



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ESPASMOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO
DA CASCA DO CAULE DE *Simarouba amara* L. NA MUSCULATURA
LISA DE COBAIA.**

MARJORIE DENTI

Recife
2015

MARJORIE DENTI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ESPASMOLÍTICO DO EXTRATO AQUOSO
DE *Simarouba amara* L. NA MUSCULATURA LISA DE COBAIA.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo

Recife

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

D414a Denti, Marjorie.
Avaliação do efeito espasmolítico do extrato aquoso de Simarouba amara
L. na musculatura lisa de cobaia. / Marjorie Denti. – 2015.
79 f: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2015.
Inclui referências.

1. Simarouba. 2. Simaroubaceae. 3. Espasmolíticos. 4. Íleo de cobaia. I.
Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-052)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Recife, 27 / 11 / 2015.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Deptº de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

EXAMINADOREXTERNO: Dra. Hélida Maria de Lima Maranhão
(NASF – Prefeitura Municipal de Recife)

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. João Henrique Costa Silva
(Deptº de Educação Física e Ciência do Esporte – UFPE/CAV)

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Rafael Ximenes

AGRADECIMENTOS

Se existe algo que a vida me ensinou foi a ter GRATIDÃO. Uma palavra linda, que quando sentida e expressada verdadeiramente pode transformar as nossas vidas.

Por isso sou grata, primeiramente a Deus, fonte de toda a força, paz e conforto e por estar sempre presente em minha caminhada.

À minha família, por todo apoio, incentivo e amor, pela educação que me deram e por estarem sempre torcendo pela minha felicidade independente do caminho que eu escolher.

Ao Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley, pela oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório, pela confiança, pela ajuda e por toda a orientação dispensada para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

A Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo, por todos os ensinamentos transmitidos, pelo exemplo de pessoa e professora que és, por toda orientação e ajuda e pela amizade que construímos ao longo desses anos. Muito obrigada!

Aos professores: Dra. Fabiana Cavalcante, Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, Dr. Rafael Ximenes, Dr. Pedro Rolim e Dr. Cláudio G. Rodrigues pela colaboração no trabalho.

Aos amigos do laboratório e da pós-graduação: Eliadna de Lemos, pela amizade e incentivo, Paulo Nunes, pela amizade, pela colaboração durante o mestrado, por toda a troca de conhecimentos e orientação. Tadeu Peixoto Sobrinho, pela companhia, pelo auxílio e colaboração. Daniere Souza, por toda a caminhada que trilhamos juntas, pela ajuda durante os experimentos, pela dedicação exemplar, pela amizade e carinho. Alisson Oliveira e Joannelys Lima pela boa companhia, convívio e colaboração. Muito obrigada!

Aos colegas do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, ao “seu Fredson” por ser exemplo de generosidade, de amor ao trabalho e por ser sempre solícito. A Rose e Bruna pela simpatia, pelos lanches e pela companhia.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas que contribuíram para a minha formação e funcionários, de maneira especial a Nerilin Trajano, pelo excelente atendimento, por estar sempre disponível a ajudar. Obrigada!

Ao Laboratório Cristália[®] por gentilmente ter cedido verapamil para continuação dos estudos.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pela concessão da bolsa de estudo.

"O que está destinado a não acontecer, não vai acontecer, por mais que você tente. O que está destinado a acontecer, irá acontecer, faça o que você fizer para evitar. Então, a melhor opção é permanecer em silêncio." Ramana Maharshi

RESUMO

Simarouba amara (Simaroubaceae) é popularmente conhecida como "pau-paraíba" ou "marupá". No Brasil, é encontrada em todo o litoral brasileiro e tem sido usada na medicina tradicional, principalmente no tratamento de alterações de origens inflamatória, gástrica e respiratória. Esse estudo avaliou a possível atividade espasmolítica do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* (EASa). Nesse sentido, ensaios *in vitro* de curvas concentração-efeito (CCE) simples ou cumulativas foram obtidas para histamina, carbacol, KCl e CaCl₂ na ausência ou presença de EASa ou verapamil (VRP) no íleo isolado de cobaia. Os resultados mostram que o EASa (125, 250 e 500 µg/mL) e o VRP (0,025 a 3,2 µM) reduziram estatisticamente os componentes fásicos e tônicos das CCE simples para histamina, carbacol e KCl. Nas CCE cumulativas induzidas por histamina e carbacol, o EASa e VRP produziram redução significativa do efeito máximo (Emáx) sem deslocamento das curvas à direita, características de antagonismo do tipo não competitivo. Nas curvas cumulativas de CaCl₂, EASa e VRP reduziram significativamente o Emáx, contudo com deslocamento da curva à direita, que no caso do EASa foi observado apenas com a maior dose. Na presença do anti-histamínico H₁ hidroxizina (HXZ, 0,125 e 0,250 µM), observou-se redução do Emáx das CCE cumulativas de histamina de 100,00 ± 0,00 para 84,53 ± 6,44% e 63,25 ± 4,63% respectivamente e deslocamento significativo à direita (pCE₅₀ controle = 7,08 ± 0,04 para pCE₅₀ = 5,46 ± 0,28 e 5,54 ± 0,19) respectivamente. Quando o EASa (250 e 500 µg/mL) foi associado ao HXZ houve potencialização significativa da redução do Emáx 32,72 ± 1,95% e 17,83 ± 2,48% respectivamente, todavia, os deslocamentos das curvas cumulativas à direita (pCE₅₀ = 5,13 ± 0,23 e 4,80 ± 0,74) não foram estatisticamente diferentes das obtidas na presença de hidroxizina. O conjunto dos resultados sugere possível ação espasmolítica não seletiva do extrato aquoso da casca de *Simarouba amara*, a qual foi correlacionada inicialmente ao bloqueio do influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes.

Palavras-chave: *Simarouba amara*. Simaroubaceae. Espasmolítico. Íleo de cobaia.

ABSTRACT

Simarouba amara (Simaroubaceae) is popularly known as "pau-paraíba" or "marupá". In Brazil, it is found throughout the Brazilian coast and has been used in traditional medicine, especially in the treatment of disorders of inflammatory origins, gastric and respiratory. This study evaluated the possible spasmolytic activity of the aqueous extract of the bark of *Simarouba amara*. Accordingly, in vitro concentration-effect curves (CCE) were obtained from single or cumulative histamine, carbachol, KCl and CaCl₂ in the absence or presence of this or verapamil on isolated guinea pig ileum. The results show that the EASa (125, 250 and 500 µg / ml), and VRP (3,2 0.025 mM) statistically reduced the phasic and tonic components of the single CCE histamine, carbachol and KCl. The cumulative CCE induced by histamine and carbachol, the VRP and this produced a significant reduction of the maximum effect (Emax) without shifting the curves to the right, antagonism characteristics of the non-competitive type. In the cumulative curve CaCl₂, and EASa VRP Emax significantly reduced, yet with displacement of the right turn, in which case the EASa was observed only at the highest dose. In the presence of H₁ antihistamine hydroxyzine (HXZ, 0.125 and 0.250 mM), there was reduction of Emax pCE₅₀ cumulative 100.00 ± 0.00 to 84.53 ± histamine 6.44% and 63.25 ± 4.63% respectively and significant shift to the right (pCE₅₀ control = 7.08 ± 0.04 to 5.46 ± 0.28 = pCE₅₀ and 5.54 ± 0.19) respectively. When the EASA (250 and 500 mg / mL) was associated with HXZ significant potentiation of the decrease Emax% 32.72 ± 1.95 and 17.83 ± 2.48%, respectively, however, the displacements of the curves to the right of cumulative (pCE₅₀ = 5.13 ± 0.23 and 4.80 ± 0.74) were not statistically different from those obtained in the presence of hydroxyzine. The set of results suggests possible non-selective spasmolytic action of the aqueous extract of *Simarouba* loved bark, which was initially correlated to block the calcium influx through voltage gated calcium channels.

Keywords: *Simarouba amara*. Simaroubaceae. Spasmolytic. Guinea pig ileum

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Espécie de *Simarouba amara* coletada no município de Recife-PE 24

RESULTADOS

Figura 2- Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) nas contrações induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 μ M KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia (n = 6).....42

Figura 3- Efeito do verapamil (VRP) nas contrações induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 mM KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia (n = 6).....43

Figura 4- Efeito do EASa nas contrações tônicas induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 mM KCl (**C**) no íleo isolado de cobaia (n = 6)..... 46

Figura 5- Efeito do VRP nas contrações tônicas induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 mM KCl (**C**) no íleo isolado de cobaia (n = 6)..... 47

Figura 6- Curva concentração-efeito cumulativa de histamina (**A**) e carbacol (**B**) na ausência e na presença do EASa, nas concentrações de (125 , 250 e 500 μ g/mL) em íleo isolado de cobaia..... 49

Figura 7- Curva concentração-efeito cumulativa de histamina (**A**) e carbacol (**B**) na ausência e na presença do VRP nas concentrações de (0,1; 0,4 e 0,8 μ M) em íleo isolado de cobaia (n = 6)..... 52

Figura 8- Curvas concentração-efeito cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70mM) na ausência e na presença do EASa nas concentrações de (125, 250 e 500 μ g/mL) em íleo isolado de cobaia (n = 54

Figura 9 - Curvas concentração-efeito cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) na ausência e na presença do VRP nas concentrações de (0,1, 0,4 e 0,8 μ M) em íleo isolado de cobaia (n = 55

Figura 10 - Curvas concentração-efeito cumulativas de histamina na ausência (controle) e presença de hidroxizina (0,125 e 0,250 μ M) e sua associação com o EASa (250e500 μ g/mL) em íleo isolado de cobraia (n=6)..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, histamina (controle) e na presença do EASa em íleo isolado de cobaia	51
Tabela 2 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, carbacol (controle) e na presença do EASa em íleo isolado de cobaia.....	51
Tabela 3 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, histamina (controle) e na presença de verapamil em íleo isolado de cobaia.....	53
Tabela 4 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, carbacol (controle) e na presença de verapamil em íleo isolado de cobaia.....	53
Tabela 5 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, $CaCl_2$ (controle) e na presença de EASa em íleo isolado de cobaia.....	55
Tabela 6 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, $CaCl_2$ (controle) e na presença de VRP em íleo isolado de cobaia.....	56
Tabela 7 - Valores de $Em_{\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} na ausênciã, histamina (controle) e presença de hidroxizina 0,125 e 0,250 μM ou EASa + hidroxizina (250 + 0,125 e 500 $\mu g/mL$ + 0,250 μM) em íleo isolado de cobaia	58

LISTA DE ABREVIATURAS

$[(Ca^{2+})_4-CaM]$	complexo cálcio-calmodulina
$[Ca^{2+}]$	concentração de Ca^{2+}
$[Ca^{2+}]_c$	concentração de Ca^{2+} citosólico
AMPC	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
Ca_v	canais de cálcio voltagem dependentes
Ca_v1	canais de cálcio voltagem dependentes do tipo 1
Ca_vL	canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L
CCE	curva concentração efeito
CCh	carbacol
CE₅₀	concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
DAG	diacilglicerol
e.p.m	erro padrão da média
Emáx	efeito máximo
EASa	extrato aquoso de <i>Simarouba amara</i>
G_{q/11}	proteína G _q ou proteína G ₁₁
GMPC	monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G

GTP	trifosfato de guanosina
HXZ	hidroxizina
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase de cadeia leve da miosina
MLCP	fosfatase da cadeia leve da miosina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de AMP _c
PKG	proteína cinase dependente de GMP _c
RyR	receptor de rianodina
RS	retículo sarcoplasmático
<i>S. amara</i>	<i>Simarouba amara</i>
VRP	verapamil

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS	21
2.2 <i>Simarouba amara</i> Aublet	23
2.3 REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO E DO RELAXAMENTO DO MUSCULO LISO	26
3. OBJETIVOS	33
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	35
4.2 TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	35
4.3 EXTRAÇÃO	35
4.4 ANIMAIS	35
4.5 DROGAS E REAGENTES	36
4.6 SOLUÇÕES NUTRITIVAS	36
4.7 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DO ÍLEO DE COBAIA	36
4.8 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	37
4.8.1 Efeito do extrato aquoso de <i>Simarouba amara</i> (EASa) ou verapamil (VRP) nas contrações fásicas induzidas por histamina, carbacol e KCl	37
4.8.2 Efeito do EASa ou VRP sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, carbacol e KCl	37
4.8.3 Efeito do EASa ou VRP nas curvas concentração - efeito cumulativas induzidas por histamina e carbacol	38
4.8.4 Efeito do EASa ou VRP nas curvas concentração - efeito cumulativas induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante (KCl 70mM), nominalmente sem cálcio	38
4.8.5 Efeito da hidroxizina e de sua associação com o EASA nas curvas concentração - efeito induzidas por histamina	39
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

5. RESULTADOS.....	41
5.1 EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE Simarouba amara (EASa) OU VERAPAMIL (VRP) NAS CONTRAÇÕES FÁSICAS INDUZIDAS POR HISTAMINA, CARBACOL E KCl.....	41
5.2 EFEITO DO EASa OU (VRP) SOBRE AS CONTRAÇÕES TÔNICAS INDUZIDAS POR HISTAMINA, CARBACOL E KCl.....	45
5.3 EFEITO DO EASa OU (VRP) NAS CURVAS CONCENTRAÇÃO EFEITO INDUZIDAS POR HISTAMINA E CARBACOL	49
5.4 EFEITO DO EASa OU (VRP) NAS CURVAS CONCENTRAÇÃO EFEITO INDUZIDAS POR CaCl_2 EM MEIO DESPOLARIZANTE (KCl 70mM), NOMINALMENTE SEM CÁLCIO.....	53
5.5 EFEITO DA HIDROXIZINA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O EASa NAS CURVAS CONCENTRAÇÃO - EFEITO INDUZIDAS POR HISTAMINA.....	56
6. DISCUSSÃO	60
7. CONCLUSÃO	66
REFERENCIAS	68

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado. A incansável busca pelo entendimento das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sua sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao estágio de desenvolvimento científico atual (VIEGAS JR et al., 2006).

Planta Medicinal segundo a ANVISA é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). Os produtos naturais, de origem vegetal, continuam sendo fonte de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas e terapêuticas (CALIXTO, 2005). Porém, estima-se que das 300 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos farmacêuticos (BRANDÃO et al., 2010).

A procura cada vez maior pela utilização de terapias alternativas e complementares para o tratamento ou cura de enfermidades (VEIGA JR et al., 2005), como recurso terapêutico, despertam o interesse para as investigações no intuito de desenvolver fitoterápicos (BITTENCOURT et al., 2002), descobrir novos usos das plantas (TULP; BOHLIN, 2002; PIRES, 2014) e disseminar esse valioso bem, que é parte da cultura popular (HERNANDES, 2013). Neste contexto, destaca-se o Brasil, por ser considerado como um dos países de maior biodiversidade do planeta, além de apresentar uma rica diversidade étnica e cultural (KLEIN, 2009).

Além disso, também se faz necessário à incorporação de plantas medicinais no setor de saúde pública, principalmente na Atenção Primária à Saúde no âmbito de Sistema Único de Saúde (SUS). Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) foi aprovada pelo decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelecendo diretrizes e prioridades para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e o uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, assim como o desenvolvimento de tecnologias e

inovações na área (BRASIL, 2006). A PNPMF foi avaliada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que normatizou registros de medicamentos fitoterápicos. A incorporação da prática integrativa da fitoterapia no SUS culminou na necessidade de pesquisas nessa área com o intuito de enriquecer o conhecimento dos profissionais da saúde, além de tornar as práticas fitoterápicas mais seguras e eficazes (SANTOS et al., 2011). Neste contexto destaca-se a família Simaroubaceae, em especial a *Simarouba amara* que vem sendo utilizada pela população para diversas patologias. Por isso, se faz necessário o seu estudo científico para comprovar tais usos.

