UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ REITORIA ACADÊMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lourdita Fazano Novaes

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO GUACO (Mikania laevigata Shultz Bip. ex Backer) FRENTE ÀS AÇÕES DO PROPRANOLOL E SALBUTAMOL, EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUSCULATURA ESTRIADA

Sorocaba/SP

Lourdita Fazano Novaes

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO GUACO (Mikania laevigata Shultz Bip. ex Backer) FRENTE ÀS AÇÕES DO PROPRANOLOL E SALBUTAMOL, EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUSCULATURA ESTRIADA

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP

2013

Ficha Catalográfica

Novaes, Lourdita Fazano

N816e

Efeitos farmacológicos do guaco (*Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Backer) frente às ações do propranolol e salbutamol, em modelo experimental de musculatura estriada / Lourdita Fazano Novaes. - Sorocaba, SP, 2013.

125 f.; il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2013.

Bibliografia: f. 113-124.

1. Farmacognosia. 2. Plantas medicinais — Uso terapêutico. 3. *Mikania laevigata*. 4. Junção neuromuscular. I. Franco, Yoko Oshima, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Lourdita Fazano Novaes

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DO GUACO (Mikania laevigata Shultz Bip. ex Backer) FRENTE ÀS AÇÕES DO PROPRANOLOL E SALBUTAMOL, EM MODELO EXPERIMENTAL DE MUSCULATURA ESTRIADA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em:
BANCA EXAMINADORA:
Ass.: Pres.: Prof ^a . Dr ^a . Yoko Oshima Franco
Ass.: 1° Exam.: Prof ^a . Dr ^a . Denise Grotto
Ass.:

Dedico este trabalho à memória de meus avós, a meu marido, meus filhos, meus pais, meus irmãos e meus pacientes.

Não há culpados para a dor que eu sinto.

É Ele, Deus, quem me dói pedindo amor

Como se fora eu Sua mãe e O rejeitasse.

Se me ajudar um remédio a respirar melhor,

obteremos clemência, Ele e eu.

Jungidos como estamos em formidável parelha,

Enquanto Ele não dorme eu não descanso.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos bens naturais a mim concedidos. A semente.

A meus pais pelo zelo desses bens. O solo.

A meu marido por olhar para mim. O cultivo.

A meus filhos por mostrarem o sentido da minha existência. Os frutos.

A meus irmãos e todos os que partilham comigo a experiência de estar neste mundo, dedico em agradecimento o empenho neste trabalho.

A minha orientadora Prof.^a Dra.^a Yoko Oshima Franco, com admiração por sua destemida vocação pedagógica, me iniciando nas práticas de laboratório, por sua capacidade administrativa e generosidade ao me receber, oferecendo este projeto e providenciando as condições e apoio necessários para que eu pudesse desenvolvê-lo com toda a liberdade, bem como a grande contribuição e atenção dispensadas para as correções finais.

A Prof.ª Magali Glauzer Silva, pelo trabalho realizado com a confecção dos extratos e cromatografias e pela valorosa orientação nesta área tão nova para mim.

A Valéria de Campos Orsi por seu apoio, carinho, atenção e delicadeza diários, capazes de suavizar as dificuldades cotidianas.

A minha doce companheira de caminhada Miriéle Cristina Ferraz, cuja presença diligente viabilizou minha permanência no laboratório, ambiente a princípio tão desconhecido para mim.

Às alunas de iniciação Emely Baldi por sua participação junto à Prof.ª Magali e Monique Santana pelo auxílio em alguns experimentos.

Aos Profs. Drs. Antônio Nelson Cincotto, Denise Grotto, Priscila Randazzo de Moura e Marli Gerenutti pelo trabalho de avaliação, participação na banca examinadora e grande contribuição para as correções.

Aos funcionários dos laboratórios de fármácia da Uniso, e todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

À Universidade de Sorocaba, pela iniciativa e oportunidade.

RESUMO

O guaco (Mikania laevigata) é planta popularmente utilizada para o alívio de sintomas respiratórios, tendo suas propriedades terapêuticas reconhecidas por estudos experimentais e pré-clínicos, porém com mecanismos de ação não completamente esclarecidos e atribuídos em parte a seu principal marcador, a cumarina. O salbutamol é fármaco de reconhecida ação broncodilatadora via receptores-β₂ de musculatura lisa de vias aéreas e o propranolol antagonista não seletivo de receptores-β, utilizado na clínica com diversas finalidades e ambos em estudos experimentais. Este trabalho teve como objetivos, produzir extratos de diferentes polaridades de M. laevigata (EHA- hidroalcoólico; INF1 e 2%- aquoso por infusão; EH- hexano; ED- diclorometano; EAC- acetato de etila; EM- metanol), caracterizá-los através de cromatografia em camada delgada, utilizando como referência seu marcador (fitoquímico comercial cumarina- 1,2-benzopirona); verificar os efeitos farmacológicos dos extratos e comparar com os do salbutamol, propranolol (Prop.) e fitoqúimico em modelo experimental de nervo frênico-diafragma de camundongo, tendo em vista a ação do conjunto de fármacos, fitoquímico e extratos em musculatura estriada esquelética. Os resultados mostraram ação tanto dos fármacos quanto dos extratos na resposta contrátil por estimulação indireta (%), ao final de 1 hora: o propranolol (48,4 \pm 7,2 com 0,4 μ M n=6) e o fitoquímico (65,3 \pm 5,4 com 200µg/ml n=5) produziram efeito bloqueador; o salbutamol (105,9±8,7 com 20µg/ml n=4; $113,7\pm8,7$ com $100\mu g/ml$ n=7 e $105,2\pm10$ com $500\mu g/ml$ n=4) e os extratos (EHA 99,4±3 com 1mg/ml n=6; INF2 137±3,1 n=3; EH 200µg/ml+ PEG 400 3µl/ml 105,3±4,7 n=3; ED $200\mu g/ml + DMSO 6\mu l/ml 82,3\pm4,4 n=3; EAC 100\mu g/ml + PEG 400 3\mu l/ml 103\pm5,2 n=3)$ produziram efeito facilitador da contração muscular, sendo maior o do extrato aguoso (INF2) que também interferiu significativamente no bloqueio induzido pelo propranolol (INF1 com 200μg/ml+Prop. 0,4μM 92,8±7,5 n=5). O extrato hidroalcoólico mostrou interferência nas ações do propranolol (EHA 1mg/ml+Prop. 0,4μM 0±0 n=4) e salbutamol (EHA 200μg/ml+salbutamol 0,3μM 102,8±8,4 n=5) com tendência para bloqueio nos dois casos. O extrato de acetato de etila mostrou diferença significativa na resposta entre os solventes utilizados (EAC 200μg/ml+PEG 400 3μl/ml 94,5±5,1 n=5 e EAC 200μg/ml+DMSO 6μl/ml 72,1±1,4 n=5). O fitoquímico cumarina, não apresentou no modelo ação correspendente à dos extratos e interferiu no efeito facilitador do salbutamol (T=20 salbutamol 0,3µM 111,3±2,4 T=30 salbutamol 0,3μM/cumarina 500μg 105,7±2,4 n=5). Os extratos com presença marcante

do ácido *o*-cumárico apresentaram resposta farmacológica mais expressiva. Estes resultados sugerem que as ações do guaco se desenvolvem por meio de fitocomplexo e através de múltiplos mecanismos de ação, dentre os quais a possível participação de vias adrenérgicas. Palavras chave: *Mikania laevigata*. Propranolol. Salbutamol. Junção neuromuscular. Músculo estriado esquelético.

ABSTRACT

Guaco (Mikania laevigata) is a popularly used plant in the relief of respiratory symptoms, having its therapeutic properties known by experimental and pre-clinical studies. Its action mechanisms however, are not totally clear and are partly accredited to its main marker, the coumarin. Salbutamol is a pharmacon of bronchodilator action on smooth muscle β_2 receptors of the airway and the antagonistic non-selective of β_2 propanolol used in various purposes, both in clinical treatment and experimental studies. This essay aims to produce, characterized by thin layer chromatography, verify and compare the effects of M. laevigata through its different polarity extract produced by dynamic maceration (EHAethanolic; INF- aqueous extract by infusion; EH- hexane; ED- dichloromethane; EAC- ethyl acetate; EM- methanol), as well as its marker (commercial phytochemical coumarin- 1,2 benzopyrene) with the ones in salbutamol and the propranolol (Prop.), in mice isolated phrenic nerve-diaphragm preparation, observing their own and combined action of pharmacon, phytochemicals and extracts in skeletal striated muscle. Results showed that both pharmacon and extracts produced changes on basal response of indirect stimulated twitchtension (%), after 1 hour: propranolol (48.4±7.2 with 0.4µM n=6) and the phytochemical (65.3±5.4 with 200μg/ml n=5) produced a blocking effect; the salbutamol (105.9±8.7 whith $20\mu g/ml = 4$; 113.7 ± 8.7 with $100\mu g/ml = 7$ e 105.2 ± 10 with $500\mu g/ml = 4$) and the extracts (EHA 99.4±3 with 200µg/ml n=6; INF2 137±3.1 n=3; EH 105.3±4.7 with 200µg/ml+ PEG $400 \text{ 3}\mu\text{l/ml } \text{ n=3}$; ED $82.3\pm4.4 \text{ with } 200\mu\text{g/ml+DMSO } 6\mu\text{l/ml } \text{ n=3}$; EAC $103\pm5.2 \text{ with } 1000 \text{ m}$ 100μg/ml+PEG 400 3μl/ml n=3) produced a facilitating effect of muscle contraction, being more intense at 2% aqueous extract by infusion, which has also interfered significantly in the propanolol induced blockage (INF1 92.8±7.5 with 200µg/ml+Prop. 0.4µM n=5). The hydroalcoholic extract presented interference in the action of propanolol (EHA 0±0 with 1mg/ml+ Prop. 0.4μM n=4) and salbutamol (EHA 102.8±8.4 with 200μg/ml + salbutamol 0.3µM n=5), tending towards blockage in both cases. The ethyl acetate showed relevant difference when responding to the used solvents (EAC 94.5±5.1 with 200µg/ml+PEG 400 3μl/ml n=5 e EAC 72.1±1.4 with 200μg/ml+DMSO 6μl/ml n=5). The coumarin, strongly present in the extracts, did not present corresponding action to the extracts in the model and presented interference in the action of salbutamol (T=20 salbutamol 0.3µM 111,3±2,4 T=30 salbutamol 0.3µM+coumarin 500µg 105.7±2.4 n=5). The extracts with a remarkable presence of o-cumaric acid present the best farmacological response. Such results suggest that the

actions of *M. laevigata* develop through phytocomplex and multiple action mechanisms, among which is the possible participation of the adrenergic way. Keywords: *Mikania laevigata*. Propranolol. Salbutamol. Neuromuscular junction. Skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Principais substituintes do núcleo catecol para aminas simpatomiméticas	19
Figura 2- Representação de compostos derivados do núcleo catecol e não-catecol	20
Figura 3- Derivados do ácido benzóico.	21
Figura 4- Cumarina e seus principais precursores.	29
Figura 5- Relações evolucionárias presumidas entre as subclasses de dicotiledôneas	29
Figura 6- Fórmulas estruturais do dicumarol e umbeliferona.	31
Figura 7- Representação do padrão clássico de ativação de receptor acoplado a proteína-G.	35
Figura 8- Ações de aminas simpatomiméticas em músculo estriado.	37
Figura 9- Junção neuromuscular e transmissão colinérgica.	41
Figura 10- Esquema das conexões da unidade miográfica.	53
Figura 11- Dimetilsulfóxido, monômero e polímero do etilenoglicol.	55
Figura 12- Rendimento geral dos extratos de M. laevigata.	57
Figura 13- Fotos das cromatoplacas dos extratos de M. laevigata reveladas pelo sistema 1	58
Figura 14- Fatores de retenção dos extratos de M. laevigata (sistema 1).	60
Figura 15- Fotos das cromatoplacas dos extratos de <i>M. laevigata</i> reveladas pelo sistema 2.	61
Figura 16- Fatores de retenção dos extratos de M. laevigata (sistema 2).	63
Figura 17- Fotos das cromatoplacas dos extratos de <i>M. laevigata</i> reveladas pelo sistema 3.	63
Figura 18- Fotos das cromatoplacas dos extratos de <i>M. laevigata</i> reveladas pelo sistema 4.	64
Figura 19- Fatores de retenção dos extratos de M. laevigata (sistema 4).	65
Figura 20- Foto da cromatoplaca de M. laevigata revelada pelo sistema 5.	66
Figura 21- Curva concentração-resposta do extrato aquoso por estímulo indireto	69
Figura 22- Curva concentração-resposta do EHA (A) e comparação das ações da concentra	ação
de 5mg através de estímulo direto e indireto (B)	70
Figura 23- Curva concentração-resposta do EH.	71
Figura 24- Curva concentração-resposta do ED.	72
Figura 25- Curva concentração-resposta do EAC	73
Figura 26- Comparação das ações dos solventes no EAC 1mg.	74
Figura 27- Curva concentração-resposta do EM.	75
Figura 28- Curva concentração-resposta da cumarina.	76
Figura 29- Média dos experimentos realizados com adrenalina.	77

Figura 30- Curva concentração-resposta do salbutamol.	78
Figura 31- Salbutamol estimulação direta (esquerda) e comparação dos estímulos dir	reto e
indireto para a concentração de 0,5mg (direita).	79
Figura 32- Curva concentração-resposta do propranolol.	80
Figura 33- Registro miográfico do propranolol (estímulo indireto-0,4µM)	80
Figura 34- Registro miográfico do propranolol (estímulo indireto-10µM)	81
Figura 35- Comparação da ação do propranolol por estímulo direto e indireto	81
Figura 36- Curva de Tyrode modificado com adição de KCl.	82
Figura 37- Demonstração da ação bloqueadora do propranolol sobre o salbutamol	84
Figura 38- Comparação da ação do propranolol na presença de INF1.	85
Figura 39- Comparação da ação do propranolol em presença de EHA.	86
Figura 40- Comparação da ação do propranolol em presença da cumarina	87
Figura 41- Curva dos experimentos realizados com salbutamol e cumarina.	88
Figura 42- Curva dos experimentos realizados com salbutamol e EHA.	89
Figura 43- Boqueio do propranolol em solução de Tyrode modificada	90
Figura 44- Registro miográfico do salbutamol em solução Tyrode modificada	91
Figura 45- Ações de fármacos via proteína-G.	99
Figura 46- Resumo dos desafios com propranolol.	101
Figura 47- Resumo de comparação e desafios com salbutamol	102
Figura 48- Alvos químicos para receptor acoplado a proteína-G	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Taxons da Classe MAGNOLIOPSIDA	23
Tabela 2- Características de fibras musculares estriadas	44
Tabela 3- Resumo do planejamento das cromatografias.	50
Tabela 4- Dados de extração e rendimento dos extratos de <i>M. laevigata.</i>	57
Tabela 5- Fatores de retenção dos extratos de <i>M. laevigata</i> (sistema 1)	60
Tabela 6- Fatores de retenção dos extratos de <i>M. laevigata</i> (sistema 2)	62
Tabela 7- Fatores de retenção dos extratos de <i>M. laevigata</i> (sistema 4).	65
Tabela 8- Comparação dos grupos fitoquímicos nos extratos de <i>M. laevigata</i>	67
Tabela 9- Presença dos fitoquímicos nos extratos de M. laevigata nos diferentes sistemas	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 A planta (Mikania laevigata)	22
2.1.1 Classificação e morfologia	22
2.1.2 Propriedades terapêuticas	25
2.2 Cumarina	28
2.2.1 Metabolismo da cumarina	31
2.3 Salbutamol	32
2.3.1 Farmacocinética	33
2.3.2 Mecanismos de ação	33
2.4 Propranolol	38
2.5 Modelo experimental	39
2.5.1 Junção neuromuscular	40
2.5.2 Músculo estriado	43
3 OBJETIVOS	45
3.1 Gerais	45
3.2 Específicos	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Material vegetal	46

4.2 Solventes e fármacos	46
4.3 Extratos	46
4.3.1 Extrato Bruto.	46
4.3.2 Extrato aquoso por infusão	47
4.3.3 Extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades	48
4.4 Cromatografias em camada delgada	48
4.4.1 Análise qualitativa	50
4.5 Modelo experimental	51
4.5.1 Animais	51
4.5.2 Solução de Tyrode	51
4.5.3 A técnica.	51
4.5.4 Aparelhos e registros	53
4.5.5 Delineamento experimental	54
4.5.6 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Droga vegetal	56
5.1.1 Extrato Bruto (EHA)	56
5.1.2 Extrato aquoso (INF1 e INF2)	56
5.1.3 Extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades	56
5.2 Cromatografias	58
5.2.1 Revelações pelo sistema 1	58
5.2.2 Revelações pelo sistema 2	61

5.2.3 Revelações pelo sistema 3	63
5.2.4 Revelações pelo sistema 4	64
5.2.5 Revelações pelo sistema 5	66
5.3 Ensaios farmacológicos	68
5.3.1 Extratos solúveis	69
5.3.1.1 Extrato aquoso (INF1 e 2)	69
5.3.1.2 Extrato hidroalcoólico (EHA)	70
5.3.2 Extratos de solventes de polaridade crescente	70
5.3.2.1 Extrato hexano (EH)	71
5.3.2.2 Extrato diclorometano (ED)	72
5.3.2.3 Extrato acetato de etila (EAC)	73
5.3.2.4 Extrato metanol (EM)	74
5.3.3 Fitoquímico	75
5.3.4 Fármacos.	76
5.3.4.1 Adrenalina	76
5.3.4.2 Salbutamol	77
5.3.4.3 Propranolol	79
5.3.4.4 Solução de Tyrode modiricada por adição de KCl 10%	82
5.3.5 Experimentos de desafio	83
5.3.5.1 Salbutamol x propranolol	84
5.3.5.2 Extrato aquoso x propranolol	84
5.3.5.3 Extrato hidroalcoólico x propranolol	85
5.3.5.4 Cumarina x propranolol	86

5.3.5.5 Salbutamol x cumarina	87
5.3.5.6 Salbutamol x extrato hidroalcoólico	88
5.3.5.7 Solução de Tyrode modificada x propranolol	89
5.3.5.8 Solução de Tyrode modificada x salbutamol	90
5.4 Discussão	91
5.4.1 Considerações teóricas.	103
5.4.2 Considerações finais	109
6 CONCLUSÃO	112
7 REFERÊNCIAS	113
ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa animal	125

1. INTRODUÇÃO

As qualidades vitais dos organismos vegetais como a capacidade de síntese de energia e produção de substâncias para seu metabolismo primário e secundário faz destes seres a base da cadeia alimentar do planeta, e responsáveis pela sobrevivência de todas as espécies animais.

A seleção de espécies vegetais com finalidade alimentícia ou terapêutica, entre outras, é prática milenar que acompanha o ser humano desde seus primórdios, presente em diferentes culturas como manifestação do relacionamento dos povos com os elementos do seu ambiente natural. Esta seleção pode se desenvolver a partir de critérios que vão da observação pelo homem, de informações sensoriais produzidas pela espécie vegetal ao comportamento de animais frente a elas e das consequências do consumo pelos animais e pelo próprio homem. (ELISABETSKY, 2000)

O ópio¹ pode ilustrar a longevidade deste relacionamento, pois seus efeitos psíquicos eram conhecidos pelos antigos Babilônios 4000 a.C, no antigo Egito 2000 a.C, foi levado à China por comerciantes árabes, aparecendo nos textos de medicina chinesa por volta de 1000 d.C. (BOWMAN; RAND, 1980)

Na cultura ocidental, os cinco volumes "De Matéria Médica" de Pedanius Dióscorides (40-90 d.C) representam o registro mais antigo de uma seleção de espécies vegetais com propriedades terapêuticas, tendo permanecido como um dos livros texto mais importantes da medicina até o século XXVII. Muito da nomenclatura comum e científica de plantas utilizadas atualmente se originam desta obra, sendo a família Dioscoreaceae nomeada em sua homenagem (HAAS, 1996). Dentre as 600 plantas descritas, está presente o salgueiro (*Salix alba*), cujo extrato das cascas já era utilizado anteriormente por civilizações antigas por suas propriedades terapêuticas e abandonado por volta do século II em países cristãos em razão da crença de que as doenças representavam punições divinas, portanto não mereciam interferência. (BOWMAN; RAND, 1980)

O período de expansão marítima da Europa do Renascimento possibilita a agregação de conhecimentos provenientes das novas culturas exploradas com a colonização, quando então se inicia a participação do Brasil neste corpo de conhecimentos. O interesse despertado

¹ Extrato seco de sementes de papoula trituradas.

pelas qualidades medicinais da flora do novo mundo pode ser observado já na primeira metade do século XVI, com a descrição do veneno utilizado pelos índios em suas flechas na publicação de 1516 de Pietro Mártiro d'Anghiera, De Orbes Novo. (DUARTE, 2000)

No Brasil, os primeiros registros sobre as propriedades terapêuticas da nossa flora surgem a partir de 1549, com a chegada dos padres da Companhia de Jesus, ordem missionária da Igreja romana, formada em 1540 por iniciativa de Inácio de Loiola, com função missionária, educacional e que tinha como parte dos ofícios, os serviços de saúde. Além do Brasil, os padres jesuítas estabeleceram-se em regiões de domínio português da Europa, África e Oriente, onde construíram colégios e boticas para o desenvolvimento de suas práticas, num período de escassez de médicos, o que fez dos jesuítas praticamente os únicos responsáveis pela assistência médica do Brasil no primeiro século da colonização. (CALAINHO, 2005; PEDRO, 2008)

Os registros em cartas, utilizados como forma de comunicação entre os membros da ordem, constituem relatos minuciosos, que informam sobre as dificuldades enfrentadas no ambiente e no convívio com os nativos, além de descrições de costumes e doenças, de espécies animais e vegetais, (LEITE, 1954) e de coleções de receitas, organizadas com o nome do colégio de procedência, indicações e modo de preparação e administração; o acesso a este imenso acervo de informações fora dos limites eclesiásticos somente tornou-se possível pela obra do historiador jesuita Serafim Leite² e constitui referência para historiadores dedicados ao estudo de diversas áreas do conhecimento do período da colonização. (PEDRO, 2008)

Muitas destas receitas que constavam de espécies nativas foram comercializadas (a Triaga³ Brasílica do colégio da Bahia teve grande importância), gerando recursos para a continuidade das ações missionárias e levadas para a Europa, sendo incorporadas aos conhecimentos da época. (CALAINHO, 2005)

Durante a ocupação Holandesa no Recife (1624-1654), período marcado por grande produção artística e intelectual, Georg Marcgrave e Willhem Pies, naturalistas integrantes da

³ Triagas são receitas milenares de composição variável de um a dezenas de ingredientes, (em torno de 30 na Brasilica), inicialmente concebidas como antídoto de venenos e ao longo do tempo, pela popularidade e prestígio que adquiriram, tornaram-se remédios universais (panacéias). (SANTOS, 2009)

² A "História de Companhia de Jesus no Brasil", composta por 10 volumes publicados entre 1930 e 1948, principal obra do padre Serafim Leite motivou críticas, uma vez que o autor como membro da Ordem, estaria sujeito à censura eclesiástica, entretanto esta sua condição permitiu o acesso a informações que dificilmente seriam disponibilizadas a um leigo. (PEDRO, 2008)

comitiva de Maurício de Nassau, empenhados em recolher dados da natureza ocupam-se entre outros, do reconhecimento e ordenação da flora medicinal brasileira publicando a História Natural e Médica das Índias Ocidentais, obra que permaneceu por muito tempo como referência para os estudiosos das Ciências Naturais. (RODRIGUES, 2002)

A exuberância dos recursos naturais encontrados no Novo Mundo desperta o interesse dos cientistas da época, e coleções de espécies vegetais e animais nativos são levadas para a Europa, o que está relacionado ao surgimento dos Herbários e museus de História Natural (GESTEIRA, 2004; LOPES, 2005). Porém, a ordenação destas coleções e informações era ainda muito confusa e somente a partir do reconhecimento e aplicação em todo o mundo das obras de Carolous Linnaeu (1707-1778), *Systema Naturae*, *Species Plantarum* e *Genera Plantarum*, um sistema hierárquico e binomial baseado em caracteres morfológicos para classificação dos organismos em grupos taxonômicos (SALES; SANTOS, 2007), torna-se possível uma melhor ordenação da biodiversidade, com dificuldades ainda não completamente superadas, pois conhecimentos advindos de outras áreas como paleontologia, química e genética entre outras, vem trazendo desde então novos subsídios para modificações e reestruturação desta classificação, sendo a proposta por Arthur Cronquist uma das mais utilizadas para plantas floríferas. (POSER; MENTZ, 2000)

No Brasil imperial do século XIX, a assistência médica já não está mais vinculada à igreja e os poucos médicos formados na Europa estabeleciam-se na corte do Rio de Janeiro em Salvador e algumas províncias, o que significa que a maior parte da população brasileira dispersa em regiões rurais era carente de assistência. Nestas regiões, as práticas de saúde eram realizadas por boticários, barbeiros, "curiosos", latifundiários, líderes políticos e religiosos de modo que os manuais para orientação dessas práticas tiveram importância fundamental (SOUZA, 2008). Dentre os mais populares, o Erário Mineral do cirurgião português Luiz Gomes Ferreira e o Formulário Chernoviz do médico polonês Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, nome abrasileirado de Piotr Czerniewicz, (1821-1888) publicado em 1841, incluía o código farmacêutico francês e plantas indígenas, foi atualizado em 24 edições, sendo a última em 1924, apenas dois anos antes da primeira edição da Farmacopéia Brasileira. (GUIMARÃES, 2005)

Neste formulário, encontra-se relacionada como "Mikania guaco", a "planta trepante da família das Eupatoriaceas, que habita na Nova Granada⁴ sobre as margens do rio

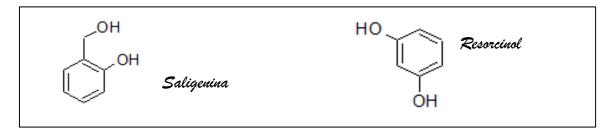
⁴ Atual Colômbia

Magdalena e no sul do Brasil, aconselhada contra a cólera, de proveito nas moléstias das vias respiratórias e com reputação de curar as mordeduras de cobra, para uso internamente na forma de infusão de 20 gramas para 1000 gramas de água fervendo ou xarope" (CHERNOVIZ, 1890). Na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira de 1929 foi oficializada como *Mikania glomerata*, indicada para o tratamento de afecções pulmonares por suas propriedades expectorantes sob a forma de infusão a 2%. (BRASIL, 2012c)

O desenvolvimento das ciências, particularmente da química no século XIX permite o isolamento⁵ e síntese⁶ de substâncias com ações farmacológica e terapêutica (TUROLA; NASCIMENTO, 2006). A indústria farmacêutica cresce nesta direção e declina o interesse por medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2000).

Neste contexto desenvolve-se em 1966 nos labotatórios Allen Hanbury⁷ a síntese do salbutamol, um derivado da saligenina (fig. 1), a partir do conhecimento de que o núcleo catecol (fig. 2) não era indispensável para a ação farmacológica de aminas simpatomiméticas (fig. 3) e que a sua substituição aumentaria o tempo de ação do composto (uma vez que deixa de ser substrato para a enzima catecol-*O*-metil transferase), idealizado particularmente para uso como broncodilatador. (CULLUM et al., 1969)

Figura 1- Principais substituintes do núcleo catecol para aminas simpatomiméticas.



Fonte: Bowman; Rand (1980). Elaboração própria.

⁵ Em 1803 o assistente de farmacêutico alemão Friedrich Wilhem Adam Sertürner (1783-1841) consegue isolar substância cristalina da planta *Papaver somniferum*, que por suas propriedades entorpecentes é nomeada morfina em referência ao mito grego de Morpheu.

⁶ Em 1827 um glicosídeo amargo é extraído da casca do salgueiro, a salicina, cuja hidrólise fornece salicil álcool (saligenina) e glicose. Em 1838 o ácido salicílico é preparado a partir da saligenina e em 1860 sintetizado a partir do fenol. Em 1899 a Bayer introduz no mercado a aspirina ou ácido acetil salicílico (fig. 3). (BOWMAN; RAND, 1980)

⁷ Comercio fundado em 1712 em Londres por Silvanus Bevan, cientista quacre que em 1792 associouse a William Allen - sua segunda mulher era Hanbury, cuja família controlou a empresa após sua morte (CHAPMAN-HUSTON; CRIPPS, 1955), até a venda para a Glaxo em 1958.

Em 1948, Raymond Ahlquist propõe a hipótese dual para adrenoceptores (α e β)⁸, e orientado por ela, James Whyte Black persegue um fármaco capaz de anular as ações dos hormônios simpáticos no miocárdio, obtendo êxito com a síntese do propranolol (fig. 2) no final dos anos 50, revolucionando a história da cardiologia, e por esta conquista recebe o prêmio nobel de medicina de 1988. (LITTLE, 1988; BLACK, 1989)

Figura 2- Representação de compostos derivados do núcleo catecol e não-catecol.

Compostos derivados do núcleo catecol (0-dihidroxibenzeno) – adrenalina e isoprenalina e não catecol –orciprenalina (resorcinol) e salbutamol (saligenina). Notar semelhanças e diferenças nos núcleos e nas cadeias laterais, inclusive com respeito ao propranolol. Fonte: Bowman; Rand (1980). Elaboração própria.

⁸ Todo o conhecimento atual sobre a fisiologia das ações de aminas simpatomiméticas se assenta sobre a hipótese de Ahlquist: tendo demonstrado em diversos órgãos de animais, que a epinefrina é responsável pelos efeitos tanto excitatórios quanto inibitórios, propõe o conceito de receptores *alfa* (excitatórios na maioria) e *beta* (inibitórios na maioria) para adrenoreceptores em oposição ao conceito vigente de que seriam duas substâncias diferentes as responsáveis por estas ações (simpatinas E e I), defendendo sua utilidade no estudo das ações da epinefrina, argumentando que para as ações da acetilcolina os efeitos excitatório e inibitório sempre foram atribuídos aos receptores nos quais atua. (AHLQUIST, 1948)

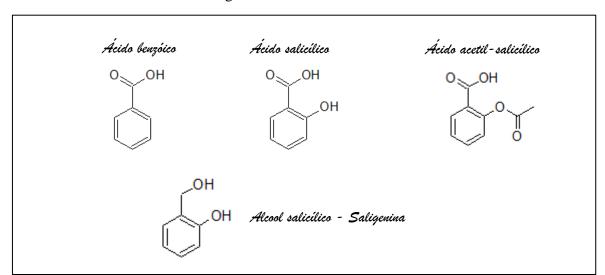


Figura 3- Derivados do ácido benzóico.

