



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**Estudo farmacológico de extratos polares da *Viola surinamensis*
(Myristicaceae) (Rol) Warb. na pressão arterial e na contração do
músculo esquelético de roedores**

THIAGO MATTOS DE ARAÚJO LIMA

MANAUS
2010



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

THIAGO MATTOS DE ARAÚJO LIMA

**Estudo farmacológico de extratos polares da *Virola surinamensis*
(Myristicaceae) (Rol) Warb. na pressão arterial e na contração do
músculo esquelético de roedores**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Lapa

MANAUS
2010

THIAGO MATTOS DE ARAÚJO LIMA

**Estudo farmacológico de extratos polares da *Virola surinamensis*
(Myristicaceae) (Rol) Warb. na pressão arterial e na contração do
músculo esquelético de roedores**

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

Aprovado em 30 de novembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. ANTÔNIO JOSÉ LAPA
PRESIDENTE DA BANCA



Dr. PAULO CÉSAR GHEDINI
PROFESSOR TITULAR

Dr. MASSAYOSHI YOSHIDA
PROFESSOR TITULAR

DEDICATÓRIA

A Deus, por permitir que pudesse chegar até aqui com saúde, aos meus pais *Lenize Mattos e Luiz Felipe Araújo* que sempre torceram e acreditaram no meu sucesso, ao meu irmão e todos da minha família.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida, pelo amor e pelo sonho que nos brinda a cada dia, dando-nos força, esperança e motivação para prosseguirmos em nossa caminhada.

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio José Lapa, pela amizade, conselhos, compreensão e por ter me mostrado que às vezes precisamos cair para aprendermos a levantar. A Dra Caden Souccar, pelo incentivo e ombro amigo, a Dra Maria Teresa R. Lima-Landman, pelo apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho, a Dra Tereza Christina Monteiro Lima, pela motivação e conselhos. A todos os professores da UNIFESP que colaboraram direta e indiretamente com esse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo elevado grau de excelência das disciplinas que foram ministradas.

A toda equipe do Biotério do Laboratório de Farmacologia, na pessoa do Dr. D'Ângelo, Antonio, Claudia Rodrigues, Celina, Leandro, Rosangela, Sterner que muito me auxiliaram na obtenção e manutenção dos animais, utilizados nos estudos farmacológicos.

A todos os técnicos do Laboratório de Farmacologia que muito contribuíram para a obtenção das práticas e dos resultados para execução desta Dissertação.

Aos amigos da convivência de todos os dias, que permaneceram desde o início do treinamento até a conclusão de mais uma etapa de minha vida (UNIFESP/UFAM), pelo auxílio e pelas valiosas discussões e críticas que muito contribuíram para enriquecer esse Trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, Toxicologia de Medicamentos e Biotério: Andrezza, Alzemir, Alcineide, Cleonice Neta, Charles, Claudia, Daniel, Danilo, Eliene, Fabíola, Franciane, Herbenya, Jeffeson, Juliana, Karla, Kaori Isla, Lucinei Maciel, Pedro, Ricardo, Sandra, Sandra, Sinome, Siglia, Suelen, Thais, Tânia pela amizade e companheirismo cultivados e amadurecidos ao longo de nossa longa jornada.

Aos amigos do Laboratório da Central Analítica, de Produção de Extratos, Fitoquímica e Cultura de Tecidos Vegetais, Esterilização, Farmacotécnica, Agronomia e Herbário: Dr. Massayoshi Yoshida, Dr. Tetsuo Yamane, Dr. Franciscon.

A direção e coordenação da Universidade Federal do Amazonas, nas pessoas, dos professores Dr. José Odair Pereira, Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. Edmar Vaz de Andrade que facilitaram os horários das aulas, para que eu pudesse frequentar, com assiduidade, as disciplinas ofertadas por este Programa de Pós-Graduação.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) o apoio financeiro obtido através do Programa de Pós-Graduação pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta etapa de minha formação.

AGRADEÇO

EPÍGRAFE

“Os sonhos são para serem sonhados”

Vinicius de Moraes

VIII

RESUMO

A *Virola surinamensis*, conhecida popularmente como ucuúba, ucuúba branca, ucuúba de igapó, sucuba, é uma árvore que cresce em várzeas e em bancos de areia em rios na Floresta Amazônica. A resina da casca é utilizada na medicina popular para o tratamento de erisipelas e o chá das folhas é indicado em cólicas, dispepsia, processos inflamatórios e para o tratamento da malária. Dentre os constituintes de *Virola surinamensis* foram descritos arilpropanoides, neolignanas, lignanas, sesquilignóides, lignóides diméricos, flavonóides, diarilpropanos, γ -butirolactonas, alcalóides e derivados do ácido benzóico. Desses, destacam-se as lignanas e neolignanas por suas atividades anti-parasitária e anti-fúngica. Estudos farmacológicos anteriores descrevem atividade anti-parasitária dos óleos essenciais, atividade anti-leishmania, anti-inflamatória, antifúngica, inseticida e gastroprotetora. Este trabalho teve como objetivo o estudo das ações farmacológicas da fração butanólica padronizada de *Virola surinamensis* e a análise dos mecanismos do efeito hipotensor e da potenciação da contração do músculo esquelético. A padronização química foi obtida após partição do extrato aquoso das folhas (EA) em butanol dando origem à fração butanólica (FBut). A purificação da Fbut por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) originou 10 frações de elevado grau de pureza (F1 a F10) que se encontra em processo de identificação. A triagem farmacológica do EA e da Fbut mostrou baixa ação no SNC. Na pressão arterial de ratos anestesiados a injeção endovenosa tanto do extrato aquoso como da fração butanólica produziu hipotensão aparentemente associada à uma ação bloqueadora de receptores α_1 -adrenérgicos. A Fbut mostrou-se eficaz na redução da pressão arterial durante o tratamento crônico. As substâncias absorvidas não modificaram o comportamento animal no teste de Irwin, mas produziram hipotensão reversível com início em torno de 30 minutos, tempo necessário para o esvaziamento gástrico. O tratamento repetido durante 7 dias também não modificou o comportamento animal, mas houve um efeito residual cumulativo da FBut que a cada dia reduziu o valor basal da pressão arterial dos ratos. Em anéis de aorta sem endotélio, a Fbut relaxou o tônus induzido pela noradrenalina de maneira concentração-dependente, mostrando que Fbut não interfere no sistema NOS. Este efeito foi indicativo de antagonismo competitivo e reforça as evidências obtidas na pressão arterial de que o mecanismo da hipotensão produzida pela Fbut é o bloqueio de adrenoceptores do tipo α_1 . A Fbut potenciou a contração obtida por estímulo direto da fibra muscular do diafragma de rato. Em microsomas isolados da musculatura esquelética do coelho, a Fbut inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase à semelhança da tapsigargina, indicando que a potenciação da contração do diafragma parece estar relacionada à diminuição da recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático.

Palavras chaves - *Virola surinamensis*, pressão arterial, musculatura esquelética, Ca^{2+} -ATPase

ABSTRACT

Virola surinamensis (Myristicaceae), popularly known as ucuuba, ucuuba branca and sucuuba, is widely distributed in flooded areas of the Amazonian Forest. The bark resin is used in the folk medicine to treat erysipela and the tea of the leaves, to treat colics, dyspepsia, inflammations and malaria. The main constituents described for *V. surinamensis* are arylpropanoids, neolignans, lignans, lignoids, flavonoids, diarylpropanes, γ -butirolactones, alkaloids and acid benzoic derivatives. Among them, lignans and neolignans showed anti-parasitic and anti-fungal activities. Previous pharmacological studies described anti-parasitic effect of the essential oils and anti-leishmania, anti-inflammatory, anti-fungal, insecticide and gastroprotective actions. The aim of this work was to study the pharmacological activity of the standardized buthanolic fraction of *Virola surinamensis* and the mechanisms of the hypotensive effect and the potentiation of the skeletal muscle contraction. The chemical standardization was obtained after partition of the leaves aqueous extract (AE) in n-buthanol originating the buthanolic fraction (BuF). The BuF purification by high performance liquid chromatography (HPLC) originated 10 high purity fractions (F1 to F10) that are still in identification process. The pharmacological screening of AE and BuF showed low action in the CNS. In the arterial blood pressure of anesthetized rats, the intravenous injection of both AE and BuF produced hypotension apparently associated with the α_1 -adrenoceptors blockade. The BuF was effective to reduce the arterial blood pressure in the chronic treatment also. The absorbed substances did not modify the animal behavior in the Irwin Test, but produced reversible hypotension initiating in 30 min, time necessary to the gastric emptiness. The treatment during 7 days did not modify the animal behavior, but there was a residual accumulated effect of the BuF reducing the basal arterial blood pressure of the rats. In the isolated aortic rings without endothelium, the BuF relaxed the tonus induced by noradrenalin in a concentration-dependent manner, showing that BuF did not interfere with the NO system. This effect was indicative of a competitive antagonism and reinforced the evidences obtained in the arterial blood pressure that the mechanism of the hypotension produced by BuF was the α_1 adrenoceptors blockade. The BuF potentiated the direct elicited twitches of the rat diaphragm. In microsomes isolated from the rabbit skeletal muscle, BuF inhibited the Ca^{2+} -ATPase activity similarly to thapsigargin, indicating that the potentiation of the diaphragm contraction may be related to the decrease in the Ca^{2+} uptake by the sarcoplasmic reticulum.

Keywords - *Virola surinamensis*, Blood pressure, Skeletal muscle, Ca^{2+} -ATPase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema da extração, fracionamento e purificação das folhas de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. 43
- Figura 2** - Cromatografia em Camada Delgada do **1: Extrato aquoso, 2: Extrato etanólico, 3: Fração butanólica, 4: Fração aquosa** de *Virola surinamensis*, utilizando BAW (4 : 1 : 2) como fase móvel. Revelação em Iodo (A) e UV 330nm (B). 44
- Figura 3** - Perfil cromatográfico da fração butanólica de *V. surinamensis* por CLAE analítico, utilizando-se coluna analítica C18, gradiente linear de água/acetonitrila 15 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV – Vis operando a 210 nm. 46
- Figura 4** - Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (Nor ;0,1, 0,3 e 1 µg/kg e.v.) antes e após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). 63
- Figura 5** - Efeitos da administração endovenosa de noradrenalina 0,1, 0,3 e 1 µg/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). 63
- Figura 6** - Variação dos Efeitos pressóricos da adrenalina (0,1, 0,3 e 1 µg/kg e.v.) antes e após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). 64
- Figura 7** - Efeitos da administração endovenosa de adrenalina 0,1, 0,3 e 1 µg/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). 65
- Figura 8** - Efeitos pressóricos da administração endovenosa da fração butanólica de *V. surinamensis* (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 5). 66
- Figura 9** - Efeitos da administração endovenosa de Fbut 1, 3 e 10 µg/kg na frequência cardíaca de ratos anestesiados após administração da Fbut de *V. surinamensis*. 66
- Figura 10** - Efeitos pressóricos da administração endovenosa da acetilcolina (1 µg/kg) e da fração butanólica de *V. surinamensis* (1, 3 e 10 mg/kg, v.i.) em condições controle e depois da administração de atropina(1 mg/kg) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). 67
- Figura 11** - Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,1, 0,3 e 1 µg/kg e.v.) antes e após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 68

mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5).

Figura 12 - Efeitos da administração endovenosa de noradrenalina 0,1, 0,3 e 1 μ g/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado em condições basais após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). 69

Figura 13 - Efeitos pressóricos da injeção de adrenalina (0,1, 0,3 e 1 μ g/kg e.v.) antes e após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5). 70

Figura 14 - Efeitos da administração endovenosa de adrenalina 0,1, 0,3 e 1 μ g/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). 70

Figura 15 - Efeito da administração oral da Fbut de *V. surinamensis* (150 mg/kg) na pressão arterial de ratos não anestesiados. Registro direto da P.A femoral durante 210 minutos após o tratamento. 71

Figura 16 - Efeito da administração oral da Fbut de *V. surinamensis* (300 mg/kg) na pressão arterial de ratos não anestesiados. Registro direto da P.A femoral durante 210 minutos após o tratamento. 72

Figura 17 - Efeito da administração oral repetida da Fbut de *V. surinamensis* (150 e 300 mg/kg/dia) na pressão arterial de ratos não anestesiados, registro direto da P.A femoral. 72

Figura 18 - Pressão arterial sistólica medida indiretamente na cauda de ratos normotensos, tratados repetidamente com veículo (controle – água, 5 ml/kg/dia p.o, n=5) ou com Fbut (75, 150, 300 mg/kg/dia, p.o, n=5) como indicado. 74

Figura 19 - Relaxamento produzido pela Fbut de *Virola surinamensis* (30, 100 e 300 μ g/mL) da contração induzida por noradrenalina (10^{-7} M) em anéis de aorta de rato sem endotélio. 75

Figura 20 - Efeito da Fbut (10 e 30 μ g/mL) na contração de anéis de aorta de rato produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor, 10^{-9} a 10^{-6} M), a 35 °C. 76

Figura 21 - Efeito cumulativo da fração butanólica (FBut) de *V. surinamensis* (10, 30, 100 e 300 μ g/mL) na frequência cardíaca do átrio direito de rato. 77

Figura 22 - Efeito cumulativo da fração butanólica (FBut) de *V. surinamensis* (10, 30, 100 e 300 mg/mL) na contração do átrio esquerdo de rato, estimulada com pulsos transmuralis supra-máximos, com duração de 2 ms e frequência de 1Hz. 78

Figura 23 - Efeito da fração butanólica (FBut) de *V. surinamensis* (1, 2 e 3 mg/mL) na contração de diafragma de ratos sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms, voltagem supra máxima). 79

Figura 24 - Efeito da Fbut (3, 10, 30 e 100 μ g/mL) na atividade da Ca^{2+} - ATPase de músculo esquelético de coelho (A) e do controle positivo tapsigargina (0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 μ M) (B), durante 10 min a 37 °C. 80

XII

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados da triagem farmacológica no comportamento e testes específicos de atividade no sistema nervoso central com camundongos tratados com o extrato aquoso (EA) e fração butanólica (Fbut) de *V. surinamensis* (0,1, 0,3 e 1 g/kg). 61

XIII

LISTA DE ABREVIATURAS

CBA	- Centro de Biotecnologia da Amazônia
DZP	- Diazepam
i.p./e.d./v.o.	- intraperitoneal/endovenosa/oral
PSB	- pentobarbital sódico
ACh	- Acetilcolina
Nor	- Noradrenalina
d-tubo	- d-tubocurarina
TYRODE	- Líquido Nutritivo
EC ₅₀	- concentração efetiva 50%
EA	- Extrato Aquoso
FBUT	- Fração Butanólica
FA	- Fração aquosa
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-Prep	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa
EGTA	- ethylene glycol tetraacetic acid
HEPES	- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
Tris - HCl	- Tris (hidroximetil) aminometano
PIPES	- Piperazina-1,4-bis(ácido-2-etanosulfônico)
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
ATR	- Atropina
ionóforo A23187	- calcimicina
BSA	- Albumina
ATP	- Adenosina trifosfato
Pi	- Fosfato inorgânico

XIV
SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
SUMÁRIO	XIV
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 A Família Myristicaceae.....	26
3.2 Gênero <i>surinamensis</i>	28
3.3 Pressão Arterial.....	31
4. MATERIAL	38
4.1 Material Botânico	38
4.2 Material Biológico	38
4.3 Material Químico	39
4.3.1 Solventes, Reagentes e Sais	39
4.3.2 Drogas	39
4.3.3 Soluções e Reagentes	40
4.4 Material Fitoquímico.....	42
4.4.1 Obtenção do Extrato Aquoso (EA)	42
4.4.2 Obtenção da Fração Aquosa e Butanólica.....	42

4.4.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	44
4.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-prep)	45
4.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica	45
5. MÉTODOS	48
5.1 Métodos Farmacológicos para avaliação da atividade dos extratos da <i>Virola surinamensis</i>	48
5.1.1 Teste geral da atividade farmacológica (Teste de Irwin ou Hipocrático)	48
5.2. Atividades Específicas no Sistema Nervoso Central	49
5.2.1 Avaliação da ação tipo-ansiolítica do EA no labirinto em cruz elevado	49
5.2.2 Avaliação da atividade do EA na temperatura corporal de camundongos	50
5.2.3 Avaliação da ação tipo-antidepressiva do EA e Fbut no teste de suspensão pela cauda	50
5.2.4 Avaliação da ação tipo-hipnosedativo do EA no sono sob anestesia com éter etílico	51
5.3 Avaliação da ação cardiovascular dos extratos da <i>Virola surinamensis</i>	51
5.3.1 Registro da pressão arterial de ratos anestesiados	51
5.3.2 Registro indireto da pressão arterial de ratos não anestesiados	52
5.3.3 Registro direto da pressão arterial em ratos não anestesiados	53
5.3.4 Avaliação da ação da Fbut em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).....	54
5.3.5 Avaliação da ação da Fbut nas curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-9} a 10^{-6} M) obtidas em anéis de aorta de rato.....	55
5.3.6 Avaliação da ação da Fbut no átrio de rato	55
5.4 Avaliação da atividade neuromuscular dos extratos da <i>Virola surinamensis</i>	56
5.4.1 Preparação nervo frênico – músculo diafragma de rato	56
5.5 Avaliação da ação da fração butanólica (Fbut) de <i>Virola surinamensis</i> na atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho	57
5.5.1 Isolamento da Ca^{2+} -ATPase	57
5.5.2 Medida da atividade da Ca^{+2} -ATPase	58

5.5.3 Determinação do teor de proteínas	58
5.6 Análises Estatísticas	59
6. RESULTADOS	61
6.1 Efeito do extrato Aquoso (EA) e da Fração butanólica (Fbut) de <i>Virola surinamensis</i> (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin, 1968)	61
6.2 Efeitos do EA e da Fbut da <i>Virola surinamensis</i> na atividade cardiovascular	62
6.2.1 Efeitos do EA e da Fbut <i>Virola surinamensis</i> na pressão arterial de ratos anestesiados	62
6.2.2 Efeito da Fbut de <i>V. surinamensis</i> na pressão arterial de ratos Não anestesiados - registro direto.....	71
6.2.3 Efeitos da administração repetida da fração butanólica (Fbut) da <i>Virola surinamensis</i> na pressão arterial sistólica de ratos normotensos não-anestesiados-registro indireto.....	73
6.2.4 Efeitos da fração butanólica (Fbut) da <i>Virola surinamensis</i> em anéis de aorta torácica de rato, sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).....	74
6.2.5 Efeitos da fração butanólica (Fbut) da <i>Virola surinamensis</i> em anéis de aorta de rato. Curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-9} a 10^{-6} M)	75
6.2.6 Efeito da fração butanólica (Fbut) de <i>Virola surinamensis</i> (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) na frequência de contração do átrio direito de rato	76
6.2.7 Efeito da fração butanólica (Fbut) de <i>Virola surinamensis</i> (10 a 300 $\mu\text{g/mL}$) na força de contração do átrio esquerdo de rato	77
6.3 Ação na junção neuromuscular esquelética	78
6.3.1 Efeitos da Fbut da <i>Virola surinamensis</i> na contração do diafragma de rato obtida por estímulo do nervo frênico e na contração muscular obtida por estímulo direto da fibra muscular na presença de d-tubocurarina.....	78
6.3.2 Atividade da fração butanólica (Fbut) na atividade da Ca^{2+} -ATPase (SERCA 1) de músculo esquelético de coelho	79
7. DISCUSSÃO	82
8. CONCLUSÃO	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1. INTRODUÇÃO

Atualmente cerca de 60% dos medicamentos utilizados na terapêutica médica são de origem sintética e cerca de 40% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese (CALIXTO, 2000). No entanto, durante os últimos 20 anos, os fármacos de origem natural que apareceram no mercado foram, quase na totalidade, oriundos das pesquisas científicas de países como China, Coréia e Japão, sendo que a contribuição dos outros países é bem menor (LOZOYA, 1997).

As plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, para a obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL *et al.*, 2001).

Pode-se considerar como planta medicinal aquela planta administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo algum tipo de ação farmacológica. As plantas podem ser classificadas de acordo com sua ordem de importância, iniciando-se pelas plantas empregadas diretamente na terapêutica, seguidas daquelas que constituem matéria-prima para manipulação e, por último, as empregadas na indústria para obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese (SILVA; CARVALHO, 2004).

Várias empresas nacionais têm empregado matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de fitomedicamentos. No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (HOSTETTMANN; VIEIRA, 2003).

Existem na Terra entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas, mas grande parte delas ainda não tem estudos químicos, analíticos e farmacológicos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em todo o mundo, apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal e, na maioria dos casos, sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e fitomedicamentos (HOSTETTMANN; VIEIRA, 2003; NODARI; GUERRA, 1999; CRAGG *et al*, 1993; HAMBURGER *et al*, 1991).