A família Simaroubaceae compreende 32 gêneros com aproximadamente 200 espécies de distribuição tropical. Caracteriza-se quimicamente pela presença de quassinoides, metabólitos secundários responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as ações antitumoral, antimalárica, antiviral, anorexígena, inseticida, amebicida, antiparasitária, herbicida, dentre outras (MENDES; CARLINI, 2007; BHATTACHARJEE et al., 2008; SILVA et al., 2010).

Simarouba amara Aublet. (Simaroubaceae), popularmente conhecida como “praíba”, “marupá”, “pau-paraíba” (BONTÉ et al., 1996; ARRIAGA et al., 2002; TAYLOR, 2005) ou caixeta, é uma árvore tropical de médio porte encontrada nas Américas Central e do Sul bem como nas ilhas do Caribe. No Brasil, está presente na Amazônia, no nordeste em Estados como Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão e Pernambuco e também está distribuída em estados do centro-oeste e Sudeste (PIRANI; THOMAS, 2015). Apesar de *Simarouba amara* apresentar várias atividades farmacológicas identificadas e ser extensamente usada na medicina popular do Brasil, ainda verifica-se na literatura poucos dados acerca de suas propriedades farmacológicas relacionadas à planta e a segurança de seu uso pela população.

Muitos metabólitos secundários obtidos de plantas medicinais tradicionais despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas também pela imensa atividade farmacológica que possuem (SIMÕES et al., 2007). Dentre essas atividades, o efeito antagonista ou espasmolítico do extrato da planta testada na musculatura lisa frente à atividade contrátil de vários mediadores químicos como

acetilcolina e histamina são largamente investigados em modelos de teste *in vitro* para elucidação da atividade do extrato da planta testada (SCHLEMPER et al., 1996; DE SOUZA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; GHAYUR et al., 2007; CAVALCANTE et al., 2008).

Buscando contribuir com a pesquisa envolvendo plantas medicinais e continuar com os estudos iniciais já desenvolvidos com *Simarouba amara*, pertencente à família Simaroubaceae, verifica-se a importância de estudar o seu efeito sobre a musculatura lisa de cobaia, uma vez que os quassinoides presentes na planta já apresentam inúmeras atividades descritas dentre elas: antimalárica, antiinflamatória e antiparasitária (DUKE, 1992; AJAIYEGBA et al., 1999; TOMA et al., 2002, ARRIAGA, 2002). Deve-se salientar que substâncias espasmolíticas possuem uma gama de aplicação em processos fisiopatológicos, tais como: asma, hipertensão, arritmias cardíacas, angina do peito, disfunção erétil, espasmos renais, intestinais e uterinos. Além disso, como os mecanismos de contração e relaxamento muscular envolvem mobilização de íons cálcio e este íon medeia grande parte das ações das drogas no nosso organismo, o músculo liso se apresenta como modelo para se investigar mecanismos de ação de substâncias que envolvem a sinalização do Ca^{2+} (WEBB, 2003).

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

Desde o início da humanidade, as práticas e os conhecimentos relativos à natureza adicionaram valores econômicos, culturais e sociais para as comunidades. Com o surgimento das discussões relacionadas ao uso sustentável dos recursos naturais, a sociedade moderna tornou-se ciente da importância econômica da biodiversidade e reconheceu a contribuição do conhecimento tradicional para a ciência e para a sociedade. O conhecimento tradicional, especificamente orientado para o uso de plantas medicinais brasileiras, tem um papel fundamental no processo de geração de inovações para a indústria, tanto por descobrir novas plantas e por sugerir suas atividades farmacológicas (SOUZA et al., 2014).

O Brasil, além de possuir uma das maiores biodiversidades do mundo também é detentor de uma riqueza de conhecimento acumulado por pessoas que tem acesso direto à natureza e aos produtos dessa biodiversidade (SILVA, 2012). Porém, apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (CARNEIRO et al., 2014). Embora não se tenha muito investimento para pesquisas com plantas medicinais, calcula-se que pelo menos metade das plantas contenham substâncias chamadas de princípios ativos, as quais têm propriedades curativas e preventivas para muitas doenças (LORENZI; MATOS, 2002).

Nos últimos anos, a procura por drogas vegetais como recurso terapêutico tem aumentado (NIERO, 2009) e o uso dessas ervas é feito na maioria das vezes por adultos e idosos que buscam complementar o tratamento de uma doença crônica e geralmente acreditam que as plantas medicinais são uma alternativa isenta de efeitos colaterais adversos (BRASIL, 2006). Outros fatores que motivam esse aumento são a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES 2001).

Os produtos naturais vêm recuperando seu espaço e importância na indústria farmacêutica, sendo fonte e inspiração para a atual farmacopeia (KINGSTON, 2011). É importante salientar que alguns estados e municípios brasileiros vêm realizando nas últimas décadas a implantação de programas de fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de minimizar ou até mesmo suprir as carências medicamentosas de suas comunidades. Atualmente, 12 medicamentos fitoterápicos estão disponíveis na rede pública para o tratamento da dor, inflamação, além de outras doenças de baixa gravidade (BRASIL., 2012).

A resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010, estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos, não sendo considerado medicamento fitoterápico aquele que inclui em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Apenas aqueles obtidos exclusivamente de matérias primas vegetais ativas (BRASIL, 2010). A RDC nº 26/2014, revoga a RDC nº 14/2010 separando os fitoterápicos em duas classes, Medicamento Fitoterápico (MF) e Produto Tradicional Fitoterápico (PTF), os medicamentos fitoterápicos têm sua segurança e eficácia com base em ensaios clínicos enquanto que os produtos tradicionais fitoterápicos tem que apresentar provas de segurança a longo prazo e da utilização eficaz em seres humanos (BRASIL., 2014; CARVALHO et al., 2014).

A Fitoterapia representa uma forma de terapia medicinal em notável expansão, cujas projeções do Instituto Brasileiro de Plantas Medicinais (IBPM), mostram que o mercado de medicamentos fitoterápicos movimenta até 500 milhões de dólares por ano no Brasil e apresenta um crescimento anual maior que o mercado farmacêutico tradicional (BANDEIRA et al., 2011). Com o crescimento desse mercado, são muitos os fitoterápicos brasileiros produzidos, entre eles: hortelã, babosa, alho, calêndula, boldo e carqueja; já as principais classes terapêuticas de fitoterápicos comercializadas são os anti-inflamatórios, sedativos, ansiolíticos, antidepressivos e os auxiliares digestivos e hepáticos (SIMÕES et al., 1999; YUNES et al., 2001).

É, portanto, indispensável continuar o processo de formação de recursos humanos e lutar pelo estabelecimento de programas direcionados para a investigação científica e tecnológica na área, buscando soluções na rica

biodiversidade brasileira, através da descoberta e desenvolvimento de fitoterápicos genuinamente nacionais e que possam atender aos interesses da política de saúde para a fitoterapia (BRASIL, 2004; KLEIN et al, 2009).

2.2. *Simarouba amara* Aublet

Simarouba amara tem uma longa história na medicina tradicional de muitos outros países. No Brasil, onde a planta é popularmente conhecida como “praíba”, “marupá” e “pau-paraíba”, a decocção alcoólica ou aquosa da casca do seu caule, a qual constitui a principal fonte de utilização, tem sido usada no tratamento da malária, inflamações, diarreia, e como tônico, sendo tomada diariamente uma xícara do decócto 2-3 vezes ao dia (BONTÉ et al., 1996; ARRIAGA et al., 2002; TAYLOR, 2005), além de já estar disponível na fitoterapia e na homeopatia (SOARES, 2014).

Simarouba amara tem sido usada popularmente desde o ano de 1713, quando os exploradores franceses descobriram que tribos indígenas da floresta da Guiana faziam uso da casca do caule da planta para tratar disenteria e malária. Quando a França foi acometida por uma disenteria endêmica entre os anos de 1718 – 1725, o uso da decocção da casca do caule de *S. amara* foi um dos poucos tratamentos efetivos, sendo usada até hoje naquela região da Guiana para esse fim. Outras tribos indígenas presentes em toda a floresta tropical sul-americana também usam as cascas de *S. amara* como agentes antitérmico, hemostático, tônico, para tratar malária e disenteria (TAYLOR, 2005). É uma árvore tropical de médio porte, que atinge cerca de 35 metros, encontrada nas Américas Central e do Sul bem como nas ilhas do Caribe (AZEVEDO et al.; 2010). Apresenta tronco reto, cilíndrico, sem raízes visíveis. A casca externa é de cor cinza-clara, de textura quase lisa à levemente rachada, com fissuras finas verticais. A casca interna é amarelo-esbranquiçada, de textura arenosa e sabor amargo. As folhas são alternas, compostas, imparipinadas, com folíolos alternos, coriáceos e de base inequilátera. Suas flores são unissexuais e dispostas em panículas terminais (ESPINAL; SIGIFREDO, 1986). O fruto é composto por cinco drupas pequenas, ovóides, até 1,5 cm de largura com uma semente cada, quando maduro, o fruto torna-se negro-azulado (GONZALES et al.,1995). A imagem de *Simarouba amara* é mostrada na figura 1.



Figura 1: Espécie de *Simarouba amara* coletada no município de Recife-PE.
Fonte: arquivo pessoal.

A família Simaroubaceae compreende 32 gêneros com aproximadamente 200 espécies de distribuição tropical e subtropical do planeta. No Brasil, está representada pelos gêneros *Quassia* L. e *Picrolemma* Hook. f., ocorrentes na região Amazônica; *Castela* Turpin e *Picrasma* Blume - no sul do país, além de *Simaba* Aubl. e *Simarouba* Aubl., em quase todas as regiões brasileiras (HALL et al., 1983). Caracteriza-se quimicamente pela presença de quassinoides, metabólitos secundários responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais destacam-se as ações antitumoral, antimalárica, antiviral (HIV), anorexígena, inseticida, amebicida, antiparasitária, herbicida, antituberculose, entre outros (OKANO et al., 2000; MUHAMMAD et al., 2004; CARLINI., 2007; BHATTACHARJEE et al., 2008; MENDES; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2012).

Em 1937 foram isolados os primeiros quassinoides de *Quassia amara* L., a quassina e a neoquassina, de sabor amargo, característico da presença de substâncias dessa classe. Os mesmos são encontrados quase que

exclusivamente na família Simaroubaceae, podendo ser considerados um marcador taxonômico da mesma (ALMEIDA et al., 2007). Atualmente mais de 150 quassinoides foram obtidos de espécies da família Simaroubaceae (KUMAR, 2009). Além dos quassinoides, destacam-se outros metabolitos isolados e elucidados estruturalmente como: alcaloides, triterpenos, esteroides, cumarinas, antraquinonas e flavonoides (BARBOSA et al., 2011)

Em estudos de investigação fitoquímica realizados Polonsky et al. (1978) foram isolados alcaloides, triterpenos e quassinóides da casca de *S. amara*. Grosvenor et al. (2006) conseguiram isolar 6 novos triterpenos das cascas de *Simarouba amara*, além de dois outros compostos anteriormente conhecidos (3-oxatirucalla-7, 24-dien-23-ol e niloticina). Coimbra (1994) isolou alcalóides e taninos da casca da planta. Dentre os alcaloides, a Canthin-6-ona tem sido reportada pelas inúmeras atividades, tais como: antiviral, citotóxica, antiparasitária, antibacteriana, redutora de altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, dentre outras (SHOWALTER, 2013). No entanto, dentre os metabólitos já identificados na espécie, apenas taninos e traços de quassinoides foram identificados por CCD na amostra de *Simarouba amara* utilizada nos estudos do nosso laboratório.

Em 1918, após cerca de dois séculos de história documentada do uso da casca do caule de *S. amara* para tratar a disenteria, a sua utilização para esse fim foi finalmente validada por médicos de um hospital militar da Inglaterra. Eles demonstraram que o chá da casca foi um tratamento eficaz para a disenteria amebiana em humanos. Em 1944, o Instituto Merck constatou em estudo que o chá da casca de *S. amara* era realmente efetiva (91,8%) contra amebas intestinais em humanos e, a mesma ação foi descrita em 1962, nas sementes de *S. amara* em seres humanos (TAYLOR, 2005).

Em 1947 ocorreu o primeiro estudo que comprovou a propriedade antimalárica tanto da casca do caule quanto da raiz de *S. amara*. Quando cepas resistentes aos antimaláricos existentes começaram a surgir, os quassinoides isolados de *S. amara* foram estudados e apresentaram ação antimalárica tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A partir dos anos 80 outras ações foram descobertas como a ação antimicrobiana, atividade amebicida e efeito bactericida dos extratos aquoso e

hidroalcoólico as casca do caule de *S. amara* frente às bactérias *Salmonella typhosa* e *Shigella flexneri*. (TAYLOR, 2005).

Polonsky et al. (1978) isolaram os quassinóides 13,18-dehidroglauucarubinona e glauucarubinona do extrato aquoso da raiz de *S. amara* que apresentaram atividade antiproliferativa contra células leucêmicas, Bonté et al. (1996) evidenciaram uma melhora na rehidratação na pele de mulheres adultas submetidas ao tratamento com o extrato aquoso da casca da raiz de *S. amara* assim como houve maior diferenciação dos queratinócitos em culturas de pele *in vitro*. Maranhão et al. (2014) demonstraram que o EASa apresentou ação anti-inflamatória ao inibir a formação do edema na pata de ratos Wistar. Provavelmente, por uma ação inibitória atribuída inicialmente ao mediador histamina, atividade antiulcerogênica e efeito hepatoprotetor significativo sobre a lesão hepática aguda induzida por CCl₄. A autora sugere que este efeito hepatoprotetor pode ser devido à ação inibitória sobre a formação de radicais livres por catequinas evidenciado pela recuperação das enzimas antioxidantes e pela diminuição da peroxidação de lipídios.

2.3. REGULAÇÃO DA CONTRAÇÃO E DO RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA

As células do músculo liso estão presentes nas paredes de vários órgãos, tais como os vasos sanguíneos, estômago, intestino, bexiga e vias aéreas (HILL, 2011). Anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso determinam várias desordens e doenças como hipertensão (UEHATA et al., 1997), asma brônquica, vaso espasmos cerebrais e coronarianos, disfunção erétil e possíveis complicações no trabalho de parto (WEEB, 2003) dispepsia, diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008). Logo, os ensaios farmacológicos no músculo liso contribuem para o desenvolvimento de futuros fármacos para serem utilizados no tratamento das diversas enfermidades que acometem esse músculo.

A característica que define as células do músculo liso é a sua capacidade de contração. Essa propriedade reflete a natureza excitável dessas células, que permite, através do potencial de membrana, o influxo de Ca²⁺ e a formação de pontes cruzadas entre os filamentos proteicos de actina e miosina, principais responsáveis pelo movimento de contração. A propriedade contrátil do músculo liso desempenha um importante papel funcional nos órgãos do corpo tais como vasos

sanguíneos, trato intestinal, urinário, vias aéreas, vasos linfáticos, pênis e útero, permitindo mudanças dinâmicas no volume do lúmen. Estas alterações podem regular o movimento peristáltico do conteúdo dos órgãos, tal como no trato gastrointestinal cuja ação causada pela contração sequencial de segmentos do músculo liso é responsável pela circulação dos alimentos (HILL, 2011).

A contração no músculo liso em resposta a vários agentes é frequentemente composta por duas fases: um componente fásico rápido, seguido por um lento mais sustentado, o componente tônico (BOLTON, 1979; TANAHASHI et al., 2009). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca^{2+} no músculo liso, uma extracelular que permite o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma, através dos canais na membrana plasmática e outra intracelular, que representa os estoques internos, em especial o retículo sarcoplasmático (RS), que libera Ca^{2+} para o citosol (MA; PAN, 2003).