Ver notas número 6 e 11. Fonte: Bowman; Rand (1980); Soares (2002). Elaboração própria.

A recuperação do interesse pelo estudo e utilização de medicamentos fitoterápicos passa a acontecer a partir de 1987 com a XXXI Assembléia Geral da Organização Mundial de Saúde, que determina o início de um programa com o fim de reconhecer, avaliar e utilizar os métodos da medicina popular (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). No Brasil a repercussão desta determinação pode se observar nas diversas medidas tomadas pelo Governo Federal e Ministério da Saúde, visando o incentivo, sistematização e regulamentação da utilização de fitoterápicos, com ênfase no reconhecimento de eficácia e segurança dos produtos e que culminam com o a portaria 971 de 3 de maio de 2006 que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b). Em 22 de junho de 2006 por meio do decreto 5.813 o Governo Federal aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a) e em fevereiro de 2009 o Ministério da Saúde divulga uma lista, com 71 plantas medicinais de interesse do SUS (RENISUS), dentre as quais a Mikania laevigata (BRASIL, 2009b), que passa a figurar entre as oito que constam na lista de medicamentos fitoterápicos do Elenco de Referência Nacional do Componente Básico da Assistência Farmacêutica, contemplado na Portaria nº 2.982 de 26 de novembro de 2009, do Ministério da Saúde. (BRASIL, 2009a)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A PLANTA (*Mikania laevigata*)

2.1.1 Classificação e morfologia

As plantas do gênero *Mikania* pertencem à Divisão Magnoliophita, classe Magnoliopsida (tabela 1), subclasse Asteridae, ordem Asterales, família Asteraceae, única da ordem Asterales, com mais de 1.100 gêneros abrigando em torno de 20.000 espécies, conhecida também como Compositae, organizada em aproximadamente 13 tribos onde a Eupatoriae abriga o gênero *Mikania* entre 600 outros.

A subclasse Asteridae distingue-se da vasta maioria das plantas dicotiledôneas pelas flores simpétalas⁹ nas quais os estames são isômeros e alternados com os lobos da corola em 99% das espécies, o que representa uma perspectiva prática de reconhecimento para todo o grupo. É a subclasse mais desenvolvida, bem sucedida e provavelmente a mais recente entre as dicotiledôneas, passando a representar papel importante na flora do planeta somente a partir do período Oligoceno. Sua evolução parece correlacionar-se com a de insetos capazes de reconhecer padrões florais complexos, porém o sucesso parece depender mais de seu arsenal químico do que da especialização de suas estruturas florais.

Quimicamente, a ocorrência de compostos iridóides¹⁰ é notável, sendo estes mais presentes que em qualquer outra subclasse exceto na família Asteraceae. Admite-se que a exploração destes compostos em detrimentos de taninos, saponinas e cianideos, repelentes mais comuns, represente recurso evolutivo destas plantas na luta contra predadores. (CRONQUIST, 1981)

As plantas da ordem Asterales são representadas por ervas ou menos frequentemente por arbustos e raramente por pequenas árvores. Suas flores são caracterizadas por grãos de

⁹ Flores nas quais as pétalas são fundidas umas as outras.

Compostos iridóides são metabólitos secundários de plantas, produzidos também por algumas espécies de insetos (*Iridomyrmex detectus*, espécie de formiga que dá origem ao nome), de natureza defensiva, relacionados com o núcleo ciclopentano-pirânico, normalmente com 10 átomos de carbono, pertencentes à classe dos terpenos, com propriedades farmacológicas diversas como sedativa (valeriana), hipotensora (folha de oliveira), etc. (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003)

pólen trinucleados, óvulo basal e ereto e pelo sistema secretório bem desenvolvido (resinífero e lactífero), que caracteristicamente produz sesquiterpenos, lactonas, poliacetilenos e repelentes químicos.

Asteraceae é a única família da ordem Asterales e a maior família de dicotiledôneas, sendo 1/3 das espécies de toda subclasse Asteridae pertencentes a esta família. É considerada uma das mais bem sucedidas famílias entre as plantas floríferas por seu grande número de gêneros, espécies e indivíduos, sendo este sucesso atribuído a seu arsenal químico, por constituírem eficientes armas contra predadores naturais. Especula-se que tendo suas origens no final do período Oligoceno, quando predadores naturais adaptaram-se para tolerar iridóides e alcalóides relacionados, esta família modificou massivamente a produção de defensivos, passando a explorar combinações eficientes de poliacetilenos e sesquiterpeno lactonas, desenvolvendo labilidade químico-evolucionária que permitiu a façanha de criar novos repelentes. A distribuição das espécies é cosmopolita, porém melhor representada em florestas pouco densas de regiões temperadas e subtropicais. (CRONQUIST, 1988)

Tabela 1- Taxons da Classe MAGNOLIOPSIDA

Subclasse	Ordem	Família
MAGNOLIIDAE	(8)	
HAMAMELIDAE	(11)	
CARYOPHILIDAE	(3)	
DILENIIDAE	(13)	
ROSIDAE	(18)	
	Fabales *	Fabaceae *
	Apiales *	Apiaceae *
ASTERIDAE	Gentianales	(6)
	Solanales	(8)
	Lamiales	(4)
	Callitrichales	(3)
	Plantaginales	(1)
	Scrophilariales	(12)
	Campanulales	(7)
	Rubiales	(2)
	Dipsacales	(4)
	Calycerales	(1)
	Asterales	Asteraceae
		(Compositae)

Foram listadas na tabela acima todas as ordens da subclasse ASTERIDAE. As ordens Fabales e Apiales e as respectivas famílias Fabaceae e Apiaceae (*) foram listadas na subclasse Rosidae pela importância de suas relações com a subclasse Asteridae comentada adiante. Os números entre parênteses referem-se ao número de ordens da subclasse correspondente ou ao número de famílias da ordem correspondente. Fonte: Cronquist (1988).

O gênero *Mikania* Willdenow foi proposto em 1803 pelo botânico alemão Carl Ludwig Willdenow (1765-1812), em homenagem a Joseph Gottfried Mikan (1743-1814), conta com mais de 400 espécies, sendo relatadas em regiões brasileiras aproximadamente 170 espécies, das quais 150 de distribuição endêmica principalmente entre Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina (HOLMES, 1995). Na visão dos botânicos é considerado um gênero perfeito por ser grande, fileticamente isolado, citologicamente distinto e morfologicamente uniforme. Porém, estas mesmas características que fazem do gênero *Mikania* um gênero ideal, tornam a delimitação subgenérica e específica extremamente difícil. (HOLMES; HIND, 2000)

Mikania laevigata Schultz Bip. ex Baker é um subarbusto trepador, volúvel, com o caule lenhoso e cilíndrico, de coloração castanho-acinzentada e verde claro nas pontas, suas folhas são opostas de contorno oval e oblongo-lanceoladas, de base obtusa e ápice acuminado de até 15 cm de comprimento e 7 cm de largura, com três nervuras bem evidentes, pecioladas, carnoso-coriáceas, verde brilhantes na face superior, mas pálida no interior. As flores são hermafroditas, reunidas em quatro capítulos iguais entre si, agrupadas em glomérulos ou ramos espiciformes congestos, infundibuliformes, com cinco lacínias, com cerca de 5 mm de comprimento e tubo com 1mm. As bractéolas são lineares e medem cerca de 5mm de comprimento. O fruto tipo aquênio é glabro, pentagular e subcilíndrico mede cerca de 2 a 4 mm e é provido de papus com coloração rosada de 4 mm de comprimento. (OLIVEIRA et al., 1986a)

As semelhanças morfológicas e organolépticas dificultam a distinção entre as espécies *M. laevigata* e *M. glomerata* Sprengel, sendo comum a substituição de uma pela outra e a comercialização indistinta entre as espécies (OLIVEIRA et al., 1986a). As diferenças morfoanatômicas entre as espécies *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*, relatadas na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2012c - 4 ed., parte 2, 1° fascículo, p. 1388), constam de proporções de comprimento e largura semelhantes para as folhas da espécie *M. glomerata* enquanto que nas de *M. laevigata* o comprimento é maior, tornando-as mais alongadas. As semelhanças entre seus constituintes demonstradas através de estudos fitoquímicos (OLIVEIRA et al., 1984), permitem considerar que ambas podem ser utilizadas de forma indistinta (BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009), de modo que ambas são listadas com as mesmas indicações na Farmacopéia Brasileira a partir de 2005. (BRASIL, 2012c)

2.1.2 Propriedades terapêuticas

As espécies *M. laevigata* e *M. glomerata* já contam com inúmeras publicações, que vão de estudos morfológicos (OLIVEIRA et al., 1986a; 1986b), agronômicos (CASTRO et al, 2007), farmacognósticos e fitoquímicos (OLIVEIRA et al., 1984; BIAVATTI et al., 2004; PEDROSO et al., 2008; BUDEL et al., 2009; FERREIRA; OLIVEIRA, 2010), controle de qualidade (ROCHA et al., 2008; ALVARENGA et al., 2009) a experimentais e pré clínicos de eficácia, segurança (SOARES et al., 2006), e possíveis mecanismos de ação .(GRAÇA et al., 2007)

No que diz respeito à toxicidade, doses de 300mg/kg de xarope de guaco, utilizadas por 90 dias consecutivos em ratos (DL50=10g/kg), não produzem alterações em parâmetros hematológicos ou bioquímicos tanto em machos quanto em fêmeas, nem evidências de toxicidade nos sistemas renal, hepático e pancreático (GRAÇA et al., 2007). Em humanos, a ingestão de 60ml de xarope de *M. glomerata* durante 21 dias, não produz alterações em parâmetros laboratoriais para avaliação de sistemas hepático, renal e hematológico. (SOARES et al., 2006)

Dentre as propriedades terapêuticas das espécies *M. glomerata e M. laevigata* demonstradas por estudos experimentais, pode-se relacionar:

- Expectorante -Farmacopéia Brasileira, 1ª ed. p. 44 (BRASIL, 2012c)
- Broncodilatadora:

Os extratos aquoso, hidroalcoólico e diclorometano de *M. glomerata* estudados *in vitro*, em músculo liso de vias aéreas (traquéia de porquinho da Índia e brônquio humano, procedente de tratamento cirúrgico ablativo de neoplasia pulmonar), músculo liso vascular (anéis de aorta de rato e mesentério de rato) apresentam significativa ação relaxadora. Os extratos aquoso e hidroalcoólico produzem inibição da contração induzida pela histamina em traquéia de porquinho da Índia. O extrato hidroalcoólico produz relaxamento dose-dependente de anéis de traquéia de porquinho da Índia pré-contraídos com histamina, acetilcolina e potássio e também de anéis de brônquio humano pré-contraídos com potássio. A fração diclorometano também produz relaxamento dose-dependente em anéis de brônquio humano pré-contraídos com propranolol e com potássio. Este relaxamento ocorre com menos intensidade em anéis de aorta de rato e leito vascular mesentérico isolado de rato pré-

contraídos com adrenalina, sugerindo menor afinidade dos ativos da fração diclorometano sobre músculo liso vascular. Esta fração, em análise cromatográfica mostra 11% de cumarina. O relaxamento de anéis de traquéia de rato pela cumarina também é relatado pelos autores em estudo anterior. (SOARES DE MOURA et al., 2002)

O extrato etanólico de *M. laevigata*, avaliado em anéis de traquéia de rato com e sem epitélio (cuja ausência funcional é demonstrada pela incapacidade de relaxamento induzido por bradicinina) produz relaxamento dose-dependente e não relacionado à presença do epitélio. O resultado é interpretado como efeito direto dos ativos sobre canais de potássio da membrana. (GRAÇA et al., 2007)

• Antimicrobiana:

A atividade antibacteriana de extratos e frações de *M. laevigata* e *M. glomerata* avaliada sobre o crescimento *in vitro* e aderência celular à superfície do vidro, de espécies de *S. mutans* (principais agentes etiológicos da cárie dentária), mostram que a fração hexânica apresenta atividade bactericida para *S. sobrinus* e os ativos presentes nas frações hexânicas de ambas as espécies apresentam atividade bacteriostática (ácido caurenóico) e bactericida (ácido cupressênico e ácido diterpênico) para *S. mutans*. (YATSUDA et al., 2005)

• Antiparasitária:

Dentre várias espécies de plantas testadas sobre o crescimento *in vitro*, de formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis* e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, a espécie *M. glomerata* (extrato hidroetanólico) apresenta inibição significativa do crescimento (%) de todas as formas, sendo a mais significativa (97,5±2,6), para a forma amastigota de *L. amazonensis*. (LUIZE et al., 2005)

• Antiespasmódica:

Soluções etanólocas e hidroetanólicas concentradas de *M. glomerata*, obtidas por percolação e por refluxo, testadas *in vitro* em jejuno de rato pré-contraído com acetilcolina e em íleo de porquinho da Índia pré-contraído com histamina, mostram acentuada atividade antiespasmódica dose-dependente, sobretudo para as extrações etanólicas (independente se por percolção ou refluxo). A cumarina, marcadamente presente nos extratos, isoladamente não apresenta ação correspondente. (ABOY et al., 2002)

• Antidiarréica:

O extrato hidroetanólico evaporado e reconstituído com água e administrado a ratos, seguido de carvão vegetal, produz diminuição significativa e dose-dependente do trânsito intestinal (porcentagem da distância percorrida pelo carvão, do jejuno ao ceco), comparável à loperamida. (SALGADO; RONCARI; MOREIRA, 2005)

• Anti-inflamatória:

A fração diclorometano de folhas de *M. glomerata* apresenta atividade antiinflamatória e antialérgica, na pleurite induzida por inoculação de antígenos em ratos, demonstrada pela redução do infiltrado inflamatório consequente à inoculação de antígenos e inibição da degranulação de mastócitos antígeno-induzida. (FIERRO et al., 1999)

• Antiofídica:

Extratos de folhas, caules e raízes de *M. glomerata* apresentam atividade neutralizante *in vitro*, sobre diversos componentes tóxicos, farmacológicos e enzimáticos de venenos dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, mostrando significativa redução da atividade hemorrágica (avaliada pela área de hemorragia subcutânea produzida pela inoculação do veneno) para várias espécies do gênero *Bothrops*; inibição total da coagulação (plasma *in vitro*) para venenos das espécies *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararacussu* e *B. newiedi*, além de neutralização total da atividade da fosfolipase A₂ de *C. durissus terrificus*. Nenhuma modificação no padrão eletroforético dos venenos é detectada após a incubação com os extratos, excluindo degradação protéica como mecanismo de ação potencial. (MAIORANO et al., 2005)

O extrato diclorometano de folhas de *M. glomerata* reduz em 30% o edema de pata de camundongo, produzido pela inoculação do veneno de *Bothrops jararacuçu* (SOARES DE MOURA et al., 2002), enquanto o extrato aquoso por infusão de raízes de *M. glomerata*, reduz em 40% o edema de pata induzido por veneno de *Crotalus durissus terrificus* (MAIORANO et al., 2005).

O extrato etanólico de folhas de *M. laevigata* apresenta proteção significativa contra eteitos miotóxicos, neurotóxicos e inflamatórios de veneno da espécie *Philodryas olfersii*

sobre preparações de nervo frênico-diafragma de camundongo e biventer cervicis de pintinhos. (COLLAÇO et al., 2012)

2.2 Cumarina

Entre as substâncias constituintes das espécies *M. glomerata e M. laevigata*, as publicações apontam a cumarina como constituinte majoritário (BIAVATTI et al., 2004; PEDROSO et al., 2008; BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009), sendo considerada marcador para a espécie, responsável pelo odor adocicado semelhante a baunilha, característico da planta e ao menos em parte, pelas propriedades farmacológicas relatadas.

Além da cumarina são também relatados entre os constituintes, seus precursores, como o ácico orto-cumárico, glicosídeos do ácido 2-hidroxi-cinâmico (melilotosídeos), derivados terpenóides como os ácidos caurenóico, beyerenóico, taraxerol, lupeol, cariofileno, espatulenol, e derivados da degradação da lignina como o siringaldeído, entre outros. (PEDROSO et al., 2008; FERREIRA et al., 2010)

A cumarina (fig. 4) é uma lactona derivada do metabolismo da fenilalanina¹¹, sendo um de seus principais precursores o ácido cinâmico, e formada a partir da ciclização do ácido orto-cumárico. (SOARES, 2002)

A cumarina é composto prevalente em outras espécies de plantas, como no cumaru, (*Dipteryx odorata*) de onde se origina a palavra cumarina, ou no trevo doce (*Melilotus officinalis*) entre outras.

¹¹ A fenilalanina (fig. 4), representa um dos aminoácidos essenciais, não produzidos por mamíferos em quantidade suficiente e obtido através da dieta. É relevante mencionar que constitui substrato para a síntese dos neurotransmissores adrenalina e dopamina, e que a deficiência genética de uma das enzimas dessa via metabólica (fenilalanina hidroxilase), é a causa da fenilcetonúria. O acúmulo da fenilalanina verificado nesta condição é lesivo para o sistema nervoso. A fenilalanina é sintetizada por plantas pela via do ácido chiquímico, sendo neste caso utilizada para a síntese protéica ou metabolizada pela via fenilpropanóide em diversas substâncias com propriedades aleloquímicas; o ácido cinâmico representa o primeiro passo da via fenilpropanóide nas plantas: é formado à partir da deamoniação da L-fenilalanina pela enzima fenilalanina amônia-liase presente nos vegetais (HYUN et al., 2011). O ácido cinâmico é um dos compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza. Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grandes grupos: flavonoides e ácidos fenólicos; estes últimos estão divididos nos que possuem 7 átomos de carbono (C6, C1) ou ácidos benzóicos, e nos que possuem 9 átomos de carbono (C6, C3) ou ácidos cinâmicos. A posição do radical-OH no núcleo benzênico resulta nos ácidos salicílico, gentísico, p-hidroxibenzóico, protocatequínico, vanílico, gálico e siríngico para os ácidos benzoicos; e o-cumárico, m-cumárico, p-cumárico, caféico, ferúlico e sináptico para os ácidos cinâmicos (SOARES, 2002). Estas observações relativas ao metabolismo da fenilalanina feitas de modo conjunto no que diz respeito a mamíferos e plantas são de interesse para este estudo, que avalia em modelo experimental de mamífero, a ação de fármacos de ação adrenérgica e de extratos de M. laevigata, que tem entre seus constituintes o ácido o-cumárico, que como a adrenalina, é derivado do metabolismo da fenilalanina.

Ac. cinâmico Ae. o-cumárico

Genilalanina

OH

OH

OH

OH

OH

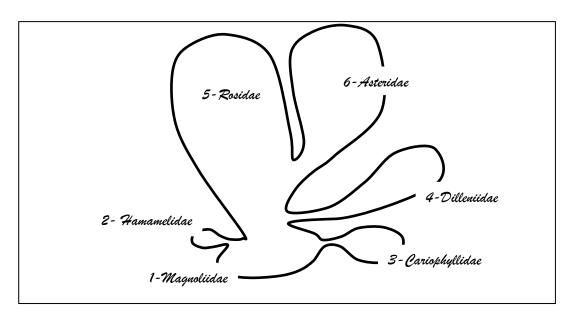
OH

Figura 4- Cumarina e seus principais precursores.

Fonte: Soares (2002). Elaboração própria.

Tanto *Dipteryx odorata* quanto *Melilotus oficinalis* possuem o odor característico da cumarina, sendo o composto prevalente em ambas, que por sua vez pertencem a subclasse Rosidae, ordem Fabales (ver tabela 1). Esta observação tem interesse, quando vista à luz da quimiotaxonomia e de teorias evolucionárias para a classificação de plantas como as propostas por Cronquist (1988), mostrando que as relações entre as subclasses de Magnoliopsida (fig. 5), podem ser compreendidas através da ocorrência do composto em espécies da subclasse Rosidae, que presumidamente deu origem à subclasse Asteridae. As cumarinas simples são compostos prevalentes na maioria das tribos de Asteraceae. (BRANDT, 2003)

Figura 5- Relações evolucionárias presumidas entre as subclasses de dicotiledôneas.



O tamanho dos balões é proporcional ao número de espécies de cada subclasse. Fonte: Cronquist (1988).

A espécie *Melilotus oficinalis*, em torno de 1930 foi causa de intoxicação hemorrágica do gado no norte dos Estados Unidos, e a investigação da causa da doença do gado, resultou no conhecimento das propriedades anticoagulantes do dicumarol (fig. 6), produto da metabolização da cumarina por algumas espécies de fungos. A intoxicação ficou conhecida como doença do feno mofado, o dicumarol foi isolado após seis anos e sintetizado após mais um; a Warfarina¹², um análogo mais potente, foi concebida a princípio como rodenticida e a partir de 1950 passa a ser utilizada para tratamento como anticoagulante. (LINK, 1959)

Mais de 1300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes, muitas delas com propriedades bioquímicas e farmacológicas estudadas, sendo suas aplicações terapêuticas dependentes dos padrões de substituição. Compostos mais complexos baseados no núcleo cumarínico incluem o dicumarol e a warfarina (anticoagulantes), o psoralen e aflatoxina (agentes fotossensibilizantes) entre muitos outros. (HOULT; PAYÁ, 1996)

Além da utilização histórica na perfumaria, algumas propriedades terapêuticas são relatadas especificamente para a cumarina (1,2-benzopirona), como antiedematosa, antilinfedematosa (CASLEY-SMITH; MORGAN; PILLER, 1993; CASLEY-SMITH et al., 1993), anti-inflamatória e antitumoral (HOULT; PAYÁ, 1996). Também para a umbeliferona, (fig. 6) ou 7-hidroxicumarina, (considerado o metabólito ativo da cumarina), composto de ocorrência em várias espécies da família Apiaceae ou Umbelliferae, (subclasse Rosidae, ordem Apiales, ver tab. 1 e fig. 5) como *Daucus carota* e *Coriandrum sativum*, respectivamente cenoura e coentro, são descritas propriedades anti-inflamatórias comparáveis à dexametazona. (VASCONCELOS et al., 2009)

Largamente utilizada como tratamento clínico de doenças vasculares por suas propriedades inferidas a partir de estudos experimentais (BRASIL, 2012b), a cumarina ainda não pode ter confirmadas suas propriedades clínicas em virtude da qualidade dos estudos disponíveis. (BADGER et al., 2008)

¹² WARF corresponde às iniciais de Wisconsin Alumni Research Foundation, subsidiária do laboratório de Karl Paul Link, onde as pesquisas para identificação, isolamento e síntese do dicumarol e warfarina se desenvolveram, a partir da necessidade uma solução para o problema enfrentado pelos produtores de gado da região. (LAST, 2002)

Dicumarol
(3.3' metileno bis 4-hidroxicumarina)

HO

O

O

Umbeliferona (7-hidroxicumarina)

Figura 6- Fórmulas estruturais do dicumarol e umbeliferona.

Fonte: Link (1959); Vasconcelos et al. (2009). Elaboração própria.

2.2.1 Metabolismo da cumarina

A biodisponibilidade no ser humano é baixa (>5%), devido à metabolização présistêmica (*first-pass effect*), com a conversão hepática via CYP450 A6 para o metabólito ativo 7-hidroxicumarina (fig. 6), com meia vida de alguns minutos, seguido de glucuronidação e excreção urinária. A conversão para metabólitos tóxicos (epoxidação) ocorre tanto em roedores como em seres humanos; nestes só ocorre mediante concentrações elevadas do substrato, roedores são mais sensíveis aos efeitos, porém a bioativação hepática da cumarina para os metabólitos tóxicos cumarina-epóxido e hidroxifenilacetaldeído em roedores não é bem compreendida. (BORN et al., 1997)

Há diferenças nas rotas metabólicas entre espécies: após a ingestão de 100mg de cumarina, coelhos excretam 3-hidroxicumarina e 7-hidroxicumarina na urina, enquanto ratos não apresentam nenhum dos dois compostos em quantidades detectáveis. A abertura do anel lactônico da cumarina é descrita para ambas as espécies por rota desconhecida, e demonstrada através da presença na urina, de ácido *o*-hidroxifenilacético após a ingestão – o ácido *o*-cumárico pode participar como intermediário desta via. (BOOTH et al., 1958)

O relato de toxicidade hepática em humanos com a dose de 400mg/dia (MORRISON; WELSBY, 1995), motivou a proibição do uso da cumarina na França e em outros países da Europa. A toxicidade parece estar associada a polimorfismos da via CYP2A6 prevalente em populações da Ásia e sul da Europa. Nestes indivíduos há redução da capacidade de formação da 7-hidroxicumarina com deslocamento para produção dos metabólitos tóxicos cumarina-epóxido e hidroxifenilacetaldeído (AGUILAR et al., 2008). É possível que se trate de pró-

fármaco¹³ (HOULT; PAYÁ, 1996; VASCONCELOS et al., 2009), sendo a 7-hidroxicumarina (fig. 6) o metabólito ativo e presente em algumas espécies vegetais.

2.3 Salbutamol

O salbutamol é um fármaco derivado da saligenina (figuras 1, 2 e 3) com ação relativamente seletiva em receptores β_2 , com pouca ação sobre receptores β_1 do músculo cardíaco. É classificado como amina simpatomimética de núcleo não-catecol, e sua principal indicação é para o tratamento das crises de asma¹⁴ por sua ação relaxante da musculatura lisa brônquica; porém, suas ações não se restringem a esta indicação por razões discutidas adiante.

Utilizado também no tratamento do parto prematuro por sua ação em musculatura lisa uterina (CROMBLEHOLME, 2009), dos estados hiperpotassêmicos da insuficiência renal crônica (MAHONEY et al., 2008) e da paralisia hiperpotassêmica familiar¹⁵ por sua ação hipopotassemiante¹⁶.

A presença prevalente de receptores β_2 em musculatura estriada de humanos (LIGGET; SHAH; CRYER, 1988) e outras espécies animais, bem como o aumento de síntese (PEAREN et al., 2009) com diminuição da degradação protéica associado ao uso de β agonistas (SATO et al., 2011), suportam o potencial anabolizante desta classe de fármacos. Sua utilização experimental em ratos, em doses de 0,3mg/kg determina modificações anatômicas em fibras musculares musculares desnervadas, induzindo hipertrofia com conversão de fibras tipo II para tipo I. (ŠOIĆ-VRANIĆ et al., 2005)

13 Composto que necessita sofrer biotransformação prévia para promover efeito farmacológico.

Doença inflamatória crônica das vias respiratórias caracterizada por responsividade aumentada da árvore traqueobrônquica a uma multiplicidade de estímulos. Clinicamente se manifesta por paroxismos de tosse, chiado e dispneia. Histopatologicamente os achados mais comuns incluem hipertrofia de células globóides, infiltrado inflamatório com eosinófilos, neutrófilos e linfócitos (especialmente linfócitos T), ativação de mastócitos e edema das vias aéreas; espessamento da membrana basal por deposição de colágeno e hipertrofia da musculatura lisa brônquica. Estes achados agravam o aumento da responsividade das vias aéreas, contribuindo com a limitação do fluxo de ar e produzindo os sintomas, incluindo a recorrência dos seus episódios. (CHESTNUTT; MURRAY; PRENDERGAST, 2009)

Doença hereditária associada a anormalidade dos canais de sódio caracterizada por episódios recorrentes de fraqueza muscular nos quais se observa elevação dos níveis séricos de potássio. (VENANCE et al., 2006)

al., 2006)

16 O relato das ações da adrenalina sobre o potássio sérico em estudo experimental *in vivo* com gatos (D'SILVA, 1934), estimulou estudos dedicados a aminas simpatomiméticas e potássio, que corroboraram seu emprego terapêutico.

A utilização veterinária destes fármacos, como produtores de massa muscular no gado de corte (RAMOS; SILVEIRA, 2009), estimulou seu uso indiscriminado entre esportistas com esta finalidade (SILVA et al., 2007). As doses relatadas por usuários em endereços de fisiculturismo na internet são de até 60mg/dia - a dose terapêutica é de 4mg/dia (BRASIL 2012a). São considerados entre as substâncias proibidas pelas organizações desportivas internacionais, figurando entre as 70 prevalentes no "dopping" dos esportes. (WADA, 2012)

2.3.1 Salbutamol - farmacocinética

Quando administrado por via endovenosa tem meia vida de 4 a 6 horas sendo parcialmente depurado pelos rins e parcialmente metabolizado ao inativo 4'-0-sulfato (sulfato fenólico), o qual é excretado principalmente pela urina, a maior parte em 72 horas - as fezes representam via menor de excreção. Por administração oral, é absorvido pelo trato gastrointestinal, sofrendo metabolismo de primeira passagem, com a conversão para sulfato fenólico. Tanto a droga inalterada quanto seu conjugado são excretados principalmente pela urina. A biodisponibilidade é de 50% e a taxa de ligação a proteínas plasmáticas de 10%. (BRASIL, 2007)

2.3.2 Salbutamol - mecanismos de ação

O conhecimento de suas ações deve ser entendido a partir das ações da adrenalina, pois foi idealizado para reproduzir suas ações em receptores-β.

A adrenalina é hormônio produzido pelas glândulas supra-renais, atingindo os tecidos através da circulação sanguínea; também é neurotransmissor, produzido pelas células pós ganglionares simpáticas do sistema nervoso autônomo (SNA), sendo neste caso, liberada localmente nos tecido pelos axônios destes neurônios, através de terminações nervosas livres, em contato com o tecido conjuntivo adjacente. As ações da adrenalina são, portanto, desenvolvidas a partir de mecanismos respectivamente sistêmicos e locais. (BRODAL, 1984; GUYTON, 1984)

No que diz respeito às ações locais, é importante salientar que todos os nervos somáticos de mamíferos são constituídos por uma parcela de fibras provenientes do Sistema Nervoso Autônomo (BRODAL, 1984), portanto, neurônios de transmissão adrenérgica

integram os feixes nervosos para fibras musculares somáticas; apesar do conhecimento de que a liberação sináptica da adrenalina guarda alguma semelhança com a da acetilcolina, (uma vez que é produzida e armazenada em vesículas no terminal, a extrusão das vesículas é dependente da elevação do cálcio, e condicionada à presença de proteínas promotoras da fusão das mesmas ao terminal), a sequência completa não é conhecida (WESTFALL; WESTFALL, 2010).

No que diz respeito à ação sistêmica da adrenalina, toda célula dotada de receptores para esta substância, responde a ela de acordo com as características individuais tanto da célula, quanto do subtipo de receptor adrenérgico presente.

