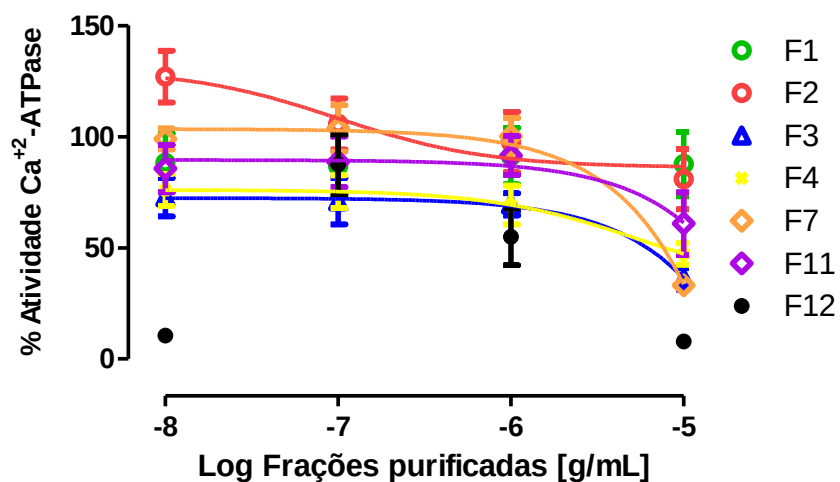


Figura 37 - Efeito das frações F1, F2, F3, F4, F7, F11 e F12 (0,3; 1,0; 3,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$) de *Q. amara* na atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação à 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n=3/grupo, em triplicata).

As frações da FBut de *Q. amara* F05, F06, F08, F09, F10, F13, F14, F15 e F16 (1,0; 3,0; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) inibiram a atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho. As frações F9, F13 e F14 foram as mais ativas com CI_{50} iguais a 0,8; 0,36 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=3 em triplicata) (Figura 38). Os valores das CI_{50} e dos limites de confiança das frações que inibiram a enzima estão expressos na tabela 08.

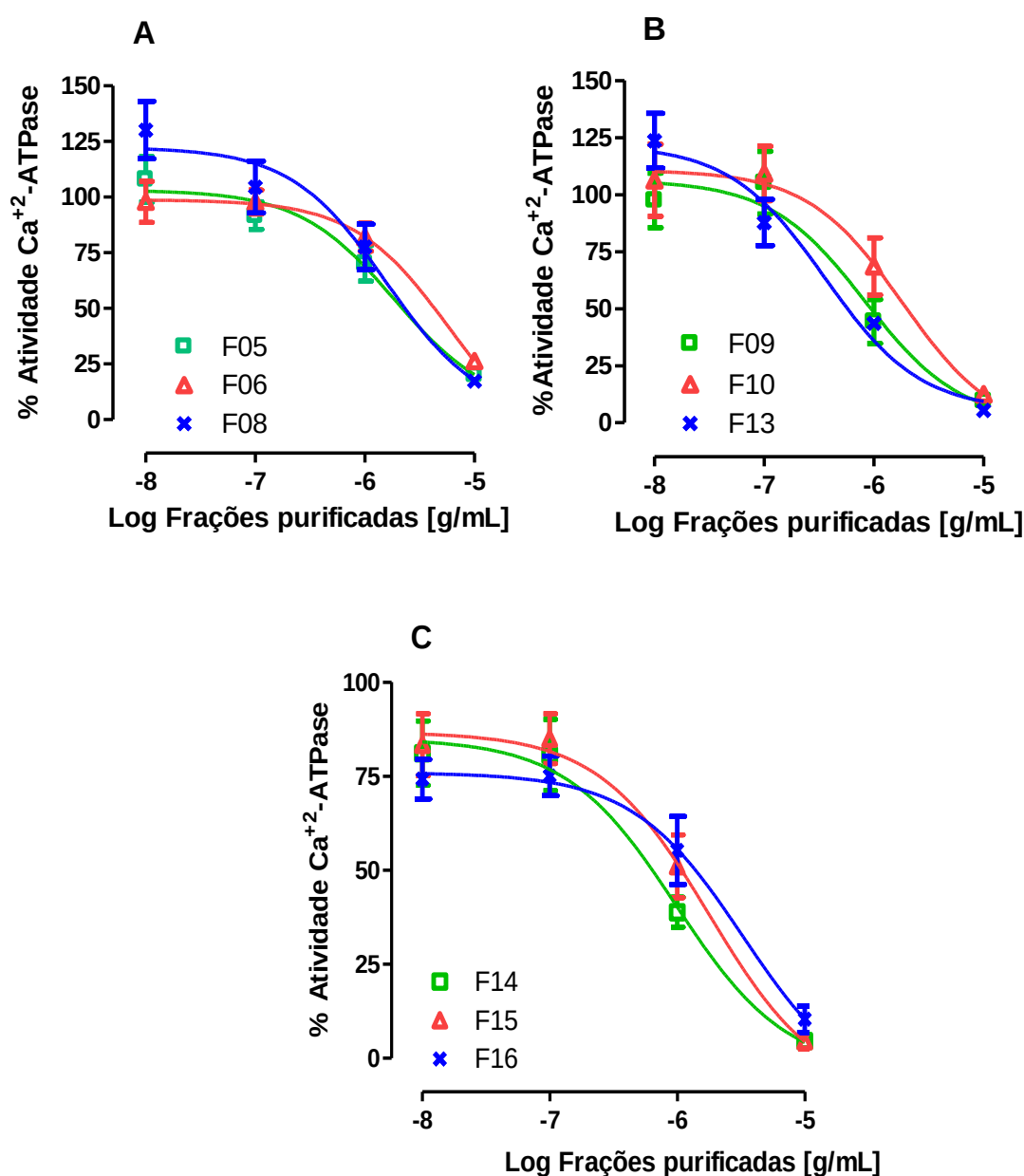


Figura 38- Efeito das frações purificadas da FBut de *Q. amara* na atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação à 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão, respectivamente (n=3, em triplicata).

Tabela 08 – Efeito da FBut (0,1 a 100 µg/mL) de *Q. amara* e frações purificadas (0,3 a 10 µg/mL) na atividade da Ca^{+2} -ATPase de músculo esquelético de coelho após 10 minutos de incubação à 37°C.

Condição	CI ₅₀ (limite de confiança)		Condição	CI ₅₀ (limite de confiança)
Fbut	6,0 µg/mL (2,3 - 15 µg/mL)		F10	1,8 µg/mL (0,4 - 8,6 µg/mL)
F5	1,8 µg/mL (0,5 - 6.3 µg/mL)		F13	0,36 µg/mL (0,1 - 1,1 µg/mL)
F6	5,8 µg/mL (0,8 - 44 µg/mL)		F14	1,0 µg/mL (0,3 - 2,7 µg/mL)
F8	1,5 µg/mL (0,4 - 5.9µg/mL)		F15	1,7 µg/mL (0,6 - 5,2 µg/mL)
F9	0,8 µg/mL (0,2 - 3,3 µg/mL)		F16	3,3 µg/mL (0,7 - 1,5 µg/mL)

Valores apresentados como CI₅₀ e limite de confiança, entre parênteses, determinados em ensaios de atividade da Ca^{+2} -ATPase (n=3, em triplicata).

5.4.2 Atividade da Fbut e frações purificadas na H^{+} - K^{+} -ATPase

Ensaio preliminares realizados na presença de diferentes quantidades da enzima (2,0; 3,5; 7,0 e 11,0 µg), em diferentes tempos de reação (10, 15, 20, 25 e 30 minutos) e quantidade fixa de ATP (20 mM), mostraram que a atividade ótima de microsomas isolados da mucosa gástrica de porco foi obtida com 3,5 µg da enzima durante 30 minutos de incubação, a 37° C. A incubação de ouabaína (1 mM) não alterou os valores de hidrólise obtidos em condições controle, indicando que a preparação estava livre de Na^{+} - K^{+} -ATPase. Nessas condições, a atividade da H^{+} - K^{+} -ATPase foi de $104,9 \pm 1,9$ µmol Pi/mg proteína/min (controle = 100%, n=3 em triplicata).

Para as medidas de inibição da atividade da enzima, a droga Schering 28080 (SCH 3, 10, 30, 100, 300, 500, 700 e 1000 µM) foi utilizada como controle positivo e inibiu a atividade da H^{+} - K^{+} -ATPase com CI₅₀ igual a 467 µM (LC: 270 - 800 µM, n=3 em triplicata). A FBut (1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL) após incubação de 30 minutos a 37°C inibiu a enzima de

forma concentração-dependente, com CI_{50} de 82 $\mu\text{g/mL}$ (LC: 50 a 130 $\mu\text{g/mL}$, $n=3$, em triplicata) (Figura 39).

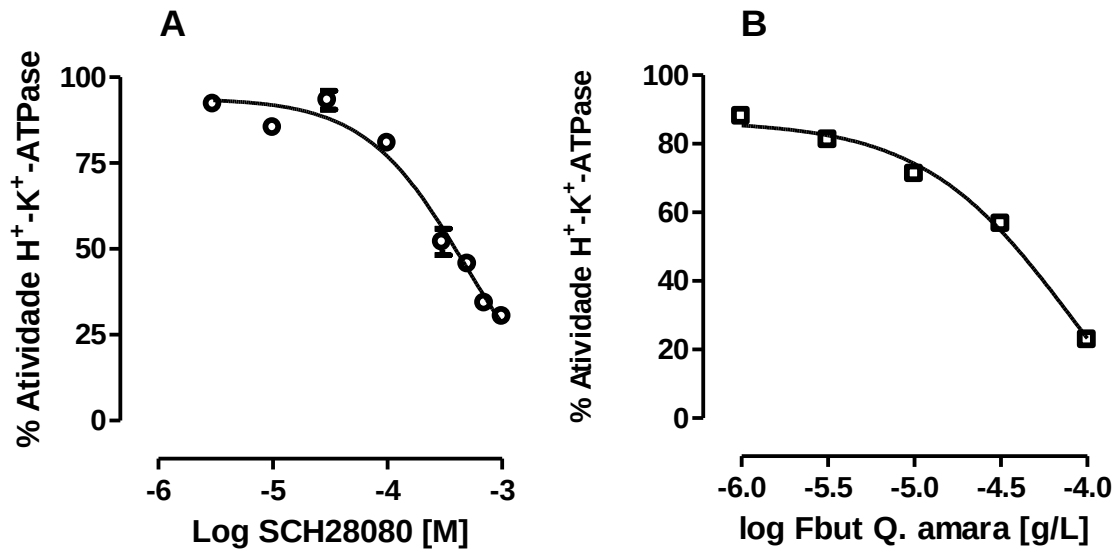


Figura 39 – Efeito do SCH 28080 (3 a 1000 μM) (A) e FBut (1,0 a 100 $\mu\text{g/mL}$) de *Q. amara* (B) na atividade da $H^+-K^+-ATPase$ isolada da mucosa gástrica de porco após incubação por 30 minutos a 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão ($n=3$, em triplicata).

As frações purificadas da FBut de *Q. amara* F1 a F10, F14 e F15 (1,0; 3,0; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$), incubadas durante 30 minutos à 37°C, não inibiram a atividade da enzima (Figura 40).

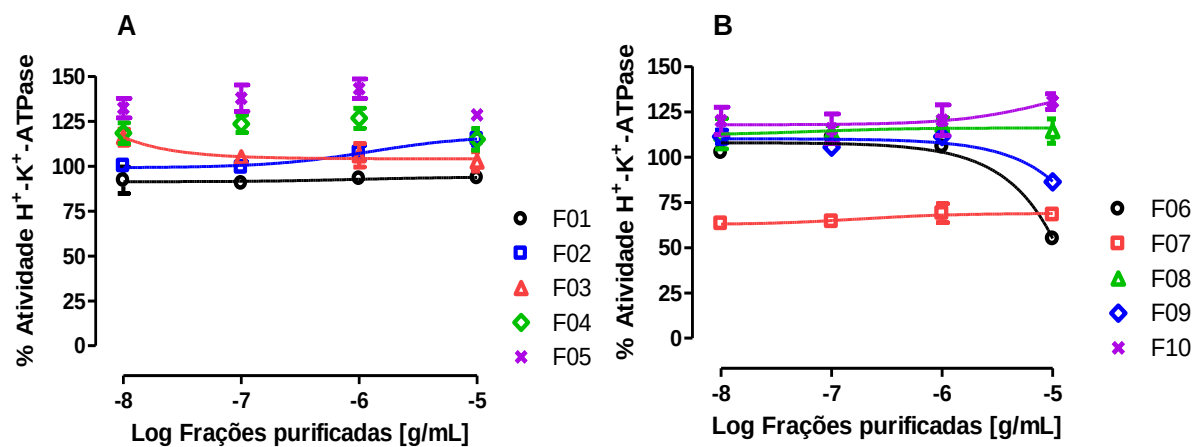


Figura 40 - Efeito das frações purificadas da FBut de *Q. amara* F01a F05 (A) e F06 a F10 (B) na atividade da $H^+-K^+-ATPase$ de mucosa gástrica de suíno após 30 minutos de incubação à 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão, respectivamente ($n=3$, em triplicata)

As frações da FBut de *Q. amara* F11, F12, F13 e F16 (1,0; 3,0; 10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) inibiram a atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da mucosa gástrica de suíno. As frações F11, F12 e F13 foram as mais ativas com CI_{50} iguais a 2,7; 2,5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (n=3 em triplicata) (Figura 41). Os valores das CI_{50} e dos limites de confiança das frações que inibiram a enzima estão expressos na tabela 09.