O cálcio é um importante segundo mensageiro que desempenha um papel fundamental em muitos processos celulares incluindo movimentos, secreção e morte celular (LAPORTE, 2004). Para desempenhar os processos intracelulares, o Ca^{2+} liga-se a sítios específicos em proteínas de ligação ao Ca^{2+} , sendo a proteína mais conhecida e de maior afinidade pelo cálcio a calmodulina (CaM) (HEIZMANN, 1991). Durante a contração do músculo liso, o cálcio é o principal mensageiro intracelular excitatório da membrana. A sua concentração é dependente de um mecanismo de transporte de íons localizada na membrana plasmática e da regulação dos estoques do retículo sarcoplasmático (LAPORTE et al., 2004).

Na musculatura lisa um aumento na concentração de cálcio citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]$) é a causa primária para o início da contração (HILL et al., 2011), (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). O início de uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamento: eletromecânico, envolvido com a mudança de potencial da membrana, devido a uma despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[\text{K}^+]_e$) e aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ através dos canais de Ca_v , e o acoplamento fármaco-mecânico, que ocorre indiretamente, induzida pela ligação dos agonistas aos seus receptores, levando a abertura de Ca_v , na membrana plasmática, causando aumento de Ca^{2+} citoplasmático e, por fim gerando a contração maior do

que a observada apenas com a mudança de potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

A entrada de cálcio na musculatura lisa visceral que vem do meio extracelular é regulada pelo potencial de membrana, o qual determina a abertura dos Ca_v (CATTERALL, 2011; WRAY et al., 2001), presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER et al., 2007). Essa família de canais de Ca^{2+} possui 10 membros, caracterizados conforme sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas e são formados por 5 subunidades distintas. Os canais de cálcio ativados por alta voltagem ($\text{Ca}_v\text{-L}$) são assim subdivididos: sensíveis a diidropiridinas, alvos de bloqueadores dos canais de cálcio utilizados na terapêutica e os não diidropiridínicos (fenilalquilaminas) são os principais Ca_v envolvidos no acoplamento excitação-contração e muitas vezes o único tipo de canal de Ca^{2+} expresso na maioria dos músculos lisos (WATTERMAN, 2000; THORNELOE; NELSON 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005). A subfamília dos Ca_v2 são ativados por alta voltagem, porém, ao contrário dos Ca_v1 , são insensíveis a di-hidropiridinas, e seu principal local de expressão é nos neurônios, e por fim a subfamília dos Ca_v3 ou $\text{Ca}_v\text{-T}$, que para serem expressos necessitam de uma fraca despolarização, também são insensíveis à dihidropiridinas e atuam em inúmeros tipos de células envolvidas na formação do potencial de ação com padrões repetitivos (CATTERALL, 2011).

Os mecanismos fármaco mecânicos da contração ocorrem quando um agonista como a histamina, carbacol entre outros, se ligam aos seus receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína G_q ou G_{11} , os quais contêm subunidades α que ativam a fosfolipase $\text{C } \beta_1$ ($\text{PLC } \beta_1$) e acabam por promover a hidrólise de fosfolipídeos presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), produzindo o 1,4,5-trifosfato de inositol (PIP_3) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 2008).

O RS representa a principal fonte de Ca^{2+} intracelular. O IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do RS quando se liga aos receptores de IP_3 (IP_3R), que são canais de cálcio ativados pelo IP_3 . Também encontram-se no RS os receptores de rianodina (RyR), que são canais de cálcio ativados pelo cálcio liberado via IP_3R num processo chamado de liberação de Ca^{2+} induzido pelo Ca^{2+} (CICR), ambos os receptores

permitem a liberação de cálcio do RS para o citosol, culminando num aumento do $[Ca^{2+}]_c$ (DELLIS et al., 2006). A liberação de Ca^{2+} do RS induz o deslocamento da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática que é ativada quando entra em contato com o DAG. Várias isoformas de PKC já foram descobertas no músculo liso, onde a ativação dessa cinase acarreta na fosforilação de proteínas alvo específicas, como os Ca_v presentes na MP ativando-os e em seguida, promovendo o influxo de Ca^{2+} (BERRIDGE, 2009). Esse mecanismo inclui canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, canais de cálcio não seletivos, liberação de cálcio no citosol e a bomba de sódio e cálcio (JANSSEN, 2002). Tem sido observado que o influxo de cálcio é o maior responsável pelos aumentos nos níveis intracelulares desse íon (KARAKI et al., 1997).

Quando o cálcio se encontra em quantidades elevadas no meio citoplasmático, independentemente da fonte de origem, ele se liga a CaM formando um complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ responsável por ativar a cinase de cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo formado representa a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina, favorecendo um deslizamento entre esses filamentos gerando a contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Sendo o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ o estímulo que leva à contração, consequentemente seu relaxamento se dá por diminuição dos níveis desse íon no citosol (SOMLYO et al., 2004) desativando a MLCK. A fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP), desfosforila a cadeia leve da miosina (MLC) causando o relaxamento do músculo liso, sendo essa reação tipicamente lenta por isso as contrações do músculo liso são mais sustentadas e se dissipam mais lentamente que as reações do músculo estriado (GARRET; GRISHAM 1995). A principal diferença entre a contração do músculo liso inicial e a manutenção dessa contração está no equilíbrio entre a MLCK e a atividade da MLCP. Esse balanço age como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integra a contração do músculo liso (WATTERSON; 2005).

Esta diminuição na $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer através do mecanismo fármaco mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias

bioquímicas que levam a contração ou pelo mecanismo eletromecânico, caracterizado pela hiperpolarização ou repolarização (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O mecanismo eletromecânico de relaxamento na musculatura lisa gastrointestinal também envolve a abertura dos canais de K^+ , entre eles: canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), canais de potássio voltagem dependente K_V , e canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}), (NELSON; QUAYLE, 1995) que desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso da membrana, na excitabilidade celular, e inibição da atividade contrátil, são canais ativados por despolarização de membrana e promovem efluxo de K^+ , o qual é responsável parcialmente pela repolarização da membrana e pela manutenção do potencial de repouso (KO et al., 2010). A condução ao K^+ determina vários processos celulares incluindo secreção hormonal, manutenção do volume celular e controle da formação e propagação de sinais elétricos em células excitáveis (MACKINNON, 2003).

Os mecanismos de relaxamento no músculo liso pelo acoplamento fármaco-mecânico podem ocorrer via GPCR acoplado a proteína G_s , cuja subunidade α ativa a adenilil ciclase (AC) e gera AMPC. Além disso, a geração de óxido nítrico (NO) nas células endoteliais adjacentes, estimulam a atividade da guanilil ciclase solúvel (GC_s) que induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) (MURTHY, 2006). Um dos mais importantes mecanismos relacionados ao relaxamento das células da musculatura lisa se deve ao aumento dos níveis citosólicos de AMPc e GMPc (PUETZ et al., 2009).

Sendo assim, ambas as proteínas cinases (PKA e PKG) fosforilam vários substratos, levando a: (1) inibição dos CA_V , causando uma redução na concentração do cálcio citosólico por diminuir o influxo de Ca^{2+} , (2) um aumento na atividade da Ca^{2+} -ATPase tanto no RS (SERCA) quanto na membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e extrusão de Ca^{2+} , respectivamente, diminuindo a $[Ca^{2+}]_c$, (3) diminuição do $[Ca^{2+}]_c$ por ativação do trocador Na^+/Ca^+ , (4) redução da liberação de cálcio do RS pela PKG através da fosforilação dos IP3R, (5) inibição da MLCK, diminuindo sua afinidade pelo complexo cálcio-calmodulina, reduzindo MLC fosforilada e o processo contrátil (6) ativação de canais de K, que, de forma indireta causam a desativação dos CA_V por hiperpolarização ou repolarização (WOODRUM; BROPHY, 2001; DANILA; HAMILTON, 2004).

O íleo de cobaia é uma ferramenta útil para revelar as propriedades antagonistas de cálcio, incluindo drogas antagonistas já conhecidas (DAR; CHANNA, 1999), além disso, não há registros na literatura sobre estudos farmacológicos do EASa na musculatura lisa, portanto, escolheu-se o íleo isolado de cobaia como um modelo experimental para o teste e início de estudos que possam dar origem, no futuro, a drogas que possam atuar em diversos processos fisiopatológicos como por exemplo as cólicas intestinais ou que venha a servir como uma ferramenta farmacológica nos estudos pré clínicos de desenvolvimento de medicamentos espasmolíticos.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar a atividade espasmolítica do extrato seco da casca de *Simarouba amara* Aublet.

3.2. ESPECÍFICOS

Investigar o efeito *in vitro* do extrato de *Simarouba amara* sobre a amplitude das contrações fásicas e tônicas induzidas por diferentes agentes contráteis em íleo isolado de cobaia e comparar seu efeito com o antagonista dos canais de cálcio, verapamil (VRP).

Averiguar o efeito *in vitro* do extrato de *Simarouba amara* sobre as curvas concentração efeito cumulativas induzidas por histamina, carbacol e CaCl_2 no íleo isolado de cobaia e confrontar com o resultado obtido na presença de verapamil (VRP).

Observar o efeito do anti-histaminíco H_1 , hidroxizina e de sua associação com o extrato de *Simarouba amara*, sobre as CCE cumulativas induzidas por histamina no íleo isolado de cobaia.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

As cascas do caule de *Simarouba amara* Aublet foram coletadas em fevereiro de 2014, no bairro de Guabiraba-PE (7° 59' 39" S e 34° 56' 24" W Gr.) e identificadas no Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). A exsiccata da planta foi depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima sob o número 88473.

4.2. TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As amostras (cerca de 7 Kg) das cascas do caule de *Simarouba amara* foram previamente secas à sombra, em local arejado e isento de umidade durante 48 horas. Em seguida, foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ até estabilização da umidade residual. Ao final, as cascas foram submetidas à moagem em moinho de facas, constituindo assim, a matéria-prima vegetal.

4.3. EXTRAÇÃO

A matéria-prima vegetal foi submetida à decocção (10:100, m/v) durante 10 minutos usando água destilada como solvente extrator. O extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* foi concentrado em liofilizador e após o procedimento, o rendimento do extrato seco de *Simarouba amara* foi de 12,15 g por litro ou 1,21% do extrato aquoso da casca de *Simarouba amara*.

4.4. ANIMAIS

Cobaias adultos (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando em torno de 350-500g, obtidos de fornecedor comercial foram utilizados para experimentos *in vitro*. Os animais foram adaptados por 72h, mantidos em gaiolas separadas sob condições ambientais padrão ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 12:12 h ciclo de claro/escuro) e tiveram livre acesso à água e ração industrializada (Presence[®], Purina, Brasil). Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº. 23076.060307/2014-95) de acordo com o instituto nacional de guia de saúde para o cuidado e uso de animais de laboratório.

4.5. DROGAS E REAGENTES

O dicloridrato de histamina e os cloridratos de carbamilcolina (CCh) e de verapamil foram obtidos a partir de Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, Missouri, EUA), o cloreto de cálcio (CaCl_2) cloreto de potássio (KCl), foram adquiridos de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Estas substâncias foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução estoque, as mesmas foram mantidas em freezer a -20°C . Para cada protocolo experimental, essas soluções foram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas para cada experimento.

4.6. SOLUÇÕES NUTRITIVAS

As soluções nutritivas tiveram seu pH ajustado com HCl ou NaOH 1N para 7,4. Todos os componentes utilizados nesta solução foram adquiridos de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), sendo as suas composições descritas abaixo:

Krebs modificado (mM): NaCl (117,0), KCl (4,7), MgSO_4 (1,3), NaH_2PO_4 (1,2), CaCl_2 (2,5), glicose (11,0) e NaHCO_3 (25,0).

Krebs modificado despolarizante (KCl 70mM) nominalmente sem Ca^{2+} (mM): NaCl (51,7), KCl (70,0), MgSO_4 (1,3), NaH_2PO_4 (1,2), glicose (11,0) e NaHCO_3 (25,0).

A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da Air Liquide[®] (Brasil).

4.7. MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DO ÍLEO DE COBAIA

Após 18h de jejum e água *ad libitum*, as cobaias foram eutanasiadas por inalação de CO_2 . Em seguida, foi realizada uma abertura na cavidade abdominal, e um segmento de aproximadamente 15 cm do íleo foi cuidadosamente retirado e colocado em placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37°C sob gaseificação com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2). Após a dissecação, o segmento do íleo foi seccionado em fragmentos de 2-3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro (10 mL), numa tensão de aproximadamente 1g e deixados em repouso por 30 minutos para a completa estabilização da preparação. Durante este intervalo, a solução nutritiva foi trocada a

cada 10 minutos. As respostas foram registradas pelo sistema de aquisição de dados PowerLab[®] 8/35 conectado a um computador com o software LabChart[®] 8, ambos da ADInstruments.

4.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.8.1. Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) ou verapamil (VRP) sobre as contrações fásicas induzidas por histamina, carbacol e KCl

Após o período de estabilização, duas contrações de amplitudes similares foram obtidas com 1 μ M de histamina, 1 μ M de carbacol ou 40 mM de KCl com intervalo de 30 minutos. A segunda contração foi definida como controle (100%). Posteriormente, o extrato de *Simarouba amara* (EASa, 125, 250, 500, 1000 e 2000 μ g/mL) foi adicionado à cuba. Cada preparação foi exposta a apenas uma concentração do extrato. Após o período de incubação de 30 minutos, uma terceira contração induzida pelos agentes contráteis foi obtida na presença do extrato e a amplitude foi mensurada. O efeito inibitório exercido pelo extrato foi calculado como um percentual da contração controle. O mesmo protocolo foi realizado com as concentrações de (0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μ M) de verapamil.

4.8.2. Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) ou verapamil (VRP) sobre as contrações tônicas induzidas por histamina, carbacol e KCl

Duas contrações de amplitudes similares foram obtidas com 1 μ M de histamina, 1 μ M de carbacol ou 40 mM de KCl, após o período de estabilização de 30 minutos. O platô da segunda contração foi definido como controle (100%). Durante a fase tônica sustentada da terceira contração, o extrato foi adicionado de maneira cumulativa à cuba, em diferentes preparações e em concentrações crescentes (62,5; 125; 187,5; 250; 312; 375; 437,5; 500; 562,5; 625; 687,5; 750; 812; 875; 937,5; 1000 e 2000 μ g/mL). O relaxamento foi expresso como a porcentagem reversa da contração inicial produzida pelos agentes contráteis. O mesmo experimento foi realizado com verapamil nas concentrações: 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 μ M.

4.8.3. Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) ou verapamil nas curvas concentração-efeito cumulativas induzidas por histamina e carbacol

As preparações foram lavadas a cada 10 minutos durante um intervalo de 30 minutos para a completa estabilização e, em seguida, foram obtidas duas contrações de mesma magnitude com 1 μM de histamina com intervalo de 30 minutos. Posteriormente foram obtidas CCE cumulativa (VAN, ROSSUM, 1963) e crescente com histamina (10^{-9} - $3 \cdot 10^{-6}$ M) ou carbacol (10^{-9} - $3 \cdot 10^{-6}$ M) na ausência ou presença (pré-incubação por 30 minutos do EASa 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) em experimentos independentes.

Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do extrato com a curva obtida na ausência do extrato (curvas controle, 100%). O mesmo protocolo foi realizado para o verapamil nas concentrações de 0,1; 0,4 e 0,8 μM .

4.8.4. Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) ou verapamil (VRP) nas curvas concentração-efeito cumulativas induzidas por CaCl_2

Após o período de estabilização do órgão por 30 minutos, a solução de Krebs modificado foi substituída pela solução despolarizante (70mM de KCl) nominalmente sem Ca^{2+} , por um período de 45 minutos, efetuando-se lavagens a cada 10 minutos. Em seguida, foram induzidas duas CCE cumulativa e crescente com CaCl_2 (10^{-6} - 10^{-1}M). Na ausência do CaCl_2 , o EASa foi incubado por 30 minutos nas diferentes concentrações (125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) e em experimentos independentes. Na presença do EASa uma terceira CCE cumulativa ao CaCl_2 foi obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a porcentagem da resposta contrátil na presença do extrato com a última curva obtida na ausência do extrato (curva controle, 100%). O mesmo protocolo foi realizado para o verapamil nas concentrações de (0,1; 0,4 e 0,8 μM).