Quando as ações da adrenalina se desenvolvem nos tecidos a partir de sua ligação com os receptores adrenérgicos¹⁷ presentes na membrana celular, o tempo de ação é da ordem de minutos: o neurotransmissor é produzido pelas glândulas supra-renais, liberado na circulação sanguínea, e em seguida destruído pela enzima catecol-orto-metil-transferase (COMT). Quando liberada pelo terminal nervoso, o tempo de ação é da ordem de segundos e seu destino após liberação é a recaptação pelo terminal (50 a 80%), difusão para líquidos vizinhos e destruição no terminal pela enzima mono-amino-oxidase (MAO) (WESTFALL; WESTFALL, 2010). O salbutamol tem sua meia vida mais longa por não representar substrato para metabolização por estas enzimas.

O conjunto destas observações deve ser mantido em mente durante este estudo, pois a ubiquidade das ações da adrenalina deve ser considerada para qualquer tecido estudado; no modelo experimental aqui utilizado, o nervo (frênico), a junção neuromuscular e o músculo estriado estão em tese, sujeitos a suas ações. Estas ações podem ser desenvolvidas tanto a partir de mecanismos locais (quando por meio da junção), quanto sistêmicos (quando a resposta se dá a partir da ligação a receptores presentes na membrana da célula muscular do diafragma).

Os mecanismos de ação são desenvolvidos, ao menos em parte, através do sistema adenilato-ciclase (fig.7).

proteína-G às quais se ligam, não respeitando neste caso a distinção α e β. (MesH, 1973)

¹⁷ O receptor adrenérgico é conceituado como proteína de superfície celular, de alta afinidade a adrenalina/noradrenlina, cuja ligação desencadeia modificações intracelulares. As duas maiores classes de receptores adrenérgicos, α e β, foram originalmente discriminadas com base em suas ações celulares, porém atualmente distinguidas por suas características de afinidade a ligantes sintéticos. Pertencem à classe dos receptores heptahélicos acoplados a proteína-G, podendo ser também classificados de acordo com os subtipos de

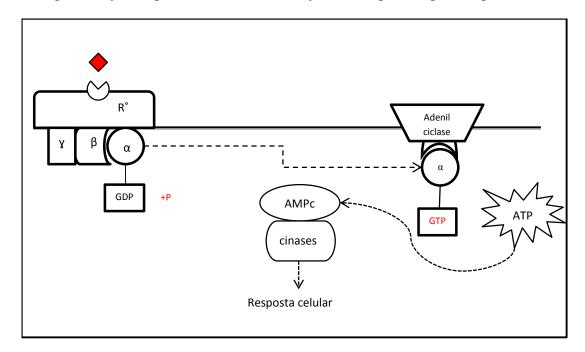


Figura 7- Representação do padrão clássico de ativação de receptor acoplado a proteína-G.

Membrana celular com o receptor (R°) e seu sítio de ligação para o hormônio ou fármaco (representado em vermelho) na superfície celular externa e as três unidades (α, β e Y) de proteína-G na superfície interna, mostrando a fosforilação, destacamento e migração da subunidade α para ativação da enzima Adenil-ciclase seguido da resposta celular por ativação das cinases pelo AMPc. Adaptado de Jack (1991). Elaboração própria.

O processo tem início com a ligação do hormônio (ou fármaco) ao receptor (R°) na superfície extracelular, que catalisa a fosforilação da guanosina difosfato (GDP), acoplada à subunidade α de proteína G^{18} na superfície interna da membrana, com seu consequente

¹⁸ O receptor acoplado a proteína G (GPCR-G-protein-coupled receptor), representa a maior e mais versátil super família de receptores de superfície celular. Consiste em cadeia única de polipeptídeos, que atravessam a membrana celular por 7 vezes e possivelmente evoluíram de receptores sensoriais de ancestrais unicelulares, conservando sua sequência de aminoácidos e também suas relações funcionais com proteínas-G intracelulares com as quais se relacionam para a transmissão da mensagem do ligante extracelular. Tecnicamente a denominação receptor heptahélico seria mais adequada, pois a versatilidade funcional destes receptores inclui relações com outros tipos de proteínas, estabelecendo padrões alternativos de sinalização independentes de sua relação com proteína-G. (ALBERTS et al., 1996; FREDRIKSSON et al., 2003)

Capazes de detectar grande variedade de sinais químicos, (estes sinais podem ser de natureza diversa, como luz, odores, pequenas moléculas difusíveis como aminas, ou proteínas e macromoléculas) de modo altamente seletivo, traduzindo este sinal gerado pela interação receptor-ligante em resposta intracelular primariamente através de interação com a unidade trimérica de proteína-G, embora padrões de sinalização independente sejam descritos; considerados os maiores contribuintes para o fluxo de informação para a célula, e por isto relacionados a múltiplas doenças, o que faz da Família importante alvo farmacológico. (CHEREZOV et al., 2007)

Segundo classificação baseada no genoma humano, estão distribuídos em 5 Famílias, sendo os adrenoceptores pertencentes à maior delas (Rhodopsina) que por sua vez apresenta 5 grupos principais (prostaglandina, melatonina, opsina, amina e MECA- Melatonina, Canabinóide, Adenosina). No grupo das aminas biogênicas, estão locados os receptores serotononérgicos, dopaminérgicos, muscarínicos, histaminérgicos, adrenérgicos, e vários receptores órfãos (cujas ações são desconhecidas). Os receptores β-adrenérgicos encontram-se por razões estruturais agrupados em maior proximidade aos dopaminérgicos; são

destacamento. Esta subunidade fosforilada promove a ativação da enzima adenilato-ciclase da membrana celular, que por sua vez catalisa a desfosforilação da adenosina trifosfato (ATP) para monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O AMPc produz a ativação das cinases intracelulares específicas concluindo assim a resposta celular. (JACK, 1991)

Admite-se que a proteína-cinase A é responsável por todas as ações celulares em músculo estriado, incluindo-se a melhora da resposta contrátil (BUCHANAN; NIELSEN; CLAUSEN, 2002), estimulação de síntese proteica (SATO et al., 2011) e ativação da bomba de sódio e potássio (CLAUSEN, 2003), sendo esta última considerada por outros autores, independente da via do AMPc e por ação direta do fármaco sobre canais iônicos (TORPHY, 1994).

Uma proposta para o papel da bomba em músculo estriado e cardíaco seria que tanto a excitação da fibra muscular (como no exercício, que por sua vez também produz liberação de catecolaminas) quanto catecolaminas ou beta agonistas, aumentem a afinidade da bomba Na-K pelo sódio intracelular, acelerando desta forma a restauração dos gradientes transmembrana de sódio e potássio, protegendo assim a excitabilidade da fibra muscular. A ativação da bomba aumentaria sua contribuição eletrogênica para a restauração do potencial da membrana, preparando a fibra para uma nova contração. (BUCHANAN; NIELSEN; CLAUSEN, 2002)

A proposta de Clausen (2003) para as ações de aminas simpatomiméticas em músculo estriado podem ser observadas no fluxograma da figura 8.

descritos pelo menos 9 subtipos para receptores adrenérgicos. Todos os ligantes para os receptores deste grupo são constituídos por pequenas moléculas de amina com um único anel aromático. (FREDRIKSSON et al., 2003)

A partir de sua clonagem (DIXON et al., 1986), receptores β -adrenérgicos tem representado modelo para estudos de sinalização por ligantes difusíveis, constituem desafio pelas inúmeras possibilidades de sinalização desencadeada pela reação receptor-ligante. Sua importância no panorama de conhecimento atual pode ser medida pelo premio Nobel de química de 2012 concedido a Brian K. Kobilka e Robert J. Lefkowitz pelos estudos sobre GPCR.

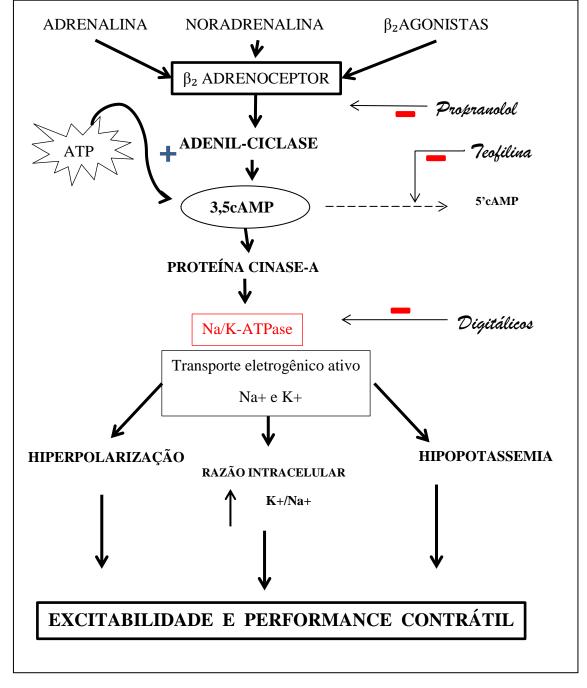


Figura 8- Ações de aminas simpatomiméticas em músculo estriado.

O fluxograma tem início com a ligação do hormônio ou fármaco ao receptor adrenérgico β_2 , com subsequente ativação da enzima adenil-ciclase, que catalisa a partir do ATP a formação do segundo mensageiro AMPc (representado pela cruz em azul), mediador da resposta celular conforme apresentado na fig.7. A resposta celular aqui enfocada consiste na ativação da bomba de sódio e potássio ou enzima Na/K-ATPase, que recolhe o potássio extracelular em troca do sódio que entrou durante a despolarização na razão de 2/3, resultando em hiperpolarização da membrana, aumento da razão intracelular de potássio (por isto atribuise a hipopotassemia), sendo estes fenômenos postulados como responsáveis pela melhora da resposta contrátil da célula muscular. À direita estão representados através de setas com traço em vermelho, a interferência negativa da ação atibuída a fármacos neste processo: o propranolol como inibidor da resposta celular via adenil-ciclase por ação antagonista no

receptor, a teofilina por ação inibidora da fosfodiesterase e consequente elevação do AMPc intracelular e os glicosídeos digitálicos por sua capacidade de ligar-se a subunidade α da bomba de sódio e potássio, inibindo sua função. Fonte: Clausen (2003).

2.4 Propranolol

Em virtude de sua utilização como controle de bloqueio para as ações do salbutamol, serão abordados brevemente aspectos das ações do propranolol.

Potente β-receptor antagonista²⁰ não seletivo, capaz de produzir redução das respostas à estimulação simpática de forma dose dependente em todos os tecidos assim inervados.

Do mesmo modo que o salbutamol suas ações são extensas e incompletamente compreendidas²¹, (sua ação hipotensora principalmente) muitas das quais indesejadas, especialmente a broncoconstrição e a insuficiência cardíaca²².

.

¹⁹ Esta ação inibidora da bomba promovida pelos glicosídios digitálicos, demonstrada por estudos experimentais é reconhecida também para o músculo cardíaco. Pode explicar a ação cronotrópica negativa dos glicosídios digitálicos, (através da redução da excitabilidade do nodo sino-atrial e muito útil no tratamento da fibrilação atrial), mas não a ação melhoradora da resposta contrátil do miocárdio, (ou inotrópica positiva), demonstrada pelo aumento da fração de ejeção sistólica. Esta ação melhoradora da contração, constitui a base da utilização clínica dos digitálicos para o tratamento da insuficiência cardíaca (ROCHA et al., 2006), mas a rigor vai contra o esquema apresentado. O mesmo glicosídio digitálico que inibe a bomba por ação direta, causa melhora da contração miocárdica – isto no mínimo põe em cheque a importância do papel da bomba na melhora da resposta contrátil proposta pelo esquema da fig. 8: demonstra que apesar da inibição da bomba a célula muscular cardíaca encontra outros meios de promover a resposta contrátil; alerta para a complexidade dos mecanismos envolvidos nas ações celulares desenvolvidas a partir de alvos farmacológicos, e expõe a fragilidade dos conhecimentos à respeito dos mecanismos de ação de fármacos, mesmo daqueles com décadas de utilização como é o caso dos digitálicos. Atualmente, a identificação de microdomínios celulares tem despontado como responsável pela grande versatilidade e diversidade das respostas encontradas, e a explicação para a melhora da resposta contrátil do miocárdio produzida por digitálicos, é explicada por trocas do sódio intracelular acumulado pela inibição da bomba, pelo cálcio extracelular, por ação da enzima Na/Ca exchanger (NOX), aumentando a disponibilidade do cálcio para as proteínas contráteis do cardiomiócito, além da ação dos digitálicos sobre canais de cálcio, com aumento da liberação do íon pelo reticulo sarcoplasmático. (TIAN; XIE, 2008)

²⁰ Atualmente o termo agonismo inverso (conceituando ligantes que mostram "eficácia negativa") tem sido preferido a antagonismo em função de conhecimentos sobre os tipos de ligações estabelecidas entre receptor-ligante e das modificações conformacionais resultantes desta ligação com consequências para a ação celular (KENAKIN, 2001). O agonismo inverso é relatado para o propranolol pela redução celular de AMPc produzida pelo fármaco em cultura de células porém, a estimulação de transcrição gênica também é relatada para o fármaco no mesmo estudo, por vias independentes de proteína-G (BAKER; HALL; HILL, 2003) mostrando que sua conceituação como antagonista β-adrenérgico não é suficiente para abrigar suas possibilidades de ação pois pode atuar simultaneamente como agonista e antagonista (ou agonista inverso).

²¹ Sua eficácia clínica observada no tratamento da hipertensão arterial ainda necessita uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em suas ações. A produção de vasoconstrição do leito vascular de músculo esquelético, mediada pelo bloqueio adrenérgico via receptores β₂ é no mínimo contraditória para esta compreensão, tanto que em pacientes com feocromocitoma este bloqueio pode resultar em agravamento da hipertensão. O agravamento das doenças vasculares periféricas produzido por esta ação está relacionado a câimbras desencadeadas por sua utilização nesta condição e é explicado por esta mesma ação sobre o leito vascular esquelético. Do mesmo modo, sua ação antiangina fica difícil de ser explicada somente por suas ações no miocárdio (prevenindo o aumento da atividade cardíaca e aumento da demanda de oxigênio além de reduzir a

Utilizado no tratamento da arritmia cardíaca e da angina pectoris onde se acredita que suas ações se desenvolvem através do bloqueio de receptores β por abolirem as influencias simpáticas para o coração. Além desta ação, reduz o estocamento de cálcio pelo reticulo sarcoplasmático, propondo-se que sua ação depressora da contratilidade miocárdica se de em parte por este mecanismo. (BOWMAN; RAND, 1980)

Sua aplicação clínica no tratamento da hipertensão arterial (BRASIL, 2012a) há mais de 50 anos, longe de ser a única, também pode ser observada no tratamento do feocromocitoma²³, tireotoxicose²⁴ e do tremor essencial²⁵. Seu potencial inibidor da proliferação e angiogênese (MABETA; PEPPER, 2011) e acelerador da apoptose em células cancerosas, demonstrado por estudos in vitro, tem estimulado sua indicação e utilização para o tratamento de vários tipos de câncer. (KOZANOGLU et al., 2013)

Quando administrado oralmente, é quase totalmente convertido através da circulação 4-hidroxipropranolol, atividade portal que tem antagonista β-adrenoceptor aproximadamente igual ao propranolol, diferindo deste por apresentar atividade simpatomimética intrínseca²⁶ (cronotrópica positiva). Quando usado por via intravenosa, a ação se dá pelo pró-fármaco. (FITZGERALD; O'DONNEL, 1971)

2.5 Modelo experimental

O modelo experimental nervo frênico-diafragma de camundongo surge na década de 40, da necessidade de se isolar os fenômenos circulatórios envolvidos na ação da adrenalina para uma melhor compreensão de suas ações, estudada então através de modelos in vivo. Executado anteriormente por Dale e Gaddum em 1930 em diafragma desnervado de gato, teve o êxito comprometido pela falta de oxigenação, que limitava a duração do experimento a poucos minutos em decorrência de fadiga muscular. Edith Bülbring corrige esta falha

força de contração miocárdica), pois o que faria o musculo liso do leito coronariano se comportar de modo diverso do esquelético ou brônquico?

²² O bloqueio de receptores β no coração pode resultar em excessiva bradicardia e nos indivíduos que necessitam da estimulação simpática para manter o débito cardíaco, este bloqueio pode precipitar falência.

²³ Tumor originário das células cromafins do eixo simpático adrenomedular caracterizado pela produção autônoma de catecolaminas.

²⁴ Estado decorrente da produção excessiva de hormônio tireoideano pelas glândulas tireóides.

²⁵ Desordem dos movimentos de expressão genética, relacionada a disfunção cerebelar. (TROIANO et

al., 2004)
Propriedades adicionais de fármacos betabloqueadores, demonstradas pelo aumento da frequência cardíaca em ratos onde se realizou depleção de catecolaminas. (FITZGERALD; O'DONNEL, 1971) O termo agonismo parcial é utilizado para relatar esta ação.

suprindo o sistema com aeração através de mistura contendo 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico; seleciona o rato por considerar a espessura do diafragma desta espécie adequada e verifica que a aplicação de estímulos no nervo a uma frequência de 0,2 Hz (12 por minuto) permite a sobrevivência satisfatória do conjunto por várias horas, além de realizar ensaios farmacológicos com adrenalina, agentes colinérgicos, anticolinesterásicos e curarizantes por meio da adição destas substâncias na solução nutritiva. (BÜLBRING, 1946)

Representa um sistema biológico estanque que permite a avaliação de fenômenos fisiológicos e anatômicos que ocorrem nas estruturas destacadas ou seja, o nervo, a junção neuromuscular e o músculo, livres das interferências dos mecanismos de regulação sistêmica que acontecem nos modelos *in vivo* e muito conveniente para realização de ensaios farmacológicos pela facilidade de sua reprodução.

2.5.1 Junção neuromuscular

É a sinapse entre o nervo motor e a célula muscular esquelética responsável pela tradução química do impulso elétrico proveniente do nervo para o músculo com finalidade de gerar contração muscular. A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor responsável por esta tradução.

Constituída por três partes distintas: o terminal nervoso, também conhecido como componente pré-sináptico; a fenda sináptica ou o espaço entre o terminal nervoso e a célula onde em invaginações da membrana celular se localizam os receptores colinérgicos; e a região pós-sináptica, representada pela porção da membrana celular muscular em contato com o terminal nervoso (HIRCH, 2007). A complexidade de sua arquitetura e dos mecanismos envolvidos na transmissão colinérgica da junção não constituem objetivo deste trabalho, sendo a sequência das etapas da neurotransmissão tratadas resumidamente a seguir (fig. 9).

A transmissão sináptica na junção neuromuscular tem início com a chegada do impulso no terminal nervoso determinando a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes²⁷ presentes no terminal (fig. 9-), com a consequente entrada de íons Ca++.

²⁷ Como a concentração de cálcio livre é 1000 vezes maior no meio extracelular, o fluxo se faz para dentro do terminal nervoso. Íons magnésio tem efeito oposto, inibindo a liberação de ACh, de modo que a liberação de ACh no terminal varia com o grau de despolarização do terminal e com as concentrações de Ca++ e Mg++ no líquido extracelular. (ALBERTS et al., 1994; BOWMAN; RAND, 1980)

Esta elevação da concentração de Ca++ no terminal, desencadeia o ancoramento, fusão e exocitose do conteúdo das vesículas de ACh (fig. 9- 3) ao terminal, por processo dependente de energia (ATP), seguido da liberação da ACh das vesículas na fenda sináptica. A presença de mitocôndrias no terminal fornece esta energia, além de fornecer a molécula de acetilcoenzima A, que na presença da colina formará a ACh em reação catalisada pela enzima colina acetiltransferase. (ALBERTS et al., 1994; WESTFALL; WESTFALL, 2010)

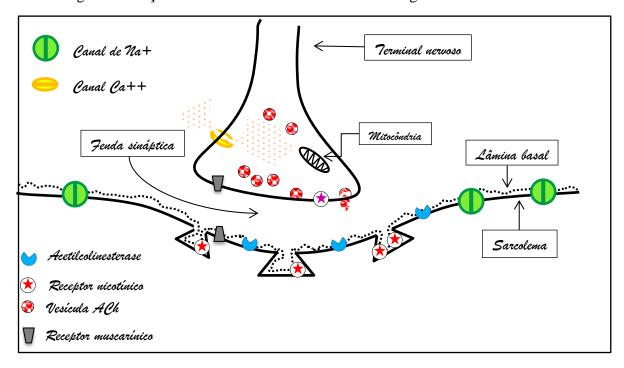


Figura 9- Junção neuromuscular e transmissão colinérgica.

Estão representadas as três partes da junção (terminal nervoso, fenda sináptica e membrana celular da célula muscular (sarcolema). Consultar texto para esclarecimento. Adaptado de Alberts et al. (1994); Hirch (2007); Fagerlung; Eriksson (2009); Westfall; Westfall (2010). Elaboração própria.

²⁸ Esta liberação consiste em sequência complexa e incompletamente compreendida: ACh sintetizada no terminal a partir de acetato e colina é armazenada em vesículas, por processo dependente de energia (há presença de grande quantidade de mitocôndrias no terminal) e as vesículas estão situadas em dois locais do terminal, sendo um deles próximo ao sítio de liberação e outro mais distante (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009). A elevação da concentração de cálcio no terminal é detectada por proteínas especializadas associadas à membrana das vesículas, que medeiam a formação de complexos com proteínas do grupo SNARE (N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor), a saber, sinaptobrevina, sintaxina, SNAP-25 (synaptosome-associated protein), responsáveis pelo ancoramento e fusão das mesmas ao terminal, promovendo então o ancoramento e fusão daquelas situadas próximas ao terminal e subsequente liberação da ACh das vesículas na fenda sináptica. A toxina botulínica digere as proteínas sintaxina e SNAP-25 da membrana plasmática e sinaptobrevina da membrana vesicular, impedindo a fusão das vesículas e consequentemente a liberação da ACh pelo terminal. (WESTFALL; WESTFALL, 2010)

Uma vez liberada na fenda sináptica, a ACh, liga-se ao receptor colinérgico nicotínico²⁹ da JNM (fig. 9 [♠]), cuja estrutura pentamérica formando poro central é adaptada para o influxo de cátions, ³⁰ permitindo este trânsito pelo poro após a ligação com a ACh e resultando em despolarização local. Esta despolarização local, causa então a abertura de canais de sódio ³¹ voltagem-dependentes (fig. 9- [♠]), próximos da fenda, permitindo a entrada de Na+, o que por sua vez causa abertura dos canais vizinhos na membrana sarcoplasmática, resultando em autopropagação do potencial de ação para toda a membrana da célula muscular. Receptores colinérgicos muscarínicos também presentes na membrana da célula (fig. 9 [♠]) desempenham função facilitadora da contração. (ALBERTS et al., 1994; GOODMAN, 2008; WESTFALL; WESTFALL, 2010)

Ao atingir regiões especializadas da membrana sarcoplasmática (túbulos T) onde canais de cálcio voltagem-dependentes são ativados pela onda de despolarização, o Ca++ do reticulo sarcoplasmático é liberado para o citosol e ligando-se então às proteínas contráteis intracelulares determinando os fenômenos de acoplamento e deslizamento da actina e miosina que resultam na contração da célula muscular. (ALBERTS et al., 1994; HIRCH, 2007)

²⁹ O receptor nicotínico colinérgico da JNM é o mais estudado dos receptores e constitui exemplo de canais iônicos controlados por ligantes. Está presente em número elevado na junção (20.000/μm²) e em pouquíssima quantidade em outras regiões do sarcolema (ALBERTS et al., 1994). São conhecidos 17 subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos, e os de representação muscular são pouco diferentes estruturalmente dos de representação no sistema nervoso, sendo estes últimos envolvidos em múltiplas funções no sistema nervoso central como comportamento, memória, cognição, adicção a nicotina; no sistema nervoso periférico, como moduladores da transmissão sináptica na junção, promovendo reforço na despolarização do terminal mediada pela ACh (BOWMAN, 1990), ou como sinalizador de hipoxemia através de quimiorreceptor carotídeo e ainda presentes na membranda de macrófagos, integrando reflexos inflamatórios vagais. (FAGERLUND; ERIKSSON, 2009)

³⁰O receptor colinérgico nicotínico, representados em corte pela figura ao lado, é formado por 5 peptídeos transmembrana, (por isto denominados receptores pentaméricos), dois dos quais idênticos e com sítios de ligação para a ACh (representados em vermelho). As cinco unidades são arranjadas como um conjunto justaposto de 5 cilindros perfurando a camada lipídica da membrana celular, formando um poro na região central por onde atravessam os gradientes iônicos. Nas porções finais dos cilindros, aminoácidos carregados negativamente ajudam a excluir íons carregados negativamente e encorajam a passagem de quaisquer íons positivos menores que 0,65nm para dentro da célula. O tráfego normal consiste principalmente de sódio, potássio e cálcio. A seletividade é pequena ao contrário dos canais de cátions voltagem-dependentes e as contribuições dos cátions para a corrente através do poro são dependentes de suas concentrações e das direções das forças eletroquímicas entre os meios intra e extracelular. A ligação da ACh ao sitio do receptor determina mudança conformacional para abertura do poro central durante 1ms, período em que se dá a passagem dos cátions, seguido de dissociação e hidrólise da ACh pela acetilcolinesterase presente na fenda, com a reversão do receptor ao estado de repouso inicial. (ALBERTS et al., 1994)

³¹ Outros canais iônicos estão envolvidos no processo, sobretudo na restauração do potencial de repouso da membrana, como canais de cloro e de potássio, estes de vários tipos, com características eletrofisiológicas diferentes entre si e com ação específica nas diferentes fases da restauração (GOODMAN, 2008), porém aqui se considera a despolarização de modo simplificado.

Imediatamente após a liberação e ligação ao receptor colinérgico, a ACh é degradada em acetato e colina pela enzima acetilcolinesterase (fig. 9- ♥) presente na membrana da célula muscular, sendo esta última recaptada pelo terminal para nova síntese do neurotransmissor. (GOODMAN, 2008; FAGERLUND; ERIKSSON, 2009; WESTFALL; WESTFALL, 2010)

A ACh tem também ação sobre receptores colinérgicos nicotínicos (fig. 9- ♥) e muscarínicos (fig. 9- ♠), presentes no terminal nervoso (receptores pré-sinápticos), cuja função é modular sua própria liberação, sendo os muscarínicos pertencentes a classe dos GPCR e sua interferência neste tipo de regulação é de caráter inibitório (WESTFALL; WESTFALL, 2010), ao contrário dos receptores nicotínicos do terminal cuja interferência é excitatória, reforçando a transmissão colinérgica na junção, sendo um dos mecanismos a mobilização das vesículas para a extremidade do terminal. (BOWMAN, 1990)

2.5.2 Músculo estriado

Admite-se que todos os músculos estriados possuem todos os tipos de fibras. Nos estágios iniciais do desenvolvimento embriológico, todos os músculos são de contração lenta e a diferenciação se dá em poucas semanas, com variações entre as espécies. A proporção dos tipos de fibras musculares que compõe um músculo, pode sofrer variação num indivíduo ao longo da vida, determinada por vias de sinalização relacionadas ao metabolismo da fibra, que interagindo com fatores genéticos resultam na modificação de sua constituição (BOWMAN, 1990; ZIERATH; HAWLEY, 2004). É relevante mencionar que o salbutamol produz em doses terapêuticas modificações na expressão gênica da célula muscular esquelética em vários genes relacionados a expressão da miostatina (PEAREN et al., 2009), e consequentes modificações estruturais nas fibras, com a reestruturação das mesmas na direção de fibras de contração rápida para de contração lenta. (ŠOIĆ-VRANIĆ et al., 2005; SATO et al., 2011)

A velocidade de contração de um músculo como um todo é dada pela proporção das fibras que o compõem, sendo que nos adaptados para contrações rápidas e potentes como os flexores e extensores superficiais, predominam fibras brancas de contração rápida (ex. tibial anterior, flexor digitorum longo e extensor digitorum longo, gastrocnêmio respectivamente). Músculos adaptados para atividade "econômica", lenta e sustentada como os posturais ou

extensores profundos, são compostos na maioria por fibras vermelhas lentas (ex. soleo e crural). Os adaptados para atividade rápida ou fásica sustentada tem maioria de fibras vermelhas intermediárias (ex. diafragma), sendo que a prevalência de β -receptores varia em relação ao tipo de fibra, sendo maior nas vermelhas e quase ausentes nas brancas; o que se admite relacionar-se ao surgimento de tremor observado quando da utilização de agonistas seletivos β_2 para tratamento clínico de doenças do sistema respiratório (BOWMAN, 1990).

Algumas das características que diferenciam os principais tipos de fibras musculares estriadas estão listados na tabela a seguir:

Tabela 2- Características de fibras musculares estriadas.

CONTRAÇÃO	LENTA	INTERMEDIÁRIA	RÁPIDA	
Twitch – sinonímia do inglês	Slow	Intermediate	Fast Fásica curta	
ADAPTAÇÃO/atividade	Tônica sustentada	Fásica sustentada		
Modelo	EXTENSORES	DIAFRAGMA	FLEXORES	
COR	VERMELHA	ROSADA	BRANCA	
VELOCIDADE CONTRAÇÃO	BAIXA	ALTA	ALTA	
MIOSINA ATPase	BAIXA	ALTA	ALTA	
RESISTÊNCIA A FADIGA	ALTA	INTERMEDIÁRIA	BAIXA	
CAPACIDADE OXIDATIVA	ALTA	ALTA	BAIXA	
ENZIMAS ANAERÓBICAS	BAIXA	INTERMEDIÁRIA	ALTA	
MITOCÔNDRIAS	ALTA	ALTA	BAIXA	
MIOGLOBINA	ALTA	INTERMEDIÁRIA	BAIXA	
GLICOGÊNIO	BAIXA	INTERMEDIÁRIA	ALTA	
INERVAÇÃO (sinapses)	1-2	1	1	
CAPILARES	ALTA	INTERMEDIÁRIA	BAIXA	
FORÇA	BAIXA	INTERMEDIÁRIA	ALTA	
DIÂMETRO	BAIXO	INTERMEDIÁRIO	ALTO	
	Tipo I			
МНС		Tipo II A	Tipo II B	
(myosin heavy chain)	cardíaca β			
POTENCIAL DE AÇÃO	+	+	+	

Fonte: Bowman (1990); Zierath; Hawley (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Realizar protocolos farmacológicos estratégicos visando ao entendimento dos mecanismos de ação do guaco, através de estudo comparativo da atividade dos extratos de diferentes polaridades de *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker com os fármacos salbutamol, propranolol e o fitoquímico comercial cumarina (1-2, benzopirona) em modelo experimental de nervo frênico-diafragma de camundongo, tendo em vista a ação do conjunto dos fármacos e extratos em musculatura estriada.