A ANVISA, MS define tecnicamente o Fitoterápico (Plantas Medicinais) como “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário (Portaria nº 6, 1995). Esta definição de Fitoterápico se confunde, portanto, com a definição de medicamento: “Produto farmacêutico tecnicamente obtido ou elaborado com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (Resolução RDC 84/2002).

A malária, também conhecida como impaludismo, é uma doença infecciosa que é causada por protozoários. As manifestações clínicas podem incluir dores de cabeça, febre recorrente periodicamente (no período de 48 a 72 horas), calafrios, mialgia, sudorese, esplenomegalia, prostração, e a presença de anemia alta nos casos de malária grave nas crianças e mulheres grávidas. Malária grave por *P. falciparum* humano pode incluir sintomas neurológicos, como o delírio e convulsões, acidose metabólica, falha múltipla de órgãos e, se não tratada adequadamente, pode levar ao coma e morte (FIDOCK *et al.*, 2004).

Os agentes etiológicos da malária são protozoários que pertencem ao gênero *Plasmodium*, Filo Apicomplexa, e família Plasmodidae. Quatro espécies de parasitas da

malária são patogênicas para os seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*. O *P. ovale* parece ser limitada a África subsaariana e em algumas ilhas do Pacífico Ocidental, enquanto o *P. falciparum* e *P. vivax* são prevalente em países endêmicos de malária, como o Brasil. *P. falciparum* é o agente de graves e potencialmente fatais malária humana (KRETTLI *et al.*, 2001).

A malária representa mais de um milhão de mortes a cada ano, dos quais mais de 80% ocorrem na África Tropical, onde esta doença é a principal causa de mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (CUNICO *et al.*, 2008).

No Brasil estima-se que ocorrem anualmente 500.000 casos, principalmente na Região Amazônica. Apesar da importância dessa doença, tem havido pouco incentivo econômico para o desenvolvimento de novas terapias à base de drogas antimaláricas. Há uma necessidade crescente de medicamentos eficazes, com novo mecanismo de ação, devido à alta taxa de mutação do parasita, que leva ao desenvolvimento de resistência. Uma das fases críticas do ciclo de vida do parasita durante a infecção humana é a degradação da hemoglobina que fornece nutrientes para o seu crescimento e maturação (COOMBS *et al.*, 2001).

O parasita causador da forma maligna da malária, o *P. falciparum*, freqüentemente apresenta resistência à cloroquina, o medicamento mais barato e mais utilizados para malária (WHO, 2008). Outro problema de resistência a drogas relativa em *P. falciparum* é a ocorrência de resistência cruzada entre os fármacos pertencentes à mesma família química (WHO, 2001).

A resistência às drogas tem um papel importante na ocorrência e gravidade das doenças epidêmicas no mundo (MAJORI, 2004). Além disso, há uma grande disparidade entre a importância da saúde pública de doenças tropicais, como malária, bem como o montante de recursos investidos no desenvolvimento de novos medicamentos para combater estas doenças (WHO, 2001).

A resistência à cloroquina do *P. falciparum* levou ao uso de outras drogas para tratar a malária, incluindo amodiaquina, sulfadoxina-pirimetamina, mefloquina, e derivados de artemisinina como o artesunato (SNOW *et al.*, 2005).

Como consequência da resistência aos medicamentos, drogas como o quinino, primaquina, cloroquina, mefloquina e são ineficazes no tratamento da malária em muitas regiões endêmicas do mundo (SCHLITZER, 2007). Assim, o desenvolvimento da farmacoterapia de novos medicamentos é necessário. Diferentes classes de produtos naturais, tais como terpenos (MESHNICK, 2002), flavonóides, (CHEA *et al.*, 2007) (AUFFRET, 2007; FROELICH *et al.*, 2007) e alcalóides, foram estudadas quanto à atividade antimalárica.

Em vista da resistência progressiva e rápida dos plasmódios aos antimaláricos existentes, e a rara introdução de novos medicamentos efetivos nessa patologia humana, é importante a busca de novos compostos inovadores com aquela atividade e a biodiversidade brasileira, principalmente na Amazônia, é privilegiada por contar com relatos populares que indicam o uso de extratos vegetais no tratamento daquela parasitose. Na medicina popular, plantas da família Myristicaceae são utilizadas com aquela finalidade.

Os índios Waiãpi do Amapá utilizam as folhas de *V. surinamensis*, por inalação de seus vapores, para o tratamento da malária (LOPES *et al.*, 1999). A *Virola surinamensis*, conhecida popularmente como “ucuúba”, “ucuúba-branca”, “ucuúba de igapó”, “sucuba”, é uma árvore que cresce em várzeas e em bancos de areia em rios na floresta amazônica (RODRIGUES, 1980).

A resina da casca é utilizada na medicina popular para o tratamento de erisipelas e o chá das folhas é indicado em cólicas, dispepsia e processos inflamatórios (SCHULTES, 1971; BERGER, 1992). Estudos *in vitro* confirmaram a atividade antiparasitária dos óleos essenciais extraídos de *V. surinamensis*, tendo sido o nerolidol o principal constituinte ativo

na inibição do crescimento parasitário. Sua atividade foi atribuída à inibição de síntese de glicoproteínas na fase trofozoita do *P. falciparum* (LOPES *et al.*, 1999).

Dentre os constituintes de *Virola surinamensis* foram descritos arilpropanoides, neolignanas, lignanas, sesquilignóis, lignoides diméricos, flavonóides, diarilpropanos, γ - butirolactonas, policetídeos, alcalóides, estilbenóides, e derivados do ácido benzóico (LOPES, 1997). Desses destacam-se as lignanas e neolignanas por suas atividades antiparasitárias (ROMOFF; YOSHIDA, 1997), antifúngica (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; PAGNOCCA *et al.*, 1996; LEMUS; CASTRO, 1989).

A atividade gastroprotetora descrita para a seiva de *V. surinamensis* foi atribuída à presença de flavonóides (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009). A estrutura básica das antocianidinas é o cátion *flavilium*, a partir do qual se tem as seis antocianidinas mais comuns: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (GREENWAY, 1991; DEY; HARBORNE, 1989). As antocianidinas são glicosídeos que possuem açúcar na posição três do anel intermediário e participam do processo de formação de prostaglandina endoperóxidos, como prostaciclina instáveis, que inibem a agregação de plaquetas no processo de prevenção do estágio inicial da trombose.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as ações farmacológicas do extrato Aquoso padronizado das folhas da *Virola surinamensis* e analisar os mecanismos do efeito hipotensor e da contração do músculo esquelético.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronização do extrato aquoso através do perfil cromatográfico dos extratos em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Análise quantitativa dos efeitos na pressão arterial;
- Determinação das ações no acoplamento excitação-contração na musculatura esquelética;
- Determinação das ações na atividade da Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho.

3. Revisão bibliográfica

3.1 A Família Myristicaceae

Myristicaceae é uma família de árvores de tamanho médio e grande porte, angiospermas, largamente confinado aos habitat de terra firme e floresta de várzea. Cerca de 500 espécies em 21 gêneros são endêmicas em uma das quatro áreas a seguir: América do Sul e Central (seis gêneros), África Continental (cinco gêneros), Madagascar (quatro gêneros) e Sudeste Asiático para o Pacífico Ocidental (seis gêneros) (SAUQUET *et al.*, 2003).

Família de distribuição considerável em algumas regiões constitui-se num dos mais importantes elementos da flora regional. Particularmente a Bacia Amazônica é o centro de distribuição da família no continente sul-americano, onde certas espécies são muito comuns. (BELOTA, 1994).

Caracterizada principalmente, por apresentar quase que exclusivamente árvores medianas, arvoretas e árvores de dossel, raramente arbustos, a família Myristicaceae pode ser reconhecida, quando em estado vegetativo, por algumas características peculiares, como: tronco com entrenós bem definidos; casca do tronco, quando cortada ou ferida, exsudando seiva avermelhada em geral abundante e translúcida que em contato com o ar se oxida, passando a vermelho (exceto em *Osteophloeum* Warb.); folhas coriáceas, inteiras e sem estípulas; pecíolo profundamente canaliculado; filotaxia alterna, dística (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Myristicaceae são consideradas florais e uniformes (SMITH; WODEHOUSE, 1937; SINCLAIR, 1958, 1961, 1968, 1974, 1975). As flores de Myristicaceae são relativamente pequenas e sempre unissexuais, com um único ciclo perianto de três pétalas (em média) que são fundidos em diferentes graus. Todas as flores femininas são unicarpelar e uniovulate e

toda a família. As flores masculinas são as mais diversas entre as famílias (KÜHN; KUBITZKI, 1993).

Muitas espécies do gênero *Virola* são de grande importância ecológica e econômica sendo usados em larga escala na fabricação de caixas, móveis, tanoaria, compensados e laminados (LOUREIRO *et al.*, 1989). E, como consequência do processo industrial, permite o uso dos resíduos de produção na confecção de papel tipo Kraft de boa qualidade, além de ser uma boa madeira para o aproveitamento racional, como fonte de celulose e papel.

Destaca-se na família o gênero *Virola*, cuja espécie arbórea é abundante na floresta Amazônica (ROMOFF; YOSHIDA, 1997).

Várias espécies de Myristicaceae são utilizadas para fins medicinais na forma de chá, emplastos, gorduras, óleos, decocções e cataplasmas de diferentes partes da planta (GOTTLIEB, 1978). Atividades alucinogênicas, antimicrobianas e anti-reumáticas foram atribuídas a várias espécies de Myristicaceae (AGURREL *et al.*, 1969; SCHULTES; SWAIN, 1976). A resina de várias espécies de *Virola* é utilizada para obtenção do rapé alucinogênico (epená) utilizado em cerimônias religiosas pelos índios Waiká e como veneno de lanças para a caça. Os alcalóides triptamina e β -carbolina foram identificados como constituintes ativos (SCHULTES; HOLMSTED, 1971).

3.2 *Virola surinamensis*

A *Virola surinamensis*, conhecida popularmente como “ucuúba”, “ucuúba-branca”, “ucuúba de igapó”, “sucuba”, é uma árvore que cresce em terra firme, várzeas e nas margens dos rios na floresta amazônica (RODRIGUES, 1980). A resina da casca é utilizada na medicina popular para o tratamento de erisipelas e o chá das folhas é indicado em cólicas, dispepsia e processos inflamatórios (SCHULTES; HOLMSTED, 1971; BERGER, 1992). Os índios Waiãpi do Amapá utilizam as folhas de *V. surinamensis*, por inalação de seus vapores, para o tratamento da malária (LOPES *et al.*, 1999). Estudos *in vitro* confirmaram a atividade antiparasitária dos óleos essenciais extraídos de *V. surinamensis*, tendo sido o nerolidol o principal constituinte ativo na inibição do crescimento parasitário. Sua atividade foi atribuída à inibição de síntese de glicoproteínas na fase trofozoita do *P. falciparum* (LOPES *et al.*, 1999).

Destacam-se entre as diversas classes de compostos que ocorrem na *Virola surinamensis* as lignanas e neolignanas, devido à diversidade de atividades biológicas mostradas (ROMOFF; YOSHIDA, 1997).

Dentre os constituintes de *Virola surinamensis* foram descritos arilpropanóides, neolignanas, lignanas, sesquilignóides, lignóides divéricos, flavonóides, diarilpropanos, γ -butirolactonas, policetídeos, alcalóides, estilbenóides, e derivados do ácido benzóico (LOPES, 1997). Desses destacam-se as lignanas e neolignanas por suas atividades antiparasitárias (ROMOFF; YOSHIDA, 1997), antifúngica (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; PAGNOCCA *et al.*, 1996; LEMUS; CASTRO, 1989).

As neolignanas virolina e surinamensina isoladas das folhas da planta protegeram contra a penetração de cercarias de *Schistosoma mansoni* em pele de camundongos (BARATA *et al.*, 1978). As lignanas veraguensina e grandisina isoladas dos galhos foram

ativas contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (LOPES *et al.*, 1998). Surinamensina e outras neolignanas isoladas de *V. surinamensis* e *V. pavonis* apresentaram também atividade anti-leishmania (BARATA *et al.*, 2000).

A atividade leishmanicida nas espécies *V. oleifera*, *V. surinamensis*, *V. donovani* e *V. pavonis* foi atribuída à presença de neolignanas (FERNANDES *et al.*, 1994) como a surinamensina (PINTO *et al.*, 1998; BARATA *et al.*, 2000). A propriedade antioxidante foi confirmada para *V. carinata* e *V. sebifera*, mas não foi detectada em *V. elongata* (DAVINO *et al.*, 1996). Constam ainda relatos das atividades antitumoral, tripanossomida, cercaricida e moluscocida de *V. surinamensis* (LOPES *et al.*, 1996, e 1998), alucinogênica de *V. duckei* (BENNETT; ALARCON, 1994), inseticida de *V. calophylla* (MILES *et al.*, 1987) e anti-hemorrágica de *V. koschnyi* (CASTRO *et al.*, 1999).

A atividade gastroprotetora descrita para a seiva de *V. surinamensis* foi atribuída à presença de flavonóides (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009). A estrutura básica das antocianidinas é o cátion *flavilium*, a partir do qual se tem as seis antocianidinas mais comuns: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (GREENWAY, 1991; DEY; HARBORNE, 1989). As antocianidinas são glicosídeos que possuem açúcar na posição três do anel intermediário e participam do processo de formação de prostaglandina endoperóxidos, como prostaciclina instáveis, que inibem a agregação de plaquetas no processo de prevenção do estágio inicial da trombose.

As lignanas tetrahidrofurânicas isoladas de madeiras e folhas adultas apresentaram atividade tripanocida contra várias formas tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (LOPES *et al.*, 1996, 1998). Recentemente, o processo de obtenção e uso das lignanas de *V. surinamensis* contra a doença de Chagas foi patentado (Br, o INPI 9.903.472-7).

Grandisina presente em neolignana em várias espécies de plantas do Norte e Nordeste do Brasil é usado na medicina popular para o tratamento de uma variedade de transtornos, especialmente cólica, inflamação, artrite, transtornos hepáticos e dispepsia (AYRES; LOIKE, 1990).

Neolignanas são dímeros oxidativo de alil-fenol e propenil-fenol entre si ou cruzado, e fazem parte da composição da parede celular da planta. Estes compostos são predominantemente encontrados em árvores e arbustos e se acumulam na madeira em resposta a danos mecânicos ou ataque de microrganismos (SIMÕES *et al.*, 2004), e assim como lignanas, estes compostos desempenham um papel importante na defesa da planta, agindo como agentes antimicrobianos, antifúngicos e inseticidas (DEWICK, 2002).

Diferentes atividades farmacológicas da Grandisina foram demonstradas *in vivo* ou em modelos *in vitro*, tais como atividades antiviral, antireumáticos, antineoplásicos e antipsoriático (LOPES *et al.*, 1998) Grandisina bem como outras lignanas e neolignanas extraídos de plantas têm um efeito analgésico e antiinflamatório (CARVALHO *et al.*, 2009).

3.3 Pressão Arterial

Para que a troca de materiais ao nível dos capilares entre o sangue e as células do organismo se faça de forma eficiente, é essencial, particularmente, em tecidos com o metabolismo muito sensível, como no sistema nervoso central, que o aporte de oxigênio pelo sangue arterial seja constante e não intermitente (DAVIES, 1995).

A resistência que faz com que o ventrículo ao esvaziar o seu conteúdo nas artérias encontre maior facilidade em distendê-las do que em drenar, instantaneamente, todo o sangue pelas arteríolas. O volume de sangue armazenado durante o esvaziamento (sístole) será enviado à periferia no período em que o ventrículo estiver no processo de enchimento (diástole). Portanto, o sistema arterial funciona como uma câmara elástica de alta pressão que amortece as flutuações de descarga da bomba cardíaca, assegurando um fluxo permanente ao nível dos capilares (DAVIES, 1995).

Durante a sístole ventricular, a pressão se eleva até atingir um máximo, chamada, também, de pressão sistólica. Depois, à medida que o sangue acumulado vai sendo transferida para os capilares, a pressão nas artérias vai caindo, lentamente, até atingir um valor mínimo (pressão diastólica), imediatamente antes de iniciar-se o ciclo seguinte. Graças à combinação entre a descarga intermitente da bomba cardíaca e à alta resistência das arteríolas, acoplada à elasticidade das artérias, o organismo consegue manter um aporte constante de sangue para irrigar os tecidos. O custo desse processo é que as artérias são, permanentemente, submetidas a uma elevada pressão pulsátil: cerca de 120 milímetros de mercúrio de pressão máxima, ou sistólica, e cerca de 80 milímetros de mercúrio de pressão mínima ou diastólica (FRANCHINI; KRIEGER, 1994).

A resistência das arteríolas, que já é elevada, aumentar mais ainda, deve haver uma elevação adicional de pressão no sistema arterial para assegurar um fluxo inalterado nos capilares. Elevando-se a pressão mínima no sistema (acima de 90 milímetros de mercúrio), o coração é obrigado a aumentar também a pressão de descarga (a máxima tende a ficar acima de 130-140 milímetros de mercúrio). Como a resistência das arteríolas depende basicamente do seu calibre, sua redução eleva a pressão arterial, sendo geralmente responsável pela hipertensão. (FURCHGOT; ZAWADSKI, 1981).

A diminuição do calibre acontece pelo aumento da contração da musculatura que regula a luz do vaso, pelo espessamento dessa musculatura que passa a ocupar parte da luz, ou pela combinação dos dois fatores. A hipertensão, portanto, pode ser causada pelo desequilíbrio entre a produção aumentada de fatores vasoconstritores (os nervos simpáticos e as catecolaminas, a angiotensina, a endotelina e etc.) e ou pela produção deficiente de fatores vasodilatadores (óxido nítrico, bradicinina, etc.), com o conseqüente aumento do grau de contração da musculatura das arteríolas (FURCHGOT; ZAWADSKI, 1981).

Mas fatores anatômicos, estruturais, também podem reduzir o calibre vascular de forma permanente. Até mesmo os fatores vasoconstritores, que ativamente contraem o vaso, exercem um efeito trófico, estimulando o espessamento da camada muscular (hipertrofia muscular). Esquemáticamente, a resistência elevada, que acarreta hipertensão em um determinado indivíduo, pode resultar do aumento da produção de fatores vasoconstritores e ou da diminuição de fatores vasodilatadores, ou, ainda, da maior capacidade de reação da musculatura das arteríolas aos estímulos normais. A combinação desses fatores poderia determinar uma diminuição ativa, funcional, do calibre das arteríolas e a conseqüente hipertensão (INAGAMI *et al.*, 1995).

A parede dos vasos de resistência consiste, primariamente, de células musculares lisas, separadas da luz por uma camada de células endoteliais (INAGAMI *et al.*, 1995).

Substâncias vasoativas são produzidas pelas células endoteliais, células musculares lisas, células parenquimatosas e, também, são liberadas pelas terminações nervosas na intimidade das camadas de células musculares lisas. Além disso, os vasos são, continuamente, expostos a substâncias vasoativas circulantes (angiotensina, vasopressina, por exemplo) que podem atuar como agentes vasoativos, tanto por ação direta no músculo liso vascular como por intermediários liberados das células da estrutura vascular. Os vasos são, também continuamente, expostos a forças como pressão transmural e atrito do fluxo sanguíneo na camada endotelial. Esses múltiplos estímulos interagem para controlar a atividade contrátil das células musculares lisas vasculares e, portanto, controlar o diâmetro do vaso, controlando a resistência periférica e o fluxo sanguíneo (JULIUS, 1992).

Vasodilatação e vasoconstrição dos vasos de resistência são fundamentais para os ajustes a aumentos e diminuições da demanda metabólica dos tecidos. O simpático domina e coordena o grau de vasoconstrição nas diversas regiões da circulação sistêmica. Essa resposta neural capacita à rápida redistribuição do fluxo sanguíneo às áreas funcionalmente importantes para atividades específicas (FURCHGOT; ZAWADSKI, 1981).

O tônus adrenérgico vascular resulta da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos com consequente ativação da fosfolipase C da membrana celular e liberação de IP_3 e diacilglicerol (DAG) (ALLEN; WALSH, 1994; TOGNARINI; MOUDS, 1997). A ativação de receptores de IP_3 localizados na membrana do retículo endo/sarcoplasmático libera Ca^{2+} reticular para o citosol, enquanto que o DAG ativa quinases protéicas (proteínas quinases do tipo C, PKC) que fosforilam e ativam canais de cálcio da membrana (ALLEN; WALSH, 1994; WALSH *et al.*, 1995). Com o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, independentemente do mecanismo ativado, ocorre a contração do músculo liso vascular (WALSH *et al.*, 1995).

Essa redistribuição do fluxo sanguíneo é coordenada por uma combinação de atividade simpática gerada centralmente, e por sua modulação por receptores, localizados em posições

estratégicas do aparelho cardiovascular (sensores de tensão na parede dos grandes vasos e coração), principalmente os pressorreceptores arteriais. Além disso, a atividade tônica basal do simpático (também, modulada ciclo cardíaco-ciclo cardíaco pelos pressorreceptores) contribui de maneira importante para o tono basal dos vasos de resistência. (KAMIYA; TOGAWA, 1980).