4.8.5. Efeito da hidroxizina e de sua associação com o EASa nas curvas concentração – efeito cumulativas induzidas por histamina

As preparações foram lavadas a cada 10 minutos durante um intervalo de 30 minutos para a completa estabilização e, em seguida, foram induzidas duas CCE cumulativa e crescente com histamina (10^{-9} - 10^{-4} M), em que a segunda curva foi definida como controle (100%). Em seguida, hidroxizina (0,125 e 0,250 μ M) ou hidroxizina + EASa (0,125 + 0,250 μ M e 250 + 500 μ g/mL) foram adicionados ao banho. Após um período de incubação de 30 min, uma nova CCE cumulativa foi induzida pela histamina (10^{-9} - 10^{-4} M) e a sua amplitude foi medida. Os efeitos inibitórios foram comparados com a curva controle.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M). A diferença entre os grupos foi estabelecida pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($P < 0,05$). O efeito máximo e o logaritmo negativo da concentração molar de agonista que produz 50% do efeito máximo (pEC_{50}) foram obtidos graficamente a partir da curva de concentração-resposta. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism[®] 6.0 de GraphPad Software Inc. (EUA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Simarouba amara* (EASa) OU VERAPAMIL (VRP) NAS CONTRAÇÕES FÁSICAS INDUZIDAS POR HISTAMINA, CARBACOL E KCl EM ÍLEO DE COBAIA.

O EASa (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) reduziu as contrações fásicas induzidas por histamina 1 μM (Figura 2A) de maneira significativa. A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $58,63 \pm 8,28$ e $41,45 \pm 6,54\%$, respectivamente. A menor dose (125 $\mu\text{g/mL}$) não produziu inibição estatisticamente significativa $88,75 \pm 3,76\%$.

Nas contrações fásicas induzidas por carbacol 1 μM (Figura 2B), o EASa (250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) inibiu as contrações de forma significativa, exceto na menor concentração do extrato (125 $\mu\text{g/mL}$ - $91,27 \pm 6,31\%$). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $68,45 \pm 7,38$; $64,53 \pm 3,00$ e $35,10 \pm 4,26\%$, respectivamente.

Frente às contrações induzidas por KCl 40 mM (Figura 2C), o EASa (500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$) mostrou uma ação espasmolítica, afora nas concentrações de (125 e 250 $\mu\text{g/mL}$ - $93,75 \pm 5,05$; $90,53 \pm 3,95\%$). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $64,43 \pm 5,33$; $63,27 \pm 5,38$ e $43,80 \pm 2,70\%$.

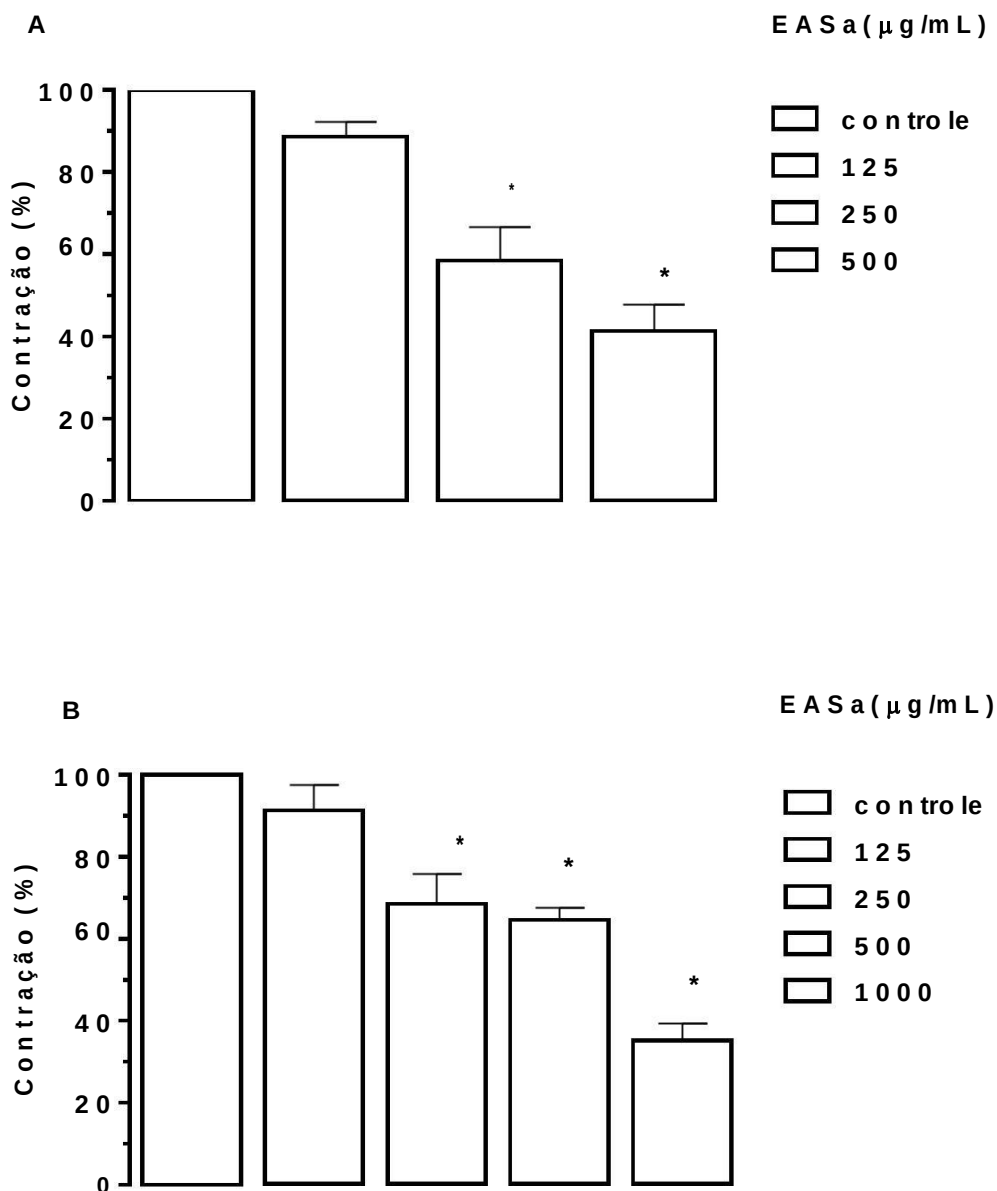
O bloqueador dos canais de cálcio, verapamil (VRP) nas concentrações de (0,4 e 0,8 μM) reduziu a amplitude das contrações fásicas induzidas por histamina 1 μM (Figura 3A) de maneira significativa. A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $54,15 \pm 5,40$ e $43,38 \pm 5,43\%$, respectivamente.

Efeito inibitório concentração-dependente foi observado frente às contrações induzidas por carbacol 1 μM (Figura 3B). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $69,93 \pm 5,02$ e $39,63 \pm 2,36\%$ respectivamente.

O verapamil nas concentrações de (0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 μM) diminuiu significativamente as contrações induzidas por KCl 40 mM (Figura 3C). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 100% (controle) para: $63,54 \pm 6,84$; $60 \pm 7,88$; $60 \pm 4,28$ e $47,20 \pm 2,73\%$, respectivamente.

Em todos os experimentos, a responsividade do íleo de cobaia aos agentes contráteis testados foi restabelecida após 30 minutos da retirada do extrato da cuba.

Figura 2. Efeito do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) nas contrações fásicas induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 mM KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia (n = 6). Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. (n = 6). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).



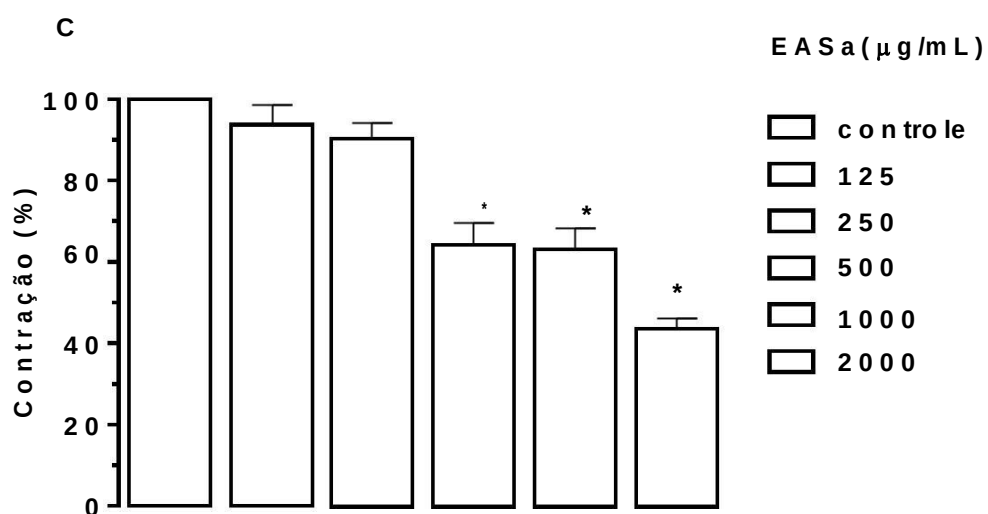
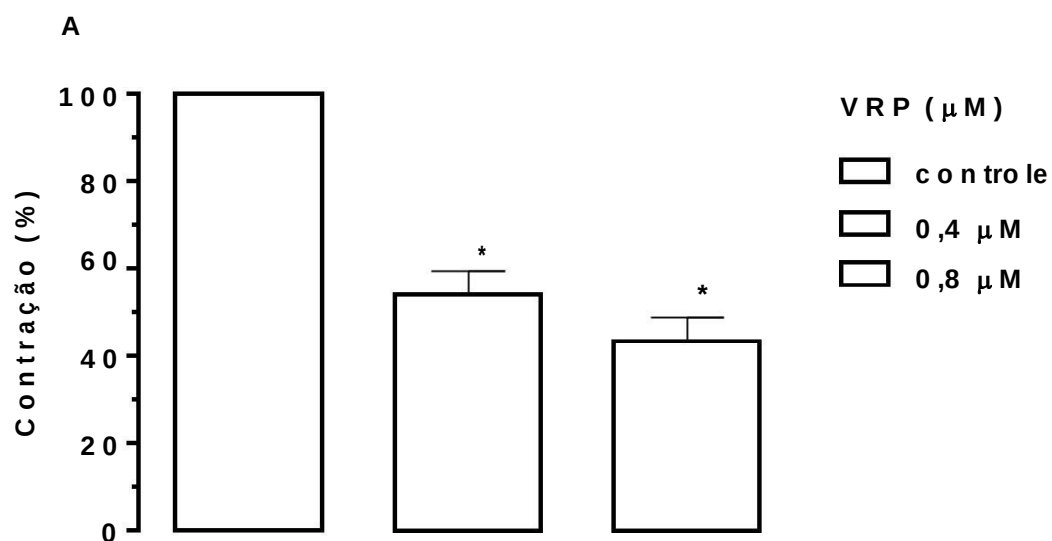
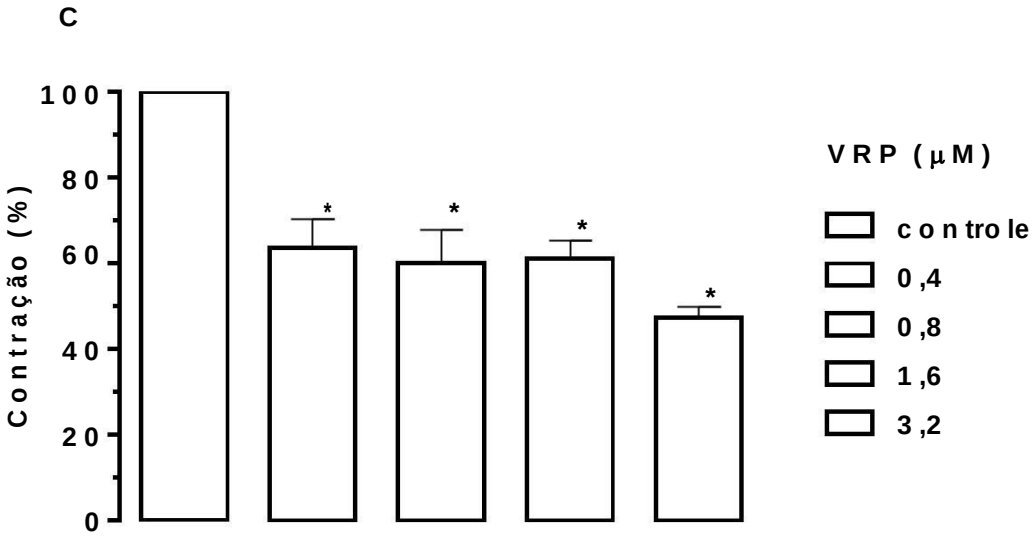
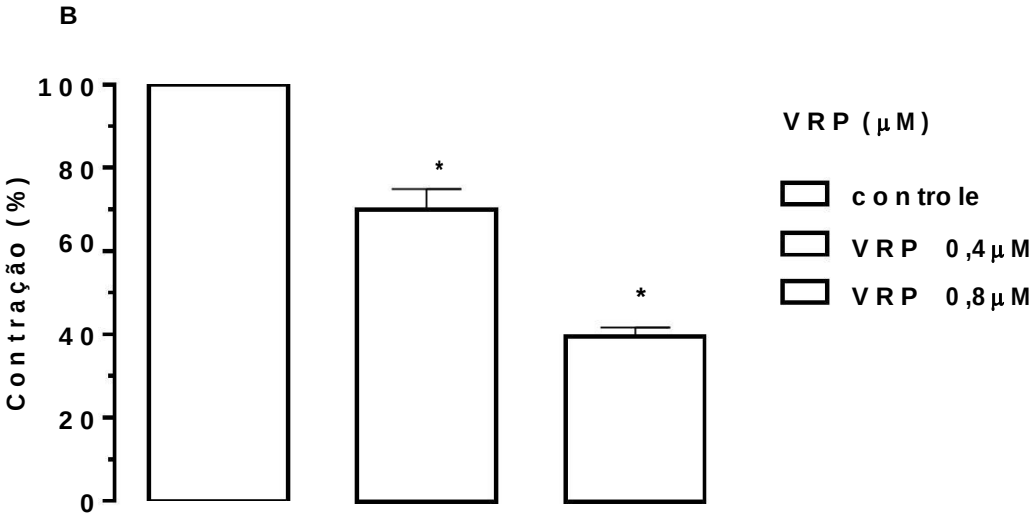


Figura 3. Efeito do verapamil (VRP) nas contrações fásicas induzidas por 1 μ M de histamina (**A**), 1 μ M de carbacol (**B**) e 40 mM KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia (n = 6). Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. (n = 6). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).





5.2. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Simarouba amara* (EASa) OU (VRP) SOBRE AS CONTRAÇÕES TÔNICAS INDUZIDAS POR HISTAMINA, CARBACOL E KCl.

O EASa (125, 187,5; 250; 312; 375; 437,5 e 500 $\mu\text{g/mL}$) relaxou de maneira significativa o íleo de cobaia pré-contráído com 1 μM histamina, exceto na menor concentração (62,5 $\mu\text{g/mL}$ - $10,00 \pm 2,55\%$), (Figura 4A). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $18,37 \pm 3,25$; $24,61 \pm 2,95$; $34,13 \pm 3,46$; $40,11 \pm 3,94$; $44,94 \pm 3,79$; $47,90 \pm 3,84$ e $50 \pm 3,96\%$, respectivamente.