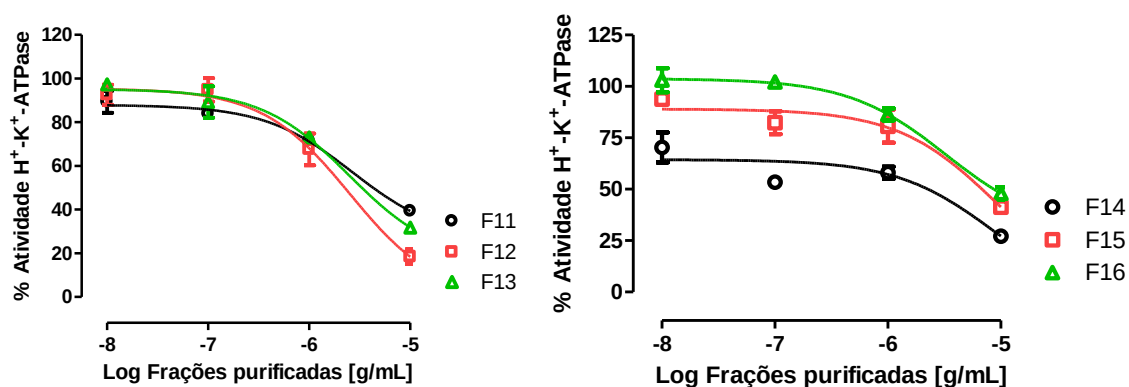


Figura 41 - Efeito das frações purificadas da FBut de *Q. amara* na atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ de mucosa gástrica de suíno após 30 minutos de incubação à 37°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão, respectivamente (n=3, em triplicata).

Tabela 09 – Efeito da FBut (0,1 a 100 $\mu\text{g/mL}$) de *Q. amara* e frações purificadas (0,3 a 10 $\mu\text{g/mL}$) na atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da mucosa gástrica de suíno após 30 minutos de incubação à 37°C.

Condição	CI_{50} (limite de confiança)
FBut	82 $\mu\text{g/mL}$ (LC: 50 - 130 $\mu\text{g/mL}$)
F11	2,7 $\mu\text{g/mL}$ (1,1 - 6,6 $\mu\text{g/mL}$)
F12	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (0,9 - 7,1 $\mu\text{g/mL}$)
F13	2,5 $\mu\text{g/mL}$ (1,0 - 6,0 $\mu\text{g/mL}$)
F16	3,3 $\mu\text{g/mL}$ (1,1 - 9,9 $\mu\text{g/mL}$)

Valores apresentados como CI_{50} e limite de confiança, entre parênteses, determinados em ensaios de atividade da $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (n=3, em triplicata).

5.5 Efeitos da FBut e Frações Purificadas no Músculo Diafragma de Camundongo sob Estímulo Elétrico Direto.

A FBut 0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL aumentou a amplitude de contração do diafragma estimulado eletricamente na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) de 5 %, 17 % e 50 %, respectivamente (n=4) (Figura 34).

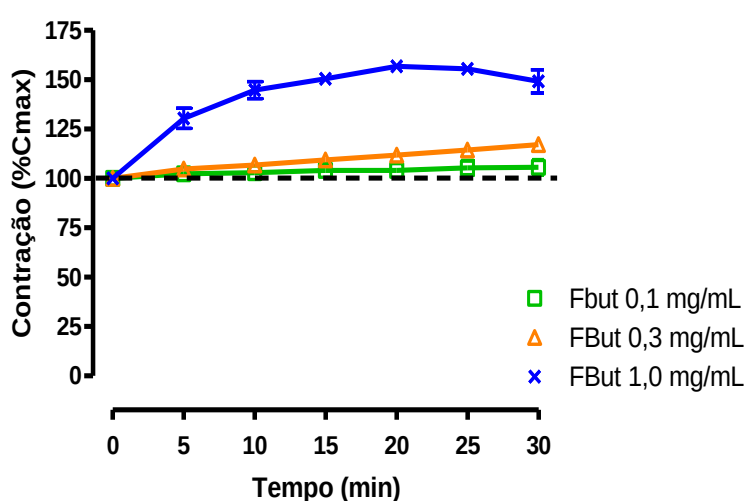


Figura 34 – Efeitos da FBut de *Q. amara* (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL) na contração do músculo do diafragma de camundongo obtida com estimulação elétrica direta da fibra muscular na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) a 30°C. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erros padrão (n = 4) da contração em % da basal antes da adição da FBut no tempo zero.

As atividades das frações purificadas da FBut na contração muscular foram estudadas no diafragma de camundongo incubado com d-tubocurarina (10^{-5} M) (n=4 para cada fração).

As frações F05, F09, F10 e F13 (1,0; 3,0; 10,0 e 30 μ g/mL) não alteraram a contração do diafragma das frações. As frações F06, F08 e F16 (1,0; 3,0; 10,0 e 30 μ g/mL) inibiram a contração muscular, quando incubadas na maior concentração (30 μ g/mL), em 5,6 %, 5,7 % e 12,7% da contração basal, respectivamente.

As frações, F14 e F15 aumentaram a amplitude da contração basal do diafragma; a potenciação foi de 17 % e 10 %, na presença da maior concentração, respectivamente (Figura 35).

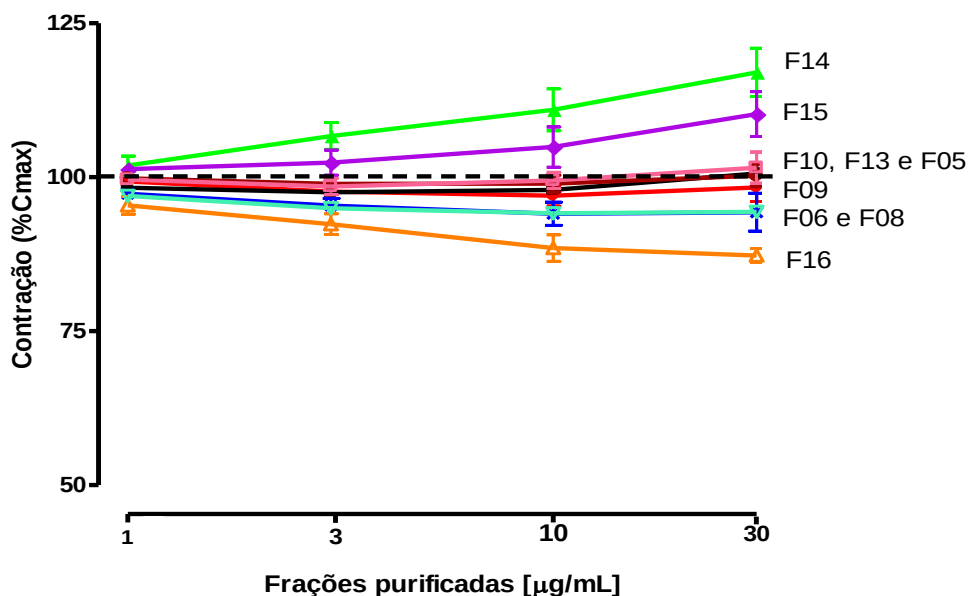


Figura 35 - Efeito das frações purificadas de *Q. amara* na contração do músculo diafragma de camundongo obtidas por estimulação elétrica direta da fibra muscular na presença de d-tubocurarina 10^{-5} M. As frações foram estudadas individualmente com concentrações acumuladas a cada 10 min. Os símbolos e barras verticais representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 4$) dos efeitos relativos à amplitude da contração basal antes da incubação das frações (100%).



VI. DISCUSSÃO

A *Quassia amara* L., Simaroubaceae, é utilizada na medicina popular como antimicrobiana, antimalárica, antiinflamatória, no combate à anemia e no tratamento de problemas do trato gastrointestinal; o uso como repelente e inseticida também é comum (BERG *et al.*, 1983; CORRÊA, 1984; RIBEIRO *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2005).

Nas redes científicas, como Pubmed e Lilacs, encontramos 26 e 5 publicações, respectivamente, que tratam da atividade farmacológica dos diferentes extratos de *Q. amara*. Dos publicados no Pubmed, cerca de 8 (oito) trabalhos relatam a atividade antimalárica de compostos isolados desta planta. Os demais tratam de ações sistêmicas como efeitos antiedematogênicos, antiulcerogênicos, atividade citotóxica, inseticida, entre outros.

Entretanto, a maioria dos estudos foca o isolamento químico dos quassinóides, principalmente da simalicalactona D, aos quais foi atribuída a atividade antimalária *in vitro* e *in vivo*. O isolamento destes compostos geralmente foi obtido do infuso de folhas frescas, particionado em CH₂Cl₂ ou metanol e, posteriormente, purificado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Com esse método foram isolados os alcalóides β-carbolina, alcalóides indólicos e os quassinóides (quassina, neoquassina, simalicalactona D e E, picrassins B, H, I e J) (BARBETTI *et al.*, 1990). Porém, a maioria dos estudos químicos e farmacológicos geralmente realizados após extração com solventes de baixa polaridade, não tem sido acompanhados da padronização química e da descrição da proporção relativa dos compostos constituintes dos extratos.

Sem o monitoramento da atividade do extrato inicial e das frações resultantes da purificação com solventes apolares, é difícil detectar a presença de princípios mais polares, talvez ativos, ou importantes por sua ação coadjuvante, que podem condicionar a reprodutibilidade dos efeitos dos extratos vegetais (DEY; HARBORNE, 1991; DE SMET, 2002).

Do ponto de vista farmacológico, a química de um extrato permite correlacionar quantitativamente a causa (quantidade de extrato) e a intensidade do efeito produzido em

animais. Em outras palavras, a padronização de extratos de plantas é um pré-requisito para a garantia da qualidade de um fitoterápico, isto é, para garantir a constância da atividade terapêutica e a segurança farmacológica. No planejamento do presente trabalho houve a preocupação de identificar taxonomicamente a planta, marcar o local de coleta, preservar amostras de folhas frescas para comparação molecular futura com outros exemplares, depositar amostra seca em herbário de referência nacional, estabilizar o material vegetal por secagem natural à sombra, extrair a planta medicinal como indicado na medicina popular, padronizar o extrato em CLAE, purificar os compostos constituintes, identificar os efeitos farmacológicos principais e os compostos responsáveis pelas atividades.

A padronização química do extrato aquoso da *Q. amara* utilizada neste trabalho foi realizada em CLAE considerando os compostos definidos pelo tempo de retenção, em colunas e eluentes padronizados, e com área maior que 1% da área total do cromatograma registrado em 210 nm. Além disso, por ser planta panamazônica sujeita às variações do ecossistema e das dificuldades de identificação taxonômica, uma amostra do material fresco (folhas) coletado foi preservada para a comparação molecular futura com exemplares de *Q. amara* de outras regiões.

A infusão a 2,5% de folhas secas moídas de *Q. amara* em água destilada, seguida de filtração, concentração e liofilização, teve rendimento de 20% relativamente à quantidade do pó da folha extraído. A fração butanólica (FBut) teve 40% de rendimento relativamente ao extrato aquoso (EA). O espectro da FBut em CLAE foi coincidente com o da EA, porém 5 vezes mais concentrado depois de eliminadas as substâncias mais polares (com baixo TR).