A importância da contribuição do sistema nervoso simpático para o tônus vascular normal é aparente pela queda na pressão arterial média seguindo-se ao bloqueio farmacológico α -adrenérgico. Os vasos de resistência são ricamente inervados pelo simpático. Os axônios dos neurônios simpáticos pós-ganglionares ramificam-se em pequenos ramos formando um plexo primário, localizado na adventícia. Os feixes dão origem a fibras que formam um plexo localizado nas proximidades das células musculares lisas e exibem varicosidades onde as fibras são, parcial ou inteiramente, destituídas da camada de mielina. São nesses pontos que as fibras se aproximam da superfície da célula muscular lisa e estabelecem o contato neuromuscular (KAMIYA; TOGAWA, 1980).

A concentração de norepinefrina no espaço extracelular é difícil de ser estimada, em condição basal e durante ativação neural. Somente uma pequena fração das células musculares lisas é diretamente inervada por nervos simpáticos, o que indica que as células musculares lisas são, elétrica e mecanicamente, acopladas, transmitindo o sinal da ativação simpática entre si. A norepinefrina liberada na fenda liga-se a sítios lipoprotéicos (receptores) na membrana das células musculares lisas, onde a resposta vasoconstritora é deflagrada (MILLER; VANHOUTTE, 1988).

A norepinefrina é removida da fenda por reabsorção ativa pela terminação neural e por difusão para os capilares. Aproximadamente, 80% da norepinefrina liberada são reincorporada ao terminal e reestocada. Nos vasos, a norepinefrina liga-se, provavelmente, aos receptores α -adrenérgicos causando aumento na permeabilidade ao cálcio tanto na

membrana celular como no retículo sarcoplasmático. O aumento da quantidade de cálcio intracelular inicia a contração da célula muscular lisa. Em algumas regiões, existem nas células musculares lisas receptores β -adrenérgicos que, quando ativados, causam vasodilatação (KRIEGER, 1989).

Quando a norepinefrina é infundida em tecidos que contenham ambos, α e β receptores, o efeito nos receptores α predomina e as arteríolas se contraem. Somente quando os receptores α são bloqueados, o efeito dos receptores β predomina e a dilatação arteriolar é observada. É interessante que, quando a norepinefrina é liberada da terminação nervosa, observa-se pouco ou nenhum efeito β -adrenérgico, mesmo quando os receptores α estão bloqueados. Portanto, a norepinefrina liberada das terminações nervosas age, predominantemente, nos receptores α causando vasoconstrição. (KRIEGER; DZAU, 1991).

Um grande número de fatores capacita o sistema nervoso a influenciar o tono vascular diferencialmente nos diversos órgãos: **1)** um fator importante refere-se à densidade de inervação das arteríolas, nos diversos órgãos. A inervação das arteríolas é especialmente densa em vasos da pele, órgãos esplâncnicos, músculo esquelético, rins e tecido adiposo; **2)** a sensibilidade do músculo liso vascular à norepinefrina varia de região para região, o que é, em parte, dependente da densidade de receptores α -adrenérgicos nos vasos; **3)** há uma heterogeneidade de receptores α -adrenérgicos entre órgãos; **4)** a reabsorção de norepinefrina pela terminação nervosa difere de região para região; **5)** a estrutura e tamanho dos vasos varia de tecido para tecido e contribui para a heterogeneidade das respostas à ativação simpática (KRIEGER; DZAU, 1991).

Agentes humorais circulantes podem tanto impedir como potenciar a resposta vasoconstritora neurogênica. Por exemplo, a angiotensina II potencia os efeitos da norepinefrina, enquanto substâncias vasodilatadoras tais como, ANP atenuam a resposta vasoconstritora neurogênica. Dessa forma, a influência da atividade simpática na circulação

regional pode, também, variar dependendo dos níveis circulantes, assim como de diferenças regionais na reatividade vascular a hormônios vasoativos. (KRIEGER *et al.*, 1996)

Modelos experimentais utilizando manipulações de aferentes neurais, bem como de núcleos do sistema nervoso central, que exercem inibição tônica sobre o simpático apresentam elevações discretas da pressão arterial, não sustentáveis quando o tono simpático se normaliza. Também diferentes modalidades de estresses, somente, elevam a pressão arterial enquanto durar o estímulo. Isso indica que alterações isoladas do simpático, em animais sem outro fator predisponente à hipertensão arterial, não são capazes de produzir alterações estruturais permanentes, suficientes para a manutenção do estado de resistência periférica elevada, característica da hipertensão estabelecida (KRIEGER *et al.*, 1996).

4. MATERIAL

4.1 Material Botânico

As folhas e frutos da *Virola surinamensis* foram coletadas no Município de Manacapuru, km 60 – Comunidade Nova Esperança, Latitude: 03016'33,2" e Longitude: 60032'37.1", nos períodos de outubro de 2007; julho de 2008 e Março de 2010.

As amostras férteis foram prensadas entre folhas de jornal alternadas com placas de papelão em grades de madeira. Após a desidratação, as prensas foram retiradas e o material vegetal seco foi amarrado apenas no jornal e guardada com naftalina, em ambiente com temperatura e umidade baixas.

O material vegetal foi identificado e classificado pelo Prof. Dr. Carlos Franciscan - Curador do Herbário do Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA. A exsicata foi incorporada ao acervo do referido herbário, sob registro nº 234220.

4.2. Material Biológico

Nos ensaios farmacológicos foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) entre 200-300 g e camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) adultos, entre 30 – 40 g, machos e fêmeas oriundos do Biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA. Coelhos (1,5 a 2 kg) e porcos (20 a 30 kg) foram adquiridos de fornecedores ocasionais.

Todos os protocolos experimentais foram realizados segundo os Princípios Internacionais para a Pesquisa e o Manuseio de animais aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFESP (CEP/EPM 0760/07).

4.3 Material Químico

4.3.1 Solventes, Sais e Reagentes

Acetona P.A (Nuclear-Brasil), acetonitrila grau HPLC (Merck-Brasil), ácido clorídrico P.A (Nuclear-Brasil), ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), ácido ascórbico P.A (Vetec-Brasil), ácido fosfórico 85 % P.A (C.P.Q), ácido bórico P.A (Synth-Brasil), ácido tricloroacético P.A (Synth-Brasil), ácido sulfúrico P.A (Nuclear-Brasil), albumina (Merck-Brasil), bicarbonato de sódio P.A (C.P.Q), clorofórmio P.A (Nuclear-Brasil), cloreto de sódio P.A (Merck-Brasil), cloreto de potássio P.A (Vetec-Brasil), cloreto de magnésio P.A (Merck-Brasil), coomassie brilliant blue (Termo Scientific), etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), EDTA (Fluka-Brasil), EGTA (Chemical-USA), ficol (Sigma-Brasil), fosfato monossódico P.A (Merck-Brasil), glicose P.A (C.P.Q), hidróxido de sódio P.A (Reagen-Brasil), hidróxido de amônio P.A (ECIBRA-Brasil), HEPES (Sigma-Brasil), iodeto de potássio P.A (Sigma-Brasil), metanol P.A (Nuclear-Brasil), manitol P.A (Sigma-Brasil), molibdato de amônio (Reagen-Brasil), PIPES (Sigma-Brasil), sacarose P.A (Queel-Brasil), tris-maleato (Sigma-Brasil), trizma-base (Sigma-Brasil), trizma/HCl (Sima-Brasil).

4.3.2 Drogas

Acetilcolina (Sigma-Brasil), Adrenalina (Sigma - EUA), aprotinina (Sigma-Brasil), ATP (Sigma-Brasil), calcimicina (Sigma-Brasil), d-tubocurarína (Sigma-Brasil), diazepam (Rambaxy S.A), ionóforo A23187 (Sigma-Brasil), Noradrenalina (Sigma - EUA), ouabaína (Sigma-Brasil), pentobarbital (Sigma-Brasil), tapsigargina (Sigma-EUA), Uretana (Sigma - EUA).

4.3.3 Soluções e Reagentes

4.3.3.1 Líquido Nutritivo Tyrode: NaCl 135,0 mM; KCl 5,0 mM; MgCl₂.6H₂O 1,0 mM; NaHCO₃ 15,0 mM; NaH₂PO₄.H₂O 1,0 mM; CaCl₂.2H₂O 2,0 mM; glicose 11,0 mM.

4.3.3.2 Líquido Nutritivo LNV: NaCl 138 mM; KCl 5,7 mM; NaHCO₃ 15 mM; NaH₂PO₄ 0,4 mM; Glicose 5,5 mM; CaCl₂ 1,8 mM.

4.3.3.3 Solução Nutritiva de Krebs-Bicarbonato: NaCl 119,0 mM; KCl 4,6 mM; MgCl₂.6H₂O 1,2 mM; NaHCO₃ 15,0 mM; NaH₂PO₄.H₂O 1,2 mM; CaCl₂.2H₂O 1,5 mM; glicose 11,0 mM.

4.3.3.4 Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 8 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g, pH 7,4.

4.3.3.5 Solução tampão para lavagem: manitol 120 mM, PIPES/Trizma 5 mM, sacarose 40 mM, pH 6,7 , EDTA 1 mM.

4.3.3.6 Solução tampão de homogeneização: PIPES/Trizma 4 mM, sacarose 30 mM, pH 7,4.

4.3.3.7 Gradiente de Ficol (Ficol 400, w/v): Ficol 4 % e 12 % em Tampão PIPES/Trizma 4 mM, sacarose 30 mM

4.3.3.8 Reagente de molibdato de amônio: 4,58 g de molibdato de amônio; 23,8 mL de ácido sulfúrico para 1 L de água destilada, 15 mL dessa solução para 0,36 g de ácido ascórbico.

4.3.3.9 Tampão de reação para Ca²⁺-ATPase: Tris-maleato 50 mM, pH 7.4; MgCl₂ 8 mM; KCl 120 mM; EGTA 1 mM; ionóforo A23187 10 µM; CaCl₂ 1 Mm, ATP 5 mM.

4.3.3.10 Soluções para a extração de Ca²⁺-ATPase de músculo esquelético

Solução I: MOPS 10 mM, sacarose 10 %, EDTA 0,1 mM, pH 7,0 (1 L).

Solução II: MOPS 10 mM, KCl 0,6 mM, pH 7,0 (0,5 L).

Solução III: MOPS 10 mM, sacarose 30 %, pH 7,0 (0,5 L).

4.3.3.11 Tampão para dosagem de proteína: Tris/HCl 100 mM; pH 7,4; trizma base 12,1 g; HCl 6N 13,8; EDTA 200 mM (PM = 327,2) pH 8,0.

4.3.3.12 Reagente de Bradford: Coomassie Brilliant Blue 0,01 %; Etanol 4,7 % e Ácido Fosfórico 8,5 %.

4.3.3.13 Albumina (Bovine Serum Albumine): BSA 100 µg/mL

4.4. Material Fitoquímico

4.4.1. Obtenção do Extrato Aquoso

As folhas de *V. surinamensis* (Rol.) Warb. foram coletadas, lavadas em água corrente, secas à sombra em temperatura ambiente e depois moídas em fragmentos ± 1 mm e armazenadas em sacos plásticos, ao abrigo da luz. O extrato aquoso foi obtido por infusão do pó das folhas a 2,5 % com água destilada a 75 °C durante 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos.

O extrato foi filtrado e concentrado em rota evaporador (RE47 –Yamato) à 50 °C e liofilizado (Modelo Modulayo – ThermoFischer).

4.4.2. Obtenção da Fração Aquosa e Butanólica

Para a obtenção da fração butanólica, 6 g do EA foram dissolvidos em 500 mL de água destilada e particionados em funil de separação com porções de 500 mL de butanol, por 3 vezes. Desse processo, foram obtidas as frações butanólica – Fbut e aquosa - FA, que foram concentradas e liofilizadas nas mesmas condições que o EA. As frações secas (aquosa e butanólica) foram submetidas aos ensaios laboratoriais visando determinar os possíveis efeitos farmacológicos e os mecanismos de ação desses efeitos.

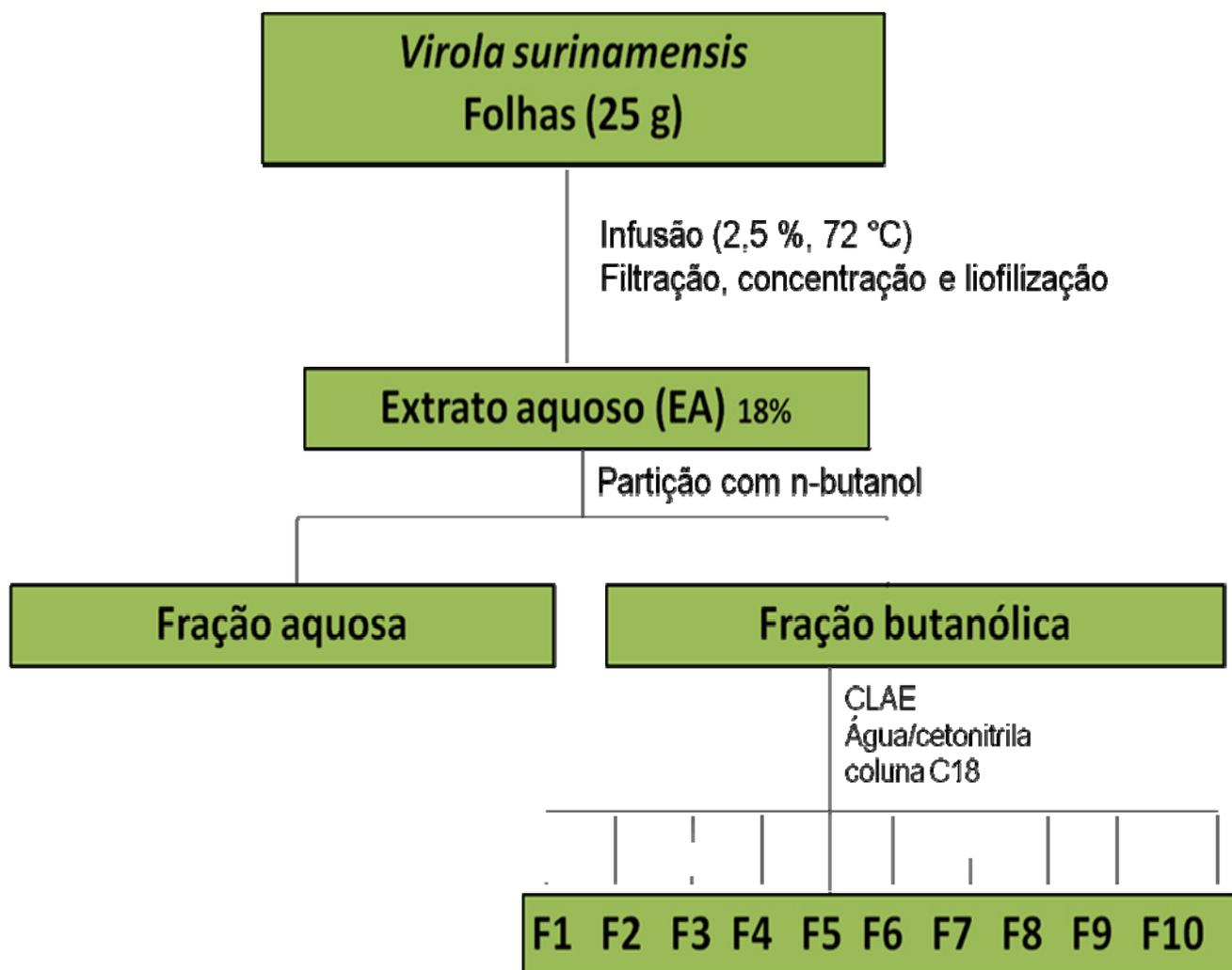


Figura 1. Esquema da extração, fracionamento e purificação das folhas de *Virola surinamensis* (Rol.) Warb.

4.4.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Utilizaram-se placas de alumínio recobertas com sílica F₂₅₄ (Merck). A fase móvel utilizada foi butanol: ácido acético: água (BAW) na proporção de 4 : 1 : 2.

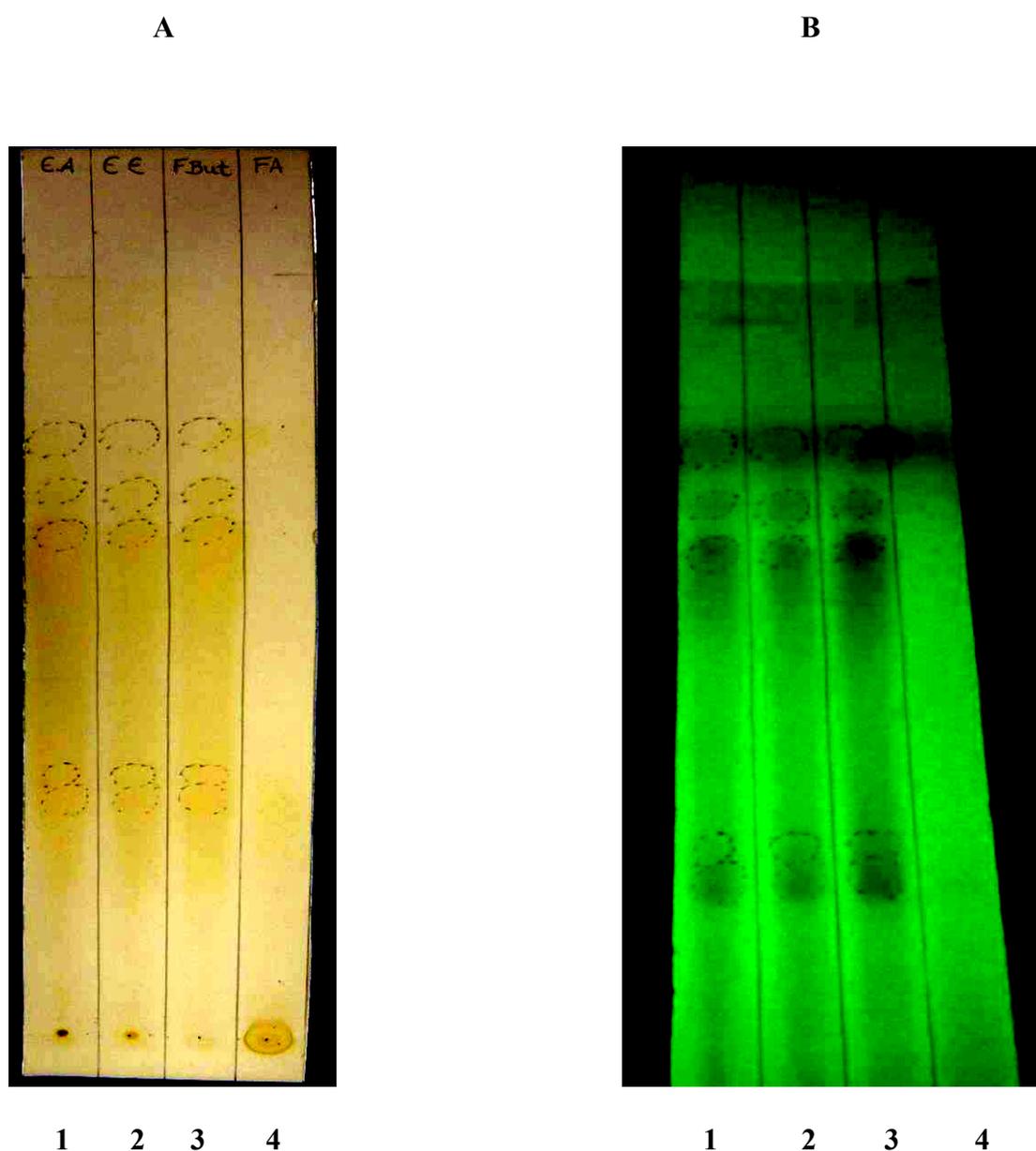


Figura 2. Cromatografia em Camada Delgada do **1: Extrato aquoso, 2: Extrato etanolico, 3: Fração butanólica, 4: Fração aquosa** de *Virola surinamensis*, utilizando BAW (4 : 1 : 2) como fase móvel. Revelação em Iodo (A) e UV 330nm (B).

4.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (CLAE-prep)

A fração butanólica foi purificada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (Shimadzu – Japão) composto por 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 fase móvel consistiu em gradiente linear de água/acetonitrila de 15 a 50% em 30 min, em coluna Shimpack Prep-ODS (25 x 2 cm), empacotada com partículas esféricas de 5 µm, em fluxo constante de 10 mL/min.

Um grama (1g) da fração butanólica liofilizada foi dissolvida em água de alto grau de pureza (Milli-Q System, USA) e injetada no cromatógrafo em alíquotas de 1 mL, coletando-se 10 frações, referentes aos picos majoritários maiores que 1% da área total do cromatograma. Todas as frações coletadas foram enviadas para identificação química por RNM.