A contração tônica no íleo de cobaia pré-contráído por 1 μM de carbacol (Figura 4B) foi inibida de maneira significativa pelo EASa (62,5; 125; 250; 500; 750; 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $11,63 \pm 3,04$; $21,75 \pm 3,49$; $24,32 \pm 4,41$; $37,61 \pm 4,83$; $45,16 \pm 1,83$; $60,70 \pm 3,62$ e $71,21 \pm 4,02\%$, respectivamente.

No íleo isolado de cobaia pré-contráído com 40 mM KCl (Figura 4C) ocorreu relaxamento de maneira significativa quando na presença do EASa (125; 250; 500; 750; 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$), exceto na concentração de (62,5 $\mu\text{g/mL}$ - $5,42 \pm 2,26\%$). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $14,80 \pm 3,92$; $28,78 \pm 4,18$; $38,79 \pm 4,75$; $46,95 \pm 4,92$; $51,79 \pm 1,07$ e $63,45 \pm 1,20\%$, respectivamente.

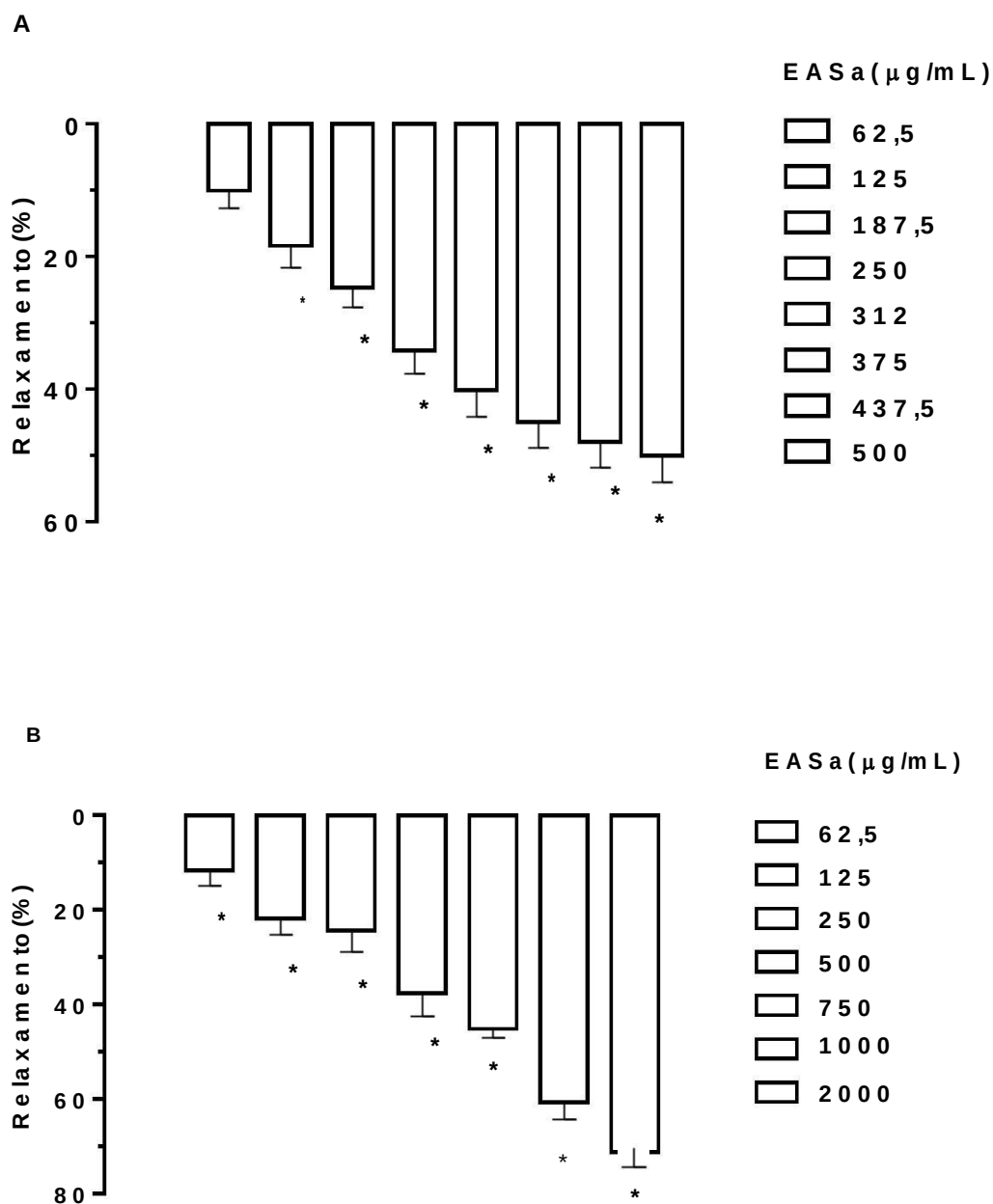
O VRP (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 μM) relaxou de maneira significativa o íleo de cobaia pré-contráído com 1 μM de histamina (Figura 5A). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $37,01 \pm 6,53$; $51,98 \pm 5,29$; $62,80 \pm 5,76$; $73,41 \pm 5,92$; $78,20 \pm 5,85$ e $83,81 \pm 5,53\%$, respectivamente.

O VRP nas mesmas concentrações, produziu relaxamento estatisticamente significativo no íleo pré-contráído com 1 μM de carbacol (Figura 5B). A porcentagem de redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $50,30 \pm 6,71$; $57,11 \pm 5,93$; $65,54 \pm 5,75$; $73,01 \pm 5,30$; $81,05 \pm 3,27$ e $87,92 \pm 2,29\%$ respectivamente.

Da mesma forma, o VRP, nas mesmas concentrações, relaxou de maneira significativa o íleo pré-contráído com 40mM de KCl (Figura 5C). A porcentagem de

redução da contração ($n = 6$) foi de 0% (controle), para: $48,66 \pm 6,20$; $58,58 \pm 6,38$; $67,89 \pm 6,68$; $78,88 \pm 4,59$; $86,26 \pm 2,90$ e $91,30 \pm 2,22\%$, respectivamente.

Figura 4. Efeito do EASa nas contrações tônicas induzidas por $1\mu\text{M}$ de histamina (**A**), $1\mu\text{M}$ de carbacol (**B**) e 40mM KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia ($n = 6$). Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).



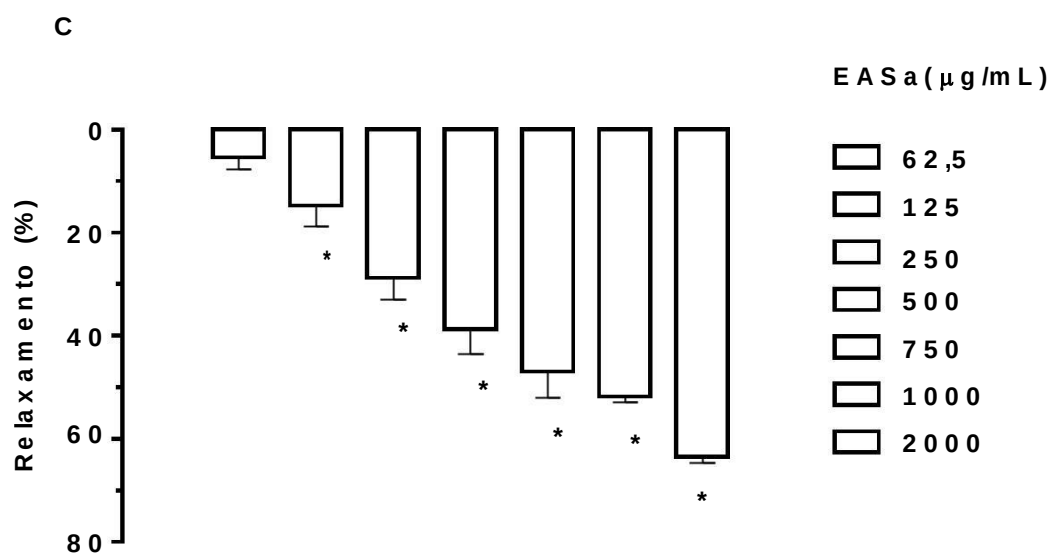
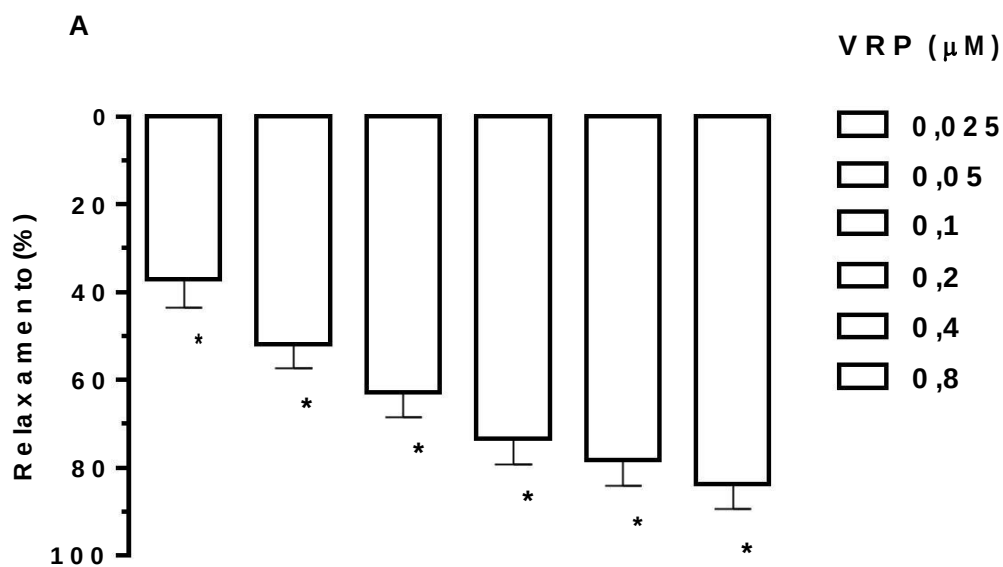
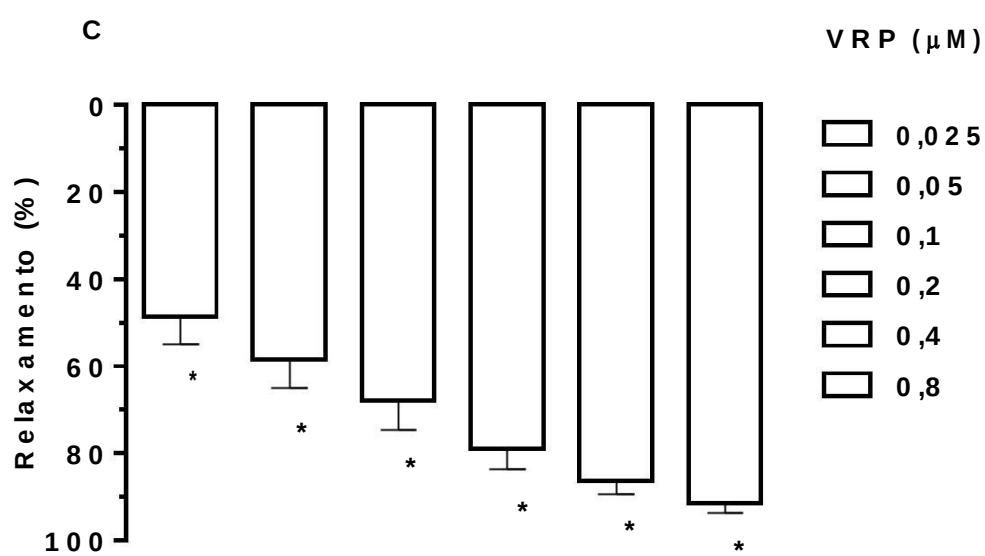
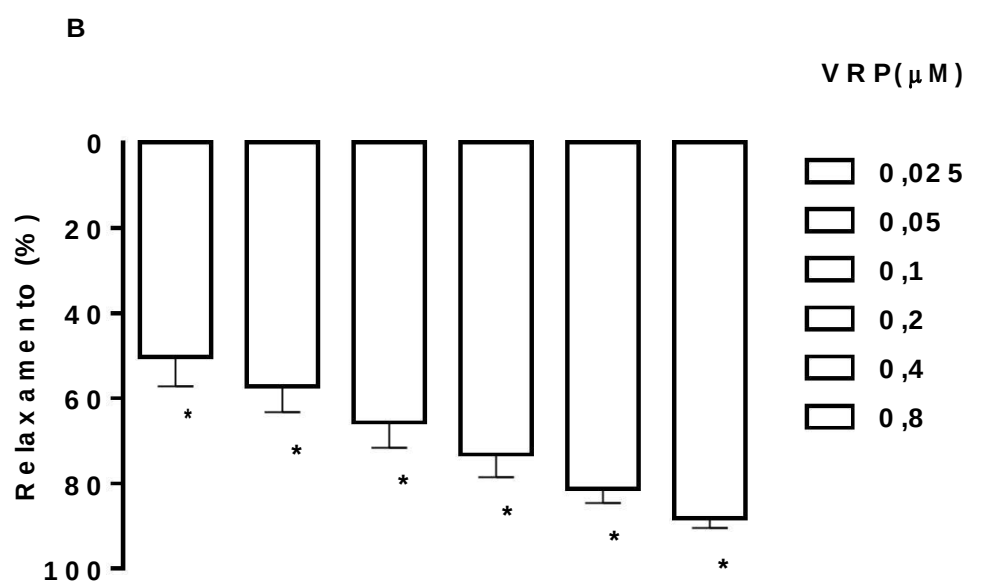


Figura 5. Efeito do VRP nas contrações tônicas induzidas por $1\mu\text{M}$ histamina (**A**), $1\mu\text{M}$ de de carbacol (**B**) e 40mM KCl (**C**) em íleo isolado de cobaia ($n = 6$). Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).





5.3. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Simarouba amara* (EASa) OU (VRP) NAS CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO CUMULATIVAS INDUZIDAS POR HISTAMINA E CARBACOL.

O EASa (125, 250 e 500 µg/mL) reduziu de maneira significativa o efeito máximo ($E_{m\acute{a}x}$) da curva induzida por histamina (10^{-9} - 3.10^{-6} M). Não houve deslocamento da curva à direita, ou seja, os valores de pCE_{50} não foram estatisticamente diferentes do controle (Figura 6A e Tabela 1).

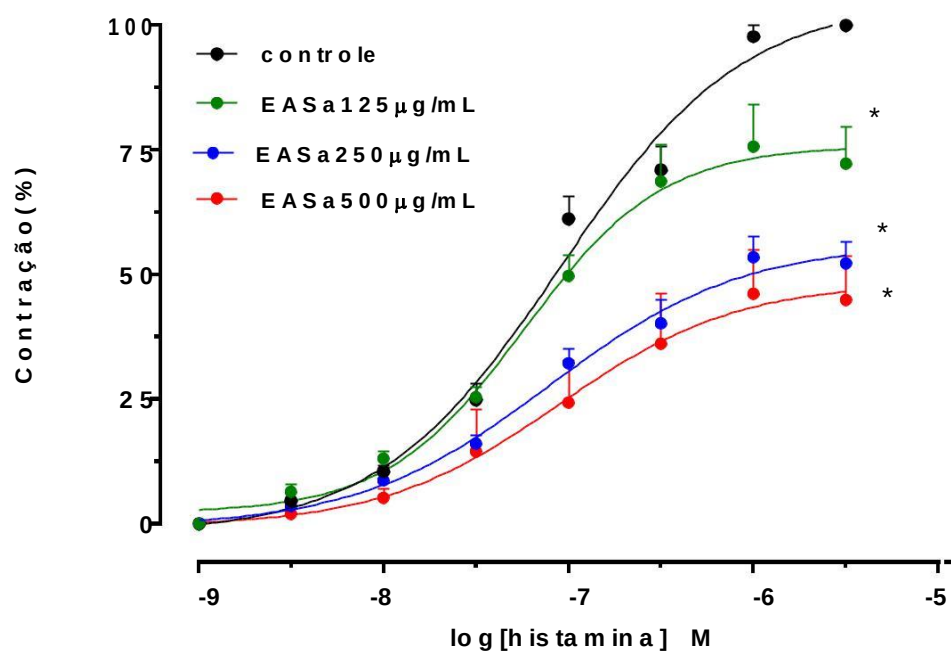
Nas contrações induzidas por carbacol (10^{-9} - 3.10^{-6} M), o EASa (125, 250 e 500 µg/mL) reduziu de forma significativa e concentração-dependente o $E_{m\acute{a}x}$ da curva cumulativa de carbacol sem alterar estatisticamente os valores de pCE_{50} (Figura 6B e Tabela 2).