A FBut purificada em CLAE preparativa levou ao isolamento de 18 frações (F1 a F18). As 6 (seis) substâncias majoritárias da FBut tiveram tempos de retenção de 6,3; 11,9; 19,0; 20,8; 21,7; 22,7 min e áreas sob a curva de 5,3; 8,2; 4,8; 7,5, 13,8 e 18,2%, respectivamente. Essas frações foram enviadas para identificação química instrumental na

Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e na Universidade de São Paulo (USP).

As frações F17 e F18 não foram estudadas nesta etapa devido a sua baixa polaridade, que exigiu a adição de tween 80 ou cremophor em concentrações que afetariam a experimentação.

O estudo farmacológico pré-clínico de um produto natural tem por objetivo comprovar (ou não) a sua eficácia primária, avaliar a potencialidade tóxica, o grau de toxicidade e o perfil dos efeitos colaterais, bem como relacionar esses efeitos às doses e ao(s) mecanismo(s) de ação em várias espécies animais (LAPA *et al.*, 1999).

O teste preliminar da atividade antiparasitária da FBut contra *Plasmodium chabaudi*, (eficácia primária realizada na UNIFESP pela equipe de professores co-orientadores da Farmacologia CBA-UFAM), mostrou que a incubação *in vitro* de FBut (3 - 100 µg/mL) não alterou o número de hemácias parasitadas em cultura de *Plasmodium chabaudi*; o tratamento prévio por via oral com a FBut (100 mg/kg/dia) tampouco foi eficaz na prevenção da infecção de camundongos induzida *in vivo* com injeção i.p. dos parasitas.

Estes resultados não confirmaram os de outros autores que descreveram atividade antiparasitária *in vivo* utilizando *P. berghei berghei*, em camundongos tratados por via oral com o extrato metanólico (200 mg/Kg/por dia) de folhas de *Q. amara* ou os obtidos *in vitro*, contra cepas resistentes de *P. falciparum*, em concentrações iniciais variando de 1,8 a 500 µg/ml, tanto do extrato aquoso bruto (CI₅₀ = 0.0025 µg/ml) quanto dos quassinóides quassina (CI₅₀ = 0.06 µg/ml, 0.15 µM) e neoquassina (CI₅₀ = 0.04 µg/ml, 0.1 µM) (PHILLIPSON *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 2009).

No entanto, os extratos da *Q. amara* utilizados no presente trabalho produziram muitos outros efeitos nas doses e concentrações utilizadas nos testes antiplasmódios.

Estudos da atividade farmacológica dos extratos de *Q. amara* no sistema nervoso central (SNC) não são freqüentes. Em nossas experiências, a triagem farmacológica do EA e da FBut em camundongos, indicou uma atividade depressora do sistema nervoso central de baixa intensidade, revelada inicialmente na alteração comportamental do animal no campo aberto, confirmada posteriormente em vários outros testes.

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar a atividade exploratória e o comportamento de medo frente a um novo ambiente. Neste teste, a tendência natural dos animais é de explorar novos lugares, apesar do conflito provocado pelo medo (MONTGOMERY *et al.*, 1955).

O tratamento oral de camundongos com o EA ou FBut 1,0 g/kg aumentou a deambulação no campo aberto, porém a FBut não alterou o número total de cruzamentos dentro da caixa, o que descartou uma ação na capacidade de locomoção dos animais. A diminuição do número de levantares dos grupos tratados por via oral com FBut 0,3 e 1,0 g/kg, sugeriu um efeito sedativo, que foi comprovado posteriormente no teste do sono induzido pelo pentobarbital. É conhecido que os barbitúricos inibem o SNC ao interagir com receptores GABA_A, promovendo aumento do influxo de cloro, hiperpolarizando e estabilizando o neurônio (LANCEL *et al.*, 1999). Outros depressores potenciam essa ação, enquanto estimulantes do SNC a antagonizam. Portanto, a potenciação do efeito barbitúrico pelo tratamento prévio com o EA e FBut indica uma depressão central produzida pelo extrato, de pequena intensidade nas doses utilizadas, mais evidente na inibição dos levantares que na deambulação espontânea.

Contudo, um resultado positivo no teste do sono não garante um efeito hipno-sedativo primário do extrato, uma vez que a interferência com o metabolismo hepático dos barbitúricos

pode alterar a cinética dessas drogas e, conseqüentemente, seus efeitos no SNC. Para verificar esta possibilidade foi utilizado o modelo da anestesia induzida pelo éter etílico. O éter é eliminado através do sistema respiratório, sem sofrer metabolização; assim, a duração do efeito anestésico pelo éter é dependente apenas do grau de depressão prévia do SNC. Depressores do SNC potenciam a ação do éter (VIEIRA *et al.*, 2001). Existem limitações a esse teste: por razões éticas, o éter precisa ser de destilação recente, sem peróxidos irritantes do sistema respiratório capazes de produzir apnéia e sem misturas, em geral etanol, que dificultam a sua evaporação. Em seguida é necessário padronizar a anestesia controlando a temperatura da sala e da capela ventilada, a vedação da câmara de anestesia, a quantidade de éter, o tempo de evaporação (pressão parcial do éter no ar inspirado) e o tempo de exposição do animal aos vapores. Apenas nessas condições os resultados são reprodutíveis (LAPA *et al.*, 2003).

Em nossas experiências, os resultados mostraram que o tratamento prévio com o EA nas doses comentadas acima, não alterou a duração da anestesia etérea, indicando que o aumento na duração do sono induzido pelo pentobarbital está provavelmente relacionado com alterações do metabolismo hepático do barbitúrico. Sabe-se que os barbitúricos são metabolizados pela via oxidativa que envolve o citocromo CYP₄₅₀, mais especificamente o CYP2B6, NADPH e O₂ (NEBERT; GONZALEZ, 1987). A inibição dessa via metabólica pode manter elevada a concentração plasmática do barbitúrico, proporcionando maior tempo de interação com o receptor GABA_A (GOLOUBKOVA *et al.*, 1998; CUPP *et al.*, 1999) e a duração do efeito depressor do SNC. Estes resultados, explicam também o efeito de pequena intensidade do EA nos camundongos no teste do campo aberto, visível apenas no número de levantares.

As outras ações do EA e FBut no SNC foram estudadas com testes indicativos da reação animal frente a situações anômalas de desafio comportamental. A atividade do tipo

antidepressiva da FBut, por exemplo, foi avaliada utilizando o modelo da suspensão pela cauda. A depressão do SNC é quadro patológico humano considerado o grande “mal do século”, pois tira milhares de indivíduos do mercado de trabalho (D’SÁ; DUMAN, 2002). A depressão do SNC não tem correlato funcional em roedores. No entanto, a medida da reação de desespero desses animais frente a agressões ambientais irremovíveis permite identificar drogas que na espécie humana tem ação naquela patologia. No teste de suspensão pela cauda, após tentativas infrutíferas de escapar da situação de ameaça, os animais desenvolvem uma postura de imobilidade cuja latência e duração são proporcionais ao estado de estresse animal (STÉRU *et al.*, 1985; 2005; CRYAN *et al.*, 2005). A imobilidade no teste de desespero comportamental em roedores indica a readequação desfavorável do animal à resposta de sobrevivência, no caso interrupção da luta para se liberar da situação agressiva (CRYAN *et al.*, 2005).

Nos camundongos tratados com FBut da *Q. amara* a latência para a instalação e a duração da imobilidade não foram significativamente diferente das obtidas nos animais controles. Portanto, ação tipo-antidepressiva da FBut não foi detectada.

Da mesma forma, ação tipo-ansiolítica foi avaliada em camundongos com o modelo do labirinto em cruz elevado (LCE). A ansiedade também é quadro patológico humano. Em roedores a “ansiedade” é inferida das respostas comportamentais de defesa frente a estímulos aversivos (PELLOW; FILE, 1986). O teste do LCE é um dos testes animais mais utilizados no estudo das bases neurobiológicas da ansiedade experimental (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005) e é uma ferramenta importante na busca de novas moléculas bioativas com potencial atividade ansiolítica. No LCE, os braços protegidos pelas paredes elevadas representam a situação de proteção à possível agressão ambiental. Grossen e colaboradores (1972) justificaram esse comportamento como uma estratégia da evolução para evitar predadores da espécie, sobretudo os predadores aéreos. O instinto animal de manter a proteção nos braços

fechados conflita, porém, com o instinto de sobrevivência que o faz explorar ativamente o ambiente novo e marcá-lo com seu próprio cheiro. A diminuição desse conflito favorecendo a exploração dos braços abertos indica um efeito do tipo-ansiolítico, enquanto a situação oposta favorecendo a permanência do animal nos braços fechados do labirinto indica uma ação tipo ansiogênica.

Alguns sinais etológicos complementares indicativos dessa situação de conflito (tempo de permanência e número de entradas nos braços abertos e fechados, imersões desprotegidas da cabeça para baixo da plataforma, estiramentos corporais com parte do corpo protegida, exploração da região distal dos braços abertos e comportamento de levantar repetidamente o corpo) quando medidos simultaneamente à movimentação do animal no LCE, facilitam a avaliação quantitativa dos efeitos comparativamente ao grupo controle (PELLOW *et al.*, 1985).

A FBut da *Q. amara* aumentou o tempo de permanência nos braços abertos (ação tipo-ansiolítica) apenas com a dose intermediária de 0,3 g/kg. A ausência de efeito no tratamento com a maior dose não tem explicação fácil: descartadas as possibilidades de concentração do extrato (diluições em série a partir da solução mais concentrada) e de erros na administração (08 animais por grupo) restaria pensar na menor disponibilidade do(s) composto(s) ativo(s) na luz intestinal, o que não foi estudado. No seu conjunto, no entanto, os efeitos da *Q. amara* no SNC foram de pequena intensidade e não há razões atuais para investir-se nesse estudo.

Diferente das ações no SNC, os efeitos periféricos do EA e da FBut foram mais evidentes.

A atividade antiinflamatória e/ou antinociceptiva foi mostrada inicialmente no teste da formalina. Este teste é utilizado no estudo de drogas que interferem com os mecanismos

fisiológicos da nocicepção e tem a vantagem de utilizar um agente químico de ação constante e prolongada. A resposta à formalina é, caracteristicamente, bifásica: a primeira fase parece estar relacionada com a estimulação química direta das terminações sensitivas de fibras nociceptivas aferentes mielinizadas (fibras sensitivas A δ) e não-mielinizadas (fibras sensitivas C); a resposta da primeira fase é suprimida por drogas analgésicas opióides como a morfina; a segunda fase é representada pela dor de origem inflamatória, com participação de prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina (LAPA *et al.*, 2003).

Diferentes trabalhos mostraram que a lesão celular, ocorrida no local após injeção da formalina, produz significativo aumento de mediadores como aminoácidos excitatórios (glutamato), neuropeptídeos (substância P), PGE2 (produzida por hidrólise do ácido araquidônico pela ação da COX-2), óxido nítrico, bem como algumas citocinas (IL-1 β , TNF α e IL-8) e cininas (bradicinina) (SANTOS; CALIXTO, 1997; CORREA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2000; KOSTER *et al.*, 1959, LAPA *et al.*, 2003).

No modelo da formalina a reação imediata do animal indicativa da nocicepção é a lambertura do local injetado. Este processo, se não controlada a concentração da formalina, pode evoluir para uma sensação dolorosa indesejável, em geral manifestada com agitação e grunhidos do animal. Dentro dos limites da nocicepção, a intensidade do processo pode ser medida pelo número de lambidas na pata injetada, o que envolve uma manifestação motora.

Em nossos estudos, o tratamento prévio com o EA diminuiu o tempo de lambertura em ambas as fases do teste da formalina, porém os resultados foram pouco precisos, sem relação dose-efeito. Como, nos testes precedentes com a administração do EA por via oral, a motricidade não foi alterada, as lambidas parecem refletir exclusivamente uma resposta nociceptiva. Essas indicações de atividade antinociceptiva tipo opióide (1ª fase) e tipo antiinflamatória (2ª. Fase) foram avaliadas com outros testes mais seletivos da ação antinociceptiva e da ação antiinflamatória.