4.4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica

A fração butanólica de *V. surinamensis* foi analisada 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 50% em 30 min, em coluna analítica C18 (Phenomenex – USA), empacotada com partículas esféricas de 5 µm e fluxo constante de 1,0 mL/min. As amostras foram dissolvidas em água/ACN 10%, filtradas

em filtro de 0,22 μm (Millipore – USA) e injetadas no cromatógrafo em alíquotas de 20 μL . A Fbut de *V. surinamensis* apresentou 10 picos majoritários com tempos de retenção de 2,6; 3,8; 5,5; 7,0; 8,2; 9,9; 14,9; 16,3; 17,3 e 18,6, com concentrações representando 2,2; 2,0 3,0; 2,6; 4,9; 4,4; 8,3; 4,8; 4,8 e 2,0%, do total do cromatograma, respectivamente.

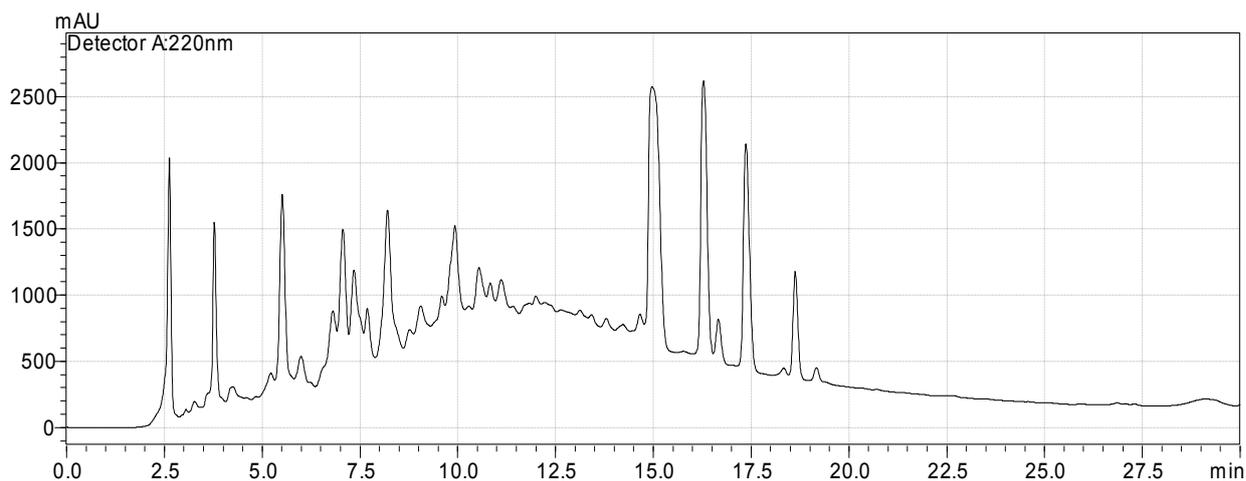


Figura 3. Perfil cromatográfico da fração butanólica de *Virola surinamensis* por CLAE analítico, utilizando-se coluna analítica C18, gradiente linear de água/acetonitrila 15 a 50% em 30 min, fluxo de 1,0 mL/min e detector espectrofotométrico UV – Vis operando a 220 nm.

5. MÉTODOS

5.1 Métodos Farmacológicos para avaliação da atividade dos extratos da *Virola surinamensis*.

Para o estudo da atividade farmacológica geral foram utilizados camundongos e ratos adultos, machos e fêmeas. Os animais ficaram em sala a 23 °C, recebendo água e ração *ad libitum*, exceto na vigência dos experimentos. Todos os testes foram realizados seguindo os métodos e padronização descritos no livro “Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais” (LAPA *et al.*, 2003), com as devidas adaptações.

5.1.1 Teste geral da atividade farmacológica (Teste de Irwin ou Hipocrático)

O teste de observação geral ou Teste Hipocrático consiste no preenchimento de uma tabela de acordo com a resposta comportamental aos estímulos provocados no animal sendo observado: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, lacrimejamento, secreção brônquica, convulsões, e morte, entre outros sinais de menor incidência.

Os testes gerais foram realizados com camundongos machos adultos, n=8/grupo. Os animais foram tratados com extrato Aquoso (EA) e fração butanólica (Fbut) das folhas da *Virola surinamensis*. (1,0 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg, v.o.) e o diazepam (1,5 mg/kg, v.o.) foi usado como padrão positivo. Os animais foram colocados em caixas-moradia e utilizando manobras padronizadas, foram observados em intervalos de tempos de 30 min a 24 h após os tratamentos. Entre os intervalos, os animais foram submetidos a testes de avaliação da atividade exploratória no campo aberto, desempenho motor do rota-rod e na resposta a estímulos nociceptivas. O resultado das observações foi

condensado em tabela de efeitos adaptada pelo grupo de estudos a partir da original publicada por IRWIN (1968).

5.2. Atividades Específicas no Sistema Nervoso Central

5.2.1 Avaliação da ação tipo-ansiolítica do EA no labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste de dois braços (30 x 5 x 25 cm) de acrílico transparentes com fundo preto e dois fechados com paredes verticais de mesma medida, opostos em forma de cruz grega. Os braços são conectados por uma placa central (5 x 5 cm) e o sistema é mantido a 45 cm do chão.

Os testes foram realizados com camundongos machos adultos, n=8/grupo, após 1 h do tratado com EA (0,1 e 0,3 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg, v.o.) e o diazepam (1,5 mg/kg, v.o.) foi usado como controle positivo.

Os animais foram colocados na plataforma central com a cabeça voltada para um dos lados fechados e o comportamento observado durante cinco minutos, medindo-se a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados. Foram também registrados comportamentos etológicos como o número de imersões de cabeça e levantares apoiado nas patas posteriores, que avaliam a atividade exploratória, e os estiramentos, que avaliam o grau de ansiedade.

5.2.2 Avaliação da atividade do EA na temperatura corporal de camundongos

O estudo da temperatura retal tem por objetivo avaliar o efeito de uma substância natural ou sintética sobre a temperatura corporal (hipotermia ou hipertermia), que pode ser indicativo de alterações em mecanismos de homeostasia controlados pelo SNC.

Os testes foram realizados com camundongos machos adultos n=8/grupo, tratados com EA (0,1 e 0,3 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg, v.o.) e o diazepam (1,5 mg/kg v.o.) foi usado como controle positivo. A temperatura retal dos animais foi medida com termômetro digital, antes e após os tratamentos.

5.2.3 Avaliação da ação tipo-antidepressiva do EA e Fbut no teste de suspensão pela cauda

O estudo da suspensão pela cauda tem por objetivo avaliar os efeitos na latência para a imobilidade e no tempo total de imobilidade apresentado pelos animais. Antidepressivos clássicos aumentam o tempo de latência e reduzem o tempo de imobilidade.

Os testes foram realizados com camundongos machos, n=8/grupo. Os animais foram pré-tratados com EA e Fbut (0,1, 0,3 e 1 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg v.o.) e a imipramina (15 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo.

O procedimento experimental consistiu em suspender os animais pela cauda, por um período de 6 minutos, registrando-se o tempo de imobilidade e a latência para seu aparecimento.

5.2.4 Avaliação da ação tipo-hipnosedativo do EA no sono sob anestesia com éter etílico

Os testes foram realizados com camundongos machos adultos, n=8/grupo. Os animais foram pré-tratados com EA (0,1 e 0,3 g/kg, v.o.); o grupo controle recebeu veículo (H₂O, 5 mL/kg, v.o.) e o diazepam (1,5 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo.

Sessenta minutos após os tratamentos os animais foram colocados em uma câmara de vidro transparente (30 cm x 20 cm de diâmetro) hermeticamente fechada saturada com 5 mL de éter etílico e foram registrados os tempos de indução do sono (latência) para a perda do reflexo postural e para recuperação do reflexo (duração do sono).

5.3 Avaliação da ação cardiovascular dos extratos da *Virola surinamensis*.

5.3.1 Registro da pressão arterial de ratos anestesiados

Ratos normotensos machos e fêmeas foram anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Em seguida foram fixados em decúbito dorsal, canulando-se a veia íliaca para injeção de drogas e do extrato em doses estabelecidas. A artéria carótida foi utilizada para registrar a pressão arterial. As variações pressóricas foram registradas por um transdutor de pressão conectado ao aparelho Power Lab da AD Instruments que transmite os dados registrados para um computador.

O extrato aquoso e a fração butanólica convenientemente diluídos em salina a 0,9 % foram injetados e.v. em doses variando de (1 a 30 mg/kg e.v.). Como o extrato produziu respostas hipotensoras, os animais foram tratados com atropina (1,0 mg/kg, e.v.) antes que uma nova dose do extrato fosse injetada.

Em todos os animais a atividade vascular foi testada com adrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg e.v}$) e noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg e.v}$) injetadas antes e após o extrato.

5.3.2 Registro da pressão arterial de ratos não anestesiados – registro indireto

O registro da pressão arterial sistólica (PA) em ratos não anestesiados permite o acompanhamento do efeito dos tratamentos por períodos prolongados, semana ou meses, bem como a observação da reversibilidade dos efeitos.

A PA dos animais foi monitorada pelo método indireto não invasivo na cauda do rato. Para tanto, um manguito e um cristal piezoelétrico foram adaptados a cauda do animal e os ruídos de korotkoff, produzido pelo turbilhamento do sangue foram captados como vibração pelo cristal piezoelétrico. Estes sinais foram transformados em pulsos elétricos e, após ampliação, foram registrados no aparelho (LE 5002 storage pressure meter). Para melhorar as condições de registro, ante da medida da PA, os animais permaneceram por 5-8 minutos, a 45 ° C. Durante o período inicial de adaptação dos animais as condições de registro (2 a 4 semanas), bem como os períodos de tratamento, a pressão arterial dos animais foi monitorada duas vezes por semana.

Após o período de adaptação, durante o qual todos os animais receberam água (5 mL/kg/dia, v.o), os animais foram separados em dois grupos sendo grupo controle (H_2O , 5 mL/kg/dia, v.o.) e tratado (Fbut 75, 150 e 300 mg/kg/dia v.o). Durante todo o período experimental os animais foram tratados uma vez por dia, sendo que nos dias de registro da PA, administração dos tratamentos foi feita após o procedimento experimental. Após 20 dias de tratamento foi feito o crossover dos grupos, sendo que os animais do grupo tratado com Fbut passaram a ser tratados com água e o grupo tratado com água passou a ser tratado com (Fbut 150 mg/kg/dia v.o). Após 40 dias de tratamento ambos os grupos passaram a ser

tratados com água (período WASHOUT) e depois de estabilizada a pressão arterial, o grupo tratado com Fbut foi novamente tratado com a dose (Fbut 300 mg/kg/dia v.o). Após 100 dias de tratamento foi feito um novo crossover entre os grupos sendo tratado com água e controle com (Fbut 75 mg/kg/dia).

5.3.3 Registro direto da pressão arterial em ratos não anestesiados – Registro direto

Permite o registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca sem o comprometimento das funções do sistema nervoso central pelo anestésico. O animal mantém a deambulação e a reatividade aos estímulos ambientais.

Os ratos são anestesiados com éter e uma cânula (PE 10) implantada na artéria femoral. Após a fixação, a cânula é levada por via subcutânea até a região cervical onde é exteriorizada e fixada em posição inacessível para o rato. Após o procedimento completo os cortes cutâneos são fechados e os animais são recuperados da anestesia, e o registro da PA é iniciado 24 horas depois. Após a recuperação os animais são conectados a um transdutor de pressão conectado ao aparelho Power Lab da AD Instruments que transmite os dados registrados para um computador. A pressão arterial basal é registrada inicialmente durante 30 minutos todos os dias até o final do experimento. Após os 30 minutos os animais são tratados com Fbut (150 e 300 mg/kg v.o). O efeito do tratamento é registrado por 5 minutos, a cada 30 minutos, durante 3,5 horas.

5.3.4 Avaliação da ação da Fbut em anéis de aorta torácica de rato, com ou sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M).

Para avaliar a ação da fração butanólica na musculatura lisa vascular, ratos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Após exsanguinamento, a aorta torácica foi removida e transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-bicarbonato para dissecação.

Anéis de aorta torácica de aproximadamente 2 mm de comprimento foram posicionados sob tensão de 2 g em cuba para órgão isolado com capacidade para 3 mL, contendo solução nutritiva de Krebs a 36 °C aerada com carbogênio (O_2 95 % CO_2 5 %), pH 7,4. A destruição do endotélio vascular, quando necessária, foi realizada mecanicamente pela introdução e giro de uma haste metálica roçando intraluminalmente o endotélio. Após 30 minutos de estabilização, a presença de endotélio foi testada observando-se o relaxamento induzido pela incubação de acetilcolina (10^{-6} M) em anéis previamente contraídos por noradrenalina (10^{-7} M). O efeito de concentrações individuais da Fbut (30, 100 e 300 μ g/mL) foi testado em preparações sem endotélio, previamente contraídas por noradrenalina (10^{-7} M) durante 30 minutos.

5.3.5 Avaliação da ação da Fbut nas curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-9} a 10^{-6} M) obtidas em anéis de aorta de rato.

Ratos foram anestesiados com éter etílico e sacrificados por deslocamento cervical. Após dissecação da aorta torácica anéis de aorta foram isolados e montados em cubas de 3 mL posicionados sob tensão de 2 g, contendo solução nutritiva de Krebs a 36 °C aerada com carbogênio (O_2 95 % CO_2 5 %), pH 7,4.. Após 30 minutos de estabilização, o efeito da Fbut (10 e 30 μ g/mL) foi obtido após 10 min da incubação prévia à curva de noradrenalina (10^{-9} a 10^{-6} M).

As contrações em porcentagem da contração máxima produzida pelos agonistas nas curvas controles foram relacionadas aos logaritmos negativos das concentrações molares de cada agonista. Das curvas concentração-efeito obtidas foram determinadas a CE_{50} (concentração efetiva 50 %) e o valor do efeito máximo.

5.3.6 Avaliação da ação da Fbut no átrio de rato

Ratos foram anestesiados com éter etílico, mortos por deslocamento cervical e o coração retirado rapidamente através de toracostomia. Após remoção do pericárdio, os átrios foram isolados. O átrio direito apresentou batimentos espontâneos e foi utilizado para verificar *in vitro* a ação sobre a frequência do marcapasso. A preparação não serviu, no entanto, para evidenciar ação inotrópica porque a força de contração é dependente e inversamente proporcional à frequência cardíaca.

O átrio esquerdo, ao contrário, não mostrou atividade própria. Esta preparação foi montada em cuba com Tyrode a 35 °C aerado com carbogênio, e ligada a um transdutor de força, sob tensão inicial de 1 g. A contração muscular foi estimulada com pulsos transmuralis supramáximos com duração de 2 ms e frequência de 1 Hz. Após 30 minutos de estabilização, a tensão de estiramento para contração máxima foi ajustada. Nessas condições, a Fbut foi incubada em concentrações cumulativas crescentes em escala logarítmica (10, 30, 100 e 300 µg/mL), registrando-se os efeitos até estabilização da resposta contrátil.

5.4 Avaliação da atividade muscular dos extratos da *Virola surinamensis*

5.4.1 Preparação músculo diafragma de rato

Ratos machos e fêmeas com peso entre 250 e 300 g, foram anestesiados superficialmente com éter e sacrificados por deslocamento cervical. Após sangramento da aorta abdominal foi feita a abertura do tórax e o músculo diafragma foi transferido imediatamente para uma placa de Petri, contendo líquido nutritivo de Tyrode, para a dissecação fina e para o posicionamento das amarras nas costelas, no centro tendíneo. O músculo diafragma foi posicionado verticalmente em uma cuba de vidro com capacidade para 5 mL, contendo líquido nutritivo à 30° C aerado constantemente com uma mistura carbogênica (CO₂ 95% e O₂ 5%). Para os registros das contrações, a amarra costal foi fixada a uma haste de vidro dentro da cuba e a amarra tendínea a um transdutor de força acoplado ao PowerLab 4/25 ADInstruments.com, sob tensão inicial de 1,0 g.

As contrações por estimulação direta do diafragma foram obtidas com pulsos de 2 ms, frequência de 0,5 Hz e voltagem supramáxima (60 a 80 volts), feitas através de um eletrodo bipolar de platina imerso na cuba. Neste caso, após o período de estabilização de 30 min, foi

incubado o antagonista d-tubocurarina (10^{-5} M), bloqueador não despolarizante dos receptores nicotínico. Após a estabilização a Fbut (1, 2 e 3 mg/mL) foi incubada e as contrações obtidas comparadas às aquelas antes da incubação.

5.5 Avaliação da ação da fração butanólica (Fbut) de *Virola surinamensis* na atividade da Ca^{2+} -ATPase de músculo esquelético de coelho

5.5.1 Isolamento da Ca^{2+} -ATPase

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 homogeneizados 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).

5.5.2 Medida da atividade da Ca⁺²-ATPase

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. A leitura foi feita a 820 nm em leitor de placa Spectramax M2 (Molecular Devices). A atividade enzimática foi expressa em µmol Pi/mg proteína/min.

5.5.3 Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976). O método baseia-se na mudança de coloração vermelha do corante ácido coomassie brilliant blue G-250, presente no reagente, para a coloração azul após a sua ligação à proteína das amostras. O complexo proteína-corante tem um alto coeficiente de extinção, resultando em uma medida precisa da quantidade de proteínas das amostras.

Alíquotas em triplicata das amostras ensaiadas foram incubadas com o reagente de Bradford e as absorbâncias das amostras contendo o complexo proteína-corante foram lidas a

595 nm em espectrofotômetro UV mini-1240 (Shimadzu). As concentrações de proteínas das amostras foram determinadas por interpolação da curva padrão obtidas com albumina de soro bovino nas concentrações (1 a 8 µg/mL).

5.6 Análises Estatísticas

Os resultados relativos às concentrações efetivas (CE_{50}) foram expressos como médias geométricas e limites de confiança (LC) e os valores comparados por análise de variância (ANOVA) não paramétrica (teste de Newman-Keuls). Os resultados com distribuição normal foram expressos como médias \pm erros padrão. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$ pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Dunnett e ou Bonferroni, utilizando-se o Programa Graphpad Prism® versão 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito do extrato Aquoso (EA) e da Fração butanólica (Fbut) de *Virola surinamensis* (1,0 g/kg) no teste geral ou hipocrático (Irwin, 1968)

No teste de Irwin, os camundongos tratados com EA e a Fbut (0,1, 0,3, 1 g/kg, v.o) (n=8) não apresentaram sinais evidentes de atividade farmacológica do extrato: a motilidade e a deambulação não foram alteradas nas 3 horas iniciais ou 24 h após administração. Sinais de ataxia, incoordenação motora, inquietação, sedação, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos não foram registrados em nenhum período de observação. Também não foram observados sinais de alteração autonômica como salivação, lacrimejamento, defecação aumentada ou de consistência pastosa. Não houve diferença significativa nos resultados comparados ao controle.

Tabela 1. Resultados da triagem farmacológica no comportamento e testes específicos de atividade no sistema nervoso central com camundongos tratados com o extrato aquoso (EA) e fração butanólica (Fbut) de *V. surinamensis* (0,1, 0,3 e 1 g/kg).

Teste Hipocrático – (Irwin)	
Deambulação	Sem efeito observável
Equilíbrio	Sem efeito observável
Esteretotipias	Sem efeito observável
Estimulante	Sem efeito observável
Depressora	Sem efeito observável
Morte	Ausente
Avaliação de atividades Centrais Específicas	
Temperatura °C	Sem efeito observável
Sono Etéreo	Sem efeito observável
Ação Anticonvulsivante	Sem efeito observável
Labirinto em cruz	Diminuição da imersão total
Suspensão pela cauda	Aumento na latência para imobilidade

6.2 Efeitos do EA e da Fbut da *Virola surinamensis* na atividade cardiovascular

6.2.1 Efeitos do EA e da Fbut *Virola surinamensis* na pressão arterial de ratos anestesiados

Ratos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) apresentaram pressão arterial de $123 \pm 3,4$ (média+desvio padrão, n=3).

A injeção do EA (10 mg/kg, e.v.) produziu hipotensão de 27 mm Hg com pico em 1 minuto e reversão à pressão basal em 2,5 minutos.

A injeção da noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) produziu hipertensão proporcional à dose, variável de $10 \pm 4,3$ mm Hg; $11 \pm 2,2$ mm Hg e $20 \pm 4,3$ mm Hg, respectivamente.