O verapamil (0,1; 0,4 e 0,8 µM) produziu inibição significativa e concentração-dependente no $E_{m\acute{a}x}$ da curva cumulativa induzida por histamina (10^{-9} - 3.10^{-6} M), entretanto, não modificou os valores de pCE_{50} (Figura 7A e Tabela 3).

Nas curvas concentração resposta induzidas por carbacol (10^{-9} - 3.10^{-6} M), o verapamil (0,1; 0,4 e 0,8 µM), também induziu um perfil de curva similar ao obtido com histamina, ou seja, redução estatística e concentração-dependente do $E_{m\acute{a}x}$, sem alterar os valores de pCE_{50} (Figura 7B e Tabela 4).

Figura 6. Curva concentração efeito cumulativa de histamina (A) e carbacol (B) na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa, 125, 250 e 500 µg/mL) em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. (n = 6). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

A



B

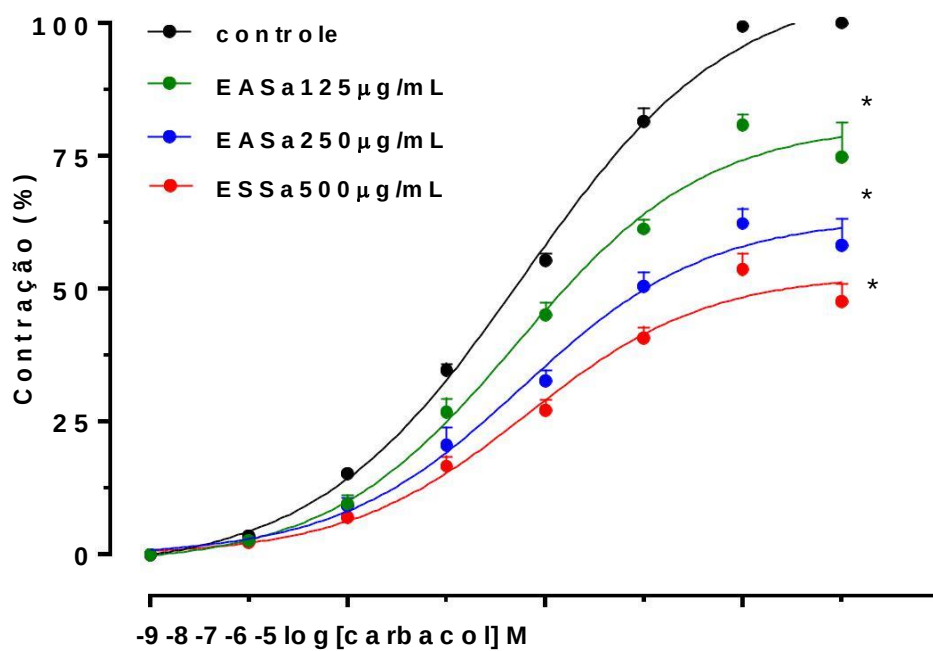


Tabela 1. Valores de Emáx (%) e pCE₅₀ da histamina na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa, 125, 250 e 500 µg/mL) em íleo isolado de cobaia.

	Emáx (%)	pCE ₅₀
histamina (controle)	100,00 ± 0,00	7,04 ± 0,07
EASa 125 µg/mL	75,64 ± 8,47*	7,22 ± 0,11
250 µg/mL	53,41 ± 4,26*	7,08 ± 0,13
500 µg/mL	46,11 ± 8,85*	7,03 ± 0,31

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6). (*) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

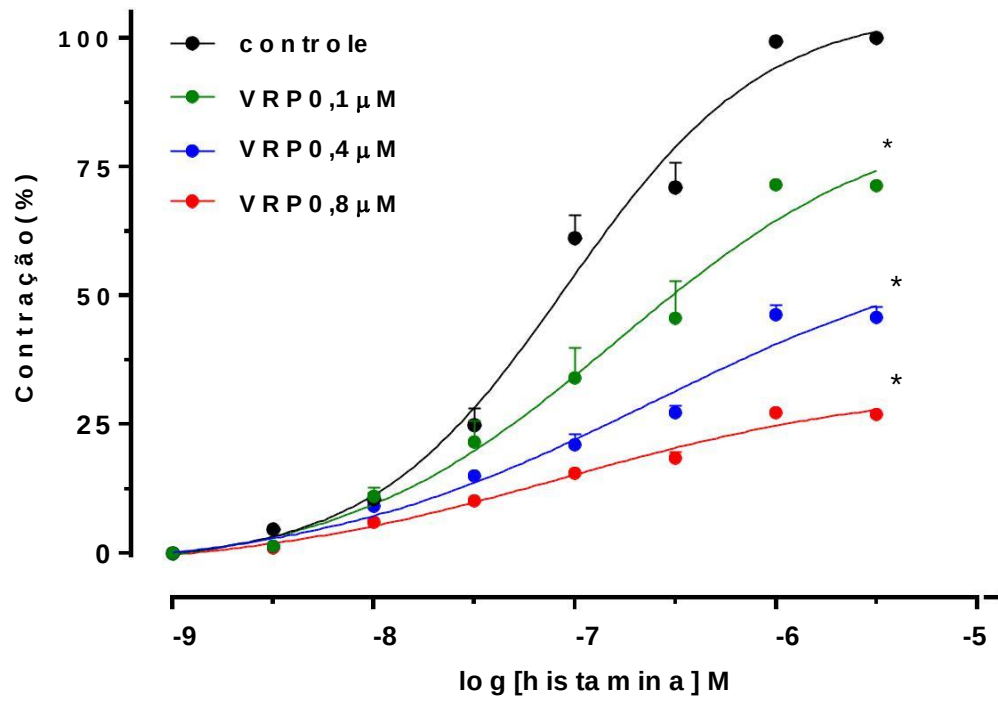
Tabela 2. Valores de Emáx (%) e pCE₅₀ de carbacol na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa, 125, 250 e 500 µg/mL) em íleo isolado de cobaia.

	Emáx (%)	pCE ₅₀
carbacol (controle)	100,00 ± 0,00	7,11 ± 0,03
EASa 125 µg/mL	80,90 ± 2,07*	7,07 ± 0,06
250 µg/mL	62,31 ± 2,84*	7,05 ± 0,08
500 µg/mL	53,75 ± 2,96*	6,98 ± 0,08

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6), (*) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

Figura 7. Curva concentração efeito cumulativa de histamina (A) e carbacol (B) na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) do verapamil (VRP, 0,1; 0,4 e 0,8 µM) em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e barras verticais representam a média ± e.p.m. (n = 6). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

A



B

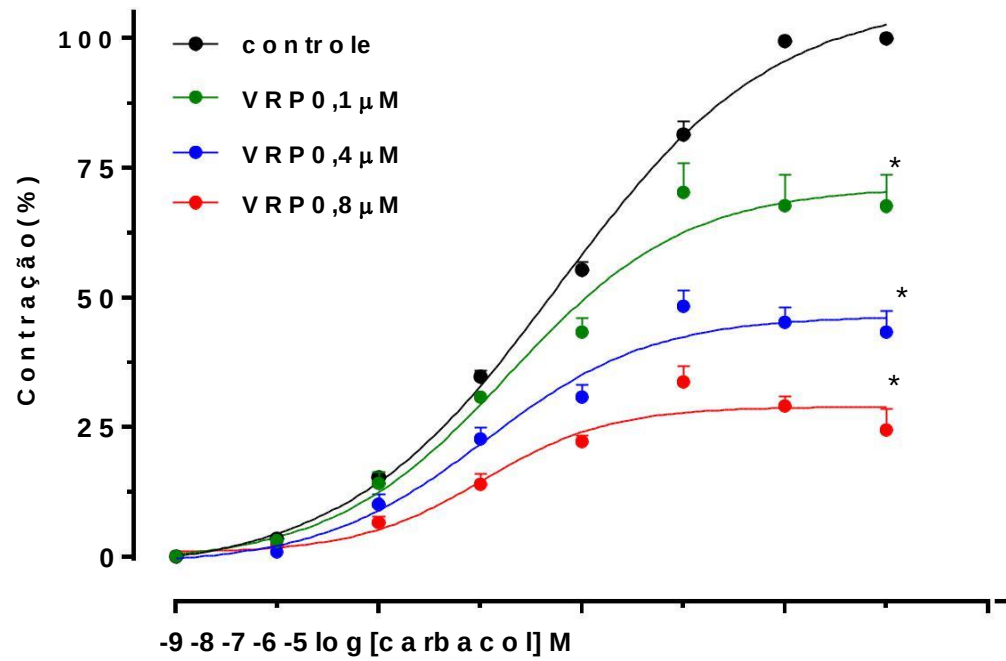


Tabela 3. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} de histamina, na aus\ecencia (controle) e presen\ca (pr\ec-incuba\cao por 30 min) de verapamil (VRP, 0,1; 0,4 e 0,8 μM) em \ecleo isolado de cobaia.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pCE_{50}
histamina (controle)	100,00 $\pm$ 0,00	7,04 $\pm$ 0,06
VRP 0,1 μM	71,32 $\pm$ 0,65*	6,79 $\pm$ 0,20
0,4 μM	45,79 $\pm$ 1,98*	6,62 $\pm$ 0,27
0,8 μM	26,89 $\pm$ 0,82*	7,06 $\pm$ 0,14

Os valores representam a m\ecdia $\pm$ e.p.m (n = 6). (*) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Tabela 4. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} de carbacol, na aus\ecencia (controle) e presen\ca (pr\ec-incuba\cao por 30 min) de verapamil (VRP, 0,1; 0,4 e 0,8 μM) em \ecleo isolado de cobaia.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pCE_{50}
carbacol (controle)	100,00 $\pm$ 0,00	7,11 $\pm$ 0,03
VRP 0,1 μM	70,27 $\pm$ 5,75*	7,32 $\pm$ 0,10
0,4 μM	48,38 $\pm$ 2,95*	7,39 $\pm$ 0,09
0,8 μM	33,72 $\pm$ 3,04*	7,31 $\pm$ 0,10

Os valores representam a m\ecdia $\pm$ e.p.m (n = 6), (*) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

5.4. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE *Simarouba amara* (EASa) OU VERAPAMIL (VRP) FRENTE AS CURVAS CONCENTRA\cao EFEITO INDUZIDAS POR $CaCl_2$ EM MEIO DESPOLARIZANTE NOMINALMENTE SEM Ca^{2+} .

O EASa (125, 250 e 500 $\mu g/mL$) reduziu de maneira significativa o efeito m\ecximo ($E_{m\acute{a}x}$) das contra\coes induzidas por $CaCl_2$ (10^{-6} - 10^{-1} M). Para a maior dose (500 $\mu g/mL$) houve deslocamento da curva \ec direita de 6,5 vezes, ou seja, para essa concentra\cao o valor de pCE_{50} foi estatisticamente diferente do controle (Gr\ecfico 8 e Tabela 5).

O VRP (0,1, 0,4 e 0,8 μM) inibiu estatisticamente o $E_{\text{máx}}$ das contrações induzidas pelo aumento da concentração de CaCl_2 (10^{-6} - 10^{-1} M) em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas cumulativas ao CaCl_2 foram desviadas à direita em respectivamente 8,1; 11,5 e 15,1 vezes. Houve alteração significativa dos valores de pCE_{50} para as concentrações de 0,4 e 0,8 μM de verapamil (Gráfico 9 e Tabela 6).

Figura 8. Curva concentração efeito cumulativa de CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 70 mM) na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) do extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa, 125, 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$) em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. ($n = 5$). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

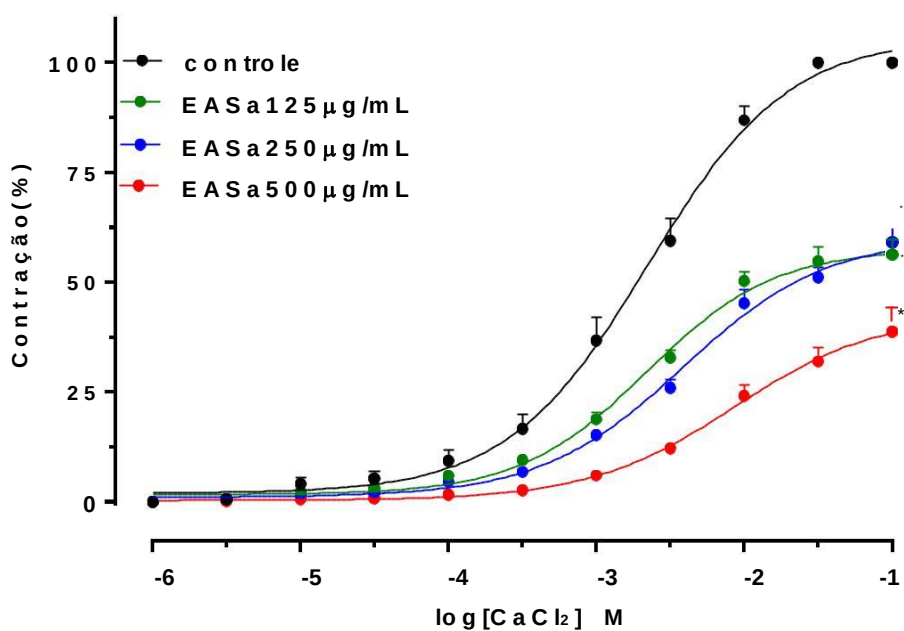


Tabela 5. Valores de Emáx (%) e pCE₅₀ de CaCl₂, na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) de EASa em fêlo isolado de cobaia.

	Emáx (%)	pCE ₅₀
CaCl ₂ (controle)	100,00 ± 0,00	2,65 ± 0,05
EASa 125 µg/mL	54,76 ± 3,43*	2,65 ± 0,05
250 µg/mL	57,52 ± 3,10*	2,41 ± 0,06
500 µg/mL	38,78 ± 3,13*	2,07 ± 0,11*

Os valores representam a média ± e.p.m (n = 5), (*) Estatisticamente diferente do controle, ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman Keuls, p < 0,05.

Figura 9. Curva concentração efeito cumulativa de CaCl₂ em meio despolarizante (KCl 70 mM) na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) de verapamil (VRP, 0,1; 0,4 e 0,8 µM) em fêlo isolado de cobaia. Os símbolos e barras verticais representam a média ± e.p.m. (n = 5). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05).