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. A dor envolve, portanto, um processamento cognitivo e emocional realizado no Sistema Nervoso Central (LOESER; MELZACK, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

O teste, algesimétrico neurogênico do “tail-flick”, se baseia no reflexo muscular de retirada da cauda ao estímulo térmico quase lesivo (55°C) das terminações sensitivas; a resposta de retirada independe de mediadores inflamatórios, mas é modulada centralmente pelo sistema opióide integrado a respostas supraespinhais (CAMARATA; YAKSH, 1985; MITCHELL; HELLON, 1977). O tratamento prévio com o EA, nas mesmas doses utilizadas no teste da formalina, não alterou a resposta de retirada da cauda em relação ao grupo controle, descartando a possibilidade do extrato possuir atividade analgésica central tipo opióide.

O teste de contorção abdominal induzida pela injeção de ácido acético no peritônio foi usado para avaliar efeitos antinociceptivos periféricos de natureza antiinflamatória, uma vez que o ácido acético, na concentração usada (1%), aumenta a nocicepção em consequência de uma inflamação aguda no peritônio (IKEDA *et al.*, 2001). Esta ação local desencadeia a liberação dos mediadores da inflamação (os citados acima) suficientes para provocar espasmos intestinais, ou resposta motora reflexa de contração da parede abdominal (contorção). O número de contorções mede a intensidade da inflamação.

O tratamento oral prévio com o EA reduziu as contorções abdominais, efeito provavelmente relacionado à inibição da liberação dos mediadores pró-inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987; IKEDA *et al.*, 2001). Este teste, portanto, foi indicativo de uma ação antiinflamatória do EA de *Q. amara* L.

Toma e colaboradores (2002) estudando um extrato hexânico de *Q. amara* da Costa Rica, relataram a redução das contorções produzidas pelo ácido acético e a proteção no teste da placa quente. Os autores atribuíram esses efeitos a uma ação sedativa do extrato, ao invés de ação analgésica. Porém, a ação sedativa foi inferida pelos autores, com base no teste de potenciação do sono induzido por barbitúrico. Essa conclusão contrasta com os aqui descritos, uma vez que a ação potenciadora do sono barbitúrico, em nossas experiências, não foi relacionada à inibição direta do sistema nervoso central, mas a uma inibição do metabolismo hepático e potenciação da ação do depressor.

A atividade antiinflamatória do EA da *Q. amara* foi estudada em ratos com os modelos de edema de pata induzido por carragenina ou dextrana, e de migração celular induzida por carragenina injetada no peritônio. Nesses estudos os efeitos do EA foram significativamente diferentes dos controles com doses 10 vezes menores que as utilizadas no teste geral da formalina e nos testes de analgesia.

A inflamação (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo), representa um processo fisiopatológico fundamental para eliminar estímulos lesivos (químico, físico ou biológico) ao organismo vivo, e se caracteriza pela presença de eritema, calor local, edema e dor no local da lesão, podendo levar à perda da função do órgão ou do tecido injuriado (LAPA *et al.*, 2003).

O modelo mais utilizado no estudo da inflamação é o do edema de pata induzido por carragenina, um polissacarídeo de origem vegetal isolado da alga *Chondrus crispus*. O tempo de duração do edema é de seis horas, com pico de hiperalgesia na terceira hora após aplicação da carragenina na pata. A liberação de mediadores inflamatórios durante o edema induzido pelo irritante pode ser dividida em três fases: a primeira fase envolve a ação da histamina e serotonina (até 90 min.), na segunda fase há a mediação de cininas (90 min. a 150 min) e, na terceira fase, há a mediação de prostaglandinas (150 a 360 min.) (DI ROSA *et al.*, 1971).

Após a injeção do irritante ocorre a liberação local de histamina e serotonina, que causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Este evento inicial é rapidamente seguido pela liberação de bradicinina, um nonapeptídeo endógeno liberado pela ativação do fator XII da via intrínseca da coagulação (KUMAR *et al.*, 2005), que tem como ação principal a indução de aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e infiltração leucocitária para o interstício, acompanhado pela retenção de água extracelular (DI ROSA *et al.*, 1971; EMIM, 1996; WILLIAMS, 1982).

A ação edematogênica destes mediadores pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas, como PGE2 e a PGI2, mediadores resultantes do metabolismo do ácido araquidônico pela ação da enzima ciclooxigenase (COX). As prostaglandinas em decorrência do aumento de AMPc e da condutância ao sódio e cálcio na fibra aferente primária, também potenciam a liberação de glutamato e da substância P na sinapse medular (SVENSSON; YAKSH, 2002; LAPA *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 1999, RANG, 2004)

Em nossas experiências, o tratamento prévio com o EA inibiu o aumento do edema de pata no início do processo inflamatório (30 e 60 min), tempo que coincide com a liberação de histamina e serotonina. A maior dose do EA (0,1 g/kg, v.o.) também inibiu significativamente o edema a partir de 1 hora da injeção da carragenina, coincidentemente com o início da ação de prostaglandinas. Essas ações foram confirmadas em outros testes que permitem a separação dos efeitos dos mediadores.

O teste da migração celular induzido pela injeção intraperitoneal de carragenina permite avaliação quantitativa da migração de leucócitos para exsudato peritoneal, durante o processo da inflamação aguda. Após as alterações no endotélio vascular, ocorre o recrutamento dos leucócitos do lúmen do vaso sanguíneo para o sítio inflamatório, e este processo pode ser dividido nas seguintes fases: contato inicial do leucócito com a parede do

vaso, rolamento ao longo da parede do vaso (diapedese), firme adesão do leucócito ao endotélio e transmigração. Após o recrutamento celular, os leucócitos promovem importante atividade fagocítica e remoção de restos celulares e teciduais (ABBAS *et al.*, 2000; COMPASSO *et al.*, 1975; ALMEIDA *et al.*, 1980).

Os principais mediadores da migração leucocitária são: as selectinas, moléculas de adesão importantes no rolamento; as integrinas, na adesão firme; e a superfamília das moléculas de imunoglobulinas (Ig), como o PECAM-1 (molécula de adesão plaqueta-endotélio celular) essenciais na transmigração (KUMAR, *et al.*, 2005).

O tratamento com EA da *Q. amara* não inibiu a migração celular para a cavidade peritoneal indicando que o EA, provavelmente, não tem ação na inflamação dependente de prostaglandinas, principais agentes quimiotáticos do processo inflamatório. Esta conclusão foi reforçada com os resultados obtidos no edema de pata induzido pela carragenina visto que o EA inibiu principalmente a etapa inicial devida a histamina e serotonina. Da mesma forma, a ação do EA foi mais evidente no edema induzido por dextrana.

A dextrana é um polissacarídeo extracelular ramificado, biossintetizado por *Leuconostoc mesenteroides*, constituída por unidades de D-glicose unidas por ligações α (1-6). A dextrana induz uma reação edematogênica diferente da carragenina, na qual o extravasamento e a formação do edema ocorre pela liberação da histamina e serotonina dos mastócitos, com um pico máximo de evolução de 2 hs após a administração (SOUZA; GARCIA, 2004; ANDRADE *et al.*, 2007; VAN WAUVE; GOOSENS, 1989). A histamina ao ligar-se ao receptor H_1 promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de desempenhar papel central na hipersensibilidade imediata e respostas alérgicas, secreção gastrointestinal e neurotransmissão (SIMONS *et al.*, 1992; NELSON *et al.*, 2002; RANG *et al.*, 2004; WHITE *et al.*, 2004).

O tratamento prévio com o EA reduziu o volume do edema de pata induzido pela dextrana no início do processo inflamatório, indicando que a ação antiinflamatória, observada com esse extrato, está relacionada à inibição dos mediadores pró-inflamatórios histamina e serotonina.

A atividade gastrintestinal foi mensurada utilizando técnicas *in vivo* e *in vitro* que permitiram o estudo da atividade gastroprotetora e antissecretora ácida, assim como da motilidade gastrintestinal sob ação da *Q. amara*.

O primeiro teste realizado foi o da velocidade do trânsito intestinal. O tempo de contato do conteúdo luminal com a mucosa determina a intensidade de absorção e a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral (LAPA *et al.*, 2003). Por isso, é importante avaliar a velocidade de propagação do bolo alimentar no trato gastrintestinal.

O tratamento prévio com o EA de *Q. amara* acelerou a movimentação intestinal e aumentou a distância percorrida pelo carvão ativado. Por se tratar de uma preparação com controle motor tipicamente colinérgico, o efeito estimulante do EA de *Q. amara*, está provavelmente relacionado à ativação direta de receptores muscarínicos vagais (M_1) e musculares (M_2) ou por uma ação anticolinesterásica do extrato de *Q. amara* como sugerido para a planta da Costa Rica (BADILLA *et al.*, 1998). Esses mecanismos moleculares não foram estudados até o momento com a planta de Manaus. Em testes preliminares realizados em nosso laboratório, a incubação da FBut deslocou paralelamente para a direita a curva concentração-resposta de ACh, sem alterar o efeito contrátil máximo, indicando um antagonismo muscarínico competitivo. Portanto, a ação anticolinesterásica, ou colinomimética direta em receptores M_1 e M_3 , dos extratos padronizados da *Q. amara* de Manaus, não foram aparentes no jejuno isolado de rato. O aumento do peristaltismo observado *in vivo* nos animais tratados com o EA deve ser explicado por mecanismo diverso, talvez relacionado ao gosto

intensamente amargo do extrato de Quássia que, como tantos outros amargos, são capazes de estimular os reflexos mioentéricos. Esta ação, no entanto, não foi comprovada.

Badilla e col. (1998) e Toma e col. (2002) utilizando extrato aquoso bruto e extrato apolare obtido com hexano, respectivamente, demonstraram a atividade antiulcerogênica de *Q. amara* da Costa Rica, sugerindo que o mecanismo dessa ação estaria relacionado à estimulação de prostaglandinas PGE₁ e à síntese de muco.

Em nossas experiências, a atividade antiulcerogênica foi avaliada em camundongos nos modelos de estresse a frio e indução de úlceras pela ingestão de etanol 75%. O EA da *Q. amara* inibiu a formação de úlceras e reduziu o índice de lesão da mucosa, mostrando uma importante ação antiulcerogênica em ambos os modelos.

As úlceras pépticas são atribuídas ao desbalanço entre os fatores agressivos da mucosa gástrica, tanto endógenos (HCl e pepsina) como exógenos (etanol, antiinflamatórios, cigarro, estresse), e mecanismos fisiológicos protetores da mucosa gastrintestinal (secreção de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sanguíneo, óxido nítrico) (GLAVIN; SZABO, 1992; WALLACE; GRANGER, 1996).

Nas lesões gástricas induzidas por estresse, os danos à mucosa estão relacionados à ativação das vias autonômicas periféricas com liberação de noradrenalina, esteróides e adrenalina da adrenal e neuropeptídeos, resultando em alteração do fluxo sanguíneo gástrico, estimulação da motilidade e da secreção gástrica (TEPPERMAN; JACOBSON, 1994; TACHE' *et al.*, 2001). Além disso, O estresse induz a peroxidação lipídica, e o dano oxidativo consequentemente, fator comum na patogenia clínica de úlcera.

A lesão gástrica produzida pela administração forçada de etanol é diferente: o aumento da permeabilidade da mucosa com consequente agressão física causada pelo efeito necrosante direto do etanol sobre a mesma, caracteriza-se por esfoliação, erosão do epitélio, lesão vascular da mucosa e necrose celular (SZABO *et al.*, 1985; GOEL *et al.*, 1991; SAIRAM *et*

al., 2002). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e diminuição dos grupamentos sulfidrílicos não-protéicos (GSH) das células que é um dos mais importantes fatores de proteção da mucosa gástrica (REPETTO; LLESUY, 2002).

Em nossos estudos, a atividade secretora ácida-gástrica foi avaliada com o método da ligadura pilórica, que nos permite estudar o efeito do tratamento prévio com os extratos da *Q. amara* na secreção gástrica total acumulada durante a experiência. Para evitar contato direto dos extratos com a mucosa secretora do estômago, nestes testes a FBut foi injetada na luz do duodeno no momento da aplicação da amarra no piloro. O tempo de 4 horas para a coleta da secreção gástrica foi escolhido de experiências anteriores do grupo.

O tratamento com FBut (0,01; 0,03 e 0,1 g/kg, i.d.) diminuiu o volume da secreção gástrica e aumentou o pH com as maiores doses; todas as doses testadas diminuíram, proporcionalmente, a secreção ácida.