A injeção prévia do EA (10 mg/kg, e.v.) 5 min antes, reduziu o efeito pressórico da noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) para 1 ± 0 , mm Hg; $2,5 \pm 1,5$ mm Hg e 5 ± 2 mm Hg (Figura 4). A frequência cardíaca não foi alterada após a administração do extrato aquoso (Figura 5)

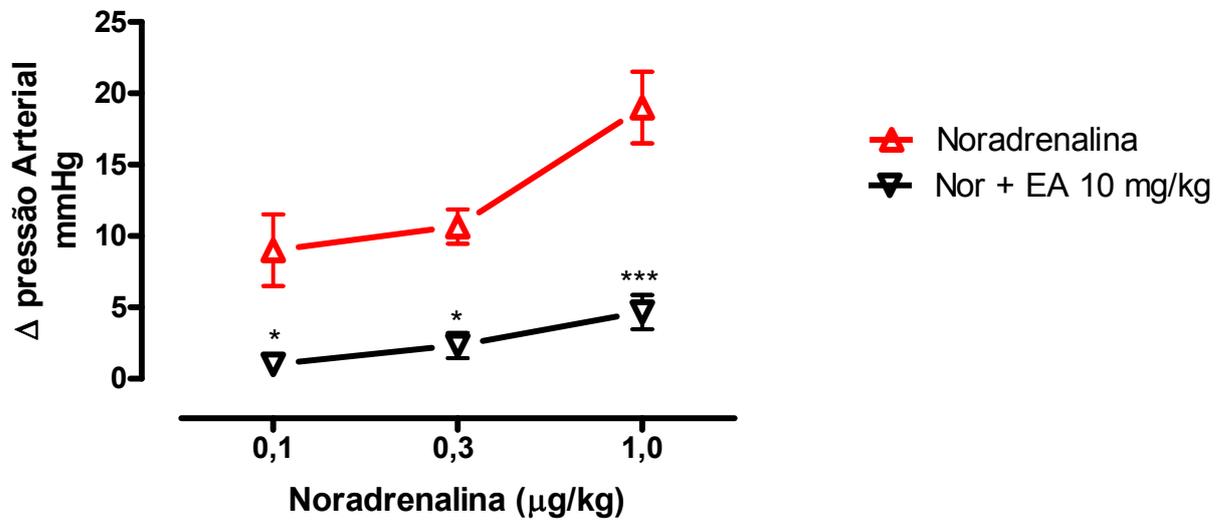


Figura 4. Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (Nor ;0,1, 0,3 e 1 μg/kg e.v.) antes e após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias ± desvio padrão (n = 3). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle.

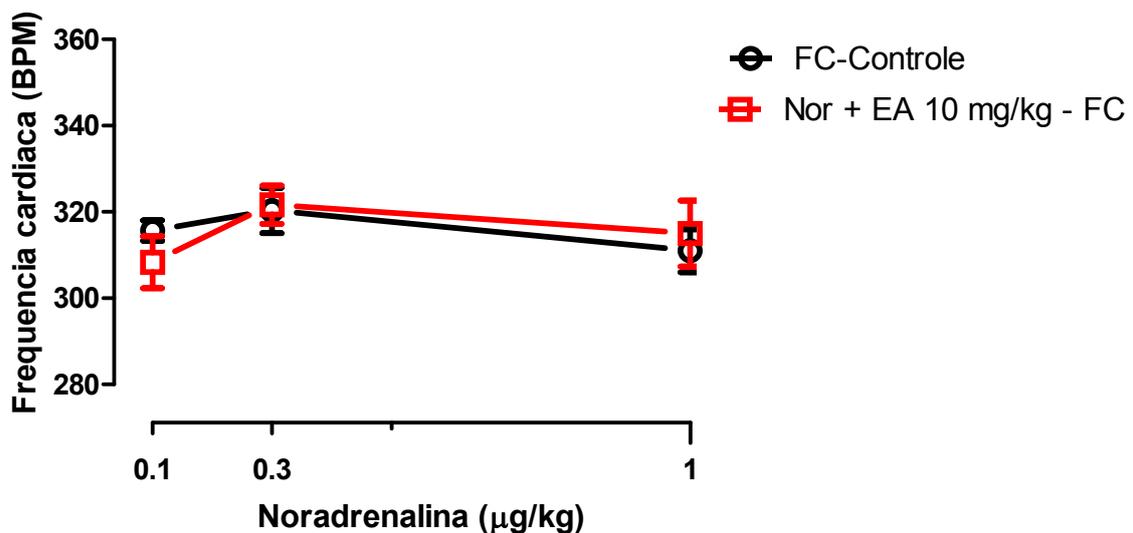


Figura 5. Efeitos da administração endovenosa de noradrenalina 0,1, 0,3 e 1 μg/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). Dados expressos como médias ± desvio padrão (n = 3)

Ratos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) apresentaram pressão arterial média de $112,5 \pm 2,5$ (n=3).

A injeção da Adrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) produziu hipertensão proporcional à dose variável de $5,5 \pm 2,1$ mm Hg; $8,1 \pm 2,2$ mm Hg e $10 \pm 0,1$ mm Hg.

Após a administração do extrato aquoso a resposta pressórica da adrenalina foi invertida nas doses de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para $-19,5 \pm 4$ m Hg; na dose de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para $-28 \pm 2,6$ mm Hg, e na dose de 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para -28 ± 3 mm Hg (Figura 6). A frequência cardíaca não foi alterada (Figura 6).

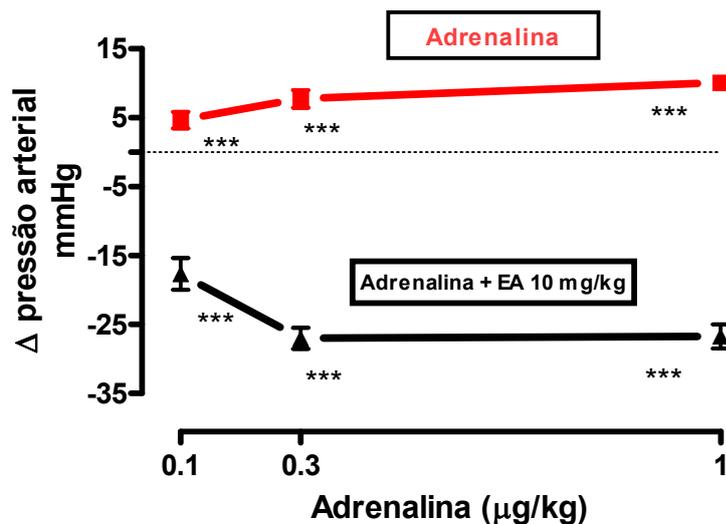


Figura 6. Variação dos Efeitos pressóricos da adrenalina (0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e.v.) antes e após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm desvio padrão (n = 3). *** $p < 0,001$, comparado ao controle.

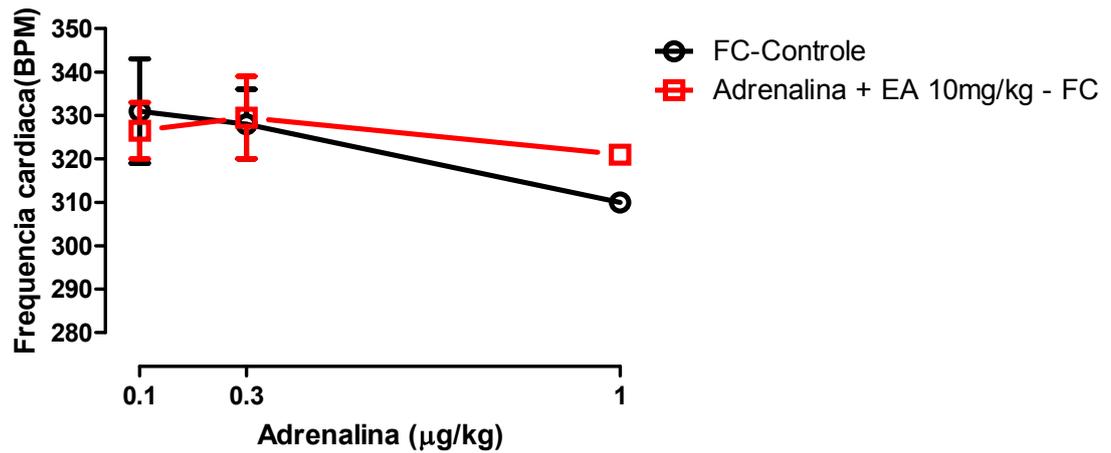


Figura 7. Efeitos da administração endovenosa de adrenalina 0,1, 0,3 e 1 µg/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração do extrato aquoso de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). Dados expressos como médias ± desvio padrão (n = 3).

Ratos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) apresentaram pressão arterial média de $123,3 \pm 1,8$ após 30 min da anestesia (n=3).

A injeção endovenosa da FBut (1, 3, e 10 mg/kg, n = 3) produziu hipotensão de -6 ± 1 ; -16 ± 1 ; e $-26 \pm 2,5$ mmHg, respectivamente, com pico de 1 minuto e reversão à pressão basal em 2,5 minutos (Figura 8). A frequência cardíaca não foi alterada (Figura 9).

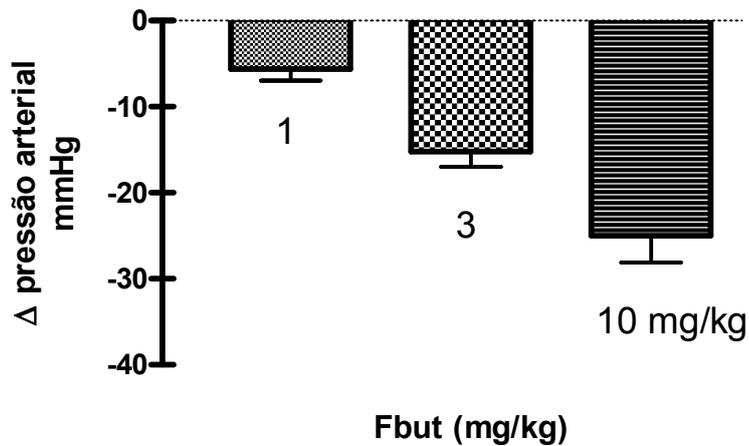


Figura 8. Efeitos pressóricos da administração endovenosa da fração butanólica de *V. surinamensis* (1, 3 e 10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5). *** $p < 0,001$.

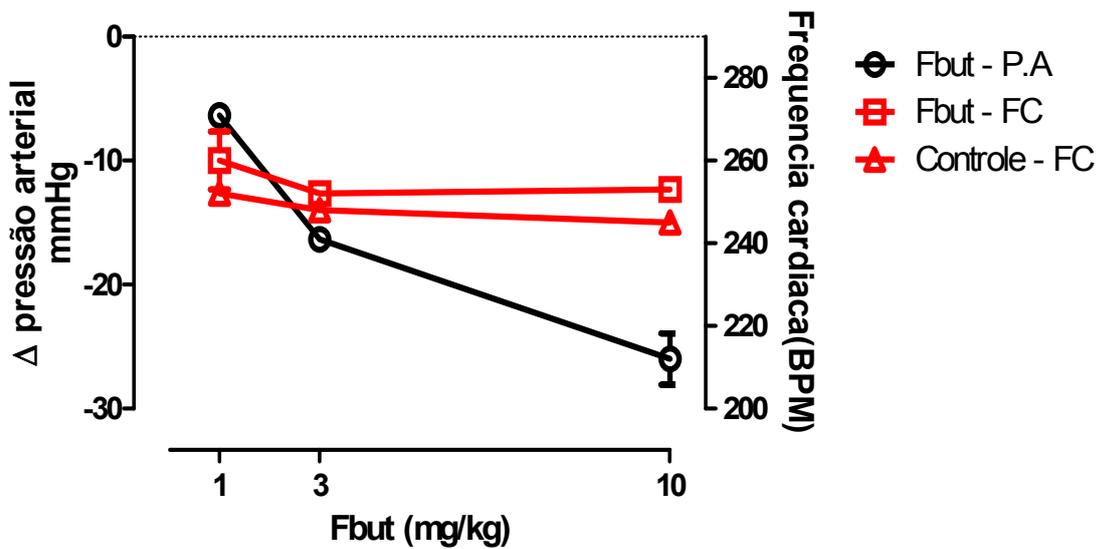


Figura 9. Efeitos da administração endovenosa de Fbut 1, 3 e 10 μ g/kg na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos anestesiados após administração da Fbut de *V. surinamensis*. Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5).

Ratos anestesiados com pentobarbital sódio (40 mg/kg i.p.) apresentaram pressão arterial média de $116,3 \pm 5,3$ após 30 min da anestesia (n=5).

A injeção endovenosa da ACh (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) produziu hipotensão de $-37,6 \pm 6,9$ mmHg. A FBut (1, 3, e 10 mg/kg) produziu hipotensão de $-12 \pm 2,5$; $-18,3 \pm 1,6$; e $-31 \pm 1,8$ mmHg, respectivamente, máxima em 1 min com reversão em 2,5 min após a maior dose (Figura 10). A frequência cardíaca não foi alterada e a hipotensão não foi bloqueada pelo tratamento prévio com atropina (1 mg/kg) (Figura 11).

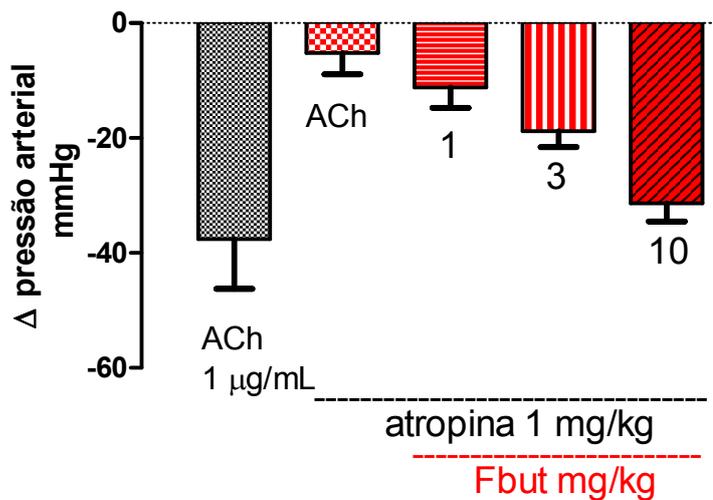


Figura 10. Efeitos pressóricos da administração endovenosa da acetilcolina (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e da fração butanólica de *V. surinamensis* (1, 3 e 10 mg/kg, v.i.) em condições controle e depois da administração de atropina (1 mg/kg) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n=5).

Ratos anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/kg i.p.) apresentaram pressão arterial média de $119,7 \pm 3,4$ após 30 min da anestesia (n=4).

A injeção da noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) produziu hipertensão proporcional à dose variável de $12,5 \pm 1,5$; $16,2 \pm 1,2$ e 24 ± 1 mm Hg, respectivamente.

Após injeção de Fbut (10 mg/kg, e.v.), as respostas pressóricas à noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) foram reduzidas para $5,3 \pm 1,6$; $7,6 \pm 1,4$ e $13 \pm 0,5$ mm Hg, respectivamente (Fig.11). A frequência cardíaca não foi alterada após a administração da fração butanólica (Fig.12).

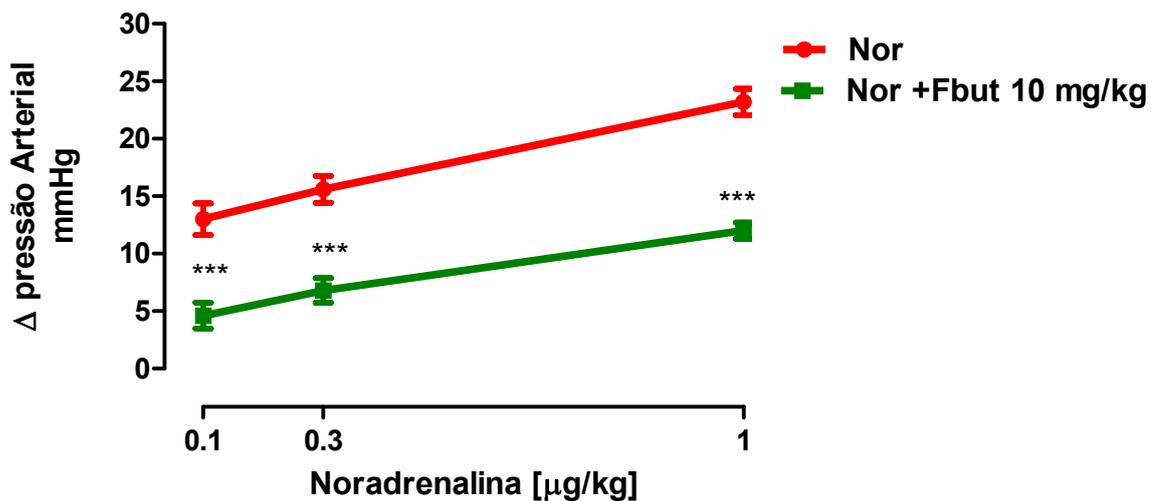


Figura 11. Efeitos pressóricos da injeção de noradrenalina (0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e.v.) antes e após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado ao controle.

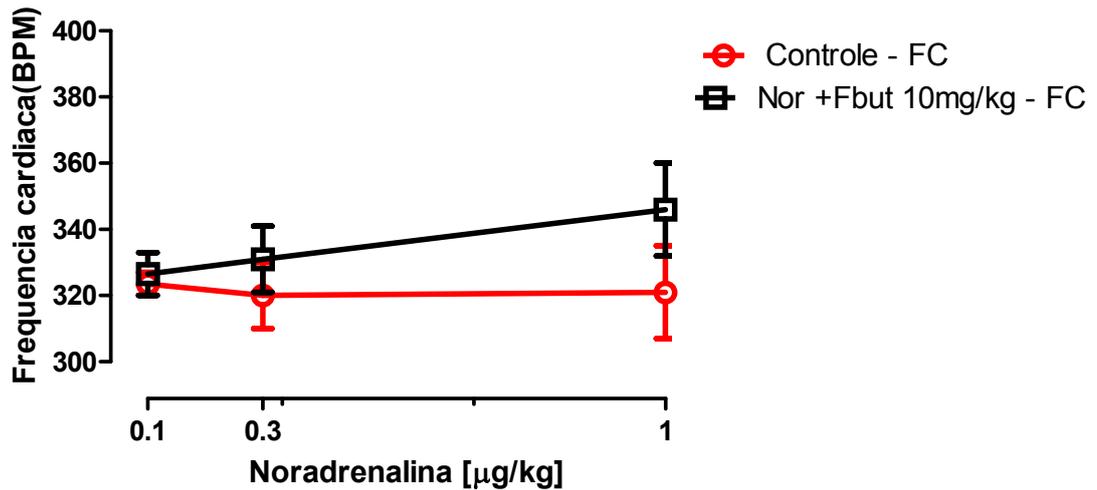


Figura 12. Efeitos da administração endovenosa de noradrenalina 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na frequência cardíaca de rato anestesiado em condições basais após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). Dados expressos como médias \pm erros padrão (n=5).

Ratos anestesiados com pentobarbital sódio (40 mg/kg i.p.) apresentaram pressão arterial média de $109,2 \pm 1,1$ após 30 min da anestesia (n=5).

A injeção de adrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) produziu hipertensão proporcional à dose variável de $11 \pm 0,3$; $15,5 \pm 0,5$ e $22,3 \pm 2,6$ mm Hg, respectivamente. Após injeção de Fbut (10 mg/kg, e.v.), as repostas pressóricas à noradrenalina (0,1, 0,3 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e.v.) foram reduzidas para $6 \pm 2,6$; $8 \pm 1,7$ e $10,3 \pm 1,7$ mm Hg, respectivamente. (Figura 13). A frequência cardíaca não foi alterada após a administração da fração butanólica (Figura 14).

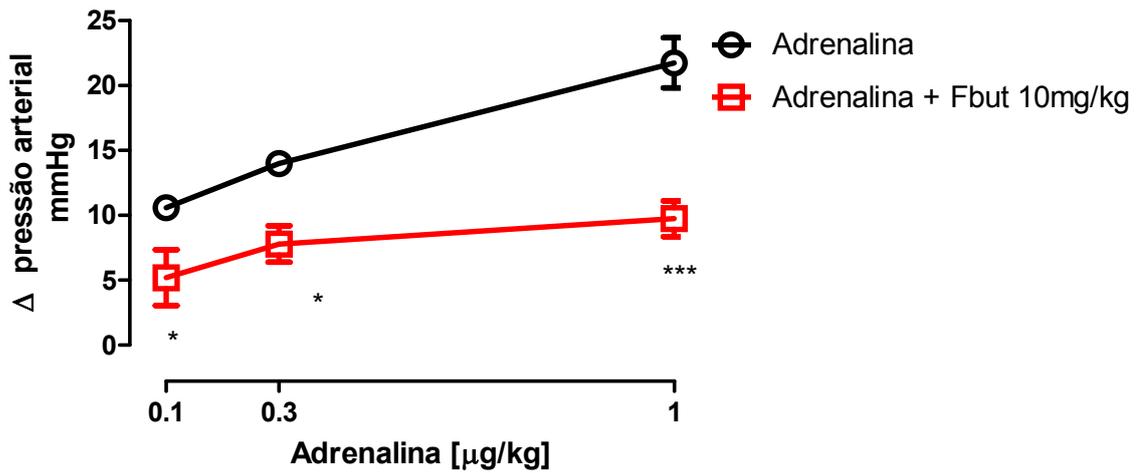


Figura 13. Efeitos pressóricos da injeção de adrenalina (0,1, 0,3 e 1 µg/kg e.v.) antes e após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg, e.v.) em ratos normotensos anestesiados com mistura de uretana (600 mg/kg, i.p.) e pentobarbital (40 mg/kg, i.p.). Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 5). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle.