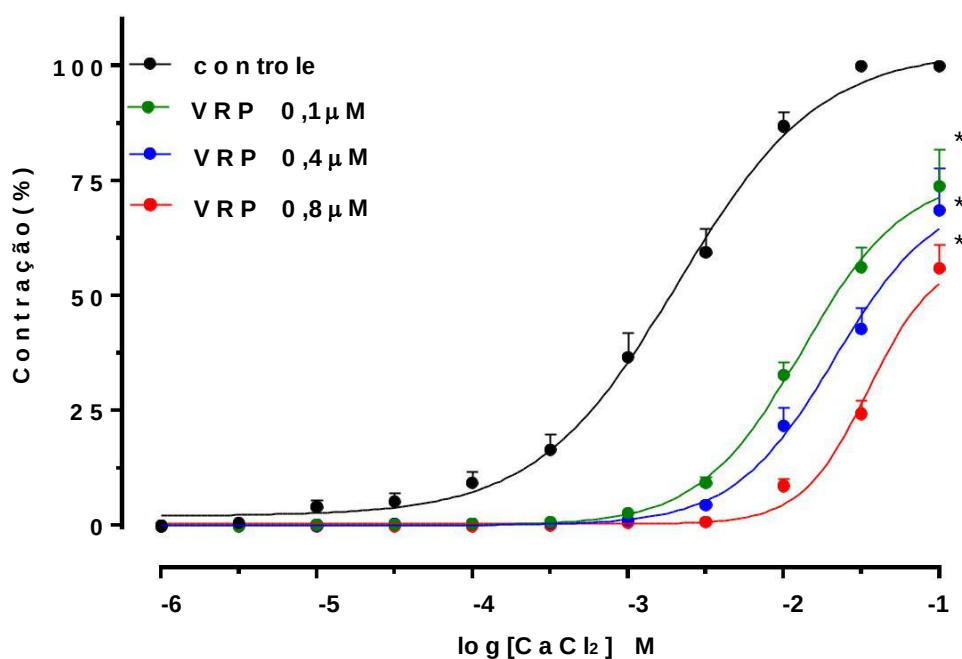


Tabela 6. Valores de $E_{m\acute{a}x}$ (%) e pCE_{50} do $CaCl_2$, em meio despolarizante (KCl 70 mM) na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) de verapamil (VRP, 0,1; 0,4 e 0,8 μM) em íleo isolado de cobaia.

	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	pCE_{50}
$CaCl_2$ (controle)	$100,00 \pm 0,00$	$2,68 \pm 0,04$
VRP 0,1 μM	$73,87 \pm 8,00^*$	$1,88 \pm 0,06^*$
0,4 μM	$68,66 \pm 9,08^*$	$1,67 \pm 0,08^*$
0,8 μM	$56,02 \pm 5,06^*$	$1,45 \pm 0,04^*$

Os valores representam a média $\pm$ e.p.m ($n = 5$), (*) Estatisticamente diferente do controle, ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman Keuls, $p < 0,05$.

5.5 EFEITO DA HIDROXIZINA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM O EASa NAS CURVAS CONCENTRAÇÃO EFEITO CUMULATIVAS INDUZIDAS POR HISTAMINA

O antagonista de receptor histaminérgico H_1 , hidroxizina (0,125 e 0,250 μM) produziu redução significativa do $E_{m\acute{a}x}$ e deslocamento à direita da curva de histamina de respectivamente 16,2 e 15, 4 vezes. Houve alteração significativa dos valores de pCE_{50} para as concentrações de 0,125 e 0,250 μM de hidroxizina (Gráfico 10A e Tabela 7).

Quando o EASa (250 e 500 $\mu g/mL$) foi associado ao antagonista histaminérgico houve potencialização significativa da redução do $E_{m\acute{a}x}$ das contrações induzidas pela histamina (10^{-9} - 10^{-5} M) quando em presença de hidroxizina, contudo, os deslocamentos das curvas cumulativas à direita (de 16,2 e 15, 4 vezes para 19,5 e 22,8 vezes respectivamente) não foram estatisticamente diferentes das obtidas na presença da hidroxizina (Figura 10B e Tabela 7).

Figura 10. Curva concentração-efeito cumulativa de histamina na ausência (controle) e presença de hidroxizina (0,125 e 0,250 μM , A) e sua associação com EASa (250 e 500 $\mu g/mL$, B) em íleo isolado de cobaia. Os símbolos e barras verticais representam a média $\pm$ e.p.m. ($n = 6$). *Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, $p < 0,05$).

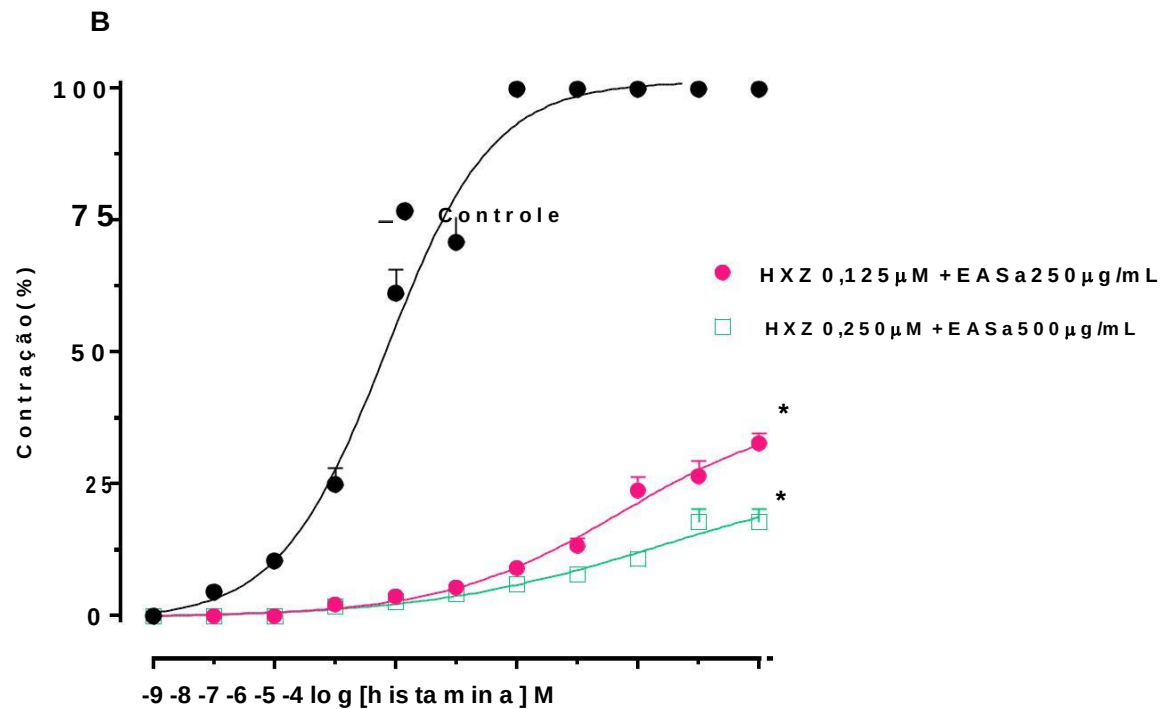
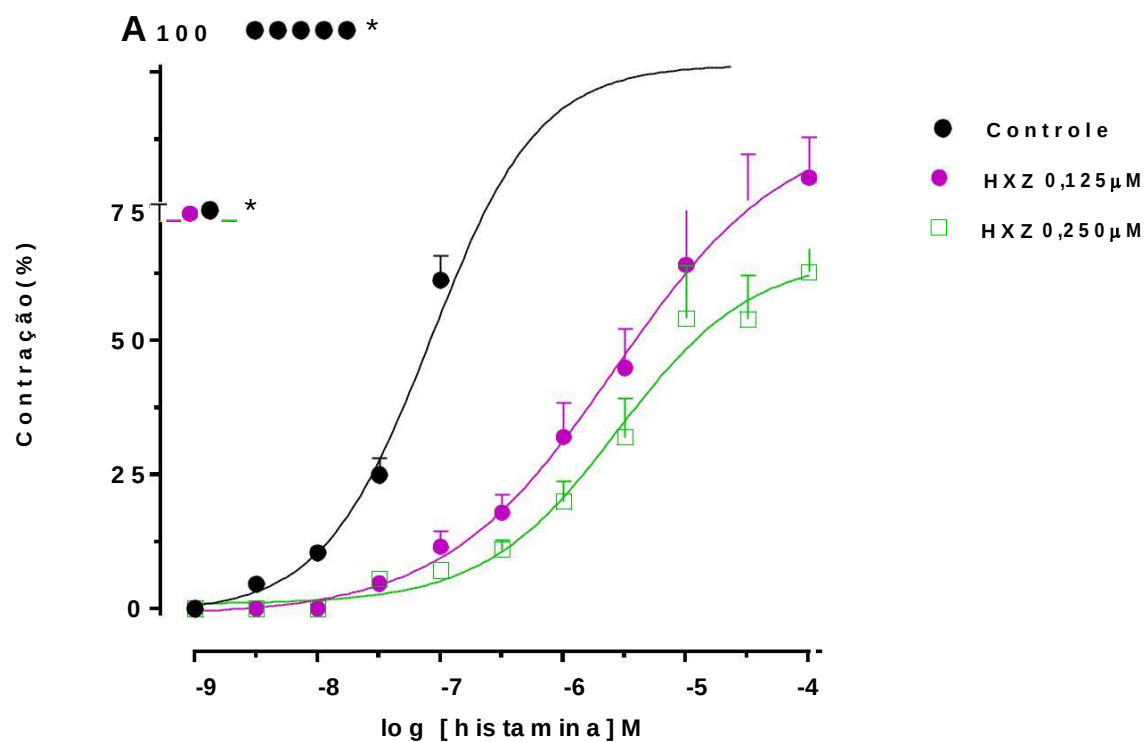


Tabela 7. Valores de Emáx (%) e pCE₅₀ de histamina na ausência (controle) e presença (pré-incubação por 30 min) de hidroxizina (HXZ, 0,125 e 0,250 µM) e sua associação com extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa, 250 e 500 µg/mL) em íleo isolado de cobaia.

tratamento	Emáx (%)	pCE ₅₀
histamina (controle)	100,00 ± 0,00	7,08 ± 0,04
HXZ 0,125 µM	84,53 ± 6,44*	5,46 ± 0,28*
HXZ 0,250 µM	63,25 ± 4,63*	5,54 ± 0,19*
HXZ 0,125 µM + EASa 250 µg/mL	32,72 ± 1,95*	5,13 ± 0,23*
HXZ 0,250 µM + EASa 500 µg/mL	17,83 ± 2,48*	4,80 ± 0,74*

Os valores representam a média ± e.p.m. (n = 6), (*) Estatisticamente diferente do controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls, p < 0,05)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A cólica intestinal é comumente causada por fortes contrações da musculatura lisa, por meio da ação do sistema nervoso entérico. Clinicamente, a dor causada pelos espasmos gastrintestinais normalmente é tratada com drogas que induzem o relaxamento dessa musculatura (SATO et al., 2007). Inúmeras plantas e fitoterápicos são relatados na literatura como agentes espasmolíticos (RYU et al., 2004; VIANA et al., 2007; YANG et al., 2011; DA ROCHA, 2012; FORLIN, 2012; PATEL et al., 2014; SHIROLE et al., 2015). Embora algumas espécies vegetais sejam utilizadas para problemas gastrintestinais na medicina popular nenhum estudo direcionado a este tipo de atividade foi encontrado para *Simarouba amara*.

Neste trabalho, buscou-se investigar o efeito espasmolítico do extrato aquoso da casca do caule de *Simarouba amara* na musculatura lisa do íleo de cobaia, em modelo *in vitro*. Pela primeira vez, a atividade espasmolítica do EASa foi apresentada. Portanto, os resultados aqui apresentados trarão uma grande contribuição para a farmacologia da espécie *Simarouba amara* e por sua vez, para a família Simaroubaceae. O efeito espasmolítico do EASa foi demonstrado podendo estar relacionado com o alívio das cólicas intestinais já relatado nos usos etnofarmacológicos.

Muitos agonistas induzem a contração do músculo liso da cobaia atuando em diferentes tipos de receptores, como a histamina (receptor H₁), acetilcolina (receptor muscarínico M₃), serotonina (receptores 5-HT₂) e prostaglandinas (receptores EP₁, EP₃ e TP). O músculo liso também pode ser contraído através de estímulos eletromecânicos, despolarizando a membrana plasmática das células musculares pelos chamados agentes despolarizantes, como o cloreto de potássio e o cloreto de bário (LARSSON et al., 2011; NATIVIDAD et al., 2011; SANTOS et al., 2012). Entretanto, existem drogas que inibem a contração induzida por mais de uma classe de agente contrátil, seja ele agonista ou despolarizante. Este efeito sobre a musculatura lisa, chamado espasmolítico não-seletivo, é muito observado com extratos de plantas, e as substâncias com ação espasmolítica têm aplicação em vários processos fisiopatológicos como asma, hipertensão e cólicas decorrentes de espasmos intestinais e uterinos (CAVALCANTE, 2001).

Com a finalidade de se investigar o EASa frente as contrações fásicas induzidas por histamina, carbacol (agonistas de acoplamento misto) e KCl (eletromecânico) observou-se que o EASa inibiu as contrações fásicas induzidas pelos diferentes agentes contráteis testados de maneira significativa o que comprova o uso etnobotânico dessa espécie da família Simaroubaceae para desordens intestinais, como já era esperado, o verapamil (controle positivo) inibiu as contrações fásicas induzidas pelos três agentes testados.

O principal gatilho para a contração do músculo liso é um aumento da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$). Este aumento provoca a ligação de Ca^{2+} com a calmodulina (CAM) e este complexo ativa MLC quinase (MLCK) para fosforilar MLC e promover a interação da miosina II com a actina, levando a um ciclo de pontes cruzadas e causando assim a contração. No músculo liso, a contração pode ocorrer através da despolarização da membrana pelo aumento de K^+ levando a um aumento na $[Ca^{2+}]_i$ ou induzida por um agonista, que ocorre independentemente da variação do potencial de membrana. Agonistas como o carbacol e histamina ligam-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do fosfatidilinositol, geralmente por ligação a proteína Gq produzindo inositol (1,4,5) – trifosfato (IP3), que estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS). Agonistas contráteis também podem elevar liberação de Ca^{2+} através de receptores de rianodina e estimular a entrada de Ca^{2+} por meio de vários tipos de canais, dentre eles os canais de cálcio operados por voltagem (Ca_v) (WATTERSON et al., 2005).

O EASa mostrou inibição da contração de forma independente do receptor com todos os agentes contráteis testados, inclusive o KCl. Como fator comum a todas essas vias é o canal para cálcio, resolveu-se avaliar seu efeito sobre o componente tônico da resposta contrátil induzida por histamina, carbacol ou KCl no íleo de cobaia. A contração tônica induzida pelos diferentes agentes contráteis, dependentes das reservas intracelulares de cálcio, foram significativamente reduzidas, mas não abolidas, tanto pelo verapamil (BERRIDGE, 1987; KARAKI et al., 1997) bloqueador dos canais de cálcio do tipo L, quanto pelo EASa. Os constituintes presentes em diferentes plantas medicinais podem apresentar o seu efeito espasmolítico através do bloqueio dos canais de cálcio. (GILANI et al., 2005; KHAN et al., 2011; SHAH et al., 2011). Dessa forma, podemos sugerir que o EASa

pode inibir o influxo de cálcio através dos Ca_v para gerar os efeitos espasmolíticos não seletivos.

Para testar a hipótese de que o antagonismo das contrações induzidas pelos agonistas não se dá em nível de receptor, e sim em um passo comum da via de sinalização que leva a contração por esses agentes, uma vez que cada agonista tem seu próprio sistema receptor, avaliou-se a característica do bloqueio induzido pelo EASa frente as curvas concentração resposta cumulativas a histamina e carbacol e verificou-se que o EASa não deslocou as curvas cumulativas a histamina e carbacol, porém houve redução significativa do $E_{\text{máx}}$. evidenciando a sua inibição. Este resultado sugeriria o bloqueio do influxo de cálcio através da membrana citoplasmática. O mesmo tipo de resposta foi observado pelo verapamil, do qual já se conhece o mecanismo de ação.

As contrações induzidas por histamina (receptor H_1) e carbacol (receptor M_3) foram inibidas pelo EASa e pelo antagonista dos canais de cálcio verapamil. Diante do conjunto de resultados obtidos é improvável que o extrato exerça seu efeito espasmolítico mediado por receptores específicos. As contrações produzidas por estes agentes são dependentes do cálcio extracelular, que exercem seu efeito contrátil ao aumento a $[(\text{Ca})]_i$ (BOLTON, 1979), indicando assim que o extrato pode reduzir as respostas contrateis da histamina e do carbacol em íleo de cobaia por inibir o influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes (Ca_v).