A secreção de ácido gástrico é um processo contínuo e complexo controlado por múltiplos mecanismos centrais (neurais) e periféricos (endócrino e parácrino). As influências nervosas são mediadas pela acetilcolina (ACh) liberada das terminações parassimpáticas, as parácrinas pela histamina liberada das células cromafim-símeis e as endócrinas pela gastrina liberada das células G (de gastrina) normalmente encontradas no antro pilórico; todos esses secretagogos desempenham papéis importantes na regulação da secreção ácida (SCHUBERT; SHAMBUK, 1990; HOOGERWERF; PASRICHA, 2003). A ativação da $H^+-K^+-ATPase$ gástrica, ou bomba de prótons, é o passo final da secreção ácida induzida nas células parietais pelos secretagogos fisiológicos. A secreção de H^+ ocorre no lúmen dos canalículos das células parietais pela ação da $H^+-K^+-ATPase$ que acopla a troca do H^+ com o K^+ extracelular. Simultaneamente, para formar o HCl, ions Cl^- fluem do citosol para o lúmen do canalículo via um trocador de ânions. A bomba de próton é formada duas subunidades: uma catalítica (alfa) e uma subunidade- β glicosilada, as quais interagem para dar estabilidade

conformacional para a enzima (KUTCHAI, 1996; ONO *et al.*, 2000; LACAPÈRE *et al.*, 2000).

O bloqueio de receptores muscarínicos com pirenzepina (M_1) e atropina (M_3) inibem a secreção ácida bem como a motilidade gástrica, mas o uso clínico destes diminuiu com o surgimento de medicamento antissecretores mais eficazes como os antagonistas dos receptores H_2 (cimetidina e ranitidina). Outra terapia utilizada é o uso de antagonista de receptores de colecistocinina como a proglumida, que interagem com a gastrina na célula parietal inibindo parcialmente a secreção ácida. Nos anos 90 surgiram os mais eficazes inibidores da secreção ácida gástrica, os inibidores da bomba de próton ($H^+-K^+-ATPase$) como o omeprazol, seguido por lansoprazol, rabeprazol e, em 2001, do esomeprazol (SACHS *et al.*, 1997; FUKUSHIMA *et al.*, 2004; RANG, 2004; JAIN *et al.*, 2007).

Para investigar o mecanismo da ação antissecretora ácida dos extratos da *Q. amara*, ratos previamente tratados com FBut foram injetados com histamina (40 mg/kg, s.c.), ou com betanecol (20 mg/kg, s.c), em doses pre-selecionadas para aumentar de 2 vezes a secreção ácida basal.

A FBut inibiu a secreção gástrica induzida com histamina, mas não alterou significativamente a secreção estimulada pelo agonista muscarínico betanecol. Estes resultados indicaram uma ação seletiva da FBut na via histaminérgica de modulação da secreção ácida na mucosa gástrica.

Na mucosa gástrica de mamíferos a resposta à histamina envolve a ativação intracelular da adenililciclase, aumento de AMP cíclico, seguido de ativação de proteína quinase A que desencadeia a translocação e a inserção da $H^+-K^+-ATPase$ na membrana plasmática da célula parietal. A via colinérgica muscarínica e da gastrina, por outro lado, envolvem a ativação da fosfolipase C e produção de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG), que aumenta a concentração de cálcio citosólico estimulando a proteína

quinase C,. As duas vias ativam a bomba de prótons (URUSHIDANI; FORTE, 1997, YAO; FORTE, 2003).

O efeito da FBut na atividade da $H^+-K^+-ATPase$ foi testada na enzima isolada da mucosa gástrica de porco; o derivado imidazólico Schering 28080 (SCH) foi utilizado como controle positivo da inibição enzimática. O SCH 28080 liga-se competitivamente ao sítio do K^+ na $H^+-K^+-ATPase$ e foi utilizado em substituição ao omeprazol, inibidor mais conhecido da bomba de proton, por não exigir a acidificação prévia do meio para sua ação (LINDBERG *et al.*, 1986; WALLMARK *et al.*, 1987).

A Fbut de *Q. amara* inibiu a atividade da $H^+-K^+-ATPase$ *in vitro*. Como esta enzima é a etapa final do processo de secreção ácida na célula parietal, este último resultado não foi concordante com os anteriores que indicavam uma inibição seletiva da via histaminérgica *in vivo*. Deve ser considerado, portanto, que a FBut talvez não seja suficientemente pura para estudos *in vitro*, o que pode aumentar a probabilidade da inibição enzimática não específica na presença da FBut.

De fato, a FBut é uma mistura de muitos compostos. A purificação da FBut realizada em CLAE separou 18 frações, das quais apenas quatro (F11, F12, F13, F16) inibiram a atividade da $H^+-K^+-ATPase$ com CI_{50} da ordem de 2.5 $\mu g/mL$. No entanto, o material purificado nesta etapa do estudo da *Q. amara* foi insuficiente para os testes de secreção ácida *in vivo*. Estas frações deverão ser analisadas posteriormente em glândulas oxínticas isoladas do estômago de coelho com a técnica de acúmulo de aminopirina radiativa.

O estudo da atividade gastrointestinal dos extratos padronizados da *Q. amara* permitiu concluir que o extrato aquoso administrado por via oral aumentou a motilidade intestinal, *in vivo*. Este efeito parece ser devido a substâncias com sabor amargo (quassinóides) contidas no extrato aquoso já que no estudo *in vitro*, com jejuno isolado, observamos uma ação

antimuscarínica da FBut (ALMEIDA *et al.*, 2007). O EA inibiu a formação de úlceras e a acidez gástrica, estimulada com o secretagogo histamina, mas a acidez não foi alterada quando induzida por betanecol (agonista muscarínico), o que nos indicou uma provável ação seletiva na via da histamina/AMPC. No entanto, a fração semi-purificada inibiu a atividade enzimática da $H^+-K^+-ATPase$ isolada da mucosa gástrica. A purificação da FBut resultou em 4 compostos ativos na enzima. Como não havia material disponível, não foi possível terminar a avaliação desses compostos na secreção ácida *in vivo*.

No planejamento inicial deste projeto foi realçado que o critério para a seleção da *Q. amara* de Manaus foi o uso para tratar malária que dela faz a medicina popular. De fato, alguns trabalhos descreveram a ação antiparasitária *in vitro* e *in vivo* de compostos isolados da espécie (PHILLIPSON *et al.*, 1993; MISHRA *et al.*, 2009), mas no nosso conhecimento, não houve referência aos mecanismos dessa ação.

Uma revisão cuidadosa da literatura mostrou que a maioria dos antimaláricos conhecidos tem ação na excitabilidade celular, interferindo com a condutância iônica de Na^+ e K^+ na membrana celular, ou com a mobilização de Ca^{+2} de seus depósitos intracelulares. P-ATPases modulam essa atividade iônica no parasita, e são importantes para a sobrevivência no hospedeiro; por isso, são também potenciais alvos moleculares para novos fármacos. Estudos fisiológicos demonstraram, por exemplo, sinalização de Ca^{+2} durante a maturação do plasmódio e a dependência de Ca^{+2} extracelular na invasão do eritrócito pelo *Plasmodium falciparum* (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992; HOTTA *et al.*, 2000; GAZARINI *et al.*, 2003). Da mesma forma, a $H^+-K^+-ATPase$ incorporada na membrana do eritrócito hospedeiro é importante para manter a acidificação do vacúolo parasitóforo utilizada para a extrusão de íons, metabólitos e drogas das organelas (KARCZ, 1993; MARCHESINI *et al.*, 2005). Skinner-Adams e colaboradores mostraram que análogos benzimidazólicos como o

omeprazol inibiram o crescimento de *Plasmodium falciparum* com CI_{50} de 20 a 40 μM . O Omeprazol inibe a $H^+-K^+-ATPase$ e, na espécie humana, é utilizado para diminuir a acidez gástrica; em combinação com antibióticos é utilizado para tratar úlceras crônicas motivadas por *Helicobacter pylori*. É possível que essas drogas interfiram com o transporte de nutrientes do parasita pelo mesmo mecanismo, porém essa via continua pouco estudada (KARCZ, 1993; SKINNER-ADAMS, 1997).

Assim como a $H^+-K^+-ATPase$, a $Ca^{+2}-ATPase$, também, está relacionada com a sobrevivência do parasita da malária em seu hospedeiro. Estudos fisiológicos demonstraram envolvimento da sinalização de Ca^{+2} no processo de maturação do plasmódio. É de conhecimento que no *Plasmodium falciparum*, o Ca^{+2} extracelular é indispensável no processo de invasão do eritrócito pelo parasita (MCCALLUM-DEIGHTON; HOLDER, 1992; HOTTA *et al.*, 2000; GAZARINI *et al.*, 2003).

Nos ensaios da atividade da $Ca^{+2}-ATPase$, a tapsigargina foi utilizada como controle positivo. Essa droga é derivada da *Thapsia garganica* e bloqueia especificamente a bomba de Ca^{+2} do RE (VAROTI *et al.*, 2003). A FBut de *Q. amara* inibiu a atividade da enzima, assim como as frações purificadas em CLAE da FBut (F05, F06, F08, F09, F10, F13, F14, F15 e F16), sendo que as frações purificadas F9, F13 e F14 foram mais ativas ao inibir a atividade da $Ca^{+2}-ATPase$ na ordem de 1,0 $\mu g/mL$. No entanto, o extrato padronizado da planta nativa de Manaus não mostrou atividade nos testes preliminares.

Por ser uma das vias metabólicas de estudo de compostos com atividade antimalárica, o bloqueio da atividade da $Ca^{+2}-ATPase$ implica em importante efeito malaricida produzido pela fração butanólica e frações purificadas de *Q. amara*. Contudo, as frações F13 e F16 inibiram tanto a $H^+-K^+-ATPase$ como a $Ca^{+2}-ATPase$ *in vitro* indicando efeito inespecífico destas duas frações.

A Ca^{+2} -ATPase, em mamíferos, exerce papel fundamental no processo de relaxamento muscular. Para que ocorra o relaxamento da fibra muscular é necessário que a concentração citoplasmática de cálcio retorne ao valor de repouso ($<10^{-7}$ M). O cálcio é um íon essencial para a sinalização celular e participa de diferentes processos na célula. Altos níveis deste íon podem levar à morte celular por apoptose, por isso os organismos desenvolveram um controle rígido a fim de manter o equilíbrio celular. O balanço entre a entrada de cálcio no citosol e sua retirada para o meio extracelular ou para estoques intracelulares é realizado através da cálcio-ATPase da membrana plasmática (PMCA – *Plasma Membrane Calcium ATPase*) e do retículo sarcoplasmático (SERCA – *Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*), respectivamente, e menos intensamente por mecanismos de troca Na^{+} - Ca^{+2} existente na membrana citoplasmática (BERRIDGE *et al.*, 1999; BERS *et al.*, 1990; WOLSKA; LEWARTOWSKI, 1993).

Em nossas experiências, a d-tubocurarina foi incubada antes da FBut e das frações purificadas (F1 a F16) de *Q. amara* para eliminar as influências da estimulação simultânea do nervo frênico na contração basal do diafragma. A FBut e três frações purificadas aumentaram a amplitude de contração do diafragma, sendo que as frações F09 e F14 também inibiram a atividade da Ca^{+2} -ATPase, sugerindo interferência na homeostasia intracelular do cálcio. Ao bloquear a Ca^{+2} -ATPase do RS ocorre a potenciação da contração do músculo do diafragma, pois com o bloqueio da enzima há uma maior concentração de íons cálcio livre no meio intracelular que aumentam a capacidade de contrátil do músculo (ALLEN *et al.*, 1998).



VII. SUMÁRIO & CONCLUSÃO

A *Quassia amara* L. pertence à família Simaroubaceae e é conhecida popularmente como pau-amargo, murubá, marupá, quina-de-caiena, quássia, simaruba e quina (CORRÊA, 1984; BERG *et al.*, 1983). É rica em compostos como quassinóides e alcalóides b-carbolina e cantin-6 aos quais foram atribuídos diferentes efeitos farmacológicos tais como atividade antimalárica, fago-repelente, antifertilidade, antiedematogênicos, antiulcerogênicos, entre outros (AJAIYEOBA *et al.*, 1999; MACEDO *et al.*, 2005).

A padronização química do extrato de *Q. amara* teve início com a partição do extrato aquoso (EA) em butanol (1:1 v/v) originando a fração butanólica (FBut), que foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A purificação em CLAE levou ao isolamento de 18 frações (F1 a F18) que estão em processo de identificação pela Central analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e da Universidade de São Paulo (USP).