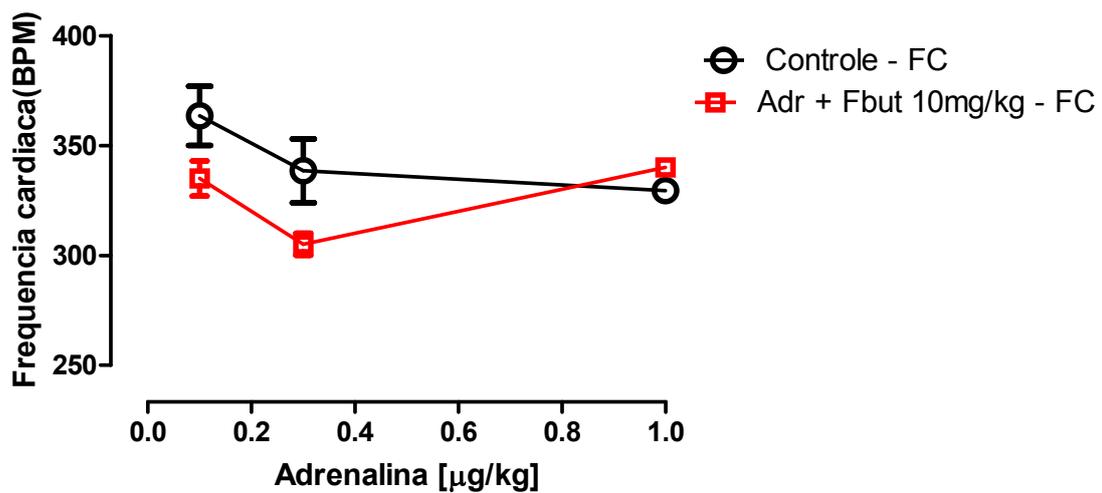


Figura 14. Efeitos da administração endovenosa de adrenalina 0,1, 0,3 e 1 µg/kg na frequência cardíaca de rato anestesiado após administração da Fbut de *V. surinamensis* (10 mg/kg e.v.). Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 5).

6.2.2 Efeito da Fbut de *V. surinamensis* na pressão arterial de ratos Não anestesiados - registro direto

Ratos normotensos apresentaram pressão arterial média de 120 ± 5 mmHg (n=5). O tratamento com a Fbut (150 mg/kg v.o.) reduziu de forma progressiva a P.A. Após 120 min; a hipotensão foi $16 \pm 3,0$ mm Hg recuperando os níveis basais após 90 min (Figura 15). O tratamento diário diminuiu 15 mm Hg da P.A basal após 7 dias (Figura 16).

Da mesma forma o tratamento com Fbut (300 mg/kg v.o.) reduziu de $25 \pm 0,5$ mm Hg a P.A femoral (n=5) após 90 min, voltando ao valor basal em 90 min (Fig. 16). O tratamento diário reduziu a P.A basal de 30 mm Hg após 7 dias (Figura 17).

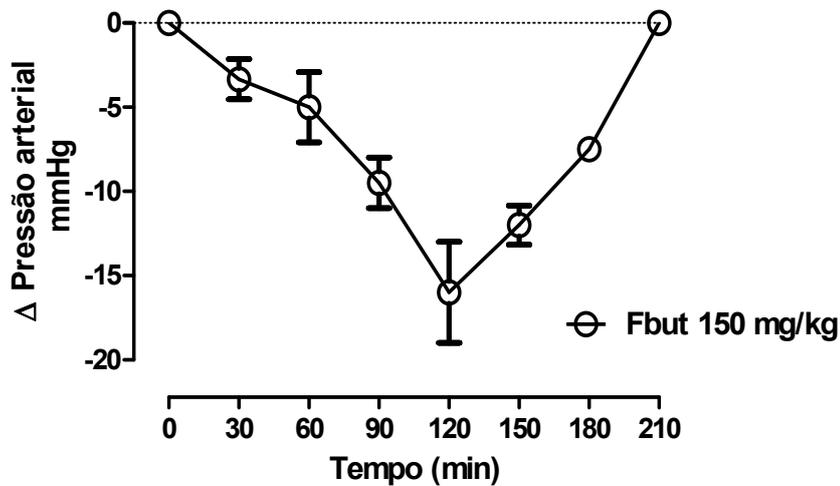


Figura 15. Efeito da administração oral da Fbut de *V. surinamensis* (150 mg/kg) na pressão arterial de ratos não anestesiados. Registro direto da P.A femoral durante 210 minutos após o tratamento. Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5).

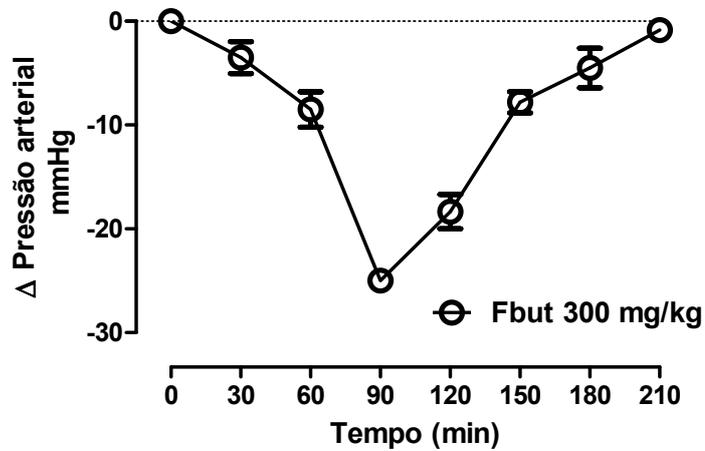


Figura 16. Efeito da administração oral da Fbut de *V. surinamensis* (300 mg/kg) na pressão arterial de ratos não anestesiados. Registro direto da P.A femoral durante 210 minutos após o tratamento. Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5).

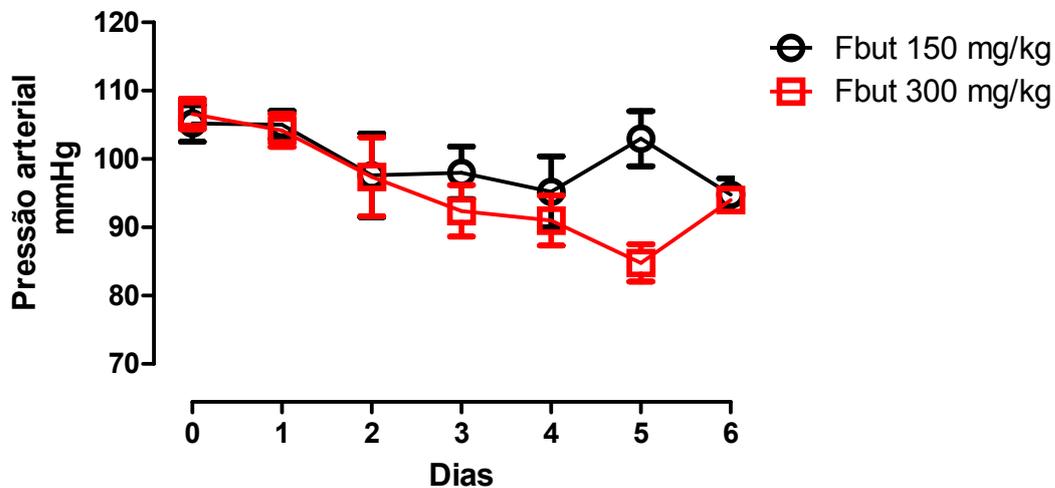


Figura 17. Efeito da administração oral repetida da Fbut de *V. surinamensis* (150 e 300 mg/kg/dia) na pressão arterial (basal) de ratos não anestesiados, registro direto da P.A femoral. Dados expressos como médias \pm erros padrão (n = 5).

6.2.3 Efeitos da administração repetida da fração butanólica (Fbut) da *Virola surinamensis* na pressão arterial sistólica de ratos normotensos não-anestesiados-registro indireto

A pressão arterial dos ratos normotensos, medida pelo método indireto não invasivo, foi $122,1 \pm 3,1$ mmHg (n=10) permanecendo inalterada durante o período de adaptação do animal as condições de registro e de administração do veículo (água – 5 mL/kg/dia, p.o).

Após a estabilização da pressão arterial e a divisão dos ratos em grupo controle (água – 5 mL/kg/dia, p.o) e tratado com Fbut o tratamento foi iniciado com a administração repetida da Fbut (300 mg/kg/dia, p.o).

Durante o tratamento com a Fbut (300 mg/kg/dia p.o), a pressão arterial sistólica dos animais do grupo tratado diminuiu para $94,4 \pm 4,2$ mmHg (n=5) em 5 dias de tratamento, estabilizando até o 18 dia (fig.18). A pressão arterial sistólica do grupo controle não foi alterada nesse período.

O grupo controle com inversão do tratamento (cross over) a pressão arterial do grupo tratado com Fbut (150 mg/kg/dia p.o) foi reduzida de $119 \pm 2,5$ para $102 \pm 1,5$ mmHg em 23 dias de tratamento diário mantendo-se estável (fig.18).

A interrupção do tratamento (wash out) com administração de H₂O (5 ml/kg/dia p.o) durante 39 dias estabilizou a P.A. nos seus valores controles (fig. 18).

O tratamento deste grupo com Fbut (300 mg/kg/dia p.o) reduziu a P.A sistólica de $115 \pm 3,5$ para $98 \pm 5,4$ mmHg no período de 16 dias necessários para atingir seu efeito máximo (fig.18).

Novamente o “cross over” com o grupo controle que recebeu FBut 75 mg/kg reduziu a P.A sistólica de $118 \pm 2,8$ para $106 \pm 2,2$ mmHg (Figura 18).

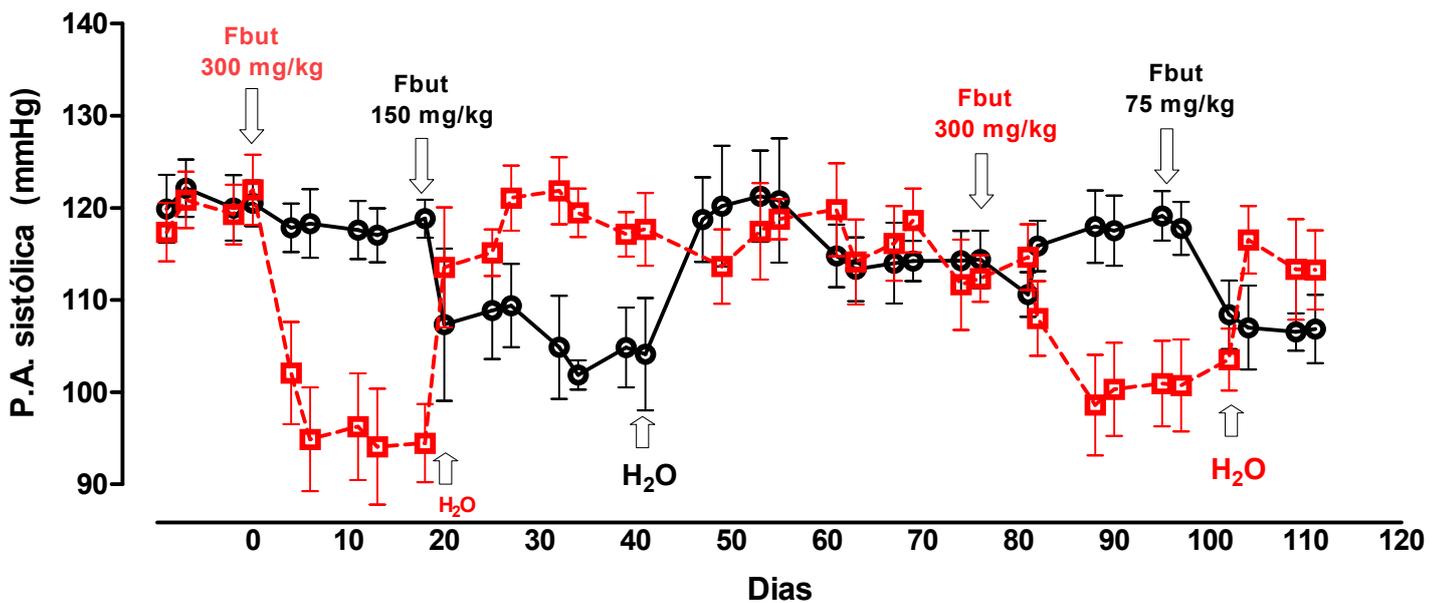


Figura 18. Pressão arterial sistólica medida indiretamente na cauda de ratos normotensos, tratados repetidamente com veiculo (controle – água, 5 ml/kg/dia p.o, n=5) ou com Fbut (75, 150, 300 mg/kg/dia, p.o, n=5) como indicado. Dados expressos como médias \pm erros padrão da media.

6.2.4 Efeitos da fração butanólica (Fbut) da *Virola surinamensis* em anéis de aorta torácica de rato, sem endotélio, pré-contraídos com noradrenalina (10^{-7} M)

A incubação de noradrenalina (10^{-7} M) contraiu a aorta e manteve o tônus contrátil a 100 % do máximo durante tempo maior que 30 min.

A incubação da Fbut (30, 100 e 300 μ g/mL) em anéis de aorta pré-contraídos relaxou o tônus de maneira concentração-dependente. Após 30 min da incubação, as percentagens de relaxamento do tônus em relação ao tônus controle, imediatamente antes da incubação, foram de 22, 33 e 78 %, respectivamente. O relaxamento dos anéis de aorta após a incubação da Fbut foi significativamente diferente (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle) (Figura 19).

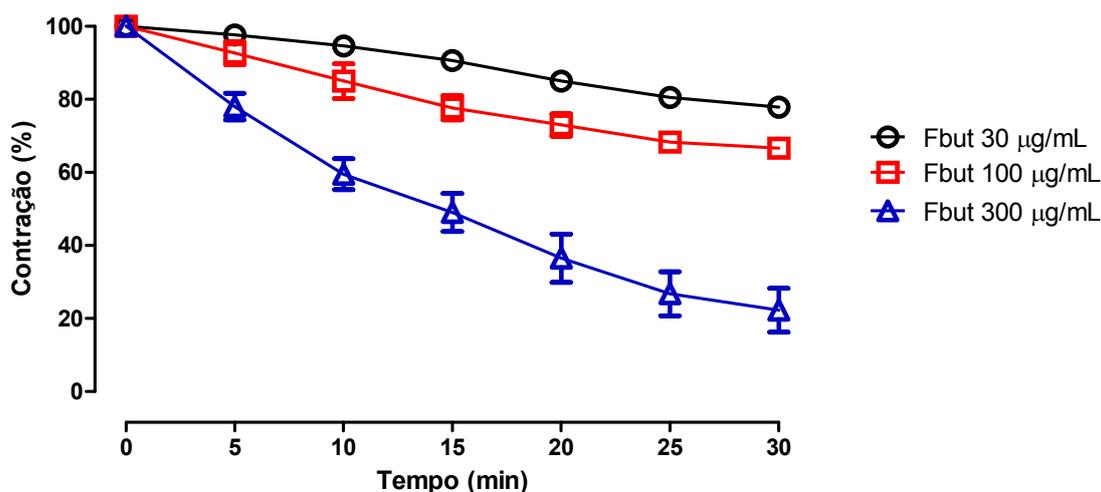


Figura 19. Relaxamento produzido pela Fbut de *Virola surinamensis* (30, 100 e 300 µg/mL) da contração induzida por noradrenalina (10^{-7} M) em anéis de aorta de rato sem endotélio. Dados expressos como médias \pm erros padrão ($n = 5$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao controle.

6.2.5 Efeitos da fração butanólica (Fbut) da *Virola surinamensis* em anéis de aorta de rato. Curvas cumulativas de noradrenalina (10^{-9} a 10^{-6} M)

Nessas preparações a adição cumulativa de Nor 10^{-9} a 10^{-6} M produziu respostas proporcionais as concentrações. Na presença de FBut houve diferença entre os valores da EC_{50} da noradrenalina: de 0,05 µM, (LC 0,04 a 0,07 µM) para 0,2 µM, (LC 0,15 a 0,3 µM) na concentração de FBut 10 µg/mL e com EC_{50} 1,7 µM, (LC 0,84 a 3,4 µM) em relação à curva controle de noradrenalina na concentração de FBut 30 µg/mL. A diferença entre os valores da EC_{50} da Fbut foi significativamente diferente (*** $p < 0,001$, comparado ao controle) em ambas as concentrações (Figura 20). Não houve alteração do efeito máximo da noradrenalina na presença da FBut.

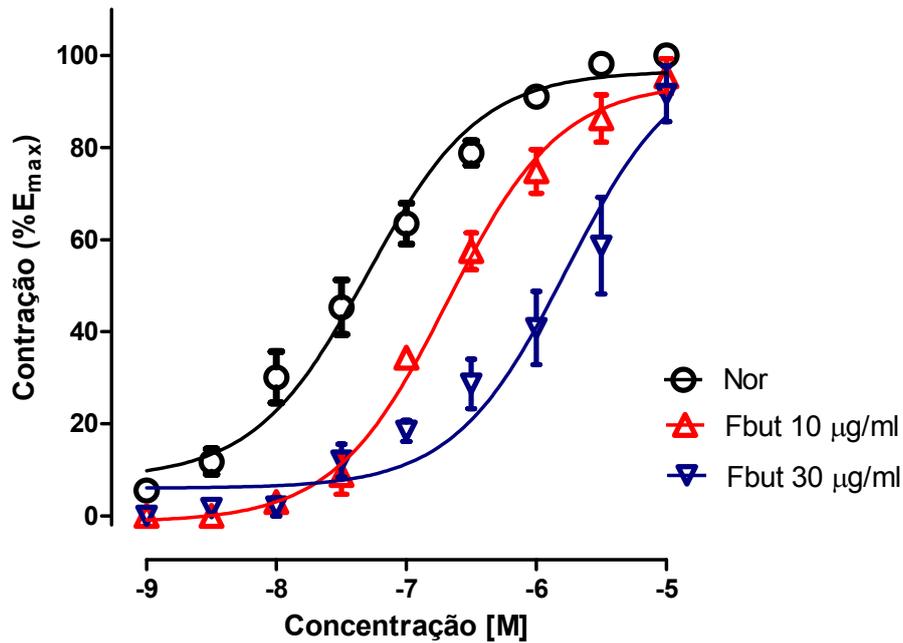


Figura 20. Efeito da Fbut (10 e 30 µg/mL) na contração de anéis de aorta de rato produzida pela adição cumulativa de noradrenalina (Nor, 10⁻⁹ a 10⁻⁶ M), a 35 °C. Dados expressos como médias ± erros padrão (n = 4). *** $p < 0,001$, comparado ao controle.

6.2.6 Efeito da fração butanólica (Fbut) de *Virola surinamensis* (10 a 300 µg/mL) na frequência de contração do átrio direito de rato

Após 30 minutos de estabilização a 35 °C, o átrio direito de rato apresentou batimentos espontâneos com frequência variando de 190 a 202 bpm (n=4).

A incubação cumulativa da Fbut (10 a 300 µg/mL) não produziu nenhum efeito significativo no automatismo do átrio direito. (Figura 21).

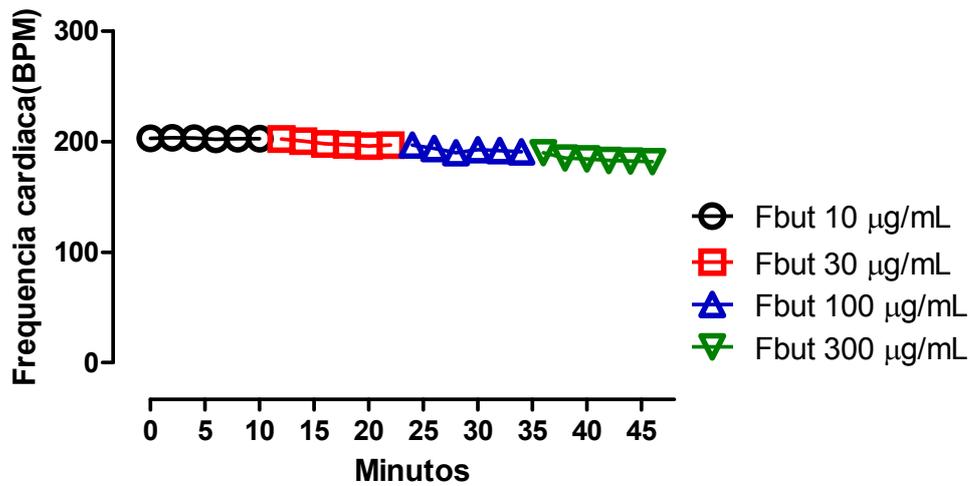


Figura 21. Efeito cumulativo da fração butanólica (FBut) de *Virola surinamensis* (10, 30, 100 e 300 µg/mL) na frequência cardíaca do átrio direito de rato. Os resultados representam as médias \pm erro padrão. (n= 4).