3.2 Específicos

- Produzir extratos de diferentes polaridades de Mikania laevigata devidamente identificada, a partir de material vegetal obtido junto ao Núcleo de Estudos Ambientais da Universidade de Sorocaba.
- Realizar análise cromatográfica (Cromatografia em Camada Delgada) dos extratos obtidos.
- Realizar ensaios farmacológicos com os fármacos e extratos obtidos, em modelo experimental de nervo frênico-diafragma de camundongo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi obtido no canteiro do Núcleo de Estudos Ambientais da Uniso (NEAS), localizado no campus da Universidade de Sorocaba, na Rodovia Raposo Tavares km 92,5. No herbário permanece guardada a exsicata identificada por B. Loeuille do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo como *Mikania laevigata*.

A coleta foi realizada em maio de 2011, retirando-se folhas frescas a partir do terceiro nó. Estas folhas foram desidratadas em estufa (Marconi®) durante 4 dias a 42°C por meio de circulação de ar. Após a secagem as folhas foram moídas em moinho de facas e martelos (Marconi®), e armazenadas em sacos plásticos de polietileno, protegido da luz, dentro de lata de alumínio, guardada e identificada.

4.2. SOLVENTES E FÁRMACOS

Hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, tolueno, álcool, acetona e ácido acético, Ecibra®. Cumarina, salbutamol, rutina, β-sitosterol e dimetilsulfóxido (DMSO) Sigma®, Propranolol cloridrato BP/USP, origem China, hemitartarato de epinefrina Ariston®. Polietilenoglicol (PEG 400) Synth®.

4.3. EXTRATOS

4.3.1 Extrato Bruto

Empregou-se 130g do pó da droga vegetal para extração por maceração dinâmica, até exaustão, inicialmente com 600ml etanol 50% v/v (preparado a partir do álcool etílico de cana

92,5 INPM). Esta solução macerou por 24 horas, sofreu agitação por 3 horas e ao término desse período foi filtrada. Em seguida foi adicionado mais 500 ml de etanol 50% ao pó da droga vegetal, macerou-se mais 1 hora, agitou-se 3 horas e procedeu-se a segunda filtração. Este procedimento foi repetido até a sexta maceração ativa onde foi observada a exaustão pela reação de fluorescência com solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH) a 5%. Resultou em aproximadamente 3 litros de extrato bruto em etanol 50% ou seja, empregou-se 10 vezes o volume de solvente para a quantidade de droga usada.

O controle da exaustão foi feito pela reação de fluorescência da cumarina em solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH 5%): após cada extração, absorveu-se uma gota do extrato em papel filtro e sobre ela uma gota de hidróxido de potássio para visualização da reação através de luz ultravioleta (365nm).

O extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador Büchi R-215 até eliminação do etanol a 37° C e 70 rotações por minuto (rpm), reduzido a aproximadamente 780ml (redução de aproximadamente 60%). Após evaporação o extrato foi congelado em Cod Lab Ultra Freezer CL 200 – 80V, a -20° C e liofilizado em equipamento Thermo Electron Corporation - ModuloD Freezer Dryer. Este extrato foi designado como EHA.

4.3.2 Extrato Aquoso por Infusão

Foram realizados dois tipos de extratos aquosos por infusão, o infuso 1 (INF1) preparado a 1% m/v, sendo utilizado 1g de pó da droga vegetal em 100ml de água e o infuso 2 (INF2), a 2%, para o qual utilizou-se 2 g de pó da droga vegetal em 100ml de água a 90°C.

O preparo dos infusos 1 e 2 foi realizado por maceração do pó da droga vegetal durante uma hora, em 80ml de água quente em ponto de fervura, em recipiente de vidro tampado com vidro de relógio. Filtrado em papel de filtro e completado para 100ml.

Após resfriamento os mesmos foram congelados em Cod Lab Ultra Freezer CL 200-80V - 20 °C. Após congelamento esses extratos foram liofilizados em equipamento Thermo Electron Corporation - Modulo D Freezer Dryer.

4.3.3 Extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades

Para a obtenção de extratos com solventes de diferentes polaridades foi empregado o método de maceração dinâmica, a partir de 20g do pó da droga. A cada adição de solvente macerava-se por 1 hora e agitava-se com imã em uma chapa magnética sem temperatura, por 30 minutos, ao término do qual a solução era filtrada. Extrações iniciais de 140ml de cada solvente, e sub extrações de 80ml, sequenciais, até observar-se a redução da presença de fenólicos e cumarinas nos extratos, através de monitoramento com reativo de cloreto férrico 2% (a vista desarmada) e solução etanólica de KOH (em 365nm), respectivamente, bem como reação para presença de flavonóides com cloreto de alumínio a 2,5% em metanol, observados por meio de luz UV 365nm. Para esses controles, empregavam-se tiras de papel de filtro com extrato e reagente, sendo preconizada a aplicação de 5 toques.

Assim sucessivamente, foram empregados os solventes em ordem crescente de polaridade: hexano (EH), diclorometano (ED), acetato de etila (EAC) e o metanol (EM).

Todos os extratos foram evaporados em rotaevaporador Büchi R-215 e estocados em dessecador, sob pressão reduzida. A massa dos resíduos foi registrada e calculada as porcentagens dos rendimentos obtidos dos resíduos de cada extrato.

4.4 CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA

A análise cromatográfica foi feita por meio de 5 sistemas, todos ascendentes, sendo o sistema 1 adaptado da Farmacopeia Brasileira, 4ª Edição (BRASIL, 2012c), fases móveis citadas por Wagner; Bladt; Zgainski (1984) e sistema 2, adaptado de Harborne (1998).

Para todos os sistemas, empregaram-se soluções padrões, sendo a presença de cumarina avaliada em comparação com solução padrão de cumarina Sigma a 1% m/v (10mg de padrão/ 1ml de etanol 50%). Para estudo do perfil flavonoídico, empregou-se padrão de rutina Sigma (solução 1% m/v, em etanol 50%), e para perfil terpênico, solução padrão de beta-sitosterol (1% m/v, em hexano).

Para avaliação dos perfis utilizaram-se 3 sistemas de revelação adaptados de Wagner; Bladt; Zgainski (1984). São eles: solução etanólica recém-preparada de hidróxido de potássio (KOH) 10% m/v; solução de NP/PEG (ácido difenilbórico-2-aminoetil-ester 1% em etanol p.a./polietilenoglicol 400 a 5% em etanol p.a) e solução de anisaldeído-sulfúrico (0,5ml de anisaldeído, 10ml de ácido acético glacial, 85ml de metanol e 5ml de ácido sulfúrico) após aplicação, aquecimento da placa a 105°C por 5 min. Além de registros por visualização em ultravioleta 365nm antes de todas as revelações.

Os sistemas cromatográficos foram empregados da seguinte forma (tabela 3):

- Sistema 1: Composto por fase estacionária de sílica gel alugram UV254, espessura de 200μm e fase móvel (120ml) composta por uma mistura de tolueno, diclorometano e acetona (45:25:30). Padrões de cumarina (PC) e beta-sitosterol (PBS). Revelação com os 3 reveladores: KOH, NP/PEG e anisaldeído-sulfúrico.
- Sistema 2: Composto por fase estacionária de sílica gel alugram UV254, espessura de 200μm e fase móvel (120ml) composta por uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2).
 Padrões de cumarina e beta-sitosterol. Revelação com os 3 reveladores: KOH, NP/PEG e anisaldeído-sulfúrico.
- Sistema 3: Composto por fase estacionária de sílica gel alugram UV254, espessura de 200μm e fase móvel (120ml) composta por uma mistura de acetato de etila, ácido fórmico e água Milli-Q (9:1:1). Padrões de cumarina e beta-sitosterol. Revelação com KOH e anisaldeído-sulfúrico.
- Sistema 4: Composto por fase estacionária de sílica gel alugram UV254, espessura de 200μm e fase móvel (120ml) composta por uma mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água Milli-Q (100:11:11:24). Padrões de rutina (PR) e cumarina. Revelação com NP/PEG.
- Sistema 5: Composto por fase estacionária de celulose, sendo empregadas placas Whatman 3mm CHR e fase móvel composta de uma solução de ácido acético a 10% v/v.
 Padrão de cumarina e revelação com solução de KOH.

As amostras ensaiadas em todos os sistemas foram os extratos convenientemente solubilizados: EHA (1% m/v em etanol 70%); INF1 e INF2 (10% m/v em etanol 70%); EH

(1% m/v em hexano); ED (1% m/v em diclorometano); EAC (1% m/v em acetato de etila) e EM (1% m/v em metanol).

Todas as soluções padrões e as amostras foram aplicados através de capilares, efetuando-se 3 aplicações para cada amostra.

Os sistemas cromatográficos realizados foram registrados em fotos das placas antes e após a revelação.

Fase estacionária Sistema		Fase móvel	Revelação	Padrão	
	1	T45:D25:A30	KOH		
Sílica gel	2	H8:AE2	NP/PEG Anisald. Sulf.	PC PBS	
	3	AE9:AcF1:MQ1	KOH Anisald. Sulf.	rbs	
	4	AE100:AcF11:AcA11:MQ24	NP/PEG	PC PR	
Whatman	5	AcA10%v/v	КОН	PC	

Tabela 3- Resumo do planejamento das cromatografias.

legenda 1: T-tolueno, D-diclorometano, A-acetona, H-hexano, AE-acetato de etila, AcF-ácido fórmico, AcA-ácido Acético, MQ-água Milli-Q, PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sitosterol, PR-padrão rutina, KOH-hidróxido de potássio, NP/PEG-ácido difenilbórico-2-aminoetil ester/polietilenoglicol 400.

4.4.1 Análise qualitativa

A análise qualitativa das substâncias foi realizada através do cálculo do seu Rf (retention factor ou fator de retenção, em português) que se determina utilizando a expressão:

$$Rf = \frac{distância (cm,mm) percorrida pela substância}{distância (cm,mm) percorrida pelo eluente}$$

Sendo que a distância percorrida pela substância, mediu-se desde o ponto de aplicação ou ponto de partida da amostra até o centro da mancha, e a distância percorrida pela fase

móvel, desde o ponto de partida até o ponto extremo atingido por ela. (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1993)

4.5 MODELO EXPERIMENTAL

4.5.1 Animais

Os animais utilizados foram camundongos Swiss machos, pesando entre 20 e 30g, fornecidos pelo Biotério da Uniso, onde receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas climatizadas a 25° C em sistema de ventilação e exaustão, umidade controlada em microambiente livre de contaminação. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, editados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, atual SBCAL- Sociedade Brasileira em Ciência de Animal em Laboratório) em junho de 1991, tendo sido aprovado o projeto pela comissão de ética em pesquisa animal da Universidade Federal de São Carlos, sob o número 028/2012 (Anexo A).

4.5.2 Solução de Tyrode

Concentrações (em mM): NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e Glicose-11,1.

4.5.3 A técnica

A técnica utilizada foi a de Bülbring, modificada para camundongos (BÜLBRING, 1946). Os animais foram sacrificados pela secção e sangria dos vasos cervicais, após anestesia inalatória, em recipiente fechado contendo algodão embebido com halotano.

O procedimento cirúrgico foi realizado *post mortem* e consistiu nas seguintes etapas:

• Incisão ventral da pele e subcutâneo do animal desde a região ventral inferior até a região cervical para exposição da caixa torácica e abdome

- Incisão da musculatura abdominal na margem dos últimos arcos costais, secção do esôfago e ligamentos inferiores do diafragma com separação da caixa torácica do abdome
- Abertura da região superior da caixa torácica próximo aos segundos arcos costais para exposição dos nervos frênicos
- Isolamento dos nervos com bastão de vidro para serem amarrados com fio de algodão e em seguida isolados por incisão acima do ponto de amarração
- Retirada dos órgãos intra-torácicos preservando-se os nervos amarrados
- Retirada da caixa torácica por incisão dos arcos costais na proximidade de sua emergência das vértebras em toda a extensão da caixa torácica seguida da incisão da insersão posterior do diafragma, completando assim a liberação da mesma do corpo do animal
- Transferência da caixa torácica para recipiente contendo solução nutritiva de Tyrode aerada onde através de incisão do externo e do diafragma medialmente obtém-se os conjuntos direito e esquerdo de nervo frênico-hemitórax-hemidiafragma ou as preparações
- Amarração da extremidade livre de cada hemidiafragma na região central da linha de secção com fio de algodão, que como se descreve adiante será utilizada para aplicação de tensão no músculo

A seguir cada preparação foi fixada pelos arcos costais em uma cuba de acrílico de volume aproximado de 6ml, contendo 5ml de solução de Tyrode, provida de ganchos de metal na sua base para a fixação; os ganchos são conectados a fios de metal capazes de transmitir estímulos elétricos diretos no músculo. Esta cuba é provida de entrada para aeração e suporte para fixação da mesma, indispensável para aplicação de tensão na preparação (fig. 10).

A aeração se fez com carbogênio (mistura de 95% de O_2 e 5% de CO_2) durante todo o procedimento experimental bem como a temperatura foi mantida em 37°C por meio de imersão do conjunto em banho-maria.

A extremidade livre do diafragma foi tensionada por meio do fio de algodão ao transdutor isométrico e o nervo frênico posto em contato a eletrodo metálico para aplicação de estímulos elétricos nos experimentos por estimulação indireta.

4.5.4 Aparelhos e registros

O músculo foi submetido à tensão constante de 5g e à estimulação direta (músculo-amplitude do estímulo 30mV) e indireta (nervo frênico-amplitude do estímulo 3 mV) gerado por estimulador ESF-15D com 0,2 ms de duração e 0,2 Hz de frequência (12 estímulos por minuto) tanto para estímulo direto quanto para indireto.

O registro da força de contração muscular foi obtido através de transdutor isométrico cat. 7003, acoplado a um fisiógrafo 2-Channel Recorder Gemini cat. 7070 contendo amplificadores Basic Preamplifiers cat. 7080 (Ugo Basile).

O esquema da figura 10 resume as condições necessárias para a execução dos experimentos.

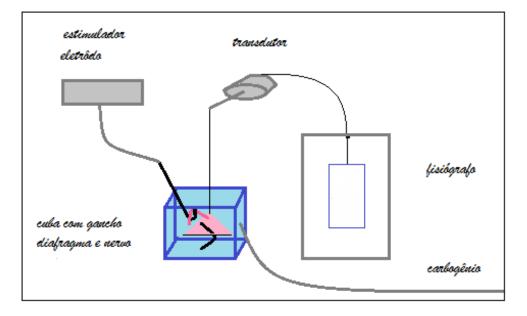


Figura 10- Esquema das conexões da unidade miográfica.

O conjunto de diafragma e nervo frênico (triângulo rosa) é imerso em cuba contendo solução de Tyrode e provida de entrada para aeração (carbogênio) e de ganchos em sua base, onde se fixam os arcos costais do conjunto. A extremidade livre do diafragma é tensionada ao cabo móvel do transdutor por amarração. O estímulo elétrico gerado no estimulador é enviado para o eletrodo que em contato

com o nervo produz a despolarização do mesmo. Uma vez despolarizado, o nervo desencadeia a liberação de ACh na fenda sináptica, como apresentado na figura 9, resultando na contração muscular. A resposta mecânica é transformada, via transdutor isométrico em força de contração, que por sua vez é captada pelo fisiógrafo que registra tais sinais. Este esquema simplificado não mostra os suportes de fixação da cuba ou do eletrodo, nem o banho-maria sobre o qual se assenta a cuba. Elaboração própria.

4.5.5 Delineamento experimental

Os ensaios farmacológicos foram realizados por meio da adição dos fármacos e/ou extratos na solução nutritiva, com a finalidade de se verificar as modificações produzidas pelos ativos farmacológicos no modelo experimental. Para isto, a solubilidade do fármaco na solução de Tyrode é condição indispensável. A cumarina e os extratos de solventes de diferentes polaridades não apresentam boa solubilidade, por este motivo, foi necessária a utilização dos agentes solubilizantes polietilenoglicol (PEG) e dimetilsulfóxido (DMSO). Os demais fármacos e extratos utilizados apresentam boa solubilidade em água.

As concentrações utilizadas para os ensaios com fármacos e extratos foram padronizadas a princípio em 0,5 - 1 - 2,5 - 5mg, porém o rendimento de alguns extratos bem como a ação dos fármacos não permitiu a manutenção desta proposta; a evolução do estudo determinou as concentrações mais interessantes para avaliação.

Para a solubilização dos extratos de solventes de diferentes polaridades, utilizou-se polietilenoglicol 400 (PEG 400) ou dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 3μl/ml e 6μl/ml respectivamente (CINTRA-FRANSCISCHINELLI et al., 2008).

PEG ou polietilenoglicol constitui polímero do etilenoglicol (Fig. 11), não tóxico e não imunogênico, que pode ser identificado pelo número de monômeros constituintes (por exemplo, o PEG 40 terá 40 unidades de etilenoglicol) ou pelo seu peso molecular (este dividido por 44, valor aproximado do peso do monômero, resultará no número de unidades constituintes). Sua consistência varia de acordo com o peso molecular, bem como suas propriedades farmacológicas. (JOKERST et al., 2011)

DMSO ou dimetilsulfóxido constitui pequena molécula anfipática (fig. 11), classificada como solvente (solubilidade polar e apolar) e agente crioprotetor. Pode ser absorvido pela pele ou por ingestão, após o que é amplamente distribuído por tecidos e líquidos corporais. Pode ser eliminado pelas fezes e urina (dimetilsulfóxido e o metabólito dimetilsulfona), pela respiração e pela pele (metabólito dimetilsulfureto), produzindo

característico odor de alho (PUBCHEM, 2012). Apresenta diversas aplicações, farmacêuticas e biotecnológicas, sendo tradicionalmente utilizado como agente crioprotetor, e para promover a penetração de substâncias pela pele. Suas propriedades farmacológicas demonstradas por estudos experimentais, incluem a modificação na estrutura de membranas lipídicas, cuja intensidade varia com as concentrações utilizadas, podendo produzir apenas ondulações na membrana, sem modificação da permeabilidade (concentrações menores que 15%), formação de poros com aumento da permeabilidade da membrana à água e íons (concentrações de até 20%), aumento da permeabilidade a macromoléculas, com consequente perda dos mecanismos reguladores da osmolaridade e surgimento deformações celulares (concentrações maiores que 30%). (MÉNORVAL et al., 2012)

Figura 11- Dimetilsulfóxido, monômero e polímero do etilenoglicol.

$$-s^{\circ}$$
 $+o^{\circ}$
 OH
 R°
 R^{2}
 R°
 R°

Fórmulas estruturais do dimetilsulfóxido, etilenoglicol e polietilenoglicol. No PEG, o terminal R_1 está associado a ligações com moléculas e nanopartículas e o R_2 a interações com o solvente. (JOKERST et al., 2011)

4.5.6 Análise estatística

Os resultados dos ensaios farmacológicos foram expressos como média \pm erro padrão da média. A significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste não pareado t-Student, com valor p<0,05, considerado significante.

5 RESULTADOS

5.1 DROGA VEGETAL

Da coleta das folhas de *M. laevigata*, obteve-se 1,175kg de folhas frescas, que foram desidratadas e moídas. Após secagem e moagem obteve-se 186g de pó da droga para obtenção dos extratos. O rendimento após secagem foi de 15,8% (umidade retirada na proporção de aproximadamente 84%).

5.1.1 Extrato bruto- EHA

A partir de 130g do pó da droga, obteve-se 22,3857g de extrato bruto liofilizado (EHA), o que demonstrou um rendimento de aproximadamente 17%.

5.1.2 Extrato aquoso (INF1 e INF2)

Obtiveram-se 0,1457g de INF1 (14,57%) e 0,2337g de INF2 (11,685%) que foram utilizados tanto na cromatografia em camada delgada, como nos ensaios farmacológicos. Esses rendimentos demonstraram que o uso do dobro da quantidade de droga (INF2) não resultou em acréscimo proporcional de extraíveis. No entanto, salienta-se que no processo de liofilização, a higroscopicidade do liofilizado promoveu perdas na computação final do rendimento, sendo parte do extrato perdido por aderência no frasco de liofilização. De qualquer forma, compreende-se que o rendimento foi aparente e a despeito das perdas, o valor em gramas obtido para INF2 foi utilizado para calcular a restituição da concentração a 2% para a realização de um dos protocolos farmacológicos.

5.1.3 Extratos obtidos com solventes de diferentes polaridades

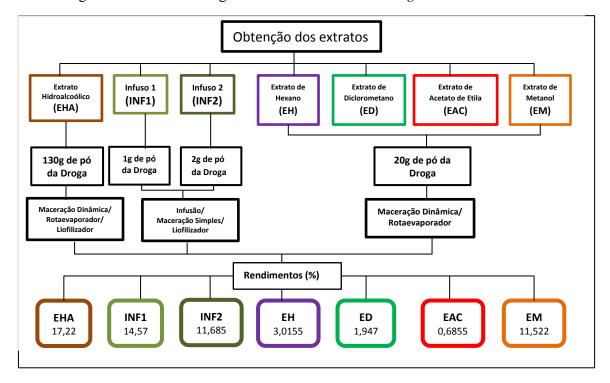
A partir de 20g de droga obteve-se aproximadamente 380ml de extrato de hexano, que após a evaporação do solvente resultou em uma massa de aspecto xaroposo. Em seguida, o solvente residual foi extraído por pressão negativa em dessecador e obteve-se 0,6031g de extrato hexânico, o que demonstrou um rendimento de aproximadamente 3,0155%.

Este procedimento foi repetido para os demais solventes de polaridades crescentes sendo necessárias oito macerações para os extratos de diclorometano, acetato de etila e metanol, que foram evaporados e concentrados à secura. Ao final, para os extratos ED, EAC e EM, obtiveram-se resíduos de 0,3894g, 0,1371g e 2,3044g, com rendimentos de 1,9470%, 0,6855% e 11,5220%, respectivamente. Estes resultados estão sumarizados na tabela 4 e o rendimento geral dos extratos na figura 12.

Massa de Droga	Solventes	Número de etapas extrativas	Volume de solvente por etapa (ml)	Volume total empregado (ml)	Massa do resíduo (g)	Rendimento (%)
ρ0	Hexano	4	140+(3x80)	380	0,6031	3,0155
20	Dicloro-metano	8	140+(7x80)	700	0,3894	1,9470
	Acetato de Etila	8	140+(7x80)	700	0,1371	0,6855
	Metanol	8	140+(7x80)	700	2,3044	11,5220
130g	Álcool	6	-	3000	22,3857	17,22
1g	Água	INF1	-	100	0,1457	14,57
2g		INF2	-	100	0,2337	11,68

Tabela 4- Dados de extração e rendimento dos extratos de M. laevigata.

Figura 12- Rendimento geral dos extratos de M. laevigata.

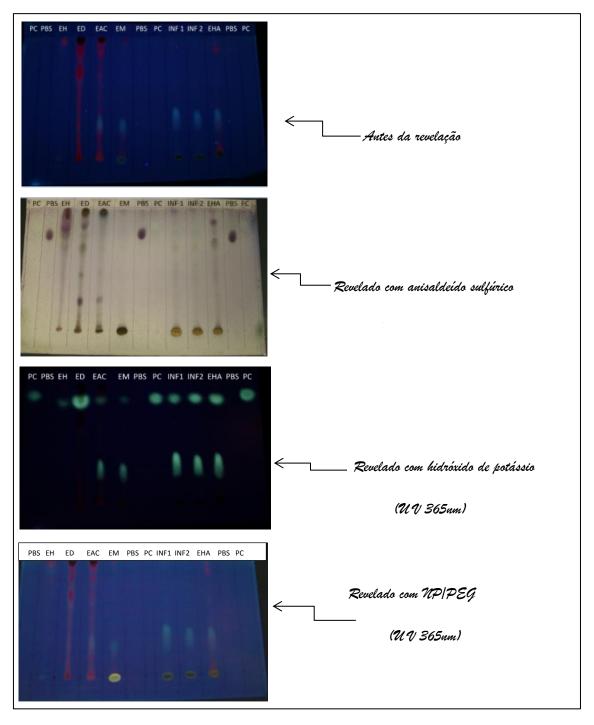


5.2 CROMATOGRAFIAS

5.2.1 Revelações pelo sistema 1

A figura 13 ilustra o perfil cromatográfico dos extratos de *M. laevigata* nas cromatoplacas submetidas ao sistema 1, após revelação com os agentes cromogênicos.

Figura 13- Fotos das cromatoplacas dos extratos de *M. laevigata* reveladas pelo sistema 1.



PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sisosterol, extratos EH, ED, EAC, EM, EHA, INF1 e 2.

A placa revelada com anisaldeído sulfúrico permitiu observar que a cumarina não apresenta nenhum padrão de revelação específico. O padrão de beta-sitosterol mostrou-se violácio, conforme Harborne (1998), sendo que a presença de compostos semelhantemente terpênicos foram observadas principalmente nos extratos EH, ED e muito pouco no EAC (Rf= 0,22) e EHA, com manchas fracas (tabela 5).

Observou-se que o EH apresentou maior expressão das manchas de Rf= 0,83 e 0,73, com formação de rastro na placa, e o ED, mostrou 4 manchas terpênicas, com menor expressão daquelas compatíveis com as do EH.

O EM não mostrou nenhuma mancha expressiva compatível com a presença de terpenos, bem como, o INF1 e INF2. Observou-se que no EH, houve uma mancha de Rf= 0,73 compatível com a do padrão de beta-sitosterol, podendo indicar a presença deste neste extrato e nas folhas de *M. laevigata*.

A placa revelada com KOH permitiu observar a presença da cumarina e do ácido *o*-cumárico nos extratos aquosos (INF1 e INF2) e no extrato bruto (EHA). O extrato de diclorometano não possui ácido *o*-cumárico, mas mostrou a presença marcante da cumarina.

O extrato de hexano não apresentou presença expressiva de cumarina e nem ácido ocumárico, apenas poucas clorofilas, entretanto possui terpenos, como observada na placa
revelada com Anisaldeído sulfúrico, e maior expressão de beta-sitosterol (Rf = 0,75).

Os extratos de acetato de etila e metanol não possuem presença expressiva de cumarina, no entanto apresentam grande quantidade de ácido o-cumárico (Rf= 0,26).

A placa revelada com NP/PEG permitiu observar que o EH não possui expressão de fluorescência, o ED possui resquícios insignificantes entre as clorofilas a aproximadamente Rf= 0,22 e três manchas de clorofila fluorescentes vermelhas em Rf= 0,95; 0,82 e 0,66.

O EAC possui uma mancha de flavonóide, com fluorescência amarela em Rf= 0,24 e uma mancha de clorofila em Rf= 0,95.

O EM não possui clorofilas, no entanto apresenta duas manchas fortes de flavonóides nos Rf= 0,22 e Rf= 0,0 onde uma forte fluorescência laranja ficou no ponto de aplicação, o que indica a provável presença de glicosídeos flavonólicos. Esses flavonóides também foram encontrados no ponto de aplicação dos infusos 1 e 2 e no extrato hidralcoólico. Nos INF1, INF2 e no EHA pode-se visualizar manchas de flavonóides (Rf= 0,37 e 0,33) e ácidos

fenólicos (Rf= 0,69), além dos glicosídeos flavonólicos citados acima. Os dados das cromatografias do sistema 1 podem ser resumidos na tabela 5 e na figura 14.

Tabela 5- Fatores de retenção dos extratos de M. laevigata (sistema 1).

Sistema 1: reveladores	PC	PBS	EH	ED	EAC	EM	INF 1	INF 2	ЕНА
	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88
	-	-	0,83	0,83	-	-	-	-	0,80
Anisaldeído Sulfúrico	-	0,75	0,73	-	-	-	-	-	0,74
Front: 10,2 cm	-	-	-	0,65	-	-	0,62	0,62	0,62
	-	-	-	0,22	0,22	0,22	-	-	-
КОН	0,84	-	0,83	0,81	-	-	0,84	0,84	0,82
Front: 10,2 cm	-	-	-	-	0,26	0,26	0,31	0,31	0,31
_	-	-	-	-	-	-	0,69	0,69	0,69
NP/PEG Front: 10 cm	-	-	-	-	-	-	0,37	0,33	0,33
	-	-	-	0,22	0,24	0,20	-	-	-
	-	-	-	-	-	0,00	-	-	-

PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sitosterol, extratos EH, ED, EAC, EM, INF1, INF2 e EHA.

SISTEMA 1

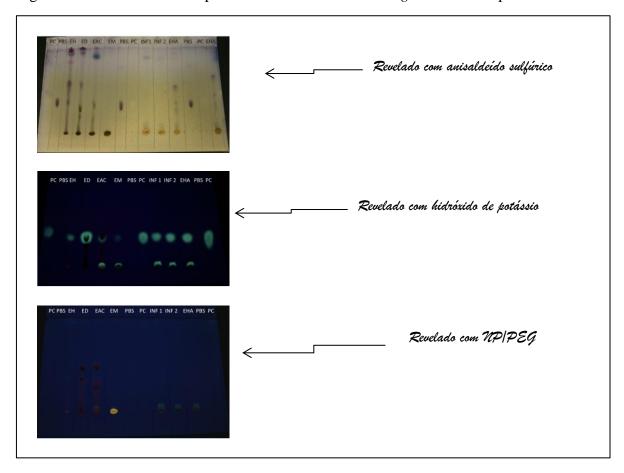
1,0
0,5
0,0
C
BS
H
D
AC
M
11
12
H.A

Figura 14- Fatores de retenção dos extratos de *M. laevigata* (sistema 1).

Cada bastão representa um fator de retenção e as cores dos bastões são representadas de acordo com as intensidades das manchas mostradas pelas placas. Cada sistema de revelação (PEG, ANIS e KOH) é representado por uma cor. C- padrão cumarina, BS- padrão beta-sitosterol, H- extrato hexano, D- extrato diclorometano, AC- extrato acetato de etila, M- extrato metanol, I1- infuso a 1%, I2- infuso a 2%, H.A- extrato hidroalcoólico.

5.2.2 Revelações pelo sistema 2

Figura 15- Fotos das cromatoplacas dos extratos de *M. laevigata* reveladas pelo sistema 2.



PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sisosterol, extratos EH, ED, EAC, EM, EHA, INF1 e 2.

A placa revelada com anisaldeído sulfúrico mostrou de forma mais ampliada o perfil terpênico dos extratos, pela separação das manchas mais isoladamente. Observou-se que as clorofilas ficaram concentradas no ED, com menor quantidade no EAC e em ambas, na metade inferior da placa. Apesar da maior proporção dos tamanhos das manchas terpênicas no extrato EH (tabela sistema 2), 3 destas também se fizeram presentes no extrato ED e apenas uma também presente no EAC, com uma outra, de Rf diferente (0,85).

Os extratos EM, INF1 e INF2 não apresentaram revelação para terpenos, conforme sistema cromatográfico empregado. O extrato EHA apresentou duas manchas muito fracas de Rf= 0,52 e 0,29. Todas as manchas próximas de Rf= 0,30 indicam provável presença de betasitosterol.

A placa revelada com KOH permitiu observar que nos extratos ED, EHA e nos dois infusos há uma presença muito forte de cumarina. Nos extratos de EAC e EH uma fraca presença de cumarina e no EM quase ausência da mesma. Pode-se observar que essa placa não revela outros compostos além de clorofilas visíveis e fluorescentes vermelhas

Também pode ser avaliada a presença do ácido *o*-cumárico, Rf próximo à aplicação (fluorescência) nos extratos de acetato de etila, metanol, hidroalcóolico e nos infusos 1 e 2. Sua presença está de acordo com o sistema 1 nas diferentes amostras.

A placa revelada com NP/PEG mostrou o perfil de presença dos flavonóides, sendo que esses ficaram no ponto de aplicação (fluorescência amarelo-alaranjada), nos extratos EM, INF1, INF2 e EHA. Este sistema foi ineficaz para demonstração deste grupo, sendo sua presença melhor visualizada no sistema 4. Os fatores de retenção encontrados para o sistema 2 nas três revelações estão sumarizados na tabela 6 e na figura 16.

Tabela 6- Fatores de retenção dos extratos de *M. laevigata* (sistema 2).

Reveladores	PC	PBS	EH	ED	EAC	EM	INF 1	INF 2	ЕНА
	-	-	0,95	0,95	0,95	-	-	-	-
Anisaldeído Sulfúrico	-	-	0,90	0,90	0,85	-	-	-	-
Front: 10 cm	-	-	0,52	0,52	-	-	-	-	0,52
	-	-	0,45	-	-	-	-	-	-
	-	0,28/0,30	0,33	-	-	-	-	-	0,29
KOH 10 cm	0,30	-	0,30	0,30	0,30	-	0,30	0,30	0,30
NP/PEG10 cm	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Todos os flavonóides ficaram no ponto de aplicação								1

PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sitosterol, extratos EH, ED, EAC, EM, INF1, INF2 e EHA.

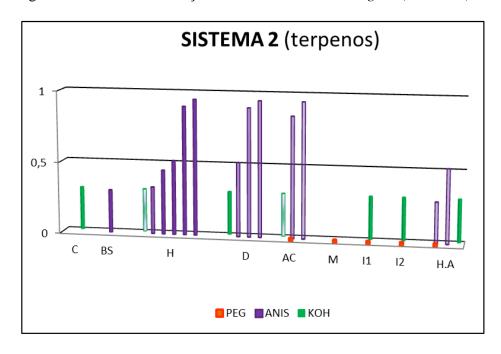
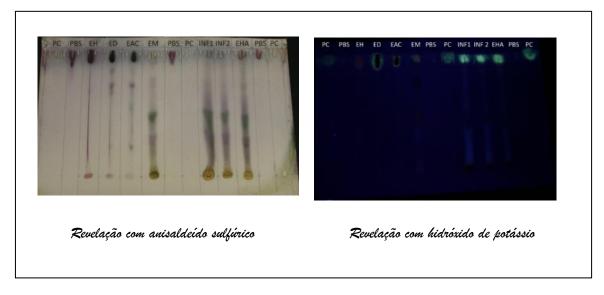


Figura 16- Fatores de retenção dos extratos de *M. laevigata* (sistema 2).

Cada bastão representa um fator de retenção e as cores dos bastões são representadas de acordo com as intensidades das manchas mostradas pelas placas. Cada sistema de revelação (PEG, ANIS E KOH) é representado por uma cor. C- padrão cumarina, BS- padrão beta-sitosterol, H- extrato hexano, D- extrato diclorometano, AC- extrato acetato de etila, M- extrato metanol, I1- infuso a 1%, I2- infuso a 2%, H.A- extrato hidroalcoólico.

5.2.3 Revelações pelo sistema 3

Figura 17- Fotos das cromatoplacas dos extratos de M. laevigata reveladas pelo sistema 3



PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta-sisosterol, extratos EH, ED, EAC, EM, EHA, INF1 e 2.

O Sistema 3 objetivou investigar a presença dos flavonóides nos extratos, indicada pelas fluorescências a 365nm. A revelação com anisaldeído sulfúrico, permitiu verificar que o padrão de beta-sitosterol atingiu o final da corrida, com comportamento mais apolar frente à fase móvel, permitindo-se verificar que os extratos com terpenos (analisados pelo sistema 1 e 2 anteriormente, EH, ED e EAC), também apresentaram mancha compactada no final da corrida.

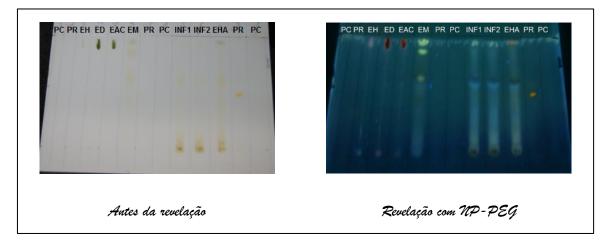
As demais manchas representam provavelmente, compostos fenólicos, mais polares, sendo os extratos EM, INF1 e INF2 e EHA, mais ricos nesses grupos. Deve-se também, verificar que o padrão de cumarina concentrou-se no final da corrida, conforme observado pela fluorescência, em revelação com anisaldeído-sulfúrico. A investigação da presença dos flavonóides foi realizada também pelo sistema 4.

O sistema 3 permitiu verificar o comportamento dos terpenos e derivados cumarínicos, frente aos outros compostos polares dos extratos. Para melhor investigação desses compostos polares, realizou-se o sistema 4.

O sistema 3 revelado com KOH reforça a observação de que os derivados cumarínicos encontraram-se no final da corrida, com as demais fluorescências provavelmente devidas aos outros compostos.

5.2.4 Revelações pelo sistema 4

Figura 18- Fotos das cromatoplacas dos extratos de *M. laevigata* reveladas pelo sistema 4.



PC-padrão cumarina, PR-padrão rutina, extratos EH, ED, EAC, EM, EHA, INF1 e 2.

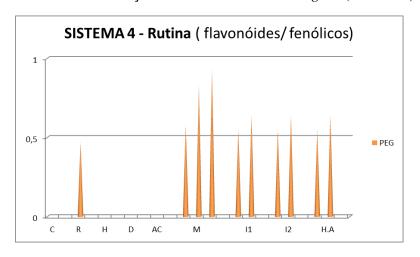
O sistema 4 permitiu a separação dos compostos mais polares de cada extrato, sendo o grupo dos flavonóides investigado em comparação ao padrão de rutina, com fluorescência laranja após revelação com NP/PEG (Figura acima) (Rf= 0,47). Nenhuma mancha expressiva compatível com rutina pode ser observada nos extratos; apenas uma fraquíssima mancha no extrato EHA, pode ser visualizada (difícil verificação na foto). No entanto, fluorescências azuis, compatíveis com ácidos fenólicos (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984), puderam ser registradas nos extratos mais polares, com água: INF1, INF2 e EHA (Rf= 0,55).

O extrato EM, no entanto, apresentou 3 manchas compatíveis com flavonóides de menor grau de glicosilação, pelas fluorescências amarelo brilhantes (Rf= 093; 0,83 e 0,58). (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984)

Sistema 4: PC PR EH ED **EAC** \mathbf{EM} INF I INF 2 **EHA** Revelador 0,93 NP/PEG 0,83 Front: 10,2 cm 0,58 0,64 0,64 0,64 0,47 0,55 0,55 0,55

Tabela 7- Fatores de retenção dos extratos de *M. laevigata* (sistema 4).

Figura 19- Fatores de retenção dos extratos de *M. laevigata* (sistema 4).



C-padrão cumarina, R-padrão rutina, extratos H, D, AC, M, I1, I2, H.A.

5.2.5 Revelação pelo sistema 5

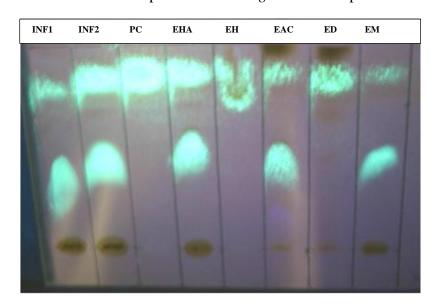


Figura 20- Foto da cromatoplaca de *M. laevigata* revelada pelo sistema 5.

PC- padrão cumarina, extratos INF1, INF2, EHA, EH, EAC, ED e EM.

O sistema 5 emprega papel como fase estacionária e faz-se adequado à separação dos compostos mais polares das amostras e solúveis em água.

Pode-se observar que a cumarina apareceu no terço superior da placa e o derivado de ácido o-cumárico na parte mediana. A presença da cumarina foi investigada pela comparação com o padrão de cumarina e a de ácido *o*-cumárico, mediante informações de literatura, sendo sua presença relatada nos extratos de *M. laevigata* em Rf= 0,45 (SANTOS, 2005). A cumarina apresentou fluorescência verde-amarelada com solução de KOH etanólica (365nm) (SANTOS, 2005; WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). Este sistema permite verificar o comportamento no papel dos derivados cumarínicos, possibilitando futuras investigações por fracionamento preparativo, extraindo-se do papel as manchas desejadas, tanto para ensaios fitoquímicos, quanto biológicos. (HARBORNE, 1998)

Na prospecção fitoquímica realizada por CCD constatou-se a presença da cumarina (1,2-benzopirona), terpenos e flavonóides nos extratos de diferentes polaridades de *M. laevigata*.

Na prospecção fitoquímica para detecção de cumarinas, observou-se no perfil cromatográfico da espécie, a presença de uma mancha fluorescente esverdeada (Rf = 0,31),

provavelmente relacionada ao ácido *o*-cumárico e uma mancha de fluorescência verde, de Rf próximo a 0,80 (Rf = 0,81; 0,82; 0,83 e 0,84) referente à cumarina, relatada na Farmacopéia Brasileira. (BRASIL, 2012c)

Os extratos obtidos com diferentes solventes permitiram a seletividade de extração dos grupos fitoquímicos, sendo a presença de cumarina evidenciada nos extratos preparados com presença de água (INF1, INF2 e EHA), e seletivamente no extrato de diclorometano.

Nos extratos obtidos por diferença de polaridade, pode-se registrar que no extrato de hexano há a presença de terpenos, sendo possível a presença de beta-sitosterol, com resquícios de cumarina e ausência de ácido *o*-cumárico e flavonóides. No extrato de diclorometano a presença de cumarina, com alguns terpenos e ausência de ácido *o*-cumárico e flavonóides. No extrato de acetato de etila a presença de resquícios de cumarina e flavonóides, com a presença do ácido *o*-cumárico e ausência de terpenos e no extrato de metanol semelhante ao EAC quanto a presença dos derivados cumarínicos, com presença de flavonóides, mas ausência de terpenos.

No extrato bruto hidroalcoólico obtido registraram-se as presenças de cumarina, ácido *o*-cumárico e flavonóides, com resquícios de terpenos.

Nos extratos aquosos obtidos, o perfil de INF1 foi igual ao de IINF2, sendo observado neste último, maiores proporções das manchas de cumarina, ácido *o*-cumárico e flavonóides e ausência de terpenos.

Mediante todos os sistemas testados e analisados pode-se verificar a presença majoritária de cumarina, terpenos e flavonóides nos diferentes extratos. As tabelas 8 e 9 esquematizam essas presenças parciais nos extratos.

Tabela 8- Comparação dos grupos fitoquímicos nos extratos de *M. laevigata*.

	PC	PBS	PR	EH	ED	EAC	EM	INF 1	INF 2	ЕНА
Cumarina	+	-	-	+	+++	-	+	++	++	++
Ac. O-cumár.						++	+	+	+	+
Terpenos	-	+	-	+++	++	-	-	-	-	+
Flavonóides	-	-	+	-	-	+	+++	+	+	+

SIST	1	1	2	2	3	4	5
REV	AN	кон	AN	кон	AN	PEG	кон
PC		cumarina		cumarina	cumarina		cumarina
PBS	Bsis		Bsis		Bsis		
EH	Bsis/terp	cumarina	Bsis/terp	cumarina	terp		cumarina
ED	terp	cumarina	terp	cumarina	terp		cumarina
EAC		Cumarina/OC	terp	Cumarina/OC	terp		Cumarina/0c
EM		Cumarina/0c		Cumarina/0c	fenol.	flav	Cumarina/0c
INF 1		Cumarina/		Cumarina/0c	fenol.	flav	Cumarina/0c
		0c					
INF 2		Cumarina/		Cumarina/	fenol.	flav	Cumarina/0c
		0c		Oc .			•

Tabela 9- Presença dos fitoquímicos nos extratos de M. laevigata nos diferentes sistemas.

SIST-sistema, REV-revelador, PC-padrão cumarina, PBS-padrão beta sistosterol, AN-anisaldeído sulfúrico, KOH-hidróxido de potássio, PEG-NP/PEG, Bsis-beta-sitosterol, terp-terpenos, flav- flavonóides, Oc-ácido orto-cumárico, extratos-EH, ED, EAC, EM, INF1, INF2, EHA. O tamanho da fonte e a indicação de negrito relacionam-se à intensidade das manchas observadas nas cromatoplacas.

0c

Cumarina/ fenol.

flav

Cumarina/0c

5.3 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Cumarina/

terp

EHA

Os resultados dos ensaios farmacológicos são apresentados na seguinte ordem: extratos, fármacos e os relacionados entre si. O volume final de Tyrode na cuba, onde foram diluídos extratos e fármacos foi de 5ml para todos os experimentos realizados, de modo que todas as concentrações relatadas devem ser consideradas nesta diluição.

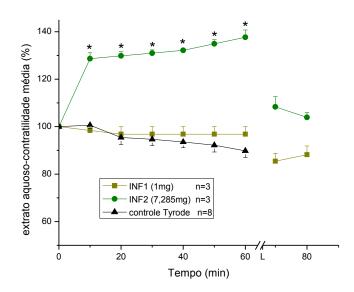
Os controles de solução de Tyrode após a lavagem dos experimentos não estão incluídos nos gráficos apresentados, pois os registros de controle do laboratório foram feitos durante duas horas. Desta forma, os resultados pós-lavagem de todos os experimentos realizados não fizeram parte da análise estatística e foram registrados apenas com a finalidade de demonstrar a integridade funcional da preparação após o término dos experimentos.

5.3.1 EXTRATOS SOLÚVEIS

5.3.1.1 Extrato aquoso (INF1 e 2)

A figura 21 ilustra o perfil farmacológico dos ensaios realizados com os infusos. A concentração de 1mg (INF1) não produziu modificação da resposta, tampouco apresentou diferença significativa em comparação ao controle de Tyrode. A concentração de aproximadamente 7mg utilizada para os experimentos representados pela curva verde escuro no gráfico, corresponde ao valor encontrado para a reconstituição do extrato aquoso liofilizado a 2% (INF2) em 5ml de solução nutritiva de Tyrode, de acordo com o rendimento do extrato liofilizado (tab. 4).

Figura 21- Curva concentração-resposta do extrato aquoso por estímulo indireto.



Cada ponto representa a média \pm erro-padrão da média do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. No eixo horizontal, L corresponde à lavagem da preparação. *p<0,05 em relação ao controle.

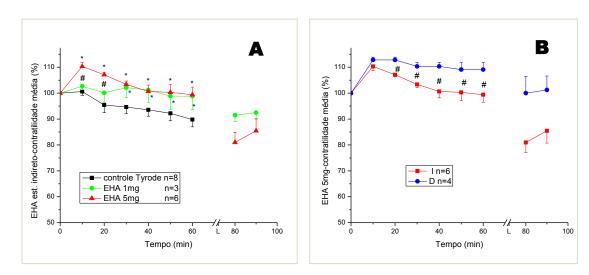
Observe o acentuado efeito facilitador da resposta contrátil representado na curva do INF2 (* p<0,05).

5.3.1.2 Extrato hidroalcoólico (EHA)

A figura 22A mostra a curva concentração-resposta do extrato hidroalcoólico liofilizado (EHA). Ambas as concentrações utilizadas, de 1 e 5mg, apresentaram diferença significativa comparadas ao controle de Tyrode. Comparadas entre si, mostraram diferença significativa nos tempos 10 e 20 por estimulação indireta (#p<0,05).

Analisou-se também a concentração de 5mg por estímulo direto (fig. 22B) que comparada à mesma concentração por estímulo indireto, apresentou diferença significativa #p<0,05).

Figura 22- Curva concentração-resposta do EHA (**A**) e comparação das ações da concentração de 5mg através de estímulo direto e indireto (**B**).



À esquerda (A) curva concentração-resposta do EHA por estímulo indireto com as concentrações de 1 e 5mg. À direita (B) EHA 5mg através de estímulação direta e indireta (D e I na legenda da figura). Cada ponto representa a média ± erro-padrão da média do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. Nos eixos horizontais, L corresponde à lavagem da preparação. */#p<0,05.

5.3.2 EXTRATOS DE SOLVENTES DE POLARIDADE CRESCENTE

Estes extratos foram avaliados apenas por estimulação indireta. A solubilidade dos extratos para a adição nos ensaios não se fez de forma satisfatória com ambos os solventes

(PEG e DMSO), apresentando turvamento da solução ou aderência ao frasco após a adição da solução de Tyrode, com exceção do extrato de metanol, motivo pelo qual há nos ensaios protocolos com o mesmo extrato e solventes diferentes.

5.3.2.1 Extrato hexano (EH)

A fig. 23 ilustra o perfil farmacológico do EH, cuja característica cromatográfica revelou uma pequena expressão de cumarina e maior expressão de terpenos. Os experimentos realizados com a concentração de 0,5mg foram solubilizados com DMSO, enquanto aqueles com concentração de 1 mg solubilizadas com PEG. Estatisticamente houve diferença significativa entre a concentração de 1mg e o controle de Tyrode (p<0,05). A concentração de 0,5mg não apresentou diferença significativa comparada ao controle. Comparadas entre si, as concentrações de 0,5 e 1mg apresentaram diferença significativa (#p<0,05).

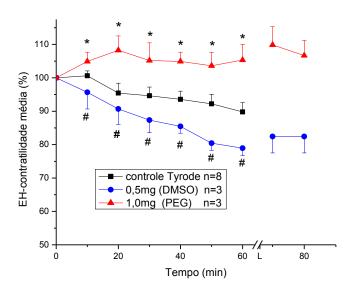


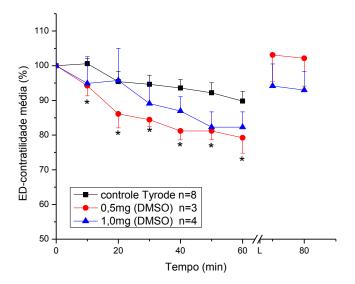
Figura 23- Curva concentração-resposta do EH.

Cada ponto representa a média ± erro-padrão da média. O número de experimentos (n) e o solvente utilizado (PEG e DMSO) são mostrados na legenda da figura. L lavagem. *p<0,05 comparação com controle e #p<0,05 comparação entre os grupos.

5.3.2.2 Extrato diclorometano (ED)

A figura 24 ilustra o perfil farmacológico do extrato diclorometano solublizado em DMSO. A presença de compostos terpenóides foi verificada para este extrato com expressão menor que o EH, entretanto, com elevada expressão de cumarina. Estatisticamente houve diferença significativa entre a concentração de 0,5mg que causou pequeno bloqueio e o controle de Tyrode (p<0,05). A concentração de 1mg não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle ou ainda quando comparada à concentração de 0,5mg. Foi realizado também um conjunto de experimentos com a concentração de 2,5mg do ED, que também não apresentou diferença significativa comparativamente ao controle de Tyrode (resultado não apresentado).

Figura 24- Curva concentração-resposta do ED.



Cada ponto representa a média ± erro-padrão da média do número de experimentos (n) mostrados na legenda da figura. L lavagem. *p<0,05.

5.3.2.3 Extrato acetato de etila (EAC)

As figuras 25 e 26 ilustram o perfil farmacológico do EAC, que pela análise cromatográfica revelou pequena expressão de cumarina e presença marcante do ácido *o*-cumárico.

A figura 25 ilustra a curva concentração-resposta do EAC diluído em PEG para as duas concentrações utilizadas. Comparadas ao controle, a concentração de 0,5mg apresentou diferença significativa (p<0,05) e a de 1mg somente nos tempos 10 e 20.

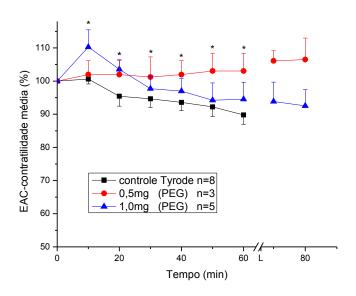


Figura 25- Curva concentração-resposta do EAC

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) e o solvente utilizado (PEG) são mostrados na legenda da figura. L lavagem. *p<0,05.

Realizou-se também com este extrato, um conjunto de experimentos com a concentração de 1mg diluída em DMSO para comparação da ação dos solventes no extrato. Estes experimentos estão representados na figura 26.

Note que a concentração de 1mg do EAC diluída em DMSO mostrou efeito bloqueador e a diluída em PEG efeito facilitador (fig. 26). A análise estatística mostrou

diferença significativa na comparação com controle (*p<0,05) e na comparação entre as diluições da concentração de 1mg em PEG e DMSO (#p<0,05).

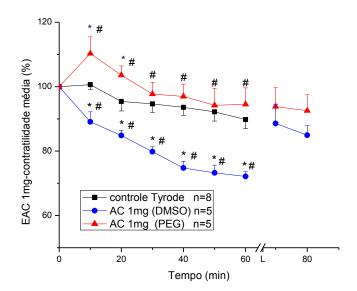


Figura 26- Comparação das ações dos solventes no EAC 1mg.

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos (n) e os solventes utilizados (PEG e DMSO) são mostrados na legenda da figura. L lavagem. (*p<0,05 comparados com controle e #p<0,05 comparação entre os grupos PEG e DMSO).

5.3.2.4 Extrato Metanol (EM)

A figura 27 ilustra a curva concentração-resposta do extrato EM, solubilizado com DMSO em todos os experimentos realizados. Na análise cromatográfica as presenças de ácido *o*-cumárico e de cumarina foram observadas à semelhança do extrato acetato de etila, porém com expressão de flavonóides e fenólicos. A análise estatística revelou diferença significativa apenas entre a concentração de 2,5mg e o controle de Tyrode (*p<0,05). Comparadas entre si, as concentrações de 2,5mg e de 1mg apresentaram diferença significativa (#p<0,05) nos 30 minutos finais

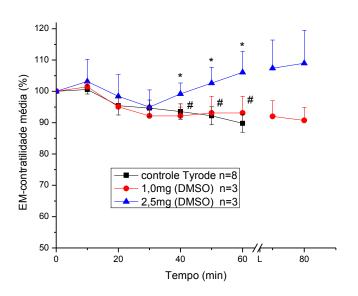


Figura 27- Curva concentração-resposta do EM.

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos (n), o solvente (DMSO) e concentrações utilizadas são mostrados na legenda da figura. L lavagem. *p<0,05 comparados com controle e #p<0,05 comparação entre os grupos de 1 e 2,5mg.

5.3.3 FITOQUÍMICO

A figura 28 ilustra o perfil farmacológico da curva concentração-resposta da cumarina (1,2-benzopirona), que também mostrou dificuldade para diluição, sendo as concentrações de 250 e 500µg solubilizadas em PEG e a concentração de 1mg em DMSO. Pela análise estatística, somente a concentração de 1mg apresentou diferença significativa comparada ao controle de Tyrode.

Note que o fitoquímico cumarina não reproduziu a facilitação observada para aqueles extratos onde sua presença foi detectada pela análise cromatográfica (avaliando-se pela intensidade das manchas, a ordem seria extrato aquoso, hidroalcoólico, diclorometano e metanólico e correlacionando-se à resposta contrátil, o efeito farmacológico segue padrão semelhante). Seu efeito se mostrou inibidor da contratilidade, de modo dose-dependente, sendo a resposta para a concentração de 250µg semelhante ao controle e a de 500µg sem diferença significativa.

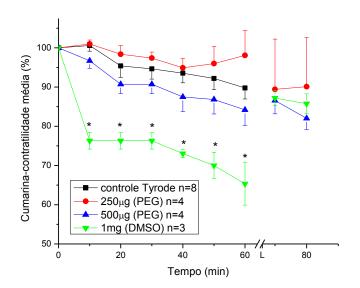


Figura 28- Curva concentração-resposta da cumarina.

Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos (n), os solventes (PEG e DMSO) e concentrações utilizados são mostrados na legenda da figura. L lavagem. *p<0,05.

5.3.4 FÁRMACOS

5.3.4.1 Adrenalina

Como ponto de partida para a demonstração das ações de aminas simpatomiméticas em músculo estriado, realizou-se um conjunto de experimentos através de estimulação indireta com a adrenalina (hemitartarato de epinefrina), na concentração de 200µg. Verifica-se efeito facilitador da contração muscular após a adição do fármaco, significativo em comparação ao controle de Tyrode (p<0,05).

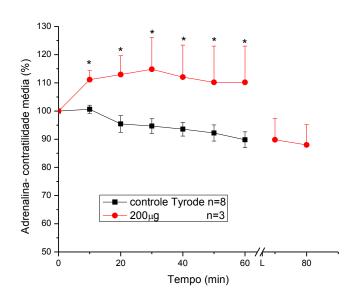


Figura 29- Média dos experimentos realizados com adrenalina.

Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem. *p<0,05.

5.3.4.2 Salbutamol

A figura 30 ilustra a curva concentração-resposta do salbutamol por estimulação indireta. Note um efeito "tudo ou nada" para a ocorrência do bloqueio neuromuscular, que se deu apenas para a concentração de 5mg, provavelmente por saturação do meio, uma vez que após a lavagem (L no eixo horizontal) e suposta retirada da substância houve recobro da resposta contrátil. Quando comparadas ao controle, não houve discriminação de respostas entre as concentrações de 0,1 a 2,5mg, sendo a diferença significativa para todas as concentrações testadas (p<0,05), nas quais se verifica uma leve facilitação da resposta contrátil, em cerca de 10%. Porém, quando comparadas entre si, somente as concentrações de 0,1 e 0,5mg apresentaram diferença significativa; a concentração de 2,5mg não apresentou diferença significativa comparada à de 0,1 ou 0,5mg.

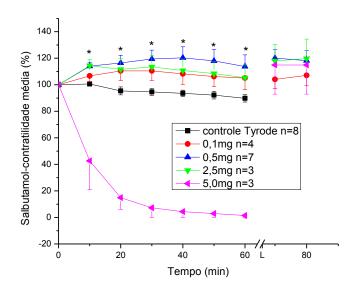


Figura 30- Curva concentração-resposta do salbutamol.

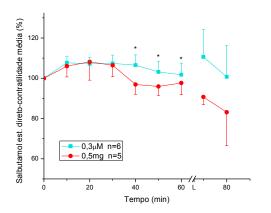
Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos e concentrações utilizadas são mostrados na legenda da figura. L, lavagem. *p<0,05.

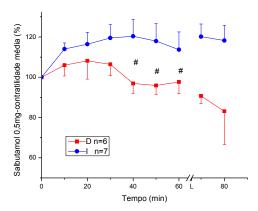
Avaliado também por estímulo direto (fig. 31 esquerda), nas concentrações de 0,5mg (que apresentou melhor desempenho por estimulação indireta como relatado acima) e de 0,3μM (0,07mg) utilizado para os experimentos adiante, apresentou efeito facilitador mesmo para a concentração de 0,3μM (fig. 31 esquerda).

Note a ocorrência do efeito facilitatório (aumento da amplitude da resposta contrátil) também sob estimulo direto, mesmo para a concentração de 0,3µM (fig 31 esquerda).

Sob estimulação direta as concentrações avaliadas de 0,5mg e 0,3μM (70 μg) apresentaram diferença significativa comparadas entre si nos últimos 30 minutos (*p<0,05). A concentração de 0,5mg comparada por estímulo direto e indireto (fig. 31 direita) apresentou esta diferença no mesmo padrão (nos últimos 30 minutos) entre os tipos de estímulo aplicados para esta concentração. (#p<0,05), mostrando tendência a queda da resposta por estimulação direta com a concentração de 0,5mg mas não com a de ~0,07mg (0,3 μM).

Figura 31- Salbutamol estimulação direta (esquerda) e comparação dos estímulos direto e indireto para a concentração de 0,5mg (direita).





À esquerda curva concentração-resposta do salbutamol por estímulo direto com as concentrações e número de experimentos realizados na legenda. À direita a concentração de 0,5 mg avaliada através de estimulação direta e indireta (D e I na legenda do gráfico à direita). Cada ponto representa a média ± erro-padrão da média. L, lavagem. #/*p<0,05.

5.3.4.3 Propranolol

A figura 32 ilustra a curva concentração-resposta do propranolol, um antagonista β-adrenérgico, sob estímulo indireto. Sua ação bloqueadora da resposta contrátil é observada em doses micromolares como demonstrado a seguir.

A concentração de $0.3\mu M$ não apresentou diferença significativa comparada ao controle de Tyrode, a de $0.4\mu M$ apresentou diferença significativa com o controle nos últimos 30 minutos dos exerimentos (*p<0.05). Comparadas entre si as concentrações de $0.3\mu M$ e $0.4\mu M$ apresentaram diferença estatística (#p<0.05).

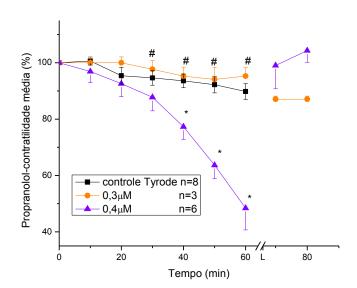


Figura 32- Curva concentração-resposta do propranolol.