Com o objetivo de correlacionar a atividade farmacológica de *Q. amara* com seu indicativo popular de antimalárica foi necessário, primeiramente, o estudo da eficácia *in vivo* e da farmacodinâmica secundária dos extratos intermediários e dos compostos isolados e, posteriormente, estudar o efeito da FBut e frações purificadas (F1-F16) em P-ATPases (H^+ - K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase) de mamíferos, correlatos fisiológicos do parasita.

As principais ações sistêmicas estão resumidas abaixo:

Sistema Nervoso Central:

1. O teste do campo aberto e o teste do sono induzido por barbitúrico sugeriram um efeito sedativo do EA e da FBut, porém essa hipótese foi descartada com o teste do sono induzido por éter etílico.
2. A Fbut não apresentou atividade do tipo-antidepressiva.

3. Apesar de possível ação do tipo-ansiolítica observada no teste do labirinto em cruz, a triagem farmacológica inicial do EA e da FBut indicou ação inconsistente no SNC.

Atividade Antiinflamatória e/ou Antinociceptiva

1. O EA não alterou a resposta de retirada da cauda de ratos no teste do “Tail-Flick”, o que descartaria a possibilidade do extrato possuir atividade analgésica.
2. O EA reduziu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 1%. Possivelmente, o mecanismo de ação é via inibição da liberação dos mediadores pró-inflamatórios.
3. O EA reduziu o volume do edema de pata induzido por carragenina, principalmente, no início do processo inflamatório, tempo que coincide com a liberação dos mediadores inflamatórios histamina e serotonina.
4. O EA não inibiu a migração celular induzida pela administração i.p. de carragenina, portanto o efeito antiinflamatório não é por inibição de prostaglandinas.
5. O EA inibiu o edema de pata induzido pela dextrana i.p. Provavelmente, o mecanismo de ação está relacionado com a inibição dos mediadores pró-inflamatórios histamina e serotonina, que promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

Atividade gastrointestinal

1. O EA aumentou a distância percorrida pelo carvão ativado, provavelmente está relacionado à substâncias amargas contidas no extrato aquoso, já que em testes preliminares com jejuno *in vitro* observamos ação antimuscarínica.
2. O EA inibiu a formação de úlceras e reduziu o índice de lesão nos modelos de úlceras induzido por estresse a frio ou etanol 75%, demonstrando uma importante ação antiulcerogênica e gastoprotetora do extrato.
3. A FBut apresentou atividade antissecretora ácida no teste da ligadura pilórica. Provavelmente, o mecanismo de inibição da secreção gástrica está relacionado a via histaminérgica (H_2).
4. A Fbut não alterou a secreção de ácido pela via muscarínica estimulada com betanecol.

Atividade ATPásica

1. O estudo da inibição das P-ATPases foi realizado com os correlatos fisiológicos do parasita: H^+-K^+ -ATPase (bomba de prótons) de mucosa gástrica de porco e Ca^{2+} -ATPase (bomba de cálcio) de músculo esquelético de coelho.
2. A FBut de *Q. amara* inibiu a atividade da H^+-K^+ -ATPase, assim como as frações purificadas em CLAE F11, F12, F13 F16, o que explicaria a atividade antissecretora ácida obtida com o teste da ligadura pilórica, por ser a via final da produção do ácido gástrico.
3. A FBut de *Q.amara* inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase, assim como as frações purificadas da FBut F05, F06, F08, F09, F10, F13, F14, F15 e F16, sendo que as frações F09 e F14 foram as mais ativas.

Atividade sobre o músculo esquelético

1. A FBut aumentou a amplitude de contração do diafragma estimulado eletricamente, na presença de d-tubocurarina, assim como as frações purificadas em CLAE F10, F14 e F15, o que sugere interferência na homeostasia intracelular de cálcio.
4. As frações purificadas F05 e F13 não alteraram a resposta contração do músculo esquelético, enquanto que as frações F06, F08, F09 e F16 o inibiram.
5. A inibição da atividade da Ca^{+2} -ATPase tanto pela FBut como pelas frações purificadas pode estar relacionada com a potenciação da contração do músculo do diafragma, pois com o bloqueio da enzima há uma maior concentração de íons cálcio livre no meio intracelular.



VIII. REFERÊNCIAS

ABBAS, K.; LICHTMAN, AH.; POBER, J.S. 2000. **Cellular and molecular Immunology**. 4th edn. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 553p.

AJAIYEoba, E. O., *et al.* In vivo antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 67, Issue 3, 30, pg. 321-325, November 1999.

AL-RAJHI, D.H. Properties of $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -ATPase from rat brain and its inhibition by pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* 37: 116-120. 1990.

ALLEN DG, LÄNNERGREN J, WESTERBLAD H. The role of ATP in the regulation of intracellular Ca^{2+} release in single fibres of mouse skeletal muscle. *J Physiol.*; 498:587-600. 1998.

ALMEIDA, A. P.; BAYER, B. M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M. A. 1980. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 74-79.

ALMEIDA, M, M. B. *et al.* . Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 4, Aug. 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400033&lng=en&nrm=iso>. access on 24 Sept. 2010. doi: 10.1590/S0100-40422007000400033.

ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A. M. A. D. Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol Phar. Bull.* 31 (5), 1017-1020, 2008.

ALLEN, D., TOTH, I., WRIGHT, C.W., KIRBY, G.C., WARHURST, D.C. and PHILLIPSON, J.D. *Eur. J. Med. Chem.* 28, p. 265. 1993.

ALVES, F. N. R. 2004. *Desafios para o desenvolvimento de fitomedicamentos no Brasil no contexto da indústria farmacêutica*. Rio de Janeiro: 248p. Dissertação de Mestrado – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.

ALVES, R.; CAMPOS, M.M.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Receptor subtypes involved in tachykinin-mediated edema formation. *Peptides*, v.20, p.921-927, 1999.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G; NETO, M. R. A; NETO, P. F. T., MOURA B. A., MELO C. T. V., ARAÚJO F. L. O., DE SOUSA D. P., VASCONCELOS P. F., VASCONCELOS S. M., SOUSA F. C. F., Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 30, 1217-1220. 2007.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.V.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extract, fraction and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 464-471, 2007.

- ARCHER, J. Tests of emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav* 21: 205–235. 1973.
- AZEREDO, C. A. C. **Fisioterapia Respiratória Moderna**. 4º ed. São Paulo: Manole, 2002.
- BADILLA, B., T. MIRANDA, G. MORA & K. VARGAS. Actividad gastrointestinal del extracto acuoso bruto de *Quassia amara* (Simarubaceae). *Rev. Biol. Trop.* 46(2): 203-210. 1998.
- BARRACHINA, M.D., PANES, J., ESPLUGUES, J.V. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm*, 7:31-48.2001.
- BARBETTI, P., G. GRANDOLINI, G. FARDELLA; I. CHIAPPINI. Indole alkaloids from *Quassia amara*. *Planta Med.* 53(3): 289-290. 1987.
- BARBETTI, P., G. GRANDOLINI, G. FARDELLA, I. CHIAPPINI & A. MASTALIA. New canthin-6-one alkaloids from *Quassia amara*. *Planta Med.* 56(2): 216-217. 1990.
- BARBETTI, P., G. GRANDOLINI, G. FARDELLA; I. CHIAPPINI. Quassinoids from *Quassia amara*. *Phytochemistry* 32(4): 1007-1013. 1993.
- BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônica: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 206 p. 1983.
- BERRIDE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. Calcium signaling. *Curr. Biology*, v.9, n.5, p. 157-158, 1999.
- BERS, D. M.; LEDERER, W. J.; BERLIN, J. R. Intracellular Ca^{2+} transients in rat cardiac myocytes: role of Na-Ca exchange in excitation-contraction coupling. *Am.J.Physiol.* 258, C944-C954.1990.
- BOYER, P. D. The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749. 1997.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analitical Biochemistry*, v.72, p.248-254. 1976.
- BRASILa. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 89 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.
- BRASILb. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASILc. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar.2004.

BRASILd. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 91 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. D.O.U. Brasília, 18 mar. 2004.

BREMAN JG, ALILIO MS, MILLS A: Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 71:1-15. 2004.

BRENNER, B. Muscle mechanics and biochemical kinetics. In *Molecular Mechanisms in Muscular Contraction*, ed. Squire, J. M., pp. 77-149. CRC Press, Inc., Boca Raton. 1991.

BROWN, D.A.; DOCHERTY, J.R.; FRENCH, A.M.; MCDONALD, A.; MCGRATH, J.C.; SCOTT, N.C. Separation of adrenergic and nonadrenergic contractions to field stimulation in the rat vas deferens. *B. J Pharmacol* 79: 379-393. 1983.

CACHET, N., *et al.* "Antimalarial activity of simalikalactone E, a new quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)." *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(10): 4393-8. 2009.

CALIXTO, João B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.* [online]. 2003,v. 55, n. 3 pp. 37-39. Available from:
<http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300022&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0009-6725. Acesso: 15/06/2009.

CAMARATA, P.J.; YAKSH, T.L. *Characterization of the spinal adrenergic receptors mediating the spinal effects periaqueductal gray.* Brain Research. 1985, 336:133-142.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Ver. Biochem.*, v. 56, PP. 395-443, 1987.

CARLINI, E.A., CONTAR, J.D.P., SILVA-FILHO, A.R., DA SILVEIRA-FILHO, N.G., FROCHTENGARTEN, M.L., BUENO, O.F.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on the laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.*, v.17, p.37 – 64. 1986.

CARNEIRO, R.P.; MARKUS, R.P. Presynaptic nicotinic receptors involved in release of noradrenaline and ATP from the prostatic portion of the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 95-100. 1990.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29(8): 1193-205, 2005.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal*, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

COMPASSO, F.; DUNN, C. J.; YAMAMOTO, S.; WILLOUGBBY, D. A.; GIROUD, J. P. 1975. *Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats*. *J Pathol* 116: 117-124.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, v. 5, 687 p., il. 1984.

CORREA, C.R; KYLE, D.J.; CHAKRAVERTY, S. CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Brit. J. Pharm acol.*, v.117, n.3, p.552-558, 1996.

COSTA, D. **Fisioterapia Respiratória Básica**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999.

CRYAN JF, HOLMES A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4:775–790. 2005

CUPP, M.J. Herbal remedies: adverse effects and drug interactions. *Amer. Fam. Phys.*, 59 (5): 1239-1244, 1999.

D'SA, C.; DUMAN, R. S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bip. Disord.**, v. 4, p. 183-194, 2002.

DE SMET, P. A. G. M. Herbal remedies. *New England Journal of Medicine*, v.347, n.25, 2046-56, 2002.

DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 6.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*, England, v. 104, p. 15-28, 1971.

DRORY, O; NELSON, N. *Physiology* (Bethesda) 21:317–325. 2006.

DUKE, J., 1992. **Handbook of Phytochemical Constituents of Grass Herbs and Other Economic Plants**. CRS Press, Boca Raton, FL, p. 654.

DULHUNTY, A.F., HAARMANN, C.S., GREEN, D., LAVER, D.R. *et al.*. Interactions between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors in striated muscle. *Prog. Bio. Mol. Biol.* 79, 45-75. 2002.

EBELE, J. I.; EMEKA, E. N.; NNENNA, C. A.; IGNATIUS, C. M.; EBELE, A. A. Malaria Parasitaemia: Effect on Serum Sodium and Potassium Levels. *International Journal of Tropical Medicine*, Vol.5, Issue: 2, Pg: 46-49 DOI: 10.3923/ijtmmed.2010.46.49

ECKSTEIN-LUDWIG U, WEBB RJ, VAN GI, EAST JM, LEE AG, KIMURA M, O'NEILL PM, BRAY PG, WARD SA, KRISHNA S: Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 424:957-961, 2003.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias Ativas. Pp. 91-103. In: C.M.O. Simões; E.P. Schenkel; G. Gosman; J.C.P. Mello; L.A. Mentz & P.R. Petrovick (orgs.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3 ed. rev. Porto Alegre, EdUFRGS; Florianópolis, EdUFSC. 2001.

EMIM, J.A.S. *Atividades farmacológicas de um inibidor seletivo da calicreína tecidual em processos nociceptivos e antiinflamatórios de camundongos*. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1996.

EVANS, D. A., *et al.* "Larvicidal efficacy of Quassin against *Culex quinquefasciatus*." *Indian J. Med. Res.*; 93: 324-7. Sep 1991.

EVANS, D. A., *et al.* "Extracts of Indian plants as mosquito larvicides." *Indian J. Med. Res.* 88(1): 38-41. 1988.