6.2.7 Efeito da fração butanólica (Fbut) de *Virola surinamensis* (10 a 300 µg/mL) na força de contração do átrio esquerdo de rato

A contração do átrio esquerdo de rato foi produzida por estimulação elétrica (1 Hz, 2 ms, e voltagem supramáxima). Após 30 minutos de estabilização a 35 °C a incubação da Fbut cumulativa (10 a 300 µg/mL) não produziu efeito significativo na força de contração do átrio esquerdo. (Figura 22).

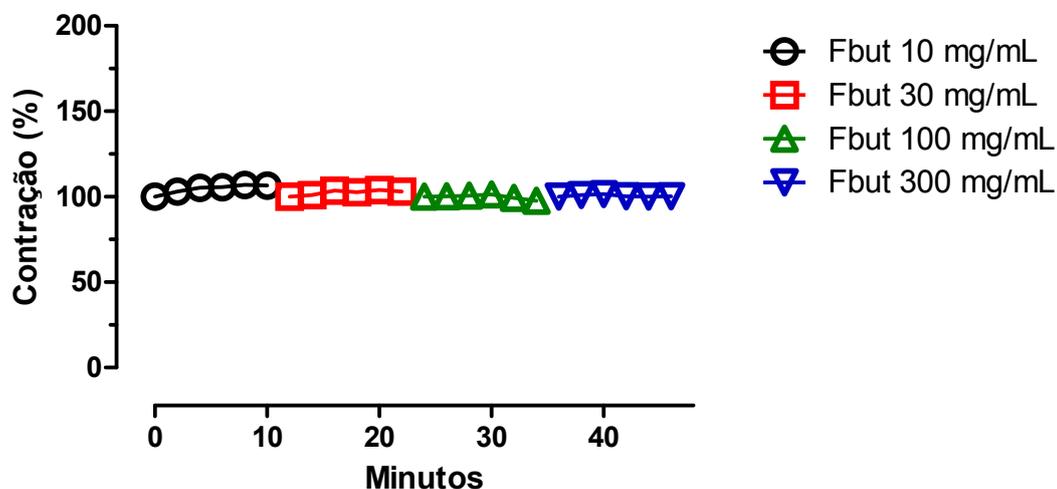


Figura 22.

Efeito cumulativo da fração butanólica (FBut) de *Virola surinamensis* (10, 30, 100 e 300 mg/mL) na contração do átrio esquerdo de rato, estimulada com pulsos transmuralis supra-máximos, com duração de 2 ms e frequência de 1Hz. Os resultados representam as médias \pm erro padrão. (n= 4).

6.3 Ação muscular esquelética

6.3.1 Efeitos da Fbut da *Virola surinamensis* na contração muscular obtida por estímulo direto da fibra muscular na presença de d-tubocurarina.

A contração do diafragma de rato produzida por estimulação elétrica diretamente na fibra muscular na presença de d-tubocurarina (10^{-5} M) foi potenciada com a incubação da Fração butanólica (1, 2, 3 mg/mL) da *V. surinamensis* em 9, 18, 31% respectivamente em relação à contração basal (Figura 23).

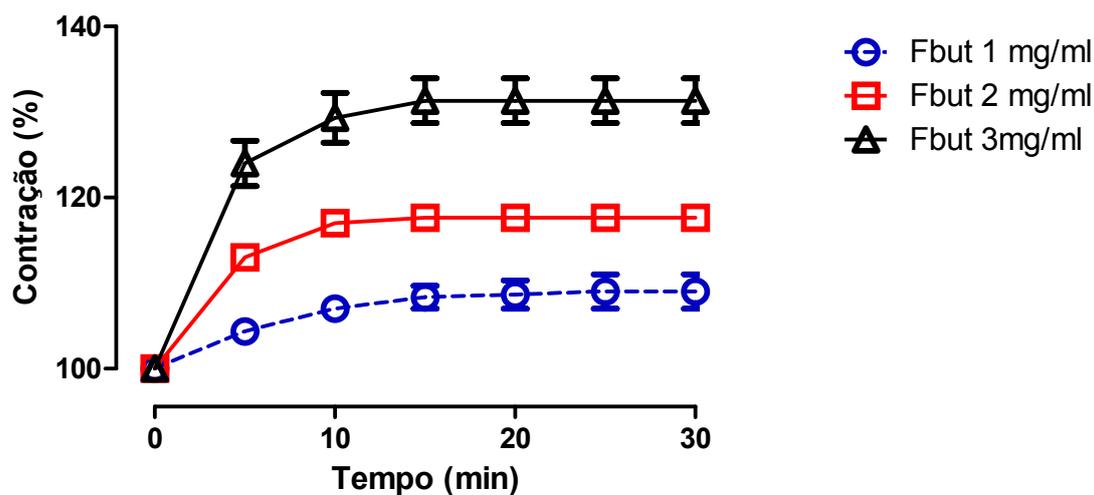


Figura 23. Efeito da fração butanólica (FBut) de *Virola surinamensis* (1, 2 e 3 mg/mL) na contração de diafragma de ratos sob estímulo direto (0,2 Hz, 0,5 ms, voltagem supra máxima). Os valores representam as médias \pm erro padrão da porcentagem da contração máxima basal. (n= 4 animais).

6.3.2 Atividade da fração butanólica (Fbut) na atividade da Ca^{2+} - ATPase (SERCA 1) de músculo esquelético de coelho

Ensaio preliminares realizados na presença de diferentes concentrações da enzima (0,4; 0,8; 1,2; 1,6 e 2,4 μg), diferentes tempos de reação (5, 10, 15 e 20 minutos) 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 $205,5 \pm 1,0 \mu\text{mol Pi/mg}$ proteína/min (controle = 100%, n = 3). A Fbut de *Virola surinamensis*, nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, diminuiu significativamente a atividade da Ca^{2+} - ATPase em relação ao controle positivo tapsigargina (Figura 38 A e B). A pré-incubação de ouabaína (1 mM)

nas mesmas condições, não alterou os valores de hidrólise obtidos em condições controle indicando que a preparação estava livre de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

O controle positivo tapsigargina foi testado nas concentrações (0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 μM) e reduziu a hidrólise de forma concentração dependente (Figura 24).

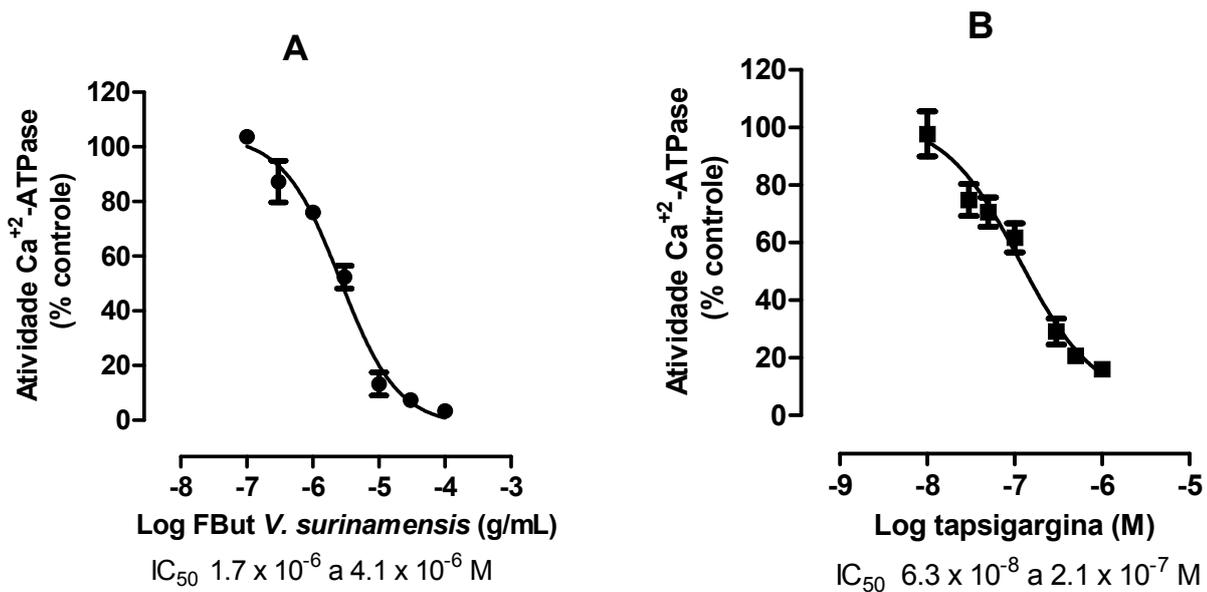


Figura 24. Efeito da Fbut (3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) na atividade da $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ de músculo esquelético de coelho (A) e do controle positivo tapsigargina (0,01; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e 1,0 μM) (B), durante 10 min a 37 °C

7. DISCUSSÃO

A família Myristicaceae inclui dezenove gêneros e aproximadamente quatrocentas espécies, localizadas principalmente na região tropical (MABBERLEY, 1997). Destacam-se na família o gênero *virola*, cujas espécies arbóreas são abundantes na floresta Amazônica (ROMOFF; YOSHIDA, 1997).

Várias espécies de Myristicaceae são utilizadas para fins medicinais na forma de chá, emplastos, gorduras, óleos, decocções e cataplasmas de diferentes partes da planta (GOTTLIEB, 1978). Atividades alucinogênicas, antimicrobianas e anti-reumáticas foram atribuídas a várias espécies de Myristicaceae (AGURREL *et al.*, 1969; SCHULTES; SWAIN, 1976).

A *Virola surinamensis*, conhecida popularmente como “ucuúba”, “ucuúba branca”, “ucuúba de igapó”, “sucuúba”, é uma árvore que cresce em várzeas e em bancos de areia em rios da floresta amazônica (Rodrigues, 1980). A resina da casca é utilizada na medicina popular para o tratamento de erisipelas e o chá das folhas é indicado em cólicas, dispepsia e processos inflamatórios (SCHULTES; HOLMSTED, 1971; BERGER, 1992).

Estudos *in vitro* mostraram a atividade antiplasmodio dos óleos essenciais extraídos de *V. surinamensis*, tendo sido o nerolidol o principal constituinte ativo. Sua atividade foi atribuída à inibição de síntese de glicoproteínas na fase trofozoita do *P. falciparum* (LOPES *et al.* 1999). Atividade anti-leishmania, anti-tripanosoma, anti-cercaria, antitumoral também foram relatadas (LOPES *et al.*, 1996; 1998). Estudos *in vivo* com compostos extraídos da *V. surinamensis* são poucos, destacando-se o estudo do efeito gastroprotetor do extrato etanólico da resina administrado por via oral (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009) e o estudo da atividade antiinflamatória da neolignana grandisina também administrada por via oral (CARVALHO *et al.*, 2010).

O extrato aquoso tal como descrito no uso popular não tem avaliação publicada, nem foram encontradas sugestões, ou tentativas de padronização química do fitoterápico recomendado na medicina popular. Estes foram os objetivos do presente trabalho.

As folhas da *Virola surinamensis* foram coletadas em outubro no Município de Manacapuru, a 60 km de Manaus, estabilizadas por secagem à sombra e extraídas por infusão a 75°C. O extrato liofilizado foi particionado em butanol e a Fbut preparada em quantidade para todos os testes; após a homogeneização a Fbut foi analisada em CLAE, comparativamente ao EA. A partição em butanol teve a finalidade de eliminar os compostos mais polares, em geral açúcares e ácidos clorogênicos do extrato aquoso, compostos inativos que, nos controles em CLAE com coluna de fase reversa, correspondem aos primeiros picos do cromatograma. As 10 frações correspondentes aos picos majoritários do cromatograma da Fbut foram recromatografadas em CLAE analítica para avaliação do grau de pureza e enviadas para identificação química visando futuros estudos moleculares.

Neste trabalho apresentamos os principais resultados obtidos na triagem farmacológica da Fbut da *V. surinamensis* da região de Manaus, às vezes comparativamente às ações do EA.

No teste geral de atividades com administração oral de doses elevadas do EA e da Fbut (1,0 g/kg) foram poucas as informações obtidas. Nenhum sinal característico de atividade foi observado. Questiona-se, portanto, se há qualquer biodisponibilidade das substâncias extraídas no chá. Os dois estudos farmacológicos com a *V. surinamensis* publicados recentemente utilizaram a via oral para administrar o extrato etanólico da resina cujo principal componente era a epicatequina (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2009), ou para administrar uma neolignana pura (grandisina) (CARVALHO *et al.*, 2010). Não há possibilidade imediata de se estabelecer a proporção relativa desses compostos na Fbut, ou no EA que foram por nós testados, mas, em vista da baixa polaridade daquelas substâncias, não é

esperado sua extração em escala durante o preparo do chá. Será necessário identificar quimicamente as frações purificadas da Fbut para outras considerações.

A injeção endovenosa do EA, e da Fbut em ratos anestesiados produziu hipotensão rápida e passageira, proporcional à dose injetada, sem alteração da frequência cardíaca. O efeito hipotensor com essas características pode ser explicado mais freqüentemente por 1) bloqueio de receptores α 1-adrenérgicos, 2) por ação muscarínica em receptores M3 vasculares ou M2 cardíacos, 3) por ativação da NOS endotelial, 4) por bloqueio dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L.

O efeito hipotensor da Fbut não foi bloqueado pelo tratamento prévio com atropina em dose suficiente para bloquear a ação da acetilcolina no mesmo rato, este resultado descartou uma possível ação colinomimética do extrato. Também nesse sentido, foi observado que a hipotensão não se acompanhava de bradicardia.

O tratamento prévio com o EA ou com a Fbut reduziu a hipertensão produzida pela injeção de noradrenalina. Em algumas experiências o efeito da adrenalina na pressão arterial foi invertido com a injeção prévia do EA, caracterizando, nos dois casos um bloqueio dos receptores α 1-adrenérgicos e do tônus vascular induzido pela noradrenalina. A Fbut não inverteu a ação pressórica da adrenalina, mas bloqueou com mesma intensidade a hipertensão produzida pela noradrenalina e adrenalina.

A inversão do efeito pressórico da adrenalina é explicada por sua afinidade por receptores β 2 que produzem vasodilatação mediada pela ativação da cadeia de segundo-mensageiros acoplados à proteína Gs. Uma vez ativada a adenililciclase que catalisa a síntese de AMPcíclico e da proteína quinase-A (PKA), a vasodilatação ocorre por inibição da miosina de cadeia leve quinase (AHLQUIST, 1948). A frequência cardíaca não foi alterada com administração do EA ou da Fbut, descartando ação β 1 adrenérgica, posteriormente confirmada com os resultados obtidos *in vitro* no átrio isolado.

A cinética do efeito hipotensor foi acompanhada em alguns ratos preparados para o registro da pressão arterial diretamente da artéria femoral em animais não anestesiados. A pressão arterial média dos ratos normotensos, medida pelo método direto foi ao redor de 120 mmHg, como esperado da colônia dos ratos do CBA. O tratamento com a Fbut (150 mg/kg) administrada com sonda oral reduziu progressivamente a pressão a partir dos 30 min do tratamento, atingindo o máximo ao redor de 15 mm Hg, em 120 minutos. O efeito foi reversível espontaneamente, recuperando os níveis basais em 90 min, A resposta à Fbut não diferiu durante os 7 dias de tratamento diário, mas a pressão arterial basal dos ratos tratados diminuiu ao longo do tratamento. O tratamento com a dose maior de Fbut (300 mg/kg), produziu efeito semelhante, um pouco mais rápido e mais intenso como esperado da dose utilizada.

Os resultados mostraram que alguns compostos da Fbut têm biodisponibilidade oral. As substâncias absorvidas não modificaram o comportamento animal no teste de Irwin, mas produziram hipotensão reversível com início em torno de 30 minutos, tempo necessário para o esvaziamento gástrico. O tratamento repetido durante 7 dias não modificou o comportamento animal, mas houve um efeito residual acumulado da Fbut que a cada dia reduziu o valor basal da pressão arterial dos ratos.

O registro direto da pressão arterial foi limitado a 1 semana. Depois desse período, as cânulas começaram a entupir e as manobras de desobstrução interferiram com o registro da pressão. Por este motivo, o efeito da administração crônica da Fbut na pressão arterial de ratos não anestesiados foi avaliado com o método indireto, medindo a pressão arterial na cauda do animal.

Os métodos indiretos utilizados para registrar a pressão arterial têm papel importante na investigação experimental de hipertensão. As limitações do método são numerosas e importantes: permitem, por exemplo, registrar apenas a pressão sistólica, ainda que os

aparelhos modernos façam o cálculo automático da pressão média; exigem o aquecimento do animal e não possibilitam medidas repetidas em curtos intervalos. Por outro lado, os métodos indiretos têm quatro grandes vantagens: (1) eles não são invasivos e não requerem cirurgia, (2) podem ser utilizados para obter medições repetidas de pressão arterial sistólica dos animais conscientes durante estudos de alguns dias, ou de longa duração, (3) exigem equipamentos menos caros que alguns métodos diretos (por exemplo, telemetria) e tem operação menos dispendioso, e (4) pode ser usado para triagem de animais com hipertensão arterial sistólica (THEODORE *et al*, 2004).

Nas experiências deste trabalho, a pressão arterial dos ratos normotensos, medida pelo método indireto não invasivo, foi 122 mmHg, portanto, igual à pressão registrada diretamente da artéria. Importante notar que depois de estabilizada durante o período de adaptação dos animais, a pressão se manteve estável facilitando a observação dos efeitos hipotensores produzidos pela Fbut.

Com o método de registro indireto ficou claro que a Fbut reduziu a pressão arterial sistólica de forma rápida, proporcionalmente às doses administradas e que o efeito foi reversível com a interrupção do tratamento. A possibilidade de registro por tempo prolongado mostrou também a baixa toxicidade da Fbut.

O mecanismo de ação foi estudado em preparações isoladas. Vasos sanguíneos, o sistema nervoso simpático é capaz de modular a resistência periférica total e o retorno venoso através da regulação do tônus vascular, efeito esse mediado pelas catecolaminas endógenas nos diferentes tipos de receptores adrenérgicos encontrados no endotélio e músculo liso de diferentes leitos vasculares (LEVY, 2004)

O tônus adrenérgico vascular resulta da ativação de receptores α_1 -adrenérgicos com conseqüente ativação da fosfolipase C da membrana celular e liberação de IP₃ e diacilglicerol (DAG) (ALLEN; WALSH, 1994; TOGNARINI; MOUDS, 1997). A ativação de receptores

de IP₃ localizados na membrana do retículo endo/sarcoplasmático libera Ca²⁺ reticular para o citosol, enquanto que o DAG ativa quinases protéicas (proteínas quinases do tipo C, PKC) que fosforilam e ativam canais de cálcio da membrana (ALLEN; WALSH, 1994; WALSH *et al.*, 1995). Com o aumento da concentração intracelular de cálcio livre, independentemente do mecanismo ativado, ocorre a contração do músculo liso vascular (WALSH *et al.*, 1995).

O óxido nítrico (NO) é um vasodilatador que contribui para a regulação do fluxo sanguíneo regional e redução da resistência vascular (GARDINER, *et al.*, 1990; SIGMON., BEIERWALTES, 1993). O efeito é mediado pela ativação da guanilato ciclase solúvel, o que aumenta o monofosfato de guanosina cíclico celular (GMPc), resultando no relaxamento vascular e diminuição da resistência vascular (IGNARRO, 1990). Com a ativação da eNOS, a produção de NO é desencadeada e, uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula alvo, ou seja, das células endoteliais para as células musculares lisas do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO ativa uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Essa ativação é feita pelo acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima (sítio receptor), formando o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular, promovendo a redução do tônus vascular e, conseqüentemente, vasodilatação (GUYTON; HALL, 1996; MONCADA, 1994; MONCADA; HIGGS, 2006; PALMER *et al.*, 1988; VIARO *et al.*, 2000; WEBB, 2003; ZAGO; ZANESCO, 2006).

Nos anéis de aorta sem endotélio, a incubação da Fbut relaxou o tônus de maneira concentração-dependente mostrando que Fbut não interfere no sistema NOS. O relaxamento promovido pela Fbut na aorta sem endotélio pode estar relacionado ao bloqueio de receptores α 1-adrenérgicos, como discutidos anteriormente. De fato, a Fbut deslocou para a direita as curvas concentração-efeito de noradrenalina na aorta de rato, sem alterar o efeito máximo do

agonista. Este efeito foi indicativo de antagonismo competitivo e reforça as evidências obtidas na pressão arterial de que o mecanismo da hipotensão produzida pela Fbut é o bloqueio de receptores adrenoceptivos tipo α_1 .

Durante a hipotensão arterial produzida pela Fbut, a frequência cardíaca não foi alterada. Esta observação *in vivo* foi confirmada com os estudos nas preparações isoladas de átrio. De fato, a incubação de Fbut em concentração 10 vezes maior que a efetiva na aorta, não modificou a frequência ou a força de contração atrial, indicando que a excitabilidade e o acoplamento excitação-contração do miocárdio não foram alterados.