Sabendo que o íleo é um órgão totalmente dependente de variação do potencial de membrana (NOUAILHETAS et al., 1985) e como o componente tônico da contração induzida por agonistas de acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) como o carbacol e a histamina (BOLTON et al., 1981) ou por um agente despolarizante (KCl) (acoplamento eletromecânico) é mantido quase que exclusivamente por influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (BOLTON, 2006), resolveu-se estudar a hipótese do EASa estar agindo por bloqueio de de influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Os Ca_v estão presentes na maioria das células excitáveis. Pelo menos 10 tipos diferentes de Ca_v foram até agora descritos e estão divididos em três grandes famílias: (1) sensíveis a di-hidropiridinas, ativados por alta voltagem, Ca_v1 (tipo L);

(2) insensíveis a di-hidropiridinas e ativados por alta voltagem, Ca_v2 ; e (3) ativados por baixa voltagem, Ca_v3 (tipo T) (ALEXANDER et al., 2011). Os $\text{Ca}_v1.2$ são amplamente expressos no corpo humano (músculo liso, cardíaco, neurônios e células endócrinas) (CATTERALL et al., 2005). Os Ca_v mais expressos em íleo de cobaia são os do tipo L ($\text{Ca}_v\text{-L}$) (BOLTON, 1979), atualmente chamados de $\text{Ca}_v 1.2$ (CATTERALL et al., 2005).

Caso o EASa estivesse realmente bloqueando os Ca_v , era esperado que o mesmo antagonizasse as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (70mM KCl), nominalmente sem Ca^{2+} . Este protocolo baseia-se no fato de que a contração ocorre, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pela elevada $[\text{K}^+]$ induz a abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1996). De fato, as curvas cumulativas ao CaCl_2 na presença do EASa foram deslocadas para a direita de forma não paralela e com redução do Emáx de maneira significativa. Resultados semelhantes foram obtidos quando se utilizou o verapamil como controle positivo (BOLTON, 1979; GODFRAIN, 1987).

Neste conjunto de experiências, o verapamil deslocou curvas concentração-resposta do CaCl_2 para a direita e reduziu os valores de Emáx , enquanto que o EASa nas diferentes concentrações, reduziu o Emáx , e, apenas na concentração de 500µg/mL deslocou as curvas concentração resposta para a direita.

Com base nos valores de CE_{50} obtidos, observou-se que o EASa apresentou uma maior potência em antagonizar as contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} do que aquelas induzidas por histamina e carbacol. Quando os resultados foram comparados com o controle positivo (verapamil) as respostas foram muito semelhantes, corroborando a hipótese de que, o EASa pode estar bloqueando o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v .

Várias plantas antiespasmódicas demonstraram ser antagonistas não competitivas sobre a musculatura do íleo (SANCHES de KOJAS et al, 1995; KARAMENDERS e APAYDIN, 2003; EMENDORFER et al, 2005). Dessa forma realizou-se CCE de histamina na presença de hidroxizina e sua associação com o EASa. Nossos resultados mostraram que o extrato de casca de Simarouba amara quando associado com hidroxizina apresentou uma maior eficácia em antagonizar as

contrações induzidas pela histamina quando comparado ao efeito da hidroxizina isolada. O EASa diminuiu significativamente o efeito máximo, sugerindo um perfil antagonista não competitivo.

Os resultados do presente estudo indicam que o EASa possui atividade antiespasmódica e sua atividade pode ocorrer através dos bloqueio do influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes, bloqueando a entrada de cálcio.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) possui atividade espasmolítica em íleo isolado de cabaia. Essa atividade foi inicialmente relacionada ao possível bloqueio do influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes.

O extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) inibiu as contrações fásicas e tônicas induzidas pelos compostos histamina, carbacol e KCl, cujo perfil de inibição foi qualitativamente similar ao obtido com o antagonista de canal de cálcio verapamil.

Frente às CCE cumulativas para histamina, e carbacol e cálcio, o extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) apresentou um perfil inibitório similar ao obtido com verapamil, apresentando características de antagonismo não competitivo.

A associação do anti-histaminíco H₁, hidroxizina com o extrato aquoso de *Simarouba amara* (EASa) potenciou a redução do efeito máximo (Emáx) das curvas induzidas por histamina, entretanto não interferiu com o deslocamento da curva à direita.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

____Ministério da Saúde: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 14, de 31 de março, Brasília, 2010.

____Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.

____Ministério da Saúde: Cadernos de Atenção Básica: Práticas Integrativas e Complementares. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. Brasília, 2012.

____Ministério da Saúde: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006.

____Ministério da Saúde: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006.

AJAIYEOBA, E. O.; ABALOGU, U. I.; KREBS, H. C.; ODUOLA, A. M. *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 321–5, 1999.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels (GRAC), 5^a ed. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 142-143, 2011.

ALMEIDA, M. M. B. Ocorrência e Atividade Biológica de Quassinóides da Última Década. **Quimica Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

ARRIAGA, A. M. C.; MESQUITA, A. C.; POULIQUEN, Y. B. M.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; CARVALHO, M. G.; SIQUEIRA, J. A.; ALEGRIO, L. V.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents of *Simarouba versicolor*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 3, p. 415-424, 2002.

AZEVEDO, I. M. G.; ALENCAR, R. M.; BARBOSA, A. P.; ALMEIDA, N. O. Estudo do crescimento e qualidade de mudas de marupá (*Simarouba amara* Aubl.) em viveiro. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 157-164.

BANDEIRA, J. M.; BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. M. P.; RODRIGUES, I. C. S.; BACARIN, M. A.; PETERS, J. A.; BRAGA, E. J. B. Composição do óleo essencial de

quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 2, 2011.

BARBOSA, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.C. Chemical constituents of plants from the genus *Simaba* (Simaroubaceae). **Chemical Biodiversity**, v.8, p. 2163-2178, 2011.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. **Annual Reviews Biochemical**, v. 56, p.159-193, 1987.

BERRIDGE, M. J. Smooth Muscle Cell Calcium Activation Mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BERRIDGE, M. J. Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling Mechanisms. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1793, p. 933-940, 2009.

BHATTACHARJEE, S.; GUPTA, G.; BHATTACHARYA, P.; MUKHERJEE, A.; MUJUMDAR, S. B.; PAL, A.; MAJUMDAR, S. Quassin alters the immunological patterns of murine macrophages through generation of nitric oxide to exert antileishmanial activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 317-324, 2009.

BITTENCOURT, S.C.; CAPONI, S.; FALKENBERG, M. B. O uso das plantas medicinais sob prescrição médica: pontos de diálogo e controvérsias com uso popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.89-91, 2002.

BOLTON, T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. *The Journal of Physiology*, v. 570, p. 5-11, 2006. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle preparations. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 67-72, 1981.

BOLTON, T. B. Mechanisms of Action of Transmitters and Other Substances on Smooth Muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.

BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; LANG, R. J. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 320, p. 363-379, 1981.

BONTÉ, F.; BARRET, P.; PINGUET, P.; DUSSER, I.; DUMAS, M.; MEYBEC, A. *Simarouba amara* extract increases human skin keratinocyte differentiation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 65-74, 1996.

BRANDÃO, M. G. L.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V; SANTOS, A. C. P.; SAMIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em Minas Gerais. Belo Horizonte. **Anais do XIV Seminário de Economia Mineira**, p. 1-10, 2010.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos Estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes, e práticas educacionais-UEG/ Campus de Iporá**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of Herbal Medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.

CATTERALL, W. A.; REYES, E. P.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.

CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, Cold Spring Harbor **Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetinona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee. (Solanaceae). 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

CAVALCANTE, F. A.; SILVA, J. L. V.; CARVALHO, V. M. N.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, α and β -lapachone, on the guinea-pig ileum involves

blockade of voltage gated calcium channels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 183-189, 2008.

CAVALCANTI, B. C.; COSTA, P. M.; CARVALHO, A. A.; RODRIGUES, F. A. R.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, E. C. C.; POHLIT, A. M.; COSTA-LOTUFO, L.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Neosergeolide-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: the role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 8, p. 980-993, 2012.

DAR, A.; CHANNA, S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea pig. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 167-174, 1999.

DE SOUZA, L. N. C.; CARDOSO, J. H. L.; MATOS, F. J. A.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Relaxant effect of the essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and this main constituent 1-8 cineole on guinea pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v. 71, p. 1173-1175, 2005.

DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; RAHMAN, T. U.; DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca_2^+ Entry Through Plasma Membrane IP3 receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.

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

EMENDORFER, F.; BELLATO, F. NOLDIN, V. F.; NIERO, R.; CECHINEL-FILHO, V.; CARDOZO, A. M. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of Pharmacology Science**, v. 8, p. 63-68, 2005.

ESPINAL, T.; SIGIFREDO, L. Arboles de Antioquia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia, 1986. 251p.

FORLIN, A. M. Plantas Aromáticas: Diferentes formas de multiplicación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Estación Experimental Agropecuaria El Colorado, 1ª edição, 2012.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle Contraction. In: Molecular Aspects of Cell Biology. Philadelphia, Saunders, p. 1156-1179, 1995.

GHAYUR, M. N.; KHAN, H.; GILANI, A. H. Antispasmodic, Bronchodilator and Vasodilator Activities of (+)-Catechin, a Naturally Occurring Flavonoid. **Archives Pharmacology Research**, v. 30, n. 8, p. 970-975, 2007.

GILANI, A. H.; SHAH, A. J.; MUHAMMAD, N. G.; MAJEED, K. Pharmacological basis for the use of turmeric in gastrointestinal and respiratory disorders. **Life Sciences**, v. 76, p. 3089-3105, 2005.

GODFRAIND, T. Classification of Calcium Antagonists. **The American Journal of Cardiology**, v. 59, p. 11B-23B, 1987.

GONZALES, F.; DIAZ, J. N.; LOWY, P. Flora Ilustrada de San Andrés y Providencia. Colômbia: Sena/Universidad nacional, 242p, 1995.

GROSVENOR, S. N. J.; MASCOLL, K.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. Tirucallane, Apotirucallane, and Octanorapotirucallane Triterpenes of *Simarouba amara*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 9, 2006.

Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 4, DE 18 DE JUNHO DE 2014.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; IMAKURA, Y.; OKANO, M.; JOHNSON, A. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 72, p. 1280-1282, 1983.

HEIZMANN, C. W. (Ed.) Novel Calcium-Binding Proteins, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 65-99, 1991.

HERNANDEZ, P. M.; NOVOA, M. C.; CIVITELLA, S. M.; MASSON, D.; OVIEDO, A. Plantas usadas em medicina popular em La Isla Santiago, Buenos Aires, Argentina. **Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 4, 2013.

HILL- EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium Signaling in Smooth Muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1-21, 2011.

JANSSEN, L. J. Ionic Mechanisms and Ca²⁺ Regulation in Airway Smooth Muscle Contraction: Do the Data Contradict Dogma?. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 282, p. 1161-1178, 2002.

KALOKASIDIS, K.; MOLYVA, D.; MIRTOSU, V.; KOKKAS, B.; GAULAS, A. Evidence for the contribution of tumor necrosis factor in oedema formation induced by histamine in the hind paw of the rat. **Inflammation Research**, v. 58, p. 437-440, 2009.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; SAITO, M. M.; AMANO, K. I.; HARADA, K. I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 2, 1997.

KARAMENDERS, C. APAYDIN, S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p.175-179, 2003.

KHAN, M.; SHAH, A. J.; GILANI, A. H. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Vitex negundo* are mediated through calcium channel blockade. **Journal of the Bangladesh Pharmacology**, v. 8, p. 317-322, 2013.

KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth Muscle Signalling Pathways in Health and Disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KO, E. A.; PARK, W. S.; FIRTH, A. L.; KIM, N.; YUAN, J. X. J.; HAN, J. Pathophysiology of Voltage-Gated K⁺ Channels in Vascular Smooth Muscle Cells: Modulation by Protein Kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, p. 95-101, 2010.

KUMAR, V.; MAHAJAN, A.; CHIBALE, K. Synthetic Medicinal Chemistry of Selected Antimalarial Natural Products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2236–2275, 2009.

LARSSON, A. K.; HAGFJÄRD, A.; DAHLEN, S. E.; ADNER, M. Prostaglandin D2 induces contractions through activation of TP receptors in peripheral lung tissue from the guinea pig. **European Journal of Pharmacology**, v. 669, p. 136-142, 2011.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum, 5. ed, 324p, 2002.

MA, J.; PAN, Z. Retrograde Activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.

MACKINNON, R. Potassium Channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.

MARANHÃO, H. M. L.; VASCONCELOS, C. F. B.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; NETO, J. C. S.; FILHO, R. C. S.; FERNANDES, M. P.; SILVA, J. H. C.; ARAÚJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Hepatoprotective Effect of the Aqueous Extract of *Simarouba amara* Aublet (Simaroubaceae) Stem Bark against Carbom Tetrachloride (CCl₄)-Induced Hepatic Damage in Rats. **Journal of Molecules**, v. 19, p. 17735-17746, 2014.

MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493-500, 2007.

MUHAMMAD, I.; BEDIR, E.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; KHAN, I. A.; TAKAMATSU, S.; PELLETIER, J.; WALKER, L. A. A New Antimalarial Quassinoid from *Simaba orinocensi*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 772-777, 2004.

MURTHY, K. S. Signaling for Contraction and Relaxation in Smooth Muscle of the Gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.

NATIVIDAD, G. M.; BROADLEY, K. J.; KARIUKI, B.; KIDD, E. J.; FORD, W. R.; SIMONS, C. Actions of *Artemisia vulgaris* extracts and isolated sesquiterpene lactones against receptors mediating contraction of guinea pig ileum and trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 808-816, 2011.

NOUAILHETAS, V. L. A.; SHIMUTA, S. I.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Calcium and sodium dependence of the bifasic response of the guinea pig ileum to agonists.

European Journal of Pharmacology, v. 16, p. 41-47, 1985.

OLIVEIRA, R. C. M.; MONTEIRO, F. S.; SILVA, J. L. V.; RIBEIRO, L. A. A.; SANTOS, R. F.; NASCIMENTO, R. J. B.; DUARTE, J. C.; AGRA, M. F.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, B. A. Extratos metanólico e acetato de etila de *Solanum megalonyx* Sendtn. (Solanaceae) apresentam atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia: um estudo comparativo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 146-151, 2006.

PATEL, M.; KANZARIYA, N.; SONI, H.; PATEL, G. Evaluation of acute toxicity and in-vitro anti-spasmodic activity of Caspa drops, na ayurvedic formulation. **The Pharma Innovation Journal**, v. 3, n. 6, p. 70-76, 2014.

PIRANI, J. R.; THOMAS, W. W. Simaroubaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB1380>>. Acesso em: 19 Jul. 2015.

PIRES, I. F. B.; SOUZA, A. A.; FEITOSA, M. H. A.; COSTA, S. M. Medicinal plants as a therapeutic option in the community Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

Revista Brasileira de Plantas medicinais, v.16, n. 2, 2014.

POLONSKY, J.; VARON, Z.; JACQUEMIN, H.; PETTIT, G. R. The Isolation and Structure of 13,18-dehydroglaucarubinone, a New Antineoplastic Quassinoid from *Simarouba amara*, v. 34, p.1122, 1978.

RATES, S. M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n. 2, p. 57-69, 2001.

ROCHA, M. B.; SOUZA, F. V. M.; PIZZA, E. C. E.; SANT'ANA, A. E. G.; MARÇAL, R. M. Antispasmodic effect of 4'- methylepigallocatechin on guinea pig ileum. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1286-1289, 2012.

RYU