FANDEUR, T., MORETTI, C.; POLONSKY, J. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of sergeolide. *Planta Medica*, 51:20-23. 1985.

FEELICH, M; NOACK, E. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. *Eur J. Pharmacol.* 27; 142 (3): 465-9. Oct 1987.

FISHER, A.B.; CHIEN, S.; BARAKAT, A.I.; NEREM, R.N. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol.* 2001; 281: L529-L533.

FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66, 375. 1925.

FITCH, C.D; CHEVLI, R; KANJANANGGULPAN, P; DUTTA, P; CHEVLI, K; CHOU, AC. Intracellular ferriprotoporphyrin IX is a lytic agent. *Blood*. 62:1165-1168, 1983.

FUKUSHIMA, Y. *et al.* Unique roles of G-protein-coupled histamine H2 and gastrin receptors in growth and differentiation of gastric mucosa. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 502, p. 234-252, 2004.

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

FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 175-197, 1994.

FURLAN, R., G. MOLINA, O. MICHELONI, M. ZUDENIGO & S. ZACCHINO. Uso del bioensayo de *Artemia salina* para la detección de productos naturales con actividad biológica de la familia Simaroubaceae. *Anales de S.A.I.P.A.* (Buenos Aires) 12: 293-312. 1994.

GAFIN, I. S. Simplified calcium transport and storage pathways. *J. os Therm. Biol.* N. 24, p. 251-264. 1991.

GARCIA GONZALEZ, M., *et al.*. "Pharmacologic activity of the aqueous wood extract from *Quassia amara* (Simarubaceae) on albino rats and mice." *Rev. Biol. Trop.* 44-45: 47-50. 1997.

GARCIA, C.R. Calcium homeostasis and signaling in the blood-stage malaria parasite. *Parasitol.Today.* 15:488-491, 1999

GAZARINI M.L.; GARCIA, C.R. The malaria parasite mitochondrion senses cytosolic Ca^{2+} fluctuations. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 321:138-144, 2004

GAZARINI, M., THOMAE, A., POZZAN, T. and GARCIA, C.R.S. "Survival in a low calcium environment: low intracellular parasites such as *Plasmodia* have solved the problem". *J. Cell Biol* 161, 103-110, 2003.

GERMOSÉN-Gobineau, L. (ed.). **Farmacopea Vegetal Caribeña**. 2ª. ed. TRAMIL, León, Edit.Universitaria, UNAN. 486 p. 2005.

GEWALTIG, M. T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanism and therapeutic potential. *Cadiovasc Res.* 2002, 55: 250-260.

GHIASUDDIN, S.M. & F. MATSUMURA. DDT inhibition of Ca^{2+} -Mg-ATPase from peripheral nerves and muscles of lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103: 31-37.1981.

GIBALDI M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol*, 33:488-96. 1993.

GINSBURG H, KUTNER S, KRUGLIAK M, CABANTCHIK ZI: Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of *Plasmodium falciparum* infected red blood cells. *Mol.Biochem.Parasitol.* 14:313-322, 1985.

GLAVIN, G.B., SZABO, S., 1992. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic. *FASEB J.* 6, 825-831

GOEL RK, BHATTACHARYA SK 1991. Gastroduodenal mucosal defense and mucosal protective agents. *Indian J Exp Biol* 29: 701-714.

GONÇALVES, J. C. R., OLIVEIRA, F. S., BENEDITO, R. B., SOUSA, D. P.,

GROSSEN, N. E., KELLY, M. J. 1972. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 81, 307-310.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HAMILTON, S.L., SERYSHEVA, I., STRASBURG, G.M. Calmodulin and excitationcontraction coupling. *News Physiol. Sci.* 15, 281-284. 2000.

HOOGERWERF, W.A.; PASRICHA, P.J. Agentes usados para o controle da acidez gástrica e no tratamento de úlceras pépticas e da doença do refluxo gastroesofágico. In: Hardman, J. G. e Limbird, L. E. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003

HOUEL, E., *et al.* "QUASSINOID constituents of *Quassia amara* L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity." *J. Ethnopharmacol.*; 126(1): 114-8. 2009.

HOUSSEIN SADRZADEH, S.M., VINCENZI, F.F., HINDS, T.R. Simultaneous measurement of multiple membrane ATPases in microtiter plates. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. Vol 30, Issue 2, Pg 103-110, 1993.

HOTTA, C. T. *et al.* Calcium-dependent modulation by melatonin of the circadian rhythm in malarial parasites. *Nat. Cell. Biol.* V.2, n.7, p. 466-468, 2000.

HUNSKAAR, S.; O.B. FASMER & K. HOLE . 1985. Formalin test in mice, a useful technic for evaluation mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 769-785.

IKEDA Y, UENO A, NARABA H, OH-ISHI S, Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci* 69, 2911–2919, 2001.

IRWIN, S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*, 13(3):222-57. 1968.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.15, p. 1181-1205, 2007.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanism of nociception. *Nature*, 413: 203-210, 2001.

KARCZ, S. R., HERRMANN, V. R.; COWMAN, A. F. Cloning and characterization of a vacuolar ATPase A subunit homologue from *Plasmodium falciparum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 58, 333–344. 1993.

KARCZ, S. R., V. R. HERMANN; A. F. COWMAN. Cloning and characterization of the vacuolar ATPase B subunit from *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65:123-133.1994.

KIM, H.S.; SHIBATA, Y.; KO, N.; IKEMOTO, N.; ISHIZUKA, Y.; MURAKAMI, N.; SUGIMOTO, M.; KOBAYASHI, M.; WATAYA, Y. *Parasitol. Int.*, 48, 271. 2000.

KIMURA, M, YAMAGUCHI Y, TAKADA S, TANABE K. Cloning of a Ca^{2+} -ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca^{2+} -ATPases. *J Cell Sci.*;104 (:1129–1136. 1993.

KIRK K, HORNER HA, ELFORD BC, ELLORY JC, NEWBOLD CI: Transport of diverse substrates into malaria-infected erythrocytes via a pathway showing functional characteristics of a chloride channel. *J.Biol.Chem.* 269: 3339-3347, 1994.

KNOLL, J.; SOMOGYI, G.T.; ILLÉS, P.; VIZI, E.S. Acetylcholine release from isolated vas deferens of the rat. *N-S Arch Pharmacol* 274: 198-203. 1972.

KRETTLI A.U, ANDRADE-NETO, V. F, BRADAO, M.G, FERRARI, W.M: The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96:1033-1042. 2001.

KRISHNA, S., ECKSTEIN-LUDWIG, U., JOËT, A., UHLEMANN, C., MORIN, C., WEBB, R., WOODROW, C.J, KÜN, J. and KRENSNER, P. *Int. J. Parasitol.* 32, pp. 1567–1573. 2002.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, v. 18. p.412, 1959.

KUMAR N, ZHENG H. Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 76: 214-218. 1990.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. In: **Robbins & Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

KUO, A.G. *et al.*, DAMU, K.H. LEE and WU, T.S. 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12,p. 537–544. 2004.

KUPCHAN, S.M: STREELMAN,D.R. Quassamarin, a new antileukemic quassinoid from *Quassia amara*. *J Org Chem* 41, Dept Chem Univ Virginia Charlottesville,VA 22901 USA. 1976.

KUTCHAI, H. C. Secreções gastrintestinais. In: BERNE, R. M. & LEWI, M. N. **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1996.

LACAMPAGNE, A., KLEIN, M.G., WARD, C.W., SCHNEIDER, M.F. 2000. Two mechanisms for termination of individual Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA*. 97,7823-7828

LACAPÈRE, J. J.; ROBERT, J. C.; THOMAS-SOUMARMON, A. Efficient solubilization and purification of the gastric H^{+} - K^{+} -ATPase for functional and structural studies. *Biochem. J.*, v. 345, p. 239-245, 2000.

LANCEL, M. Role of GABA A receptors in the regulation of sleep: initial sleep responses to peripherally administered modulators and agonists. *Sleep*, 22(1): 33-42. 1999.

LANG'AT,C.C. 1995. Ph.D. tese. *Synthesis and biological activities of quassinoid analogues*. Commonwealth Association of Universities Scholarship, University of London.

LANNERGREN, J.; J. NOTH. 1973 . Tension in isolated frog muscle fibers induced by hypertonic solutions. *J. Gen. Physiol.* 61 :158-175 .

LAPA, A. J. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis/São Carlos: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999.

LAPA, A. J. *et al.* **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. 2003.

LE BLANC, C.; MIRONNEAU, C.; BARBOT, C.; HENAFF, M.; BONDEVA T.; WETZKER, R.; MACREZ, N.. Regulation of vascular L-type Ca²⁺ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Circ Res.* 2004 6; 95(3): 300–307. 2004 doi: 10.1161/01.RES.0000138017.76125.8b.

LINCOLN, T.M.; CORNWELL, T.L.; TAYLOR, A.E. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca⁺² by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 258: C399-407, 1990.

LINDBERG, P., NORDBERG, P., ALMINGER, T., BRANDSTORM, A.,WALLMARK, B. The mechanism of action of the gastric acid secretion inhibitor omeprazole. *J. med. chem.* 29, 1327–1329. 1986.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. *Pain: an overview*. *Lancet*, 353: 1607-1609, 1999.

LUTSENKO S., KAPLAN, J.H. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity.*Biochemistry*. v.5;34(48):15607-13. 1995.

MACEDO, E. G., POTIGUARA, R. C. V. e ROCHA NETO, O. Anatomia foliar de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), uma espécie medicinal e inseticida. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, série. Ciências Naturais*, vol.1, no.1, p.9-18. 2005.

MASSOULIE, J. *et al.* *Progress Neurobiol.* v.41, n.1, p.31-91, 1993.

MARCHESINI, N.; VIERA M, LUO S, MORENO SNJ,DOCAMPO R. A. Malaria parasite-encoded vacuolar H⁺-ATPase is targeted to the host erythrocyte. *J Biol Chem* 2005; 280: 36841-7. 2005.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH V. L. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 5 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000.

McCALLUM-DEIGHTON, N.; HOLDER, A. A. The role of calcium in the invasion of human erythrocytes by *plasmodium falciparu*. *Mol. Biochem. Parasitol.* V. 50, n.2, p. 317-323, 1992.

- MISHRA, K., *et al.* "Plasmodium falciparum: In vitro interaction of quassin and neo-quassin with artesunate, a hemisuccinate derivative of artemisinin." *Exp. Parasitol.* 2009.
- MITCHELL, D.; HELLON, R. F. Neuronal and behavioral responses in rats during noxious stimulation of the tail. *Proceedings of the Royal Society Biological Science*, vol. 197, p. 169–194, 1977.
- MOLLER, J. V.; JUUL, B.; MAIRE, M. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 1-51. 1996.
- MONCADA, S; PALMER, RMJ; HIGGS, EA. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43:109-42. 1991.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 48(4):254-60, 1955.
- MUHAMMAD, E. B., KHAN, S.I., TEKWANI, B.L., KHAN, I.A, TAKAMATSU, J.P. e WALKER, L.A. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *Journal of Natural Products* 67, pp. 772–777. 2004.
- MÜLLER, T.C. *et al.* Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1587, p.92-98, 2002.
- MURAKAMI, S.; ARAI, I.; MURAMATSU, M.; OTOMOS, S.; BABA, K.; KOZAWA, M.- Inhibition of gastric H⁺, K⁺ - ATPase and acid secretion by cassigarol A: A polyphenol from *Cassia garrettiana* Craib. *Biochem. Pharmacol.*, 44: 33-37, 1992.
- NEBERT, D.W., GONZALEZ, F.J., *P450* genes: structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 945–993. 1987.
- NELSON, W. L. Antihistamines and related antiallergic and antiulcer agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. Ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. P. 794-818.
- NEMETH, E. F. Calcium receptor-dependent regulation of cellular functions. *News Physiol. Sci.*, v.10, pp. 1-5, 1995.
- NOSTEN F, ASHLEY E. The detection and treatment of *Plasmodium falciparum* malaria: time for change. *J Postgrad Med*. 50:35-9. 2004.
- NJAR, V.C.O., T.O. ALAO, J.I. OKAGUN & H.L. HOLLAND. 2-methoxycanthin-6-one: a new alkaloid from the stem wood of *Quassia amara*. *Planta Med.* 59(3):259-261. 1993.
- O'NEILL, M.J.; BRAY, D.H.; BOARDMAN, P.; PHILLIPSON, J. D; WARHURST, D. C.; PETERS, W.; SUFFNESS, M. Plants as Sources of Antimalarial Drugs: *In Vitro* Antimalarial Activities of Some Quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. p. 101-104 Vol. 30, No. 1. 1986.