Estes resultados foram diferentes dos obtidos no diafragma de rato. Nesta preparação a incubação da Fbut potenciou a contração obtida por estímulo direto da fibra muscular. Como as experiências foram realizadas na presença de d-tubocurarina, a potenciação não se deve à facilitação da transmissão neuromuscular, mas sim a uma ação direta da Fbut na fibra muscular esquelética. Este efeito não guarda relação com a atividade bloqueadora de receptores α_1 -adrenérgicos.

Em microsomas isolados da musculatura esquelética do coelho, a Fbut inibiu a atividade da Ca^{2+} -ATPase à semelhança da tapsigargina, indicando que a potenciação da contração do diafragma parece estar relacionada à diminuição da recaptção de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático.

Nos músculos estriados (cardíaco e esquelético), a despolarização elétrica da membrana plasmática desencadeia um aumento da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) que ativa a contração muscular. O processo responsável pela interligação da despolarização da membrana celular à contração muscular, isto é, o acoplamento excitação-contração envolve a participação de dois canais de cálcio na tríade muscular: o canal dependente de voltagem localizado nos túbulos T (receptor de dihidropiridina), e o canal localizado na cisterna terminal do retículo sarcoplasmático (receptor de rianodina). A propagação do potencial de

ação ao longo da membrana muscular e dos túbulos T estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático promovendo a contração muscular (HILLE, 1992). O relaxamento da musculatura ocorre com a remoção do excesso de Ca^{2+} do citoplasma para o retículo sarco(endo)plasmático contra um gradiente de concentração. A Ca^{2+} -ATPase dos músculos esquelético (SERCA1) e do miocárdio (SERCA2) são as isoenzimas responsáveis por essa ação. Inibidores da SERCA potenciam a contração muscular (LUO, 2000). A tapsigargina (TG), Ácido Ciclopiazônico (CPA) e 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBHQ), embora estruturalmente diferentes, os três compostos inibem a Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (RS) ou retículo endoplasmático (ER), sem afetar transporte de Ca^{2+} na membrana plasmática. Mais importante ainda, estes fármacos têm sido amplamente utilizados em estudos fisiológicos, uma vez que podem limitar um efeito que é independente de qualquer produção de IP_3 ou estimulação da proteína quinase C. (GROVER ; KHAN 1992; ROONEY; MELDOLESI, 1996). Entre os três inibidores, TG demonstra a maior afinidade para SERCAs em relação ao CPA e TBHQ. Além disso, o tratamento com TG são apenas parcialmente reversíveis, enquanto que os efeitos da CPA e TBHQ podem ser completamente revertidos. Além disso, dependendo das isoformas de SERCAs estudadas, algumas diferenças na sensibilidade a esses compostos têm sido observados. Por exemplo, TG inibe a SERCAs em uma variedade de células musculares, enquanto as Ca^{2+} -ATPase do SR de células cardíacas são apenas parcialmente inibidas. Em contraste, CPA e TBHQ não têm seletividade (MISSIAEN *et al*, 1991;. DETTBARN; PALADE, 1998; SALVADOR; MATA, 1998).

Apesar da possibilidade de ser estimulante, é inesperado que a Fbut tenha bloqueado diferentemente as duas isoformas de Ca^{2+} -ATPase.

Será necessário prosseguir com o estudo da *Virola surinamensis* purificando e isolando os compostos constituintes.

8. CONCLUSÃO

- A análise da Fbut em CLAE com coluna de fase reversa gerou 10 frações purificadas;
- Fbut foram recromatografadas em CLAE analítica para avaliação do grau de pureza e enviadas para identificação química visando futuros estudos;
- No teste geral de atividades com administração oral de doses elevadas do EA e da Fbut (1,0 g/kg) nenhum sinal característico de atividade foi observado;
- A injeção endovenosa do EA, e da Fbut em ratos anestesiados produziu hipotensão rápida e passageira, proporcional à dose injetada, sem alteração da frequência cardíaca;
- O efeito hipotensor da Fbut não foi bloqueado pelo tratamento prévio com atropina;
- O tratamento prévio com o EA ou com a Fbut reduziu a hipertensão produzida pela injeção de noradrenalina;
- O efeito da adrenalina na pressão arterial foi invertido com a injeção prévia do EA;
- A Fbut não inverteu a ação pressórica da adrenalina, mas bloqueou com mesma intensidade a hipertensão produzida pela noradrenalina e adrenalina;
- O tratamento com a Fbut (150 mg/kg) administrada com sonda oral reduziu progressivamente a pressão a partir dos 30 min do tratamento, com a dose maior de Fbut (300 mg/kg), produziu efeito semelhante, um pouco mais rápido e mais intenso como esperado da dose utilizada;

- As substâncias absorvidas não modificaram o comportamento animal no teste de Irwin, mas produziram hipotensão reversível com início em torno de 30 minutos, tempo necessário para o esvaziamento gástrico;
- O tratamento repetido durante 7 dias não modificou o comportamento animal, mas houve um efeito residual acumulado da Fbut que a cada dia reduziu o valor basal da pressão arterial dos ratos;
- Com o método de registro indireto ficou claro que a Fbut reduziu a pressão arterial sistólica de forma rápida, proporcionalmente às doses administradas e que o efeito foi reversível com a interrupção do tratamento;
- Nos anéis de aorta sem endotélio, a incubação da Fbut relaxou o tônus de maneira concentração-dependente mostrando que Fbut não interfere no sistema NOS;
- Este efeito foi indicativo de antagonismo competitivo e reforça as evidências obtidas na pressão arterial de que o mecanismo da hipotensão produzida pela Fbut é o bloqueio de receptores adrenoceptivos tipo α_1 ;
- A incubação de Fbut em concentração 10 vezes maior que a efetiva na aorta, não modificou a frequência ou a força de contração atrial, indicando que a excitabilidade e o acoplamento excitação-contração do miocárdio não foram alterados;
- Incubação da Fbut potenciou a contração obtida por estímulo direto da fibra muscular;
- Apesar da possibilidade ser estimulante, é inesperado que a Fbut tenha bloqueado diferentemente as duas isoformas de Ca^{2+} -ATPase. Inibidores da SERCA.

9 - Referências Bibliográficas

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/MINISTÉRIO DA SAÚDE (ANVISA/MS). Resolução RDC nº 84, DE 19 de março de 2002. Dispõe sobre conceito de medicamento. D.O.U. de 20/03/2002. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showact.php>. Acesso em: 5 abril 2010.

AGURELL, S.; HOMSTEDT, B.; LINDGREN, J.E.; SCHULTES, R.E. *Acta Chem Scan.*, v.23, p.903, 1969.

AHLQUIST, R.P. A study of adrenotropic receptors. *Am J Physiol.*, 153: 586–600, 1948.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.. The simple α -carboline alkaloids. *Phytochemistry*, 19, 1980. p. 1573.

AUFFRET, G.; LABAIED, M.; FRAPPIER, F.; RASOANAIVO, P.; GRELLIER, P.; LEWIN, G. Synthesis and antimalarial evaluation of a series of piperazinyl flavones. *Bioorg Med Chem Lett*, 15:959–963, 2007.

AYRES, D.C.; LOIKE, J.D. Lignans Chemical and Clinical Properties. *Cambridge University Press*: Cambridge. 1990.

BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M.; GOTTLIEB, O. R.; RUVEDA, E. A. Neolignans of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 17, p. 783-786, 1978.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PAINE, A.; CROFTS, S. L.; PHILIPSON, J. D. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, Inglaterra, v. 55, n. 6, p. 589-595. 2000.

BEBBINGTON, P. The classification and epidemiology of unipolar depression. In: Power, M. (Ed.), *Mood Disorders: A Handbook of Science and Practice*. Wiley, Chichester, 3–28. 2004.

BELOTA FILHO, W.L. As espécies de *Iryanthera* Warburg (Myristicaceae) da Reserva Florestal Ducke. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA, Manaus, AM. 94pp. 1994.

BENNETT, B.C.; ALARCÓN, R. *Osteophloeum platyspermum* (A.DC.) Warburg and *Virola duckei* A.C. Smith (Myristicaceae): Newly reported as hallucinogens from Amazonian Ecuador. *Econ. Botany*, v. 48:152-158. 1994.

BERGER, M.E. In: *Plantas Mediciniais da Amazônia*, v. 2: p. 207. 1992.

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

CASTRO, O; GUTIÉRREZ, J. M; BARRIOS, M; CASTRO, I; ROMERO, M; UMAÑA, E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. biol. trop* v.47 n.3. 1999.

CARVALHO, A. A. V; GALDINO, P. M; NASCIMENTO, M. V. M; KATO, M. J; VALADARE, M. C.; CUNHA, L. C; COSTA, E. A. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisin extracted from *Virola surinamensis*. *Phytother. Res.* 24: 113–118, 2010.

CHEA, A.; HOUT, S.; BUN, S.S.; TABATADZE, N.; GASQUET, M.; AZAS, N.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Antimalarial activity of alkaloids isolated from *Stephania rotunda*. *J Ethnopharmacol*, 30:132–137, 2007.

COOMBS, G.H.; GOLDBERG, D.E.; KLEMBA, M.; BERRY, C.; KAY, J.; MOTTRAM, J.C. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol*, v.17, p. 532, 2001.

CUNICO, W.; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.; MARQUES, G.H. Synthesis and antimalarial activity of hydroxyethylpiperazine derivatives. *Rev. Bras. Farm.* v.89, p. 49, 2008.

CRAGG, G. M; SCHEPARTZ, S. A; SUFFNEZ, M; GREVER, M. R. The taxol supply crisis: New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat Prod.* 56: 1657-1668, 1993.

DAVIES, P.F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75: 519-560, 1995.

DAVINO, S. C.; BARROS, S. B. M.; SILVA, D. H. S.; YOSHIDA, M. Antioxidant Activity of *Iryanthera sagotiana* Leaves. *Fitoterapia*, v. 69, p. 185-186, 1998.

DETTBARN, C; PALADE, P. Effects of three sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} pump inhibitors on release channels of intracellular stores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285: 739-745. 1998.

DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. *Anthocyanins. Methods Plant Biochem*, 1:325-356, 1989.

DEWICK, P.M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 2nd edn. John Wiley: Chichester, 130–142. 2002.

FERNADES, A.M.A.P; BARATA, L.E.S; FERRI, P.H. Absolute configuration of the lignan oleiferins from *Virola oleifera*. *Phytochemistry*, 36, p. 533-534. 1994.

FIDOCK, D.A.; ROSENTHAL, P.J.; CROFT, S.L.; BRUN, R.; NWAKA, S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nature Rev Drug Discovery*, 3:09–520. 2004.

FRANCHINI, K.G; KRIEGER, E.M. Neurogenic hypertension in the rat. In: GANTEN D & JONG W de, eds. Experimental and genetic models of hypertension, *Elsevier Science BV*, p. 482-500, 1994.

FROELICH, S.; ONEGI, B.; KAKOOKO, A.; SIEMS, K.; SCHUBERT, C.; JENETT-SIEMS, K. Plants traditionally used against malaria: phytochemical and pharmacological investigation of *Momordica foetida*. *Braz J Pharmacogn*, 17:1–7, 2007.

FURCHGOT, R.F; ZAWADSKI, J.V. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle cells by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1981.

FURNESS, J. B.; COSTA, M. Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience*, v. 5, p. 1-20, 1980.

GARDINER, S.M.; COMPTON, A.M.; BENNETT, T.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension*, 15:486-492, 1990.

GREENWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography mass spectrometry of 150 compounds in *propolis*. *Z Naturforsch*, 46: 11-121, 1991.

GROVER, A.K; KHAN, I. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium*,13: 9 -17. 1992.

GOTTLIEB, O, R. Neolignans, In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Springer Verlag*, v. 35, p.1, 1978.

HAMBURGER. M; MARSTON, A; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. *Advances in Drug Research*, **20**, p.167-169, 1991.

HIRUMA-LIMA, C.A; BATISTA, L. M; ALMEIDA, A. B. A; MAGRI, L. P; SANTOS, L. C; VILEGAS, W; BRITO A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Viola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2): 406-409. 2009.

HOSTETTMANN, K. E. F; VIEIRA, Q. P. C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. *Série de textos da Escola de Verão em Química- IV*, 152 p. 2003.

IGNARRO, J.L.; Nitric oxide; a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*, 16: 477-483, 1990.

INAGAMI, T; NARUSE, M; HOOVER,R. Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol*, 57: 171-189, 1995.

JULIUS, S. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 21: 886-893,1992.

KAMIYA, A; TOGAWA, A. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 239 (Heart Circ Physiol 8): H14-H21, 1980.

KRIEGER, E.M. Arterial baroreceptor resetting in hypertension (The JW McCubbin Memorial Lecture). *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*, 15:3-17, 1989.

KRIEGER, J.E; DZAU, V.J. Molecular biology of hypertension. *Hypertension* 18 (suppl I): I-3-I-17; 1991.

KRIEGER, E.M; FRANCHINI, K.G; KRIEGER, J.E. Fisiopatogenia da hipertensão arterial. *Medicina, Ribeirão Preto*, 29: 181-192, 1996.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRAND, O. M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The search for new antimalarial drugs from plants randomly selected: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:1033–1042. 2001.

KÜHN, U.; KUBITIZKI, K. Myristicaceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, eds. The families and genera of vascular plants, V, II. Berlin: Springer-Verlag, 457–467. 1993.

LEVY, M.N. A circulação periférica e seu controle. In: BERNE, R.M.; LEVY, R.M.; KOEPPEN, B.M.; STATON, B.A. *Fisiologia 5 edição, Elsevier*, 399-413. 2004.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Antifungal Constituents from Roots of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 29-33, 1999.

LOPES, N. P.; BLUMENTHAL, E. E. A.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Neolignans, gama-Lactones and Propiophenones of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 43, p. 1089-1092, 1996.

LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs Active Against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Planta Medica*, v. 64, p. 667-669, 1998.

LOPES, N. P.; SILVA, D. H. S.; KATO, M. J.; YOSHIDA, M. Butanolides as a Common Feature Between *Iryanthera lancifolia* and *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, v. 49, p. 1405-1410, 1998.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A. R.; KATZIN, A. M. Antimalarial use of volatile oil from Leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiãpi Amazon Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 313-319, 1999.

LOUREIRO, A.A.; FREITAS, M.C.; VASCONCELOS, F.J. Estudo Anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae) da Amazônia. *Acta Amazônica*, 19(Único):415-465. 1989.

LOPES, N.P.; BLUMENTHAL, E.E.A.; CAVALHEIRO, A.J.; KATO, M.J.; YOSHIDA, M. Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry*, 43:1089–1092. 1997.

LOZOYA, X. Fármacos de origem vegetal de ayer y de hoy. *Investigacion y ciência*, 4 - 10, 1997.

LUO, D; NAKAZAWA, M; YOSHIDA Y; CAI, J; IMAI, S. Effects of three different Ca²⁺ pump ATPase inhibitors on evoked contractions in rabbit aorta and activities of Ca²⁺ pump ATPases in porcine aorta. *General Pharmacology*, 34: 211 – 220. 2000.

MABBERLEY, D. J. A portable dictionary of the vascular plants. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press, *The plant book*, p. 858. 1997.

MESHNICK, S.R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Par*, 32:1655–1660, 2002.

MILES, D. H; ANA, M. L.Y; SHIRLEY, A. R; PAUL, A. H; MARCUS, L. B. Alkaloidal insect antifeedants from *Virola calophylla* Warb, *J. Agric. Food Chem.*, v.35, n.5, p.794-7, 1987

MILLER, V.M; VANHOUTTE, P.M. Enhanced release of endothelium- derived relaxing factor by chronic increase in blood flow. *Am J Physiol*, 255 (Heart Circ Physiol 24): H446-H451, 1988.

MISSIAEN, L; WUYTACK, F; RAEYMAEKERS, L; SMEDT, H.D; DROOGMANS, G; DECLERCK, I; CASTEELS, R. Ca^{2+} extrusion across plasma membrane and Ca^{2+} uptake by intracellular stores. *Pharmacol. Ther.* 50:191-232. 1991.

MONCADA, S. Nitric oxide. *J. Hypertens. Suppl.* v. 12, n. 10, p. 35-39, 1994.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J Pharmacol.* v. 147, suppl 1, p. 193-201, 2006.

NODARI, R. O; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, Legais e éticos, *Farmacognosia da planta medicamento.* 1999.

PAGNOCCA, F.C; RIBEIRO, S.B; TORKOMIAN, V.L.V; HEBLING, M.J.A; BUENO, O.C; O DA SILVA, A; FERNANDES, J.B; VIEIRA, P.C; DA SILVA, M.F.G.F; FERREIRA, A.G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *J. Chem. Ecol*, 22: 1325-1330, 1996.

PALMER, R. M. J. et al. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. Biochemistry of smooth contraction. San Diego, *Academic Press*, p. 227 - 239, 1996.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C.. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central.* 816pp. 1999.

RODRIGUES, W.A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. *Acta Amazonica*, 10:1–127.1980.

ROMOFF, P.; YOSHIDA, M. Chemical constituents from *Myristicaceae*. *Ciência. Cultura J. Braz. Assoc. Adv. Sci.*v.49, n.5/6, p.345-353, 1997.

ROONEY, E; MELDOLES, J. The endoplasmic reticulum in PC12 cells. Evidence for a mosaic of domains differently specialized in Ca^{2+} handling. *J. Biol. Chem.* 271: 29304-29311. 1996.

SALVADOR, J.M.; MATA, A.M. Characterization of the intracellular and the plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in fractionated pig brain membrane using calcium pump inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 351: 272- 278. 1998.

SAUQUET, H. Androecium diversity and evolution in Myristicaceae (Magnoliales), with a description of a new Malagasy genus, *Doyleanthus* gen. nov. *Amer. Jour. of Bot.*, 90: 1293–1305, 2003.

SILVA M, C; CARVALHO J, C, T. Plantas Medicinais: In: J. C. T. Carvalho, Fitoterápicos. Antiinflamatórios. Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. *Tecmedd*, p 480, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 5th edn. Editora UFRGS: Porto Alegre. 2004.

SCHLITZER, M. Malaria chemotherapeutics part I: history of antimalarial drug development, currently used therapeutics and drugs in clinical development. *Chem Enab Drug Disc*, 7:944–986, 2007.

SCHULTES, R.E., HOLMSTEDT, B. De plantis toxicariis el mundo novo tropicale commentationes. VII *Miscellaneousnotes on Myristicaceous plants of South America. Lloydia*, 34:61–78. 1971.

SCHULTES, R.E., SWAIN, T., De plantis toxicaris e Mundo Novo tropicale commentationes. XIII. Further notes on *Virola* as an orally administered hallucinogen. *Jour. of Psys. Drugs* 8:317–324, 1976.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001. Capítulo15. pp. 301-332.

SIGMON, D.H.; BEIERWALTES, W.H. Angiotensin II: Nitric oxide interaction and the distribution of blood flow. *Am J Physiol* 265: R1276–R1283. 1993.

SINCLAIR, J. A revision of the Malayan Myristicaceae. *Garden Bulletin, Singapore*, 16:205–446. 1958.

SINCLAIR, J. The genus *Knema* (Myristicaceae) in Malaysia and outside Malaysia. *Garden Bulletin, Singapore*, 18:102–308. 1961.

SINCLAIR, J. The genus *Myristica* in Malesia and outside Malesia. *Garden Bulletin, Singapore*, 23:1–540. 1968.

SINCLAIR, J. The genus *Horsfieldia* (Myristicaceae) in and outside Malesia. I. *H. sabulosa* and *H. whitmorei*. *J. Sinclair spp. nov. Garden Bulletin, Singapore*, 27:133–141. 1974.

SINCLAIR, J. The genus *Horsfieldia* (Myristicaceae) in and outside Malesia. II. *Garden Bulletin, Singapore*, 28:1–181. 1975.

SMITH, A.C.; WODEHOUSE, R.P. The American species of Myristicaceae. *Brittonia*, 2:393–510. 1937.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 434:214-217, 2005.

THEODORE, W. K; KAREN, A. G; ANIL, K. B; ROBIN, L. D; JOHN E. H. Recommendations for Blood Pressure Measurement in Humans and Experimental Animals Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals. *Hypertension*, 45:299-310, 2005.

TORGNARINI, D.P.; MOULDS, R.F.W. Intracellular Ca^{2+} and contractile responses to α_1 -adrenoceptor subtype activation in rat aortic vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacol*, 1997. 322(1):31-36.

VIARO, F. et al. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. *Arq. Bras. Cardiol.* v. 74, n. 4, p. 380-393, 2000.

WALSH, M.P; KARGACIN, G.J; KENDRICK-JONES, J; LINCOLN, T.M. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol*, 73(5):565-73, 1995.

WALSH, M.P. Regulation of vascular smooth muscle tone. *Can. J. of Physiol Pharmacol*, 1994. 72(8):919-936.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/topics/malaria/en/>. 18 de maio de 2001.

YOSHIDA, M. Biologically active neolignans from Amazonian trees. In: SEIDL, P.R., GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A.C. (Eds.), *Chemistry of the Amazon. American Chemical Society*. Washington, DC. 1995.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq. Bras. Cardiol.* v. 87, n. 6, p. 264-270, 2006.