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem. *p<0,05 comparado ao controle e #p<0,05 comparação entre os grupos

Nos 20 minutos iniciais de alguns experimentos, observou-se discreto efeito facilitador da contração, com a concentração de 0,4µM que está representado na figura 33:

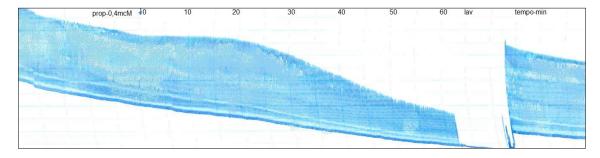


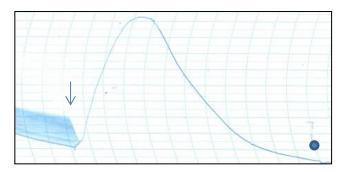
Figura 33- Registro miográfico do propranolol (estímulo indireto-0,4μM).

Registro miográfíco que caracteriza o perfil farmacológico de experimentos com propranolol na concentração de 0,4µM (~120µg), mostrando efeito facilitador inicial nos primeiros 20 minutos após a adição do fármaco (no tempo 0) e seguido de queda da resposta contrátil próximo da média de 50% após 1h. lav-lavagem da preparação.

Concentrações mais elevadas do fármaco produziram efeito bloqueador seguido de contratura e perda da capacidade funcional da preparação. A figura 34 mostra o registro

miográfico do propranolol na concentração de 10µM, na qual se observa que a perda da resposta contrátil é seguida de resposta contraturante. Ao final do experimento não houve recuperação da resposta, denotando uma ação tóxica do fármaco sobre a maquinaria contrátil.

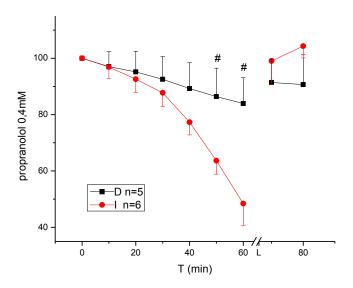
Figura 34- Registro miográfico do propranolol (estímulo indireto-10μM).



O momento de adição do fármaco é indicado pela seta e a lavagem pelo ponto.

O propranolol foi também avaliado por estímulo direto com a concentração de 0,4µM. A figura 35 mostra a média dos experimentos realizados com propranolol com a concentração de 0,4µM por estímulo direto e indireto.

Figura 35- Comparação da ação do propranolol por estímulo direto e indireto.



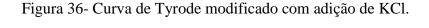
Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos (n) e o tipo de estímulo aplicado (D-direto/I-indireto) são mostrados na legenda da figura. L, lavagem da preparação. (#p<0,05).

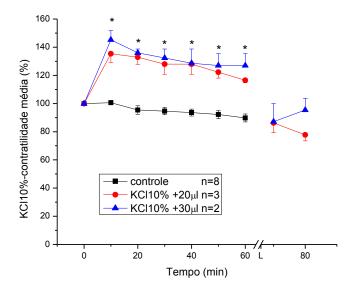
Observa-se redução ou prolongamento do efeito bloqueador do fármaco, de modo significativo nos 20 minutos finais dos experimentos quando comparados àqueles por estímulo indireto (#p<0,05), revelando maior sensibilidade da resposta através da junção para a mesma concentração utilizada.

5.3.4.4 Solução de Tyrode modificada por adição de KCl 10%

Estes experimentos foram realizados por meio da adição de K+ na solução nutritiva. A adição de 20 a 30µl de KCl 10% na solução de Tyrode, resulta em elevação da concentração de K+ na solução padrão, de 2,7 mM para aproximadamente 8,1mM a 10,8mM respectivamente. A adição de 40µl produziu bloqueio imediato da resposta contrátil, com recuperação após lavagem (resultado não mostrado).

Na fig. 36 estão representados os experimentos realizados com estas soluções modificadas. Note a elevação da resposta contrátil após a adição da solução de KCl para as duas concentrações testadas. A análise estatística mostrou diferença significativa com o controle de Tyrode (p<0,05) para as duas concentrações, sem diferenças entre os dois grupos.





Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos e as quantidades adicionadas são mostrados na legenda da figura. L, lavagem. *p<0,05.

5.3.5 EXPERIMENTOS DE DESAFIO

Esta série de experimentos foi realizada com a finalidade de encontrar possíveis influências entre os fármacos e os extratos, tendo em vista as inúmeras possibilidades de ativação de receptores β, dentre as quais se consideram possíveis as simultâneas (CONGREVE et al., 2011). Os experimentos foram feitos por meio da adição/registro do primeiro durante 20 a 40 minutos, seguido da adição do segundo sobre o primeiro, prosseguindo-se o registro com os dois diluídos na solução nutritiva por outros 40 a 60 minutos. Os extratos solúveis foram escolhidos em detrimento dos extratos de diferentes polaridades, pois a necessidade de adição de solventes para utilização dos mesmos no modelo representaria uma variável a mais a ser considerada; dentre os escolhidos (INF1 e EHA), os rendimentos foram considerados para as escolhas quando nos protocolos as concentrações desejadas seriam mais (EHA) ou menos (INF) elevadas.

Foram realizados também experimentos com solução de Tyrode modificada por adição de KCl com salbutamol e propranolol tendo em vista a perda do potássio extracelular durante a contração muscular e o relato das ações de aminas simpatomiméticas sobre o potássio extracelular associadas à redução da potassemia. (BUCHANAN; NIELSEN; CLAUSEN, 2002)

5.3.5.1 Salbutamol x propranolol

Para verificar os efeitos relacionados do salbutamol e propranolol, realizaram-se experimentos com ambos os fármacos em concentrações equivalentes (0,3μM), ou seja: ~70μg de salbutamol, registrando-se sua ação por 40 minutos, e então adicionando ~90μg de propranolol e prosseguindo o registro por outros 40. Os resultados estão representados na figura 37.

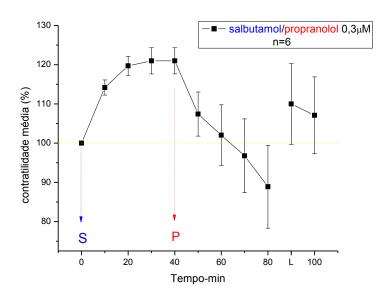


Figura 37- Demonstração da ação bloqueadora do propranolol sobre o salbutamol.

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem. O momento de adição dos fármacos (S-salbutamol e P-propranolol) é indicado pelas setas.

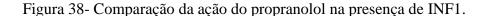
Pode-se notar que o propranolol, que na concentração de 0,3µM não havia mostrado ação bloqueadora (fig. 32), frente ao salbutamol já nos primeiros minutos mostrou sua presença, reduzindo a resposta aos níveis iniciais de contratilidade, neutralizando a ação do salbutamol. Em seguida, apresenta ação bloqueadora não observada com esta concentração quando sozinho, mostrando que sua ação bloqueadora além de sobrepor-se a ação do salbutamol, é potencializada pela presença deste.

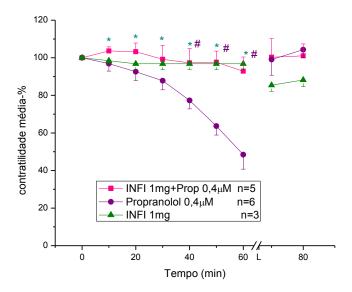
5.3.5.2 Extrato aquoso x propranolol

Com a finalidade de verificar possíveis influências dos extratos sobre o bloqueio do propranolol, tomou-se a concentração de 0,4µM por esta ser a menor concentração do fármaco encontrada para bloqueio como se verifica pela curva dose resposta do propranolol (fig. 32). O extrato INF1 foi escolhido na concentração de 1mg, por ser esta a utilizada para o extrato que não mostrou modificação da resposta no modelo (fig. 21).

Os experimentos representados na fig. 38, mostram a ação de 1mg de INF1 sobre $0.4\mu M$ de propranolol.

Nota-se influência neutralizadora do INF1 sobre o bloqueio do propranolol, pelo prolongamento do tempo de bloqueio do fármaco para a concentração utilizada. A análise estatística mostrou diferença significativa entre ambos os controles (p<0,05).





Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. Experimentos por estímulo indireto realizados com propranolol na concentração de 0,4 μ M na presença de 1mg de INF1. Controle de INF1 1mg (curva em verde) e controle de propranolol 0,4 μ M (curva em roxo). O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem. *p<0.05 comparado com o controle de INF1 e #<0,05 comparado com controle de propranolol 0,4 μ M.

5.3.5.3 Extrato hidroalcoólico x propranolol

A figura 39 ilustra o efeito do propranolol em preparações previamente tratadas com extrato EHA comparativamente ao fármaco sozinho. Para estes experimentos foi escolhida a concentração do EHA com ação facilitadora (fig. 22) e do fármaco com ação bloqueadora (fig. 32).

Pode-se notar pela curva de respostas (fig. 39), que a presença do extrato hidroalcoólico na concentração de 5mg acelera o bloqueio produzido pelo propranolol, e pela análise estatística os experimentos com propranolol em presença de EHA apresentaram diferença significativa quando comparados com o propranolol sozinho (p<0,05).

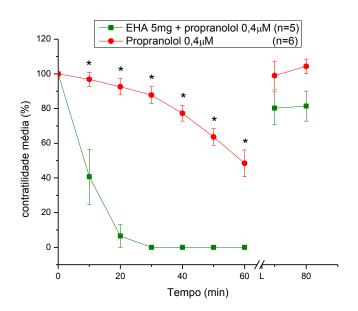


Figura 39- Comparação da ação do propranolol em presença de EHA.

Bloqueio neuromuscular induzido pelo propranolol em presença do extrato hidroalcoólico (em verde) comparativamente ao fármaco sozinho (em vermelho). Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos e concentrações utilizadas são mostrados na legenda da figura. L, lavagem. * p<0,05.

5.3.5.4 Cumarina x propranolol

Sendo a cumarina um dos constituintes majoritários dos extratos solúveis, procurou-se comparar sua ação com a dos extratos, sobre o bloqueio do propranolol, sendo usado o fitoquímico com esta finalidade, uma vez que a extração da cumarina dos extratos não foi realizada; este então foi diluido em DMSO por ter sido o veículo no qual o fitoquímico mostrou melhor solubilidade. A concentração escolhida de cumarina foi como a do extrato aquoso, a que não teve ação no modelo. A figura 40 ilustra a comparação dos experimentos realizados com propranolol 0,4µM em preparações previamente tratadas com cumarina,

solubilizada com DMSO e aqueles com o propranolol sozinho. Pode-se notar que a cumarina não produziu modificação significativa no bloqueio induzido pelo propranolol.

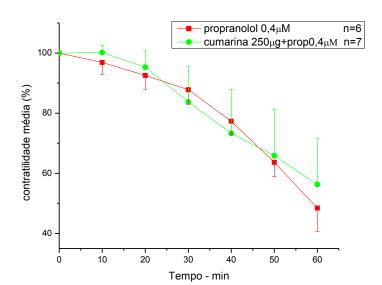


Figura 40- Comparação da ação do propranolol em presença da cumarina.

Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. Experimentos por estímulo indireto realizados com propranolol na concentração de 0,4 μ M sozinho (curva em vermelho) e na presença de cumarina 250 μ g (curva em verde claro). O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem.

5.3.5.5 Salbutamol x cumarina

Para verificar a ação da cumarina sobre o salbutamol utilizou-se a concentração de 0,3 μM e a concentração de 500μg de cumarina (fig. 28). Foi também realizado um conjunto de experimentos no mesmo padrão destes, com a concentração de 100μg de cumarina, que não apresenta efeito sobre o modelo, e o comportamento foi semelhante (resultados não apresentados).

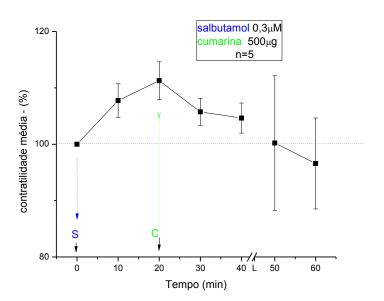


Figura 41- Curva dos experimentos realizados com salbutamol e cumarina.

Cada ponto representa a média ± erro padrão da média. O número de experimentos e as concentrações utilizadas são mostrados na legenda da figura. L, lavagem. O momento de adição dos fármacos (S-salbutamol e C-cumarina) é indicado pelas setas.

Estes experimentos mostram que a presença da cumarina e/ou seu solvente causam pequena redução do efeito facilitador do salbutamol.

5.3.5.6 Salbutamol x extrato hidroalcoólico

Para verificar influências entre o salbutamol e os extratos, realizaram-se experimentos com o salbutamol e o extrato hidroalcoólico, (fig.42) sendo utilizada a concentração de 1mg deste em preparações previamente tratadas com 0,3µM de salbutamol.

Pode-se notar que após a adição do extrato há pequena tendência para a redução da resposta do salbutamol.

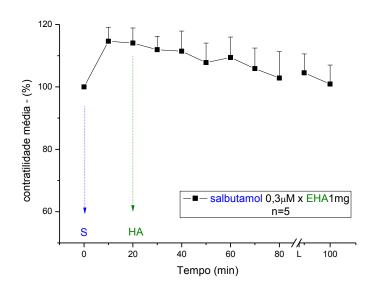


Figura 42- Curva dos experimentos realizados com salbutamol e EHA.

Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos e as concentrações utilizadas são mostrados na legenda da figura. L, lavagem. O momento de adição dos fármacos (S-salbutamol e C-cumarina) é indicado pelas setas.

5.3.5.7 Solução de Tyrode modificado x propranolol

Para estes experimentos, escolheu-se a concentração de propranolol de 0,3μM, que não produziu bloqueio da preparação pela curva concentração-resposta (fig. 32), sendo realizado também um experimento com a concentração de 0,2μM, que mostrou resultado idêntico ao apresentado pela figura 43. A adição de 30μl de KCl à solução de Tyrode padrão eleva a concentração de K+ para aproximadamente 10,8mM na solução nutritiva. Os valores de concentração plasmática e extracelular de K+ para o rato, são relatados muito próximos às de humanos (PETERNUSSO et al., 2009), sendo assumido esta condição para o camundongo neste protocolo. Os valores plasmáticos e intersticiais médios para concentrações de K+ são da ordem de 4,5 e 4mM respectivamente (BOWMAN; RAND, 1980), a toxicidade cardíaca entre 8-12mM (GUYTON, 1984) e nas soluções despolarizantes utilizadas em modelos experimentais de musculo liso, a concentração utilizada é em torno de 60mM.

Note o bloqueio imediato apresentado após a adição do fármaco (fig. 43), e que é recuperado após a lavagem, mostrando influência da elevação da concentração extracelular de

K+ sobre o bloqueio produzido pelo fármaco, que não ocorreu para a concentração de 0,3μM em solução padrão como se observou anteriormente e representado na figura 32.

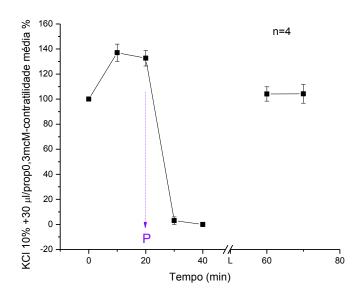


Figura 43- Boqueio do propranolol em solução de Tyrode modificada.

Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média. O número de experimentos é mostrado na legenda da figura. L, lavagem. O momento de adição do fármaco (P-propranolol) é indicado pela seta.

5.3.5.8 Solução de Tyrode modificado x salbutamol

Para verificar a influência da concentração de K+ extracelular sobre as ações do salbutamol realizou-se apenas um registro miográfico do salbutamol (fig. 43) com a concentração de 0,5mg em solução de Tyrode com adição de 30µl de KCl 10%.

Note que o efeito facilitador do fármaco se desenvolve apesar da concentração elevada de K+ no meio nutritivo, além de discreta resposta contraturante verificada pela elevação da linha de base, que cede ao longo do experimento enquanto persiste pequeno efeito facilitador.

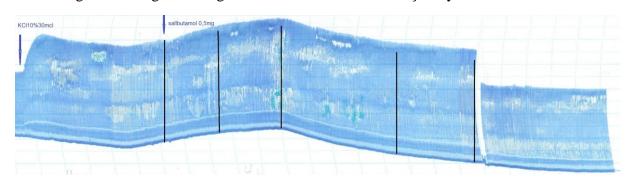


Figura 44- Registro miográfico do salbutamol em solução Tyrode modificada.

As primeira seta indica o momento de adição de KCl e a segunda do salbutamol. As 5 linhas verticais tem a mesma medida, permitindo a avaliação da discreta elevação da resposta contrátil após a adição do fármaco.

5.4 DISCUSSÃO

As folhas das plantas *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*, popularmente conhecidas como guaco, são tradicionalmente utilizadas na forma de extrato, xarope e infusão, no tratamento das afecções respiratórias, especialmente asma, bronquite e tosse (OLIVEIRA et al., 1984), tendo o salbutamol como um dos representantes sintéticos, administrado por via oral ou por inalação para alívio sintomático do broncoespasmo. (BARNES, 2012)

Neste estudo, os efeitos farmacológicos das folhas de *Mikania laevigata*, em diferentes apresentações – infuso (INF1 e INF2), extrato hidroalcoólico (EHA), extrato hexano (EH), extrato diclorometano (ED), extrato acetato de etila (EAC) e extrato metanólico (EM) –, foram avaliados em modelo experimental de musculatura estriada. O fato de seu principal uso medicinal causar o relaxamento em musculatura lisa (constitutiva dos brônquios e traquéia) determinou a comparação com o salbutamol. Em vista da atividade terapêutica do guaco ser atribuída majoritariamente à cumarina, este fitoquímico comercialmente obtido também foi utilizado. Sendo assim, um racional teórico foi se estabelecendo à medida que os estudos avançavam, incluindo o efeito de fármacos clássicos de ação reconhecidamente adrenérgica (salbutamol e adrenalina, β-agonistas ou propranolol, β-antagonista), em musculatura esquelética estriada.

Ao se propor estudo com plantas, todos os procedimentos preconizados nas farmacopéias e/ou literaturas com métodos validados devem ser criteriosamente seguidos, e envolvem etapas desde a coleta do material botânico (período da coleta, partes da planta, se frescas ou secas, secagem, moagem, etc.), obtenção de infusos, extratos, xaropes (dependendo da proposta), separação, até a identificação dos compostos químicos (fitoquímicos) isolados com estudos bioguiados (KROLL; CORDES, 2006). A finalidade é o controle de qualidade e a reprodutibilidade do estudo, principalmente em se tratando de fitoterápicos. As técnicas de padronização utilizam compostos característicos presentes em plantas medicinais como marcadores analíticos, assim como a cumarina presente na *Mikania laevigata*, que no presente estudo, foi extensivamente caracterizada através de cromatografia em camada delgada (CCD).

A prospecção fitoquímica da *M. laevigata* aqui realizada por CCD encontra respaldo com dados da literatura e foram constatadas as presenças de ácido *o*-cumárico, cumarina (1,2-benzopirona), terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos de diferentes polaridades de *M. laevigata*. As presenças de ácido *o*-cumárico, cumarina e terpenos estão de acordo com as descrições feitas por outros autores (OLIVEIRA et al., 1984; SANTOS et al., 1999; MATOS et al., 2004; SANTOS, 2005), bem como a presença de flavonóides (PEDROSO et al., 2008; BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009). Assim, cada extrato influenciou diferentemente na resposta farmacológica obtida e discutida a seguir.

Os extratos solúveis, aqui denominados infusos (INF1 e INF2) e o HA mostraram efeito facilitador acentuado no modelo, sendo que o extrato hidroalcoólico foi também estudado por estímulo direto e mostrou comportamento semelhante porém com diferença significativa entre os estímulos. O fato de, durante a vigência do estímulo direto, tal efeito se manifestar e se manter, mostra que o guaco tem componentes que agem diretamente sobre a fibra muscular, independente da maquinaria contrátil acionada via receptores nicotínicos (estímulo indireto). Alguns fitoquímicos já tiveram este efeito demonstrado, como por exemplo, a teaflavina presente no chá preto da *Camellia sinensis* (BASU et al., 2005); os glicosídeos digitálicos pertencentes aos grupos dos triterpenóides (LI; XIE, 2009) e a betulina e lupenona da *Dipteryx alata* (FERRAZ et al., 2012). Mecanismos envolvendo cálcio e óxido nítrico (teaflavina) e Na,K-ATPase (digitálicos) foram sugeridos nesses estudos, graças ao uso de ferramentas farmacológicas. Neste estudo, o mecanismo de ação não foi aprofundado por se tratar de infuso ou extrato, que cromatograficamente revelou uma gama de grupos tais como cumarina, *o*-cumárico, fenólicos, flavonóides (em INF1 e INF2) e, além desses, mais o grupo terpênico (em EH e EHA). O fugaz efeito facilitador – não mantido em EHA – pode

ser atribuído à presença de terpênicos neste extrato, e não nos infusos, mostrando maior eficiência extrativa para este grupo na mistura água:álcool que a água sozinha, já demonstrada em outros estudos (CELEGHINI; YARIWAKE; LANÇAS, 2007).

O extrato hexânico, que revelou a maior expressão de terpenos, apresentou facilitação significativa da resposta comparado ao controle para a concentração de 1mg diluída em PEG, porém quando diluído em DMSO, o efeito foi oposto para a concentração de 0,5mg. Uma hipótese para este achado curioso, é de que os solventes podem de algum modo interferir no efeito do extrato. A descrição de ação relaxadora do cariofileno em músculo liso de traquéia de rato (PINHO-DA-SILVA et al., 2012) e o relato de sua presença e também de lupeol em folhas de *M. laevigata* (FERREIRA; OLIVEIRA, 2010), podem representar indícios destas presenças neste extrato e responsáveis em parte pela ação do mesmo.

Em relação ao perfil farmacológico dos demais extratos obtidos com solventes de polaridade crescente (EH, ED, EAC e EM), avaliados apenas por estímulo indireto, mostraram comportamento diverso frente ao solvente utilizado para solubilizar o extrato, PEG ou DMSO. A princípio os solventes foram utilizados aleatoriamente, mas a natureza das respostas encontradas (como a do extrato de hexano relatada acima) motivou a investigação de uma mesma concentração com ambos os solventes, o que foi feito para o EAC, permitindo esclarecer esta diferença (fig. 25 e 26). Cintra-Francischinelli et al. (2008) padronizaram a concentração máxima a ser adicionada à cuba contendo a preparação biológica que não causasse alteração da resposta contrátil sendo 15µl e 30µl para PEG e DMSO, respectivamente, o que foi seguido neste estudo. A diferença entre as respostas para a concentração de 1mg do EAC pode, neste caso, encontrar explicação na ação dos solventes sobre o extrato, pois a solubilização com PEG mostrou efeito facilitador e com DMSO, efeito bloqueador; esta divergência de respostas foi observada também com o EH (1mg diluído em PEG-efeito facilitador e 0,5mg diluído em DMSO-efeito bloquedor), porém com o extrato hidroalcoólico esta diferença não foi observada (resultado não apresentado).

Note também, que o extrato diclorometano apresentou efeito bloqueador mais acentuado para a concentração de 0,5mg do que para a de 1mg, e ambas foram diluídas em DMSO. Além disto, somente a concentração de 0,5 mg apresentou diferença significativa comparada com o controle. Este efeito curioso de bloqueio para concentrações menores, que de certo modo foi observado em todos os extratos por solventes de diferentes polaridades, não pôde ser relacionado com solvente para o ED, já que ambas as concentrações foram diluídas

em DMSO. Uma hipótese para esta ocorrência pode ser a perda do equilíbrio do fitocomplexo, além de indicar a presença de substâncias cuja toxicicidade pode ser exacerbada pelo DMSO. De qualquer modo, os extratos de *M. laevigata* merecem estudo mais aprofundado no que diz respeito a suas ações em conjunto com solventes para esclarecimento dos efeitos tão incomuns aqui apresentados.

Em relação ao PEG sabe-se que o mesmo apresenta inúmeras aplicações farmacêuticas e biotecnológicas, sendo de grande interesse seu potencial de estabelecer ligações covalentes com peptídeos, macromoléculas e nanopartículas (PEGylation), modificando as propriedades físico-químicas destas substâncias e melhorando suas propriedades farmacológicas, como melhora da solubilidade, diminuição da imunogenicidade, diminuição da excreção renal da droga, entre outras, viabilizando a utilização de proteínas e macromoléculas com potencial terapêutico para tratamento de doenças crônicas (VERONESE et al., 2008). Aqui, os extratos diluídos em PEG apresentaram de modo geral tendência melhoradora da resposta.

Tanto o PEG quanto DMSO são considerados agentes crioprotetores por modificarem a fase de transição de temperatura em vesículas de fosfolípedes, além de promoverem a fusão das mesmas, sendo por este motivo conhecidos como agentes fusogênicos (BOWMAN, 1990). Há relato da ação de ambos os agentes na promoção da fusão das vesículas de ACh com o terminal nervoso, facilitando a exocitose da ACh na junção neuromuscular. (GERON; MEIRI, 1985)

O fato de as respostas apresentadas pelos EH e EAC diluídos em DMSO terem sido de bloqueio, pode estar associado à possibilidade de o solvente permitir o acesso de substâncias tóxicas presentes nos extratos, que normalmente não atravessariam a camada lipídica da membrana, já que este solvente tem como característica a formação de poros em membranas celulares (MÉNORVAL et al., 2012). Entretanto a concentração aqui utilizada não permite esta afirmação; a avaliação histológica comparativa de preparações submetidas aos efeitos de extratos e solventes poderia auxiliar no esclarecimento desta hipótese.

A interação entre os solventes com o ácido *o*-cumárico (por exemplo EAC/PEG) ou compostos terpênicos (EAC/DMSO e EH/DMSO) pode ser considerada, uma vez que com a cumarina, marcadamente presente nos extratos e avaliada através do fitoquímico comercial, os solventes não interferiram na resposta farmacológica (fig. 28). Em modelo experimental com músculo liso de traquéia de rato há relato de ação relaxadora da musculatura lisa exercida especificamente pela cumarina (SOARES DE MOURA et al., 2002). Aqui, a curva

concentração-resposta da cumarina manteve-se proporcional ao aumento da concentração, que quanto maior causava maior bloqueio. Concentrações menores que as demonstradas na figura 28 não causaram facilitação da resposta contrátil (resultados não mostrados).

O efeito facilitador da contração apresentado pelos extratos, que pode de certo modo ser considerado de modo crescente para os INFII, INFI, EHA, EAC e EM, encontra correlação com a presença do ácido *o*-cumárico, cuja marcada presença foi demonstrada pela análise cromatográfica também em ordem crescente relativamente à intensidade das manchas, dos extratos INFII, INFI, EHA, EAC e EM (fig. 13-revelado com KOH), sugerindo deste modo sua participação nos efeitos farmacológico dos extratos.

Estas observações levantam a necessidade de esclarecimento sobre a importância da participação do ácido *o*-cumárico nos efeitos farmacológicos do guaco, principalmente tendo em vista a proximidade das vias metabólicas envolvidas na sua síntese em vegetais e na síntese da adrenalina em mamíferos: ainda que por vias diversas, ambos são compostos derivados do metabolismo da fenilalanina.

Os ensaios com a adrenalina demonstraram efeito facilitador (aumento da amplitude da resposta contrátil), o que está de acordo com a literatura, pois já lhe foi descrito um efeito pré-juncional com aumento de liberação de ACh, e que exerce um fraco efeito anti-curare. (BOWMAN, 1990)

O salbutamol também apresentou facilitação da resposta contrátil no modelo, à semelhança da adrenalina ou ligante nativo. Esta facilitação se deu tanto por estímulo direto quanto indireto, o que se pode relacionar com ações juncionais e pós-juncionais para as ações do fármaco (figs. 30 e 31). A elevação da concentração de K+ na solução nutritiva não impediu sua ação (fig. 44), o que pode estar relacionado às ações relatadas para o fármaco sobre a melhora da resposta contrátil em musculatura estriada relacionada à redução da potassemia associadas à ativação da enzima Na+K+ATPase. (BUCHANAN; NIELSEN; CLAUSEN, 2002)

O propranolol mostrou antagonismo da resposta contrátil no modelo em doses micromolares (fig. 32), além de leve agonismo parcial representado pelo aumento da resposta contrátil no início dos experimentos (fig. 33). A ação agonista parcial não é relatada para o pro-fármaco (sendo este utilizado para os ensaios) e sim para seu metabólito 4-hidroxipropranolol, para o qual é descrita ação simpatomimética intrínseca no sistema

cardiovascular, e relacionada à ação cronotrópica sobre o coração e não sobre a contração da fibra muscular cardíaca ou inotrópica (FITZGERALD; O'DONNEL, 1971). Porém, o efeito facilitador da contração mostrado pelo pró-fármaco no modelo (fig. 33) foi interpretado como tal ainda que se trate de tecido muscular estriado, pois a complexidade das ações do propranolol, demonstrada pelo seu envolvimento em vias diversas de sinalização celular e sua ação constritora de músculo liso de leito vascular de músculo esquelético (ver notas 20 e 21) suportam esta interpretação. Os mecanismos de ação envolvidos nas ações simpatomiméticas intrínsecas do propranolol não são completamente conhecidos, bem como sua ação hipotensora (BOWMAN; RAND, 1980).

Além disto, concentrações elevadas de propranolol (10μM) empregadas no modelo experimental causaram importante contratura (fig. 34), podendo-se entender deste fenômeno, que a redução do estocamento do cálcio pelo retículo sarcoplasmático, relatada para ação do fármaco (BOWMAN; RAND, 1980) faria num primeiro momento com que estivesse mais disponível para as proteínas contráteis da fibra, talvez uma explicação para seu efeito facilitador inicial e um possível mecanismo adicional para explicar as câimbras observadas algumas vezes na sua utilização para o tratamento da insuficiência vascular periférica (ver nota 21), uma vez que o relaxamento da fibra depende do sequestro do cálcio pelo retículo sarcoplasmático. O fato de após a lavagem não haver recuperação da resposta contrátil foi interpretado como toxicidade potencial do fármaco em altas concentrações para a fibra muscular estiada; apesar de concentrações desta magnitude não serem viáveis *in vivo*, este tipo de resposta não foi observado para o salbutamol, que mesmo em concentrações maiores que esta (~34μM- resultado não mostrado) não causou bloqueio irreversível da preparação.

O bloqueio do propranolol também se mostrou acelerado em solução de Tyrode modificada com excesso de potássio (fig. 36), e neste caso com recuperação da resposta após a retirada do fármaco. Pode-se entender disto que sua ação bloqueadora se desenvolve ao menos em parte através de canais de cálcio voltagem-dependentes como relatado para a fibra muscular cardíaca nas soluções cardiopégicas ricas em potássio (OLIVEIRA et al., 2005), ou na inativação de canais de sódio voltagem-dependentes, porém estudos eletrofisiológicos são necessários para esclarecimento pois é possível o envolvimento de outros tipos de sinalização a partir de gradientes ou de canais iônicos com ação em fases específicas dos potencial de ação e restauração; a elevação da resposta nos limites de concentração observadas pelo estudo é relatada na literatura (BOWMAN; RAND, 1980), e explicada pela facilitação da restauração do potencial de membrana: a elevação do gradiente iônico extracelular do potássio até certos

limites facilitaria seu retorno para dentro da célula, e com isto a restauração do potencial de membrana se dá com mais facilidade, mas a real natureza da interferência na resposta contratil da célula muscular por este mecanismo, não é conhecida. O acúmulo extracelular de potássio acima destes limites está ao contrário, relacionado à despolarização da célula muscular, inativação de canais de sódio voltagem-dependentes (fig. 10) com consequente perda da excitabilidade e da resposta contratil (CLAUSEN, 2011). Contudo dentro destes limites, é possível que a alteração do gradiente iônico do potássio seja favorável à atividade da Na+/K+ATPase, explicando a melhora contrátil observada por este mecanismo, bem como o bloqueio mostrado pelo propranolol em solução de Tyrode com excesso de potássio, por sua ação inibidora da bomba (fig. 8).

Os valores utilizados para a concentração de potássio nos experimentos (fig. 36) dificilmente serão atingidos em condições fisiológicas por estarem nos limites de toxicidade cardíaca (considerando-se ainda que a concentração intersticial de potássio é um pouco menor que a plasmática); porém o efeito facilitador da resposta nos limites aqui utilizados (8,1 a 10,8mM), não é relatado para esta condição em músculo estriado esquelético, e sim a redução da contração (observada no modelo apenas com a concentração de potássio acima de 10,8mM), como a fraqueza muscular, comum na insuficiência renal crônica, onde há elevação da potassemia. A hiperpotassemia, comum nesta condição, é complicação de alto risco pelas consequências na fibra muscular cardíaca, para qual os limites de toxicidade relatados são de concentração plasmática entre 8 e 12 mM (BOWMAN; RAND, 1980) e demonstra que a elevação da potassemia se relaciona à perda da força de contração e não ao seu aumento como observado nos experimentos da fig. 36. De qualquer modo, a elevação da potassemia mostrou influência significativa na resposta contrátil de músculo estriado para as concentrações utilizadas (fig. 36); com respeito ao bloqueio da resposta contrátil induzido pelo propranolol (fig. 43) o aumento da potassemia produziu significativo aumento deste bloqueio para concentrações do fármaco (0,2 e 0,3 µM) que não produziram modificação da resposta quando sozinho. Este fato demontra o risco relatado para seu uso em condições onde a potassemia pode estar elevada como na insuficiência renal crônica.

A ação antagonista do propranolol foi intensificada pela presença do extrato hidroalcoólico (figs. 39 e 46) e sua ação agonista parcial melhor demonstrada quando associado ao extrato aquoso da planta, (figs. 38 e 46) sendo neste caso a interferência apresentada como prolongamento do tempo de bloqueio, de modo significativo quando comparado a sua ação sozinho (figs. 32 e 46). Este fenômeno pode encontrar explicação nas

propriedades de fármacos com ação em adrenoceptores e na natureza das interações³² do fármaco com o receptor, onde a possibilidade de acomodação simultânea de mais de um ligante ao receptor (CONGREVE et al., 2011), pode resultar em modificações na eficácia do ligante, além de mostrar que a conceituação do propranolol, consagrada como de antagonista ou seja, fármaco que impede a ligação de outro ao receptor sem modificar sua atividade basal constitutiva (DEUPI; KOBILKA, 2010) não corresponde à realidade.

O comportamento dos extratos estudados de Mikania laevigata no modelo de músculo estriado estudado frente ao propranolol, (EHA e INF1) sugerem a participação de vias adrenérgicas nas ações da planta. Se por um lado, o bloqueio demonstrado pelo extrato hidroalcoólico sobre o propranolol é de valor discutível, primeiro pela concentração elevada do extrato utilizada, e segundo pela sensibilidade do modelo às ações do propranolol, levando a pensar que muitas outras substâncias provavelmente apresentem este comportamento (a cumarina não apresentou), por outro as prováveis interferências destas mesmas muitas substâncias podem estar implicadas neste tipo de transmissão.

O fitoquímico entretanto não apresentou correspondência para as respostas dos extratos solúveis, e além disto causou interferência na ação do salbutamol (fig. 41), num padrão inicial semelhante àquele apresentado quando o salbutamol e propranolol foram analisados em conjunto em concentrações equimolares (fig. 37); quando o fitoquímico foi analisado em conjunto com o propranolol (fig. 40), não se pode concluir que tenha interferido no bloqueio do fármaco.

O erro crescente observado nestes experimentos (fig. 40-propranolol 0,4µM/cumarina 250µg, T10=2,4; T20=5,7; T30=11,7; T40=14,4; T50=15,7 e T60=15,7 n=7) bem como naqueles com propranolol e salbutamol (fig. 37-salbutamol 0,3 µM/propranolol 0,3µM, T40=3,3; T50=5,6; T60=7,7; T70=9,4 e T80=10,5 n=6), podem estar relacionados a polimorfismos do receptor.

basal constitutivo, (R° na fig. 44) que pode ser modificado pela presença de ligantes levando ao conceito de agonismo de proteus, que teoricamente seria a redução da atividade basal constitutiva do receptor por um ligante.

(KENAKIN, 2001; EVANS et al., 2010; WARNE et al., 2011)

³² Estudos sobre a interação entre receptor-fármaco com respeito a adrenoceptores mostram que ligantes sintéticos podem ativar ou inibir a resposta celular, dependendo dos locais de acomodação do fármaco ao receptor, que pode acontecer de modo diferente entre o ligante nativo e os sintéticos. Entre os ligantes sintéticos esta acomodação também é diferente de um para outro, levando à classificação dos ligantes como agonistas totais, parciais ou antagonistas, caso a resposta celular seja semelhante àquela produzida pelo ligante nativo, reduzida ou inibida respectivamente. Mesmo na ausência do ligante, o receptor se encontra num estado funcional

A interferência bloqueadora do efeito do salbutamol produzida pela cumarina constitui resultado inesperado, pois para ambos é descrita ação relaxadora de musculatura lisa, e ainda que esta ação ocorra por mecanismos diferentes para cada um (já que neste estudo mostratam efeitos diversos), a interferência apresentada indica intersecção de local de ação, possivelmente compartilhado por ambos, sugerindo que a cumarina pode reduzir a eficácia do salbutamol.

Desta forma, as modificações produzidas pelos extratos solúveis e fitoquímico estudados concomitante aos fármacos foram interpretadas como deslocamento das eficácias dos fármacos, e as ações dos extratos (INF1 e EHA) e fitoquímico analisadas por meio dos ensaios apresentados nas figuras 37 a 42, foram interpretadas como ação de agonistas neutros exercida pelos extratos e fitoquímico sobre os fármacos.

Apesar de ainda pouco compreendidas, estas relações entre receptores heptahélicos e ligantes (DEUPI; KOBILKA, 2010) tem ganhado interpretações teóricas que auxiliam na compreensão da diversidade das consequências destas ligações, sendo uma proposta representada pela figura 45.

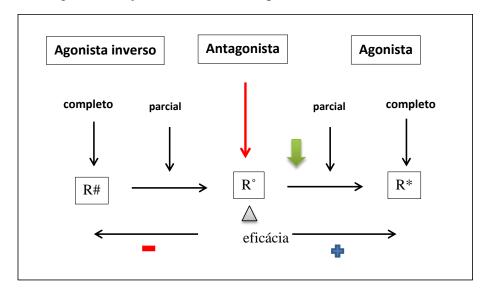


Figura 45- Ações de fármacos via proteína-G.

Relações entre as ações de ligantes a receptor acoplado a proteína-G baseadas em conhecimentos clínicos de vários tipos de fármacos com ação através deste sistema sejam por vias adrenérgicas, histaminérgicas, dopaminérgicas ou serotoninérgicas. R#- receptor em estado constitucional, R°- receptor inativo, R*-receptor ativado. A ligação de um agonista ao receptor desloca a ativação para a conformação R*; um agonista inverso tem alta afinidade pela conformação R#, deslocando a ação para R°, reduzindo a atividade espontânea do receptor; agonistas neutros tem afinidade pelo receptor tanto na conformação R°, quanto R*, e são capazes de bloquear ações tanto de

agonistas como de agonistas inversos (KHILNANI; KHILNANI, 2011). A seta verde representa a ação do segundo ligante deslocando a eficácia do antagonista na direção do agonismo, (agindo como agonista neutro), ilustrando a ação presumida do extrato aquoso sobre o propranolol. Modificado de Khilnani; Khilnani (2011).

A ação relaxadora de musculatura lisa é reconhecida para o salbutamol (WATSON; RICHENS, 1974) e descrita para a planta em modelos experimentais de musculatura lisa de vias aéreas (GRAÇA et al., 2007; NAPIMOGA; YATSUDA, 2010). Há relato na literatura, de que as ações da planta são independentes de β₂-receptores em modelo experimental de músculo liso: o relaxamento produzido pelo extrato hidroalcoólico sobre a contração prévia de anéis de traqueia de porco e de brônquio humano com propranolol se faz de modo dosedependente e foi interpretado como tal (SOARES DE MOURA et al., 2002).

Os resultados aqui apresentados indicam que em musculatura estriada, extratos de M. laevigata interferem nos efeitos de fármacos de ação adrenérgica, e a presença de receptores β_2 , relatada em musculatura estriada permite assumir que estas ações se desenvolvam ao menos em parte através destes receptores, ainda que a diversidade de possibilidades de ações destes fármacos inclua ação em outros sítios celulares.

O painel com as curvas que ilustram os experimentos de desafio com propranolol podem ser avaliados na figura 46, e aqueles para comparação da ação de extratos e desafios com o salbutamol na figura 47.

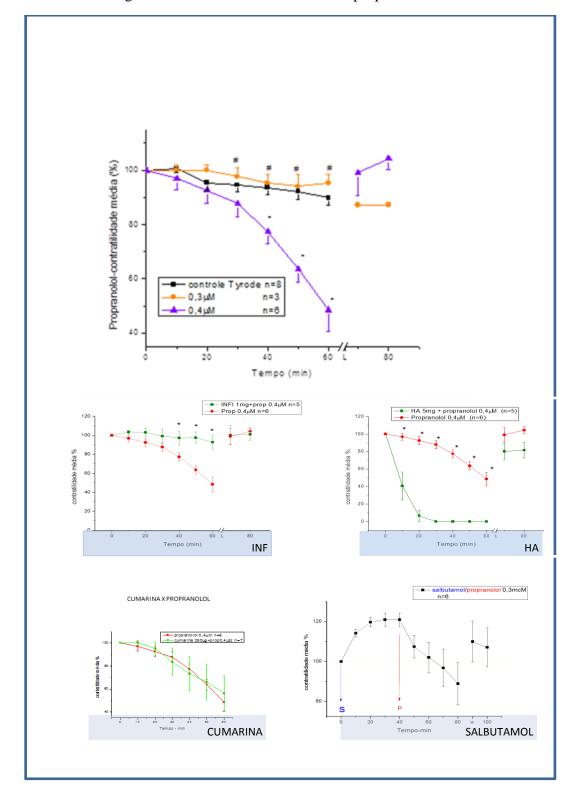


Figura 46- Resumo dos desafios com propranolol.

Composição das figuras 32, 37, 38, 39, e 40 apresentadas nos resultados para a visualização dos efeitos dos extratos (INF1 e EHA), fitoquímico e salbutamol sobre o bloqueio do propranolol.

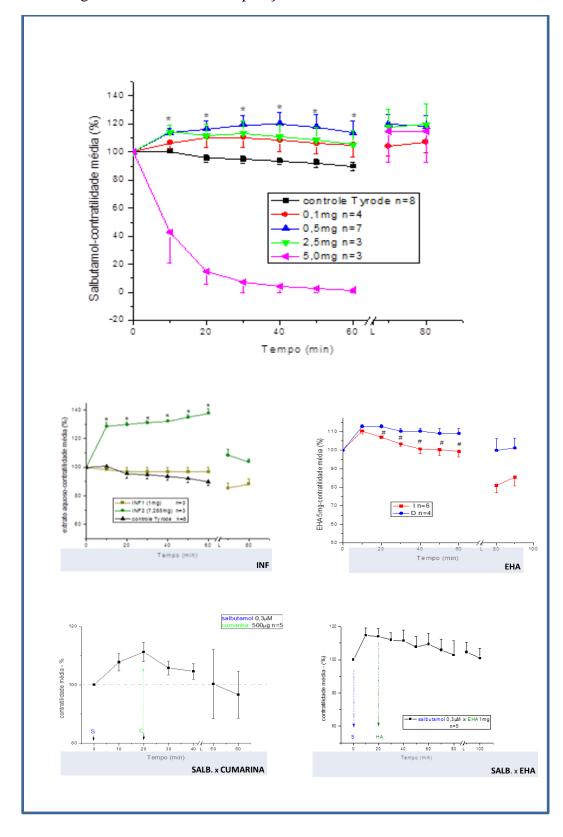


Figura 47- Resumo de comparação e desafios com salbutamol.

Composição das figuras apresentadas nos resultados para visualização da semelhança entre as ações dos extratos e o salbutamol (figuras 21, 22 e 30) e dos efeitos do fármaco sobre o fitoquímico e extrato hidroalcoólico (figuras 41 e 42).

5.4.1 CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

Algumas considerações teóricas, a seguir, serão discutidas para fundamentar a conclusão do estudo.

A relevância do confronto entre estudos por diferentes modelos experimentais está na possibilidade de avaliação das diferentes variáveis e limitações inerentes aos diferentes sistemas que compõem os modelos, além da confirmação da aplicabilidade de informações obtidas através de outras metodologias em sistemas biológicos; e através das semelhanças e diferenças encontradas no comportamento de cada um, obter o reconhecimento de padrão adequado para concordância de todas as variáveis a condições fisiológicas. Neste estudo, utilizou-se modelo experimental de musculatura estriada para a averiguação do efeito de fármacos e extratos cuja ação é reconhecida em musculatura lisa, e pelo menos no caso dos fármacos se dá através de receptores β₂, a variável presente nos dois tipos de tecido.

Apesar das semelhanças estruturais entre receptores β^{33} , as características funcionais dos do músculo estriado podem não ser as mesmas daqueles da musculatura lisa brônquica, porém, o comportamento de fármacos cujas ações são reconhecidas em ambos os tecidos pode trazer alguma luz sobre a complexidade de suas ações. É descrito que a sinalização predominante para um mesmo subtipo pode diferir entre células e órgãos (DEUPI; KOBILKA, 2010), além de que polimorfismos para um mesmo subtipo num mesmo tecido, sejam responsáveis por comportamento diferente frente ao mesmo ligante (JHONSON, 1998) mostrando que a identidade do receptor adrenérgico está de algum modo associada tanto a particularidades de sua estrutura quanto ao tecido de origem (BOLTON; LARGE, 1986), e que os receptores apesar de semelhantes estruturalmente, podem ter comportamento diverso em resposta ao mesmo sinalizador (INSEL et al, 2007). Estas qualidades dos β -receptores devem ser mantidas em mente na avaliação das ações da planta e fármacos em musculatura estriada feita por este estudo.

Acredita-se que evolutivamente estes receptores adaptaram-se para otimizar o maior número possível de contato com ligantes, com grande número de pontos sensíveis a

 $^{^{33}}$ O alto grau de homologia entre diversos subtipos de GPCR parece não encontrar correlação com qualidades funcionais (DEUPI; KOBILKA, 2010). O receptor rodopsina, encontrado na retina de mamíferos é ativado por fótons com, propriedades funcionais muito diferentes (correlaciona-se com proteína- G^t via fosfodiesterase), mas estruturalmente muito semelhante aos β -receptores. (ALBERTS et al., 1994; CHEREZOV et al., 2007)

modificações conformacionais decorrentes desta esta ligação, resultando em possibilidades diferentes de resposta para cada uma delas, e que as diferenças entre as ligações entre agonistas e antagonistas sejam de natureza energética ao invés de topográfica (AMBROSIO et al., 2000). A reatividade desta classe de receptores é tão sensível, que há demonstração da ação funcional de anticorpos anti-receptor-β por estudos *in vitro*, bloqueando o acúmulo de AMPc e consequente redução de atividade cronotrópica positiva em cardiomiócitos (PETER et al., 2003), além do relato de que as ações entre isômeros de um mesmo fármaco (salbutamol) em modelo de musculatura lisa brônquica pode variar de tal modo, que seus isômeros purificados podem desempenhar função antagonista ou agonista dependendo do isômero do fármaco estudado. (DELMOTTE; SANDERSON, 2008)

Apesar do ganho na compreensão da natureza das alterações estruturais entre o receptor adrenérgico e ligantes nos últimos anos, a natureza de suas relações com proteína-G estão apenas no início, há apenas 1 ano se conseguiu observar a ativação de proteína-G em receptor adrenérgico isolado (ROSENBAUM et al., 2011), sendo reconhecido que um mesmo receptor pode acoplar-se a mais de um tipo de proteína-G, determinar sinalizações independentes deste acoplamento, além de estarem sujeitos a interferências regulatórias de pequenas moléculas e outras proteínas, incluindo a de outros GPCRs (DEUPI; KOBILKA, 2010). A presença de sítios alostéricos de ligação no receptor, permitem a acomodação simultânea de mais de um ligante; os ligantes alostéricos são atualmente denominados moduladores positivos e negativos, dependendo de sua ação sobre o ligante ortostérico (CONGREVE et al., 2011). A fig. 48 mostra as modificações desta conceituação nos últimos anos e a fig.45, os deslocamentos dos efeitos produzidos pelas ações destes ligantes sobre o receptor.

Ligantes ortostéricos Ligantes alostéricos Antagonistas Agonistas totais parciais Pré-1995 Agonista Agonista totais parciais Agonista inverso antagonista Modulador Amplificador Pós-2000 alostérico alostérico

Figura 48- Alvos químicos para receptor acoplado a proteína-G.

Fonte: Kenakin (2001)

No caso da contração muscular estriada, tão conhecida e classicamente representada pelo acoplamento da actina e miosina em presença de elevação do cálcio intracelular, fenômeno observado tanto em músculo liso brônquico quanto estriado ou cardíaco, encontra no relaxamento de musculatura lisa brônquica e na contração de musclatura lisa vascular por vias adrenérgicas (BOLTON; LARGE, 1986), uma divergência para a qual as soluções vislumbradas não oferecem repouso. Tanto no músculo estriado quanto no liso, a ativação de adrenoceptores produz ativação da via Gs-adenilato ciclase (JANSSEN, 2002; CLAUSEN, 2003) ainda que outras sinalizações também sejam descritas para o primeiro (BILLINGTON; PENN, 2003). Há indícios que na musculatura lisa de vias aéreas, o relaxamento não acontece somente através do sistema adenilato ciclase: camundongos modificados com aumento de expressão da enzima paradoxalmente tem o relaxamento produzido por β-agonistas comprometido. (WAYNE et al., 2011)

As limitações para a compreensão das ações celulares desenvolvidas a partir da transmissão adrenérgica são muitas e podem também ter origens nos fundamentos conceituais, que encontram no ponto de partida, ou seja na subdivisão de adrenoceptores α e β, talvez uma barreira. Curiosamente, o trabalho de Ahlquist que originou o conceito e classificação de receptores α e β para as ações de aminas simpatomiméticas (AHLQUIST, 1948) assumiu as exceções observadas³⁴ como sem consequência para a elaboração da hipótese (no caso, o músculo cardíaco representa a exceção relatada para as ações via β-receptores). A ação observada pela adrenalina no músculo estriado, também constitui "exceção": do mesmo modo que o músculo cardíaco, o músculo estriado estudado neste modelo sob ação da adrenalina apresenta aumento da contratilidade. Talvez estas "exceções" representem papel fundamental para a compreensão das ações desempenhadas por estas vias através de adrenoceptores, além de constituirem ponto chave para sua identificação, conceituação e classificação.

A classificação de adrenoceptores a partir do comportamento celular frente a fármacos parece inadequada: equivale a assumir que uma fechadura adquiriu identidade diferente porque foi aberta por outra chave. A associação das ações com o tipo de ativação desencadeado em proteína-G equivale a assumir que a fechadura aceita mais de um tipo de chave, sendo que diferentes chaves abrem segmentos diferentes da porta, talvez o que mais se

 $^{^{34}}$ Para o receptor α , associado a ações principalmente excitatórias (vasoconstricção, motricidade uterina, ureteral, dilatação da pupila), relata importante efeito inibitório (relaxamento da musculatura intestinal). Para o receptor β , associado a ações principalmente inibitórias (vasodilatação, relaxamento uterino e brônquico), relata uma ação excitatória (estimulação miocárdica). (AHLQUIST, 1948)

aproxime da realidade, porém há ativações independentes de proteína-G. Os esforços para identificação e isolamento de receptores adrenérgicos em estado funcional ainda não permite uma classificação nestas bases, pois a versatilidade funcional desta classe de receptores resulta em padrões muito variados de ativação (CHEREZOV et al., 2007) e as semelhanças encontradas nos subtipos presumidos β_1 e β_2 sugerem que possam ser aplicáveis a muitos outros subtipos (DELMOTTE; SANDERSON, 2008; WARNE et al., 2011), bem como são reconhecidos padrões diferentes de sinalização para subtipos homólogos (DEUPI; KOBILKA, 2010). Em decorrência destas características, sua conceituação atual (nota 17 p. 34) se mostra mais flexível, sem contudo oferecer condições para um reconhecimento de padrões específicos de sinalização para cada tipo de receptor.

Os conhecimento de diversos padrões de sinalização celular relacionado a este tipo de transmissão (EVANS et al., 2010), atualmente tão fragmentado³⁵, extenso e ainda assim insuficiente para permitir seu alinhamento com reações fisiológicas ou clínicas associadas às ações da adrenalina ou de aminas simpatomiméticas ou ainda de fármacos com ação nestas vias, não constituem a solução para esta compreensão, trazendo extenso volume de informações a respeito destas vias, porém ainda insuficiente para a construção de um sentido para o seu conjunto, pois faltam pistas para sua polarização ou sistematização.

As dificuldades encontradas para compreensão das alterações fisiológicas observadas in vivo, propulsor de investigações progressivamente mais reduzidas, por meio de experimentos com conjuntos destacados como este modelo, com órgãos, células isoladas, organelas, material nuclear, isolamento de proteínas e receptores celulares, com finalidade de se conseguir uma visão mais clara dos fenômenos fisiológicos através de sua fragmentação, podem produzir distorções também progressivas além de não assegurar que tudo esteja sendo "visto" de fato. Para exemplificar pode-se citar, por um lado, a redução do número de adrenoceptores observado em cultura de miócitos (FAN et al., 2009), e por outro, camundongos modificados com expressão aumentada da enzima adenilato ciclase, paradoxalmente tem o relaxamento produzido por β-agonistas comprometido (WAYNE et al., 2011). Para se conseguir o isolamento de adrenoceptores para avaliação das modificações produzidas por ligantes são necessárias mutações no receptor que assegurem sua termoestabilidade. (WARNE et al., 2011; ROSENBAUM et al., 2011)

³⁵É necessario observar cada caso, cada órgão, cada situação, ainda cada fármaco, ou cada ação e assim por diante, como proposto para as ações celulares via proteína-G (BIRNBAUER et al., 1990), criando como que uma "coleção de padrões" para cada situação.

A transmissão adrenérgica é dual em princípio (representada pela ação da adrenalina como neurotransmissor de liberação local e como hormônio circulante), constituindo sistema operacional de comando simultaneamente centralizado e distribuído, desempenhado por um único sinalizador (adrenalina), submetendo todo o organismo a suas ações.

Imaginar que as ações da adrenalina como neurotransmissor possam encontrar oposição, auxílio ou inter-relações com ou através de seu contingente sistêmico e vice-versa, poderia trazer um pouco de luz *a priori* para alguns fenômenos locais e sistêmicos observados *a posteriori*. O alosterismo demonstrado através da ligação de fármacos em sítios específicos do receptor adrenérgico e que resulta nos conceitos de antagonismo, agonismo inverso, parcial, etc, podem ser somente uma distorção da avaliação das possibilidades de comunicação operantes no organismo por este sistema. Dentre as muitas particularidades da transmissão adrenérgica, em modelos experimentais de musculatura lisa vascular a ausência do endotélio modifica a resposta de constrição pela adrenalina (EGLÈME; GODFRAIND; MILLER, 1984), em modelos experimentais de músculo liso de vias aéreas, a ausência do epitélio também produz modificações destas ações (KROIGAARD; DALSGAARD; SIMONSEN, 2010), mostrando que nos sistemas circulatório e respiratório influências recíprocas entre suas estruturas encontram meios de comunicação.

Na musculatura lisa intestinal, a presença de células especializadas (células intersticiais de Cajal) em todo o sistema digestivo, identificadas do esôfago ao ânus através de anticorpos anti-receptor tirosina-cinase (neurônios e músculo liso entérico não expressam este tipo de receptor) desempenham papel fundamental na coordenação da neurotransmissão e funcionamento gastrointestinal (KITO, 2011), de modo que as respostas das células musculares lisas estão subordinadas a células especializadas com as quais estão em contato.

No caso específico do músculo estriado, estudado por este modelo, a interferência das fibras fusais, que representam um ponto de integração da contração muscular com o sistema nervoso central, começa a despertar interesse observado na validação de métodos para investigação em modelos experimentais (ZHAO et al., 2011; WILKINSON; KLOEFKORN; HOCHMAN, 2012). A participação de vias adrenérgicas é relatada neste tipo específico de transmissão (JANKOWSKA; GLADEN; CZARKOWSKA-BAUCH, 1998). A despeito da amputação de suas conexões, estas fibras permanecem na intimidade do diafragma e possivelmente representam papel funcional ainda difícil de ser avaliado, mas que certamente está associado à comunicação intercelular. O relato de potenciais aferentes em fusos

neuromusculares registrados neste mesmo modelo experimental a partir da ação de fármacos (GANGULY et al., 1978), mostra a possibilidade desta influência, porém influências recíprocas locais entre células fusais e musculares estriadas num modelo desta natureza ainda não são relatadas. Estas considerações devem ser tomadas como limitação do modelo na avaliação da ação de fármacos como a deste trabalho.

O fato é que o adrenoceptor é uma estrutura complexa, e talvez necessite uma nova conceituação, pois não se comporta no mesmo padrão substrato-ligante, que o receptor colinérgico da junção ensinou. Os conceitos de agonismo e antagonismo, herdados destes conhecimentos são dificilmente ajustáveis à transmissão por receptores heptahélicos; o que parece ter sido resolvido com as complexas conceituações de agonismo parcial e inverso (fig.45 e 48), que ademais apresentam variações entre autores, como que numa tentativa de manter uma analogia para a relação receptor-ligante da transmissão colinérgica da junção neuromuscular via receptores nicotínicos. É possível que quanto mais se avance neste entendimento, menos ajustáveis se tornem estes conceitos; as modificações conformacionais e subsequente ativação de proteína-G produzidas pelo ligante ao receptor adrenérgico ainda não foram registradas *in vivo*, e a maioria dos conceitos das ações de fármacos sobre GPCR são oriundas de observações clínicas e estudos *in vitro*.

As múltiplas possibilidades de ativação certamente aproveitadas pelos organismos podem acontecer de forma simultânea resultando em possibilidades ilimitadas de padrões de sinalização e respostas, configurando um idioma celular de sinalização. Parece haver uma forma de inteligência de manifestação periférica relacionada a este tipo de transmissão, cujo entendimento ainda não é acessível. Entendemos apenas algumas "palavras". Somente temos visões das consequências do alosterismo mostrado pela utilização de fármacos com ação nestas vias, não sabemos exatamente como nem quais células estão "entendendo" este estímulo sintético e quais as consequências disto (as ações anabólicas relatadas para o salbutamol são exemplo disto); desde a síntese do propranolol há mais de 50 anos e a despeito de sua larga utilização clínica, novas indicações para seu uso continuam a surgir decorrentes de notícias sobre novos padrões de resposta celular, reconhecidos por a sua ação em modelos experimentais. (KOZANOGLU et al., 2013)

Neste sentido, pode-se imaginar que a ação de um conjunto de substâncias, representado pela planta e seus inúmeros constituintes presentes nos seus extratos aquoso e bruto (fitocomplexo), pode desempenhar no organismo uma ação mais equilibrada do que

aquela desempenhada por fármacos sintéticos ou isolados cuja ação pontual, pode ser "entendida" pela célula de forma menos fisiológica resultando em desvios: os mecanismos de "up/down" regulation associados a estes fármacos (JHONSON, 1998), podem ser entendidos deste modo; principalmente quando sua utilização é feita por tempo prolongado como no tratamento de doenças crônicas como a asma. Os organismos parecem mostrar-se melhor adaptados a lidar com estímulos múltiplos ao invés dos pontuais; a drogaadicção é um exemplo disto, a obesidade talvez também.

Ainda, as ações sobre a expressão gênica, relatadas para o salbutamol em músculo estriado, com aumento de síntese e hipertrofia (PEAREN et al., 2009), não são relatadas para musculatura lisa. Este fato necessita esclarecimento, pois se estes mesmos padrões de sinalização forem aplicáveis a fibras musculares lisas constitutivas de vias aéreas ou ainda a fibras musculares cardíacas, esta classe de fármacos (agonistas de receptores-β₂) podem estar produzindo efeitos não conhecidos ou conhecidos e não considerados. A rigor, a possibilidade dos efeitos hipertróficos produzidos por esta classe de fármacos ocorrerem em músculo liso de vias aéreas, representaria risco de agravamento da doença para a qual estão sendo utilizados para tratamento (uma vez que a hipertofia brônquica é uma das causas do agravamento da asma), além de potencial interferência de natureza constitutiva na musculatura cardíaca; sua ação em musculatura esquelética normalmente não vem sendo considerada.

5.4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O guaco apresentou efeito facilitador da resposta contrátil em modelo de musculatura estriada esquelética, de modo dose dependente para os extratos solúveis. Esta facilitação se mostrou maior e sustentada com o extrato aquoso por infusão (T60, INF2 com ≈7 mg 137,6±3,1 n=3), na apresentação preconizada pela Farmacopeia Brasileira. A participação do ácido *o*-cumárico pode ser considerada para o efeito observado. Com o extrato hidroalcoólico a ação facilitadora se fez de forma fugaz por estímulo indireto (T10, EHA com 5mg 110,3±1,5 e T60 99,3±3 n=5) e sustentada por estímulo direto (T60 EHA com 5mg 109,1±2,7 n=4), com diferença significativa entre os dois tipos de estímulo, o que pode se relacionar a ações juncionais e pós juncionais com respeito aos mecanismos de ação da planta e

possivelmente à presença de terpenóides verificada neste extrato, porém nescessita esclarecimento sobre o papel juncional na facilitação observada.

O efeito facilitador apresentado pelos extratos não pôde ser atribuído ao seu constituinte majoritário (cumarina).

A separação dos constituintes da planta em extratos por solventes de polaridade crescente, não resultou na melhora da resposta farmacológica de nenhum destes extratos.

Os agentes utilizados para solubilização dos extratos mostraram interferência significativa nas respostas do EAC (T10, EAC 1mg/PEG 110,3±5,1 n=5 e EAC 1mg/DMSO 89,1±3,1 n=5) e provavelmente no EH (T60, com 0,5mg/DMSO 79,2±2,2 n=3 e 1mg/PEG 105,3±4,7 n=3), sendo possível interação de substância concentrada nestes extratos com o PEG ou DMSO.

O efeito do salbutamol foi facilitador da resposta e dependente da concentração utilizada por estímulo indireto (até 2,5mg facilitação e com 5mg bloqueio). Observou-se dose dependência por estímulo indireto entre as concentrações de 0,1 e 0,5mg/5ml, (T30 com 0,1mg 110,5±7,2 n=4 e com 0,5mg 119,±6,6 n=6) fato não observado para estimulação direta entre as concentrações de 0,07mg e 0,5mg (T=30 com 0,07mg 107,1±4,1 n=6 e com 0,5mg 106,4±5,7 n=5) o que demonstra respectivamente ações juncionais e diretas sobre a fibra muscular para as ações do fármaco, com diferença entre os tipos de ação.

Os efeitos do guaco e do salbutamol em modelo experimental de músculo estriado encontraram semelhança de ambos no tipo de resposta apresentada (facilitação da contração muscular).

A cumarina não apresentou correspondência à ação dos extratos no modelo. Além disto, apresentou interferência na ação do salbutamol (T=20 salbutamol 0,3μM 111,3±2,4 T=30 salbutamol 0,3μM/cumarina 500μg 105,7±2,4 n=5) e não produziu modificação significativa no bloqueio pelo propranolol, o que pode estar relacionado a mecanismos de competição em relação ao salbutamol, ou a modificação no estado funcional do receptor com redução da eficácia do agonista sem modificação da eficácia do antagonista quando se avalia o conjunto de sua interferência nas ações dos dois fármacos. A confirmação destas interferências por estudos mais detalhados podem leva-la à classificação de agonista neutro de receptores β, além de contraindicar seu uso concomitante ao de β-agonistas.

O propranolol apresentou ação bloqueadora da resposta contrátil no modelo (T60 com 0,4μM 48±7,2 n=6). Esta resposta bloqueadora foi prolongada pela presença do extrato aquoso em baixa concentração (T60 com INF1 1mg/Prop 0,4 μM 92,8±7,5 n=5) e acelerada na presença do extrato hidroalcoólico (T30 com EHA 5mg/Prop 0,4 μM 0±0 n=4), o que foi interpretado como modificação da ação do fármaco pelos extratos e por consequência como interferência, ou participação em vias adrenérgicas desempenhadas pelos extratos de *M. laevigata* em modelo de músculo estriado esquelético; além do questionamento da conceituação do propranolol como fármaco antagonista não seletivo de receptores-β.

O propranolol mostrou ainda leve ação agonista parcial no modelo, que foi melhor observada na presença do extrato aquoso nos 20 minutos iniciais dos experimentos (INF1 1mg/Prop 0,4 μM T10 103,6±2,2 e T20 103,2± 4,6 n=5), corroborando o questionamento da conceituação do propranolol e sugerindo mediação adrenérgica nos efeitos farmacológicos do extrato. Esta interferência do INFI sobre o bloqueio do propranolol, constitui resultado que não encontra explicação satisfatória dentro das possibilidades oferecidas pelo estado atual de conhecimento sobre fármacos com ação em receptores β-adrenérgicos.

A elevação da amplitude da resposta contrátil observada com a elevação da concentração de potássio nos limites de 8,1 a 10,8mM na solução nutritiva pode indicar o envolvimento da enzima Na+/K+ATPAse, sendo a perda imediata da resposta na presença do propranolol provavelmente associada à ação do fármaco inibidora da atividade da enzima em músculo estriado.

6 CONCLUSÃO

- Os extratos de *M. laevigata* apresentaram efeito facilitador (fitocomplexo) à semelhança do salbutamol em modelo de musculatura estriada.
- O extrato aquoso por infusão apresentou a melhor resposta farmacológica, sugerindo ser esta a melhor extração para a espécie e a participação do ácido o-cumárico no efeito farmacológico.
- O fitoquímico cumarina não mostrou correspondência para os efeitos dos extratos e interferiu no efeito do salbutamol, sugerindo mecanismos de competição.
- O propranolol avaliado isoladamente apresentou leve agonismo parcial e também antagonismo no modelo. Baixas concentrações do extrato aquoso por infusão acentuaram efeito agonista parcial e concentrações maiores do extrato hidroalcoólico liofilizado acentuaram efeito antagonista.
- Tomados em conjunto estes resultados sugerem a participação de vias adrenérgicas nos efeitos farmacológicos dos extratos de *M. laevigata* em musculatura estriada.
- Os solventes PEG e DMSO apresentaram interferência nos efeitos farmacológicos dos extratos, sugerindo efeito melhorador para o PEG e efeito tóxico para o DMSO.

7 REFERÊNCIAS

ABOY, A. L. et al. Atividade Antiespasmódica de Soluções extrativas de Folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco). **Acta Farm Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2002.

AGUILAR, F. et al. Coumarin in flavourings and other food ingredients with flavouring properties. **The EFSA Journal**, v. 793, p. 13-15, 2008.

AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. **Amer J Physiology**, v. 153, n. 3, p. 586-600, 1948.

ALBERTS, B., et al. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1295p.

ALVARENGA, F. R. C. et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, n. 2A, p. 442-448, 2009.

AMBROSIO, C. et al. Catechol-Binding Serines of b2-Adrenergic Receptors Control the Equilibrium between Active and Inactive Receptor States. **Mol pharm**, v. 57, p. 198-210, 2000.

BAKER, J. G.; HALL, I. P.; HILL, S. J. Agonist and Inverse Agonist Actions of B-Blockers at the Human B2-Adrenoceptor Provide Evidence for Agonist-Directed Signaling. **Mol Pharmacol**, v. 64, n. 6, p. 1357-1369, 2003.

BADGER, C. et al. Benzopironas para la disminución y el control del linfedema de los miembros (Revisión Cochrane traducida). **La Biblioteca Cochrane Plus**, v. 2, n. 3, 50p. 2008.

BARNES, P. J. Farmacologia Pulmonar. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Org.). As Bases farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 1032-1065.

BASU, S. et al. The theaflavin fraction is responsible for the facilitatory effect of black tea at the skeletal myoneural junction. **Life Sci**, v. 76, n. 26, p. 3081-88, 2005.

BIAVATTI, M. W. et al. Coumarin Content and Physicochemical Profile of *Mikania laevigata* Extracts. **Z Naturforsch**, v. 59c, 3-4, p.197-200, 2004.

BILLINGTON, C.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respir Res**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2003.

BIRNBAUER, L. et al. G protein coupling of receptors to ionic channels and other effector systems. **Br J clin Pharmac**, 30, p. 13S-22S, 1990.

- BLACK, J. W. Sir James W. Black Autobiography. **Nobelprize.org**. Stockholm, 1989. Disponível em: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/black-autobio.html. Acesso em 27 jul. 2012.
- BOLINA, R. C.; GARCIA, E. D.; DUARTE, M. G. Estudo comparativo das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Shultz Bip ex Baker. **Rev Bras Farmacog**, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009.
- BOLTON, T. B.; LARGE, W. A. Are junction potentials essential? Dual Mechanism of smooth muscle cell activation by transmitter released from autonomic nerves. **Q J Exp Physiol**, v. 76, n. 1, p. 1-28, 1986.
- BOOTH, A. N. et al. Urinary Metabolites of Coumarin and o-Coumaric Acid. **J B C**, v. 234, n. 4, p. 946-948, 1958.
- BORN, S. L. et al. Sinthesis and reactivity of coumarin 3,4-epoxide. **Drug Metab Dispos**, v. 25, n.11, p. 1318-1324, 1997.
- BOWMAN, W. C. **Pharmacology of Neuromuscular Function**. 2. ed. London: Butterworth Scientific, 1990. 316p.
- BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. **Textbook of Pharmacology.** 2. ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1980.
- BRANDT, A. J. **Flavonóides, cumarina e benzofuranos como marcadores quimiotaxonômicos em Asteraceae**. 185 f. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Química Orgânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- BRASIL. Anvisa. **Bula Aerolim Cloridrato de salbutamol**, nov. 2007. Disponível em: < http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25643-1-0].PDF>. Acesso em: 29 ago. 2012.
- ______. Anvisa. Bula Rebaten Cloridrato de propranolol, ago. 2012a. Disponível em: http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25643-1-0].PDF. Acesso em: 29 ago. 2012.

 ______. Anvisa. Bula Venalot-cumarina/toxerrutina, ago. 2012b. Disponível em: http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25990-1-0].PDF. Acesso em: 28 ago. 2012.

 ______. Anvisa. Farmacopéia Brasileira, 2012c. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/farmacopeiabrasileira/virtuais.htm. Acesso em: 30 ago. 2012.

 ______. Decreto no. 5.813, de 22 de Junho de 2006, (2006a). Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em:

http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm. Acesso

em: 28 dez. 2012.

______. Ministério da Saúde. Portaria no. 971 de 3 de maio de 2006, (2006b). Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf. Acesso em: 2 ago. 2012.

_____. Ministério da Saúde. Portaria no. 2.982 de 26 de novembro de 2009 (2009a). Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 120-122, 1 dez. 2009.

_____.Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS** (**RENISUS**), fev. 2009 (2009b). Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf. Acesso em: 28 dez. 2012.

BRODAL, A. **Anatomia Neurológica com correlações clínicas.** 3. ed. São Paulo: Livraria Rocca Ltda, 1984. 888p.

BUCHANAN, R.; NIELSEN, B. O.; CLAUSEN, T. Excitation- and b2-agonist-induced activation of the Na+-K+ pump in rat soleus muscle. **J Physiol**, v. 545 n. 1, p. 229-240, 2002.

BUDEL, J. M. et al. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Rev Bras Farmacog**, v. 19, n. 2B, p. 545-552, 2009.

BÜLBRING, E. Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. **Br J Pharmacol**, v. 1, p. 38-61, 1946.

CALAINHO, D. B. Jesuítas e Medicina no Brasil Colonial. **Tempo**, Rio de Janeiro, n. 19, p. 61-75, 2005.

CASLEY-SMITH, J. R. et al. Treatment of filarial lymphoedema and elephantiasis with 5,6-benzo-oL-pyrone (coumarin). **BMJ**, v. 307, n. 6911, p. 1037-1041, 1993.

CASLEY-SMITH, J. R.; MORGAN, R. G.; PILLER, N. B. Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6 benzopirone. **N Engl J Med**, v. 329, n.16, p. 1158-64, 1993.

CASTRO, E. M. et al. Adaptações anatômicas de folhas de Mikania glomerata Sprengel (Asteraceae), em três regiões distintas da planta, em diferentes níveis de sombreamento. **Rev Bras Pl Med**, v. 9, n. 2, p. 8-16, 2007.

CELEGHINI, R. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. **Rev Bras Pl Med**, v. 9, n. 2, p. 61-66, 2007.

CHAPMAN-HUSTON, D.; CRIPPS E. C. Through a City Archway: The Story of Allen and Hanbury, 1715-1954. Resenha de: COPE, Z. Allen and Hanbury 1715-1954. **Br Med J**, v. 5, n. 1, p. 337, 1955.

CHEREZOV, V. et al. High Resolution Crystal Structure of an Engineered Human β2-Adrenergic G-protein Coupled Receptor. **Science**, v. 23, n. 5854, p. 1258-1265, 2007.

CHERNOVIZ, P. L. **Formulário e guia médico**. 14. ed. Paris: Livraria de A. Roger & F. Chernoviz, 1890. 1423p.

CHESTNUTT, M. S.; MURRAY, J. A.; PRENDERGAST, T. J. Pulmonary Disorders. In: McPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. (Org.) **Current Medical Diagnosis & Treatment**. New York: McGaw-Hill, 2009. p. 209-286.

CINTRA-FRANCISCHINELLI, M. et al. Effects of Commonly Used Solubilizing Agents on a Model Nerve-Muscle Synapse. Lat Am J of Pharm, v. 27, n. 5, p. 721-726, 2008.

CLAUSEN, T. Na+ K+ Pump Regulation and Skeletal Muscle Contratility. **Physiol Rev**, v. 83, n. 4 p. 1269-1324, 2003.

CLAUSEN, T. In isolated skeletal muscle, excitation may increase extracellular K+ 10-fold; how can contractility be maintained? **Exp Physiol**, v. 96, n. 3, p. 356-368, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, S. B. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 5. ed. Campinas: Unicamp, 1993. 276p.

COLLAÇO, R. O. et al. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, p. 614-622, 2012.

CONGREVE, M. et al. Progress in Structure Based Drug Design for G Protein-Coupled Receptor. **J Med Chem**, v. 54, p. 4283-4311, 2011.

CROMBLEHOLME, W. R. Obstetrics & Obstetric Disorders . In: McPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. (Org.) **Current Medical Diagnosis & Treatment**. New York: Mc Graw Hill, 2009. p. 686-707.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.

CULLUM, V. A. et al. Salbutamol: a new selective B-adrenoceptive receptor stimulant. **Br J Pharmacol**, v. 35, n. 1, p. 141-151, 1969.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Constituintes activos das plantas medicinais, principais efeitos farmacológicos e acções adversas. In: _____. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbenkian, 2003. p. 31-52.

DELMOTTE, P.; SANDERSON, M. J. Effects of Albuterol Isomers on the Contraction and Ca2+ Signaling of Small Airways in Mouse Lung Slices. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 38, p. 524-531, 2008.

DEUPI, X.; KOBILKA, B. K. Energy Landscapes as a Tool to Integrate GPCR Structure, Dynamics, and Function. **Physiol**, v. 25, n. 5, p. 293-303, 2010.

DIXON, R. A. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. **Nature**, v. 321, n. 6065, p. 75-79, 1986.

D'SILVA, J. L. The action of adrenaline on serum potassium. **J Physiol**, v. 82, n. 4, p. 393-398, 1934.

DUARTE, D. F. Curarizantes - Das suas orígens aos dias de hoje. **Rev Bras Anestesiol**, v. 50, n.4, p. 330-336, jul. 2000.

EGLÈME, C.; GODFRAIND, T.; MILLER, R. C. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 81, n. 1, p. 16-18, 1984.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta de busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al.. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Universidade Santa Catarina, 2000. p. 87-121.

EVANS, B. A. et al. Ligand-directed signalling at β -adrenoceptors. **Br J Pharmacol**, v. 159, p. 1022-1038, 2010.

FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Current concepts in neuromuscular transmission. **Br J Anaesth**, v. 103, n. 1, p. 108–114, 2009.

FAN, L.-I. et al. α 1D-Adrenergic receptor insensitivity is associated with alterations in its expression and distribution in cultured vascular myocytes. **APS**, v. 30, n. 12, p. 1585-1593, 2009.

FERRAZ, M. C. et al. The Effect of Lupane Triterpenoids (*Dipteryx alata* Vogel) in the in vitro Neuromuscular Blockade and Myotoxicity of two Snake Venoms. **Curr Org Chem**, v. 16, n. 22, p. 2717-23, 2012.

FERREIRA, F. P.; OLIVEIRA, D. C. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v.51, p. 6856-6859, 2010.

FIERRO, Y. M. et al. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **J Ethnopharmacol**, v. 66, n. 1, p. 19-24, 1999.

FITZGERALD, J. D.; O'DONNEL, S. R. Pharmacology of 4-hydroxypropranolol, a metabolite of propranolol. **Br J Pharmacol**, v. 43, n. 1, p. 225-235, 1971.

FREDRIKSSON, R. et al. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. **Mol Pharmacol**, v. 63, n. 6, p. 1256-1272, 2003.

GANGULY, D. K. et al. RAt isolated phrenic nerve-diaphragm preparation for pharmacological study of muscle spindle afferent activity: effect of oxotremorine. **Br J Pharmacol**, v. 64, n. 1, p. 47-52, 1978.

GERON, N.; MEIRI, H. The fusogenic substance dimethyl sulfoxide enhances exocytosis in motor nerve endings. **Biochim Biophys Acta**, v. 819, n. 2, p. 258-62, 1985.

GESTEIRA, H. M. O Recife Holandês: História Natural e Colonização Neerlandesa (1624-1654). **Rev SBHC**, v. 2, n. 1, p. 6-21, 2004.

GOODMAN, B. E. Channels active in the excitability of nerves and skeletal muscles across the neuromuscular junction: basic function and pathophysiology. **Adv Physiol Educ,** v. 32, p. 127-135, 2008.

GRAÇA, C. et al. In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 3, p. 430-439, 2007.

GUIMARÃES, M. R. Chernoviz e os manuais de medicina popular do império. **História,** Ciências, Saúde – Manguinhos, v. 12, n. 2, p. 501-514, 2005.

GUYTON, A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984, 926p.

HAAS, L. F. Pedanius Dióscorides (Born about AD40, died about AD90). **J Neurol Neurosurg Psychiatry,** v. 60, n.4, p. 427, 1996.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods:** a guide to modern techniques of plant analysis. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1998. 320p.

HIRSCH, N. P. Neuromuscular junction in health and disease. **Br J of Anaesth**, v. 99, n. 1, p. 132–8, 2007.

HOLMES, W. C. A review preparatory to an infrageneric classification of Mikania (tribe: Eupatoriae). In: HIND D.; JEFFREY C.; POPE G. **Advances in Compositae systematics**. London: Royal Botanic Garden, Kew, 1995. p. 239-254.

HOLMES, W. C.; HIND, D. J. A New Species of Mikania (Compositae: Eupatoriae) from Bahia, Brazil. **Kew Bull**, v. 55, n. 2, p. 399-403, 2000.

HOULT, J. R.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HYUN, M. W. et al. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase. **Mycobiol**, v. 39, n. 4, p. 257-265, 2011.

INSEL, P. A. et al. Impact of GPCRs in clinical medicine: genetic variants and drug. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n. 4, p. 995-1005, 2007.

JACK, D. A way of looking at agonism and antagonism: Lessons from salbutamol, salmeterol and other B-adrenoceptor agonists. **Br J Clin Pharmacol**, v.31, n. 5, p.501-514, 1991.

JANKOWSKA, E.; GLADEN, M. H.; CZARKOWSKA-BAUCH, J. Modulation of responses of feline y-motoneurones by noradrenaline, tizanidine and clonidine. **J Physiol**, v. 512, n. 2, p. 521-531, 1998.

JANSSEN, L. J. Ionic mechanisms and Ca2+ regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 282, n. 6, p. L1161-78, 2002.

JHONSON, M. The beta-adrenoceptor. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 158, n, 5.3, p. 146-53, 1998.

JOKERST, J. V. et al. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. **Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 715-728, 2011.

KENAKIN, T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. **FASEB J**, v. 15, n. 3, p. 598-611, 2001.

KHILNANI, G.; KHILNANI, A. K. Inverse agonism and its therapeutic significance. **Indian J Pharmacol**, v. 43, n. 5, p.492-501, 2011.

KITO, Y. The functional role of intramuscular intersticial cells of Cajal in the stomach. **J. Smooth Muscle Res.**, v. 47, n. 2, p. 47-53, 2011.

KOZANOGLU, I. et al. New indication for therapeutic potential of an old well-known drug (propranolol) for multiple myeloma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 139, n. 2, p. 327-335, 2013.

KROIGAARD, C.; DALSGAARD, T.; SIMONSEN, U. Mechanisms underlying epithelium-dependent relaxation in rat bronchioles: analogy to EDHF-type relaxation in rat pulmonary arteries. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 298, n. 4, p. L531-42, 2010.

KROLL, U.; CORDES, C. Pharmaceutical prerequisits for a multi-target therapy. **Phytomedicine**, v. 13, n. 5, p. 12-19, 2006.

LAST, J. A. The missing Link: The story of Karl Paul Link. **Toxicol Sci**, v. 66, n.1, p. 4-6, 2002.

LEITE, S. Cartas dos Primeiros Jesuítas do Brasil. São Paulo: Comissão do IV Centenário da cidade de São Paulo, 1954.

LI, Z.; XIE, Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroidactivated. **Pflugers Arch**, v. 457, n. 3, p. 635-644, 2009.

LIGGET, S. B.; SHAH, S. D.; CRYER, P. E. Characterization of beta-adrenergic receptors of human skeletal muscle obtained by needle biopsy. **Am J Physiol**, v. 254, n. 6.1, p. E795-798, 1988.

LINK, K. P. The Discovery of Dicumarol and Its Sequels. **Circulation**, v. 19, p. 97-107, 1959.

LITTLE, R. C. Profiles in Cardiology-Raymond P. Ahlquist (1914-1983). **Clin Cardiol**, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1988.

LOPES, M. M. Culturas das Ciências Naturais. **Ciência e Educação**, v. 11, n. 3, p. 457-470, 2005.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (*L.*) amazonensis and *Trypanosoma cruzi*. **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 41, n. 1, p. 85-95, 2005.

MABETA, P. E; PEPPER, M. S. Hemangiomas -current therapeutic strategies. **Int J Dev Biol**, v. 55, p. 431-437, 2011.

MAHONEY B. A. et al. Intervenciones de emergencia para la hiperpotasemia. **La Biblioteca Cochrane Plus**, v. 2, p. 1-53, 2008.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **J Ethnopharmacol**, v. 102, n. 3, p. 364-370, 2005.

MATOS, F. J. et al. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. Fortaleza: Editora UFC, 2004.

MÉNORVAL, M.-A. d. et al. Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments *In Silico* and with Cells. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. e-41733. doi:10.1371/journal.pone.0041733. 2012.

MESH: Medical subject Headings-adrenoceptor (1973). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?term=adrenoceptor>. Acesso em: 02 nov. 2012.

MORRISON, L.; WELSBY, P. D. Side-effects of coumarin. **Postgrad Med J**, v. 71, n. 841, p. 701, 1995.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for Mikania laevigata and Mikania glomerata as a pharmacological tool. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 7, p. 809-820, 2010.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. 178 p.

OLIVEIRA, F. et al. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Rev Bras de Ciênc Farm**, v. 20, n. 2, p. 169-183, 1984.

OLIVEIRA, F. et al. Morfodiagnose das folhas e partes reprodutivas de *Mikania laevigata* Shutlz Bip ex Baker. **Rev Bras de Farmacogn**, v. 1, n. 1, p. 21-34, 1986a.

OLIVEIRA, F. et al. Morfodiagnose de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker- guaco-domato - estudo do Axófito. **Rev Bras Farmacogn**, v. 1, n. 1, p. 45-57, 1986b.

OLIVEIRA, M. B. et al. Solução cardioplégica polarizante: estado da arte. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 20, n. 1, p. 69-74, 2005

PEAREN, M. A. et al. Expression profiling of skeletal muscle following acute and chronic β 2-adrenergic stimulation: implications for hypertrophy, metabolism and circadian rhythm. **BMC Genomics**, v. 10, n. 448, 10p. 2009.

PEDRO, L. História Da Companhia de Jesus no Brasil: Biografia de uma obra. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado em História) - Programa de História, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

PEDROSO, A. D. et al. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Rev Bras de Farmacogn**, v.18, n.1, p. 61-63, 2008.

PETER, J.-C. et al. scFv Single Chain Antibody Variable Fragment as Inverse Agonist of the B2-Adrenergic Receptor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 38, p. 36740-36747, 2003.

PETERNUSSO, M. et al. Influência do veículo na eficácia da reposição de potássio em ratos hipocalêmicos. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 3, p. 367-372, 2009.

PINHO-DA-SILVA, L. et al. trans-Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Causes Tracheal Smooth Muscle Relaxation through Blockade of Voltage-Dependent Ca2+ Channels. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11965-11977, 2012.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES C. M. O. (Org.) et al, **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 2. ed. Florianópolis: Universidade Santa Catarina, 2000. p. 61-86.

PUBCHEM. Pubchem substance, dimethyl sulfoxide. Disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=53788579#x400. Acesso em 21 abr. 2013.

RAMOS, F.; SILVEIRA, M. I. Agonistas adrenérgicos β2 e produção animal: III - Efeitos zootécnicos e qualidade da carne. **Rev Port de Ciênc Vet**, v. 97, n. 542, p. 51-62, 2009.

ROCHA, L. et al. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev Bras Farmacogn**, v.18 (supl), p.744-747, 2008.

ROCHA, R. M. et al. Revigorando os digitálicos. **Rev SOCERJ**, v. 19, n. 3, p. 247-255, 2006.

RODRIGUES, M. L. L. Guilherme Piso e o Conhecimento da Flora Medicinal Brasileira no Século XVII (1638-1664). 2002. 157f. Dissertação (Mestrado em História da Ciência) — Programa de Estudos Pós-graduados em História da Ciência, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2002.

ROSENBAUM, D. M., et al. Structure and Function of an Irreversible Agonist-β2 Adrenoceptor complex. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 236-240, 2011.

- SALES, F.; SANTOS, J. Carl Linnaeus: Tantus Amor Florum. **Coimbra Herbarium**, Coimbra, 2007. Disponível em:
- http://www.uc.pt/herbario_digital/lineu/tantos_Amor_florum. Acesso em: 4 fev. 2012.
- SALGADO, H. R.; RONCARI, A. F.; MOREIRA, R. R. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng (Asteraceae) leaf extract in mice. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n.3, p. 205-208, jul./set. 2005.
- SANTOS, F. S. **As plantas brasileiras, os jesuítas e os indígenas do Brasil:** história e cultura na Triaga Brasilica (séc.XVII-XVIII). São Paulo: Casa do Novo Autor, 2009. 240p.
- SANTOS, P. A. et al. Esteróides e cumarina em calos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Rev Bras Ciênc Farm**, v. 35, n. 2, p. 231-235, 1999.
- SANTOS, S. C. Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker e *M. glomerata* Sprengel e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- SATO, S. et al. Muscle Plasticity and β 2-Adrenergic Receptors: Adaptive Responses of β 2-Adrenergic Receptor Expression to Muscle Hypertrophy and Atrophy. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, 10p. 2011.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 2 ed. Florianópolis: Universidade Santa Catarina, 2000. p. 291-320.
- SILVA, P. R. et al. Prevalência do Uso de Agentes Anabólicos em Praticantes de Musculação de Porto Alegre. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2007.
- SOARES, A. K. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, n. 4, p. 447-454, 2006.
- SOARES DE MOURA, R. et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human Bronchi and guinea pig trachea. **J Pharma Pharmacol**, v.54, p. 249-256, 2002.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev de Nutr**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- ŠOIĆ-VRANIĆ, T. et al. Effect of salbutamol on innervated and denervated rat soleus muscle. **Braz J Med Biol Res,** v. 38, n.12, p. 1799-1805, 2005.
- SOUZA, R. D. Medicina e fauna silvestre em Minas Gerais do século XVIII. **Varia História**, v. 24, n. 39, p. 237-291, 2008.

TIAN, J., XIE, Z. The Na-K-ATPase and Calcium-Signaling Microdomains. **Physiology**, v. 23, p. 205-211, 2008.

TORPHY, T. J. Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. **Trends Pharmacol Sci**, v.15, n. 10, p. 370-374, 1994.

TROIANO, A. R. Uso do Propranolol de ação prolongada em 40 Pacientes com tremor essencial e virgens de tratamento. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 62, n. 1, p. 86-90, 2004.

TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras de Ciênc Farm**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, J. F. et al. Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 609, n. 1-3, p. 126-131, 2009.

VENANCE, S. L. et al. The primary periodic paralyses: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Brain**, v. 129, n. 1, p. 8-17, 2006.

VERONESE, F. M.; MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **BioDrugs**, v. 22, n. 5, p. 315-29, 2008.

WADA: World Anti-Doping Agency, 2012. Disponível em: http://www.wada-ama.org/en/Science-Medicine/Archives/. Acesso em 02 set. 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer-Verlag, 1984.

WARNE, T. et al. The structural basis for agonist and partial agonist action on a b1-adrenergic receptor. **Nature**, v. 469, n. 7329, p. 241-244, 2011.

WATSON, J. M.; RICHENS, A. The effects of salbutamoland terbutaline on physiological tremor, bronchial tone and heart rate. **Br J Clin Pharmacol**, v. 1, n. 3, p. 223-227, 1974.

WAYNE, W. C. H. et al. Paradoxical attenuation of β2-AR function in airway smooth muscle by Gi-mediated counterregulation in transgenic mice overexpressing type 5 adenylyl cyclase. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 300, n. 3, p. 472-478, 2011.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Neurotransmissão-Os sistemas autônomo e somático motor. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J.S.; PARKER, K. L. (Org.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 11 ed. Porto Alegre: McGraw Hill, 2010. p. 127-163.

WILKINSON, K. A.; KLOEFKORN, H. E.; HOCHMAN, S. Characterization of Muscle Spindle Afferents in the Adult Mouse Using an In Vitro Muscle-Nerve Preparation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-9, 2012.

YATSUDA, R. et al. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **J Ethnopharmacol**, v. 97, n.2, p. 183-189, 2005.

ZHAO, X.-H. et al. Electrophysiological characteristics of the isolated muscle spindle in rats. **APS**, v. 63, n. 3, p. 281-285, 2011.

ZIERATH, J. R.; HAWLEY, J. A. Skeletal muscle fiber type: Influence on contratile and metabolic properties. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. 337-348. 2004.

ANEXO A- Parecer do comitê de ética em pesquisa animal.