ONO, K.; SAWADA, T.; MURATA, Y.; SAITO, E.; IWASAKI, E.; ARAKAWA, Y.; KUROKAWA, K.; HASHIMOTO, Y. Pentagalloylglucose, an antisecretory component of *Paeoniae radix*, inhibits gastric H⁺/K⁺-ATPase. **Clinica Chimica Acta**, v. 290, n. 2, p. 159-167, 2000.

ORJIH AU, RYERSE JS, FITCH CD: Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* by chloroquine. *Experientia*. 50:34-39, 1994.

PAGOLA S, STEPHENS PW, BOHLE DS, KOSAR AD, MADSEN SK: The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 404:307-310, 2000.

PATEL, G., KIRBY, G.C., PHILLIPSON, J.D.; WARHURST, D.C. *J. Pharm. Pharmac.* 41, p. 90P (suppl.). 1989.

PEDERSEN, P. L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases 1. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12:186–189. 1987

PEDERSEN, P. L. Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview. *J Bioenerg Biomembranes* 34:327–332. 2002

PEDERSEN, P. L. *J Bioenerg Biomembranes* 37:349–357. 2005

PEDERSEN, P. L. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr* 39:349–355. 2007.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S.E., BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 14(3): 149-67. 1985.

PING, G.; L, YANPING & L. SHIGUI. Effects of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 157-162. 2004.

PINI, L. A. *et al.* Reversible antinociception by paracetamol in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 280, p. 934 - 940, 1997.

PUPO, M. T; GALLO, M. B. C; VIEIRA, P.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 30, n. 6. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000600014&lng=en&nrm=iso> 2007. Acesso em 09 /03/2010.

PHILLIPSON, J.D., WRIGHT, C.W, KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C. 1993. Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. In: K.R. Downum, J.T. Romeo and H.A. Stafford, Editors, ***Phytochemical Potential of Tropical Plants***, Plenum press, New york, p. 1–40.

PRUT, L., BELZUNG, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33. Schmitt, U., Hiemke, C., 1998.

RABON, E.D.; IM, W.B.; SACHS, G. Preparation of Gastric H⁺, K⁺ - ATPase. *Methods in Enzymology* 157: 649-654, 1988.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. Ed. Trad. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

REPETTO, M.G; LLESUY, S. L. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medice for gastric ulcers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.35, p. 523-534, 2002.

RIEGER, F.; VIGNY, M. J. *Neurochem*. v.27, p.121-129, 1976.

RIBEIRO, J.E.L., HOPKINS, M.J.G., VICENTINI, A., SOTHERS, C.A., COSTA, M.A., BRITO, J.M., SOUZA M.A.D., MARTINS, L.H.P., LOHMANN, L.G., ASSUNÇÃO, P.A.C., PEREIRA, L. E. da C., da SILVA, C.F., MESQUITA, M.R. e PROCÓPIO, L.C. **Flora da reserva Ducke - Guia de identificação da plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central** Vol. 1, 272-272. Manaus: INPA-DFID. 1999.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal Pharmacology*, Netherlands, v. 387, 111-118, 2000.

RIEL MA, KYLE DE, BHATTACHARJEE AK, MILHOUS WK. Efficacy of proton pump inhibitor drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and their probable pharmacophores. *Antimicrob.Agents Chemother*. 46:2627-2632, 2002

RODGERS, R. J., COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), *Ethology and Psychopharmacology*. Wiley, Chichester, pp. 9-44. 1994.

ROSENTHAL, J. Curtain has fallen on hopes of legal bioprospecting, *Nature* 416 (6876), p. 15. 2002.

SACHS G, CHANG HH, RABON E, SCHACKMAN R, LEWIN M, SACCOMANI G. A oneelectrogenic H⁺ pump in plasma membranes of hog stomach. *J Biol Chem* 251:7690–7698. 1976.

SAIRAM, K; RAO, CHV; DORA BABU, M; VIJAY KUMAR, K; AGRAWAL, VK; GOEL, RK . Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinallis*: an experimental study. *J Ethnopharmacol* 82: 1-9. 2002.

SALIBA, K.J; KIRK, K. Nutrient acquisition by intracellular apicomplexan parasites: staying in for dinner. *Int.J.Parasitol*. 31:1321-1330. 2001.

SANTOS A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachycinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, .31, n.4, p.381-389, 1997.

psaicin models of pain in mice. *Neuropeptides*, .31, n.4, p.381-389, 1997

SCARBOROUGH, G. A. Structure and function of P-type ATPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 517- 522. 1999.

SCHUBERT, M. Gastric secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v.21, p. 636-643, 2005.

SCHUBERT, M.L.; SHAMBUREK, R.D. Control of acid secretion. *Gastroenterology Clinics of America*, v. 19, p. 21-25, 1990.

SHING, T.K.M; ZHU, X.Y; MAK, T.C.W. Synthetic Studies towards Pentacyclic Quassinoids: Facile and Stereocontrolled Construction of the E Ring *Tetrahedron: Asymmetry* 7. p. 673. 1996.

SIMÕES, M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. PortoAlegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H₁- receptor antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. P. 1104-1118.

SKINNER-ADAMS, T. S., T. M. E. DAVIS, L. S. MANNING; W. A. JOHNSTON. 1997. The efficacy of benzimidazole drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro rans. *R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 91:580-584

SMITH, L. K.; WEISS, E. L.; LEHMKUHL, L. D. **Cinesiologia Clínica de Brunnstrom**. 5º ed. São Paulo: Manole, 1997.

SONKUSARE, S; PALADE, P.T., MARSH, J.D. TELEMAQUE, S.; PESIC, A.; RUSCH, N.J. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications. *Vascul. Pharmacol.* 44 (3): 131-142, 2006.

SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. Métodos utilizados para validação de plantas medicinais com atividade gastrintestinal. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17. Cuiabá. Anais... Cuiabá, 32p..2002.

SOUCCAR, C. Apostila do curso: Importância funcional das p-atpases de mamíferos e sua relevância como alvos farmacológicos realizado pelo programa de pós-graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. 2008.

SOUZA, D.M.; GARCIA-CRUZ, C.H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 25, p. 331-340, 2004.

STERU, L., CHERMAT, R., THIERRY, B., SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85:367–370. 1985.

STOCK, D.; GIBBONS, C; ARECHAGA, I.; LESLIE, A. G.; WALKER, J. E. *Curr. Opin Struct Biol* 10:672–679. 2000.

STROLL, G. Insecticidal plants: Natural crop protection in the Tropics. *Margraf Publishers Scientific*, 1986. Disponível em:

<<http://wwbota.free.fr/XMLPublication/text+index/biopesticides.htm>>. Acesso em: 19 dez. 2009.

SVENSSON, CI, YAKSH, TL The Spinal Phospholipase-Cyclooxygenase- Prostanoid Cascade In Nociceptive Processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, p.553–583, 2002.

SZABO, S. TRIER, J. BROWN, A. e SCHNOOR, J. Early vascular injury and creased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterol.*, v.88, p.228-236, 1985.

TACHE', Y., MARTINEZ, V., MILLION, M., WANG, L., 2001. Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G173–G177.

TANABE K, KATO M, IZUMO A, HAGIWARA A, DOI S. Plasmodium chabaudi: in vivo effects of Ca²⁺ antagonists on chloroquine-resistant and chloroquine-sensitive parasites. *Exp.Parasitol.* 70:419-426, 1990

TAYLOR, P.; RADIC, Z. Annual Ver. *Pharmacol. Toxicol.* p. 34, 281. 1994.

TEPPERMAN, B.L., JACOBSON, E.D., 1994. Circulatory factors in gastric mucosal defense and repair. In: Leonard, R. Johnson (Ed.), **Physiology of the Gastrointestinal Tract**, third ed. Raven Press, New York, pp. 1331–1351.

TJOLSEN A, HOLE K. Animal models of analgesia. In: Dickenson A, Besson J. *The Pharmacology of Pain*. Berlin: Springer Verlag, p.1-20. 1997.

TOMA, Walber *et al.* Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Biol Pharm Bull.*, 25(9):1151-5. 2002.

TOMA, Walber *et al.* Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 85, Issue 1, P. 19-23. 2003.

TRIBE, R. M.; BORIN, M.L.; BLAUSTEIN, M.P. Functionally and spatially distint Ca⁺² stores are revealed in cultured vascular smooth muscle cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91 (13): 5908-12, 1994.

URUSHIDANI, T., FORTE, J. G. Signal transduction and activation of acid secretion in the parietal cell. *The Journal of Membrane Biology* 159, 99–111. 1997.

VAN AGTMAEL, T.A. EGGELTE and VAN BOXTEL, C.J. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Trends in Pharmacological Sciences* 20 (5), pp. 199–205. 1999.

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. Presente concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. *Veterinary Research Communications*, v. 26 (2), p. 111 – 126, 2002

VAN WAUVE, J.P., GOOSENS, J.G. Arabinolactan and dextran induced ear inflammation in mice: differential inhibition by H1-antihistamines, 5-HT-serotonin antagonists and lipoxygenase blockers. *Agents Actions*, v.28, p. 78-82, 1989.

VANHOUTTE PM. How we learned to say NO. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1156–1160. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.190215.

VAROTTI, F., BERALDO, F.H., GAZARINI, M. AND GARCIA, C.R.S. *Plasmodium falciparum* parasites display a thapsigargin-sensitive Ca^{2+} pool. *Cell Calcium* 33 , 137-144, 2003.

VERMA, N. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages." *Mol. Cell Biochem.* 2009.

VIEIRA, R.A. *Avaliação da possível atividade central da Stachytarpheta cayenensis* (gervão-roxo). Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.

VIGNERON M, DEPARIS X, DEHARO E, BOURDY G Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *J Ethnopharmacol* 98: 351-360. 2005.

VILLALOBOS, R.; CHANG, Y.; MARMILLOD, D.; BEDOYA, R.; LEIGUE, L. Desarrollo de criterios silviculturales para el manejo de *Quassia amara*, um producto no maderable del bosque tropical. In: Simpósio Internacional Possibilidades de Manejo Forestal Sostenible em América Tropical. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. p. 1-6. 15-20 jul de 1997.

WALLACE, J.L., GRANGER, D.N., 1996. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. *FASEB J.* 10, 731–740. *Biochem.* 2009

WALLMARK, B., BRIVING, C., FRYKLUND, J., MUNSON, K., JACKSON, R., MENDLEIN, J., RABON, E., SACHS, G. Inhibition of gastric H^+ , K^+ -ATPase and acid secretion by SCH 28080, a substituted pyridyl(1,2a)imidazole. *J. Biol. Chem.* 262, 2077–2084. 1987.

WEBER, J. SENIOR, A. E. Catalytic mechanism of F1- ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 19-58. 1997.

WEINECK, J. **Biologia do Esporte**. São Paulo: Manole, 2000.

WHITE, H. S. Histamina e anti-histamínico. In: GENARRO, A. R. edit. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. P. 1522-1528.

WHITE, N. J. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1413–1422. 1997.

WILKENS, S; ZHANG, Z; ZHENG, Y. *Micron* 36:109–126. 2005.

WILLIAMS TJ. Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E2 as a vasodilator and oedema potentiator in rabbit skin. *Br J Pharmacol*. Nov;77(3), p.505-509, 1982.

WILMORE, J. H.; COSTILL, D. L. **Fisiologia do Esporte e do Exercício**. 2º ed. São Paulo: Manole, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bulletin of the WHO. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *In vitro* micro-test (MARK III) for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, quinine, amodiaquine, sulfadoxine/pyrimethamine and artemisinin. CTD/MAL/97.20 Rev. 2001a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- malaria.who.int/wmr2008/malaria2008.pdf. 2008. Acesso em 15/01/2010.

WOLSKA, B. M. & LEWARTOWSKI, B. The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the Ca²⁺ extrusion from the resting myocytes of guinea- pig heart: Comparison with rat. *J.Mol.Cell.Cardiol.*25, 75-91.1993.

WRIGHT CW Traditional antimalarials and development of novel antimalarial drugs. *J Ethnopharmacol* 100: 67-71. 2005.

YAO, X., FORTE, J.G., 2003. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annual Review of Physiology* 65, 103–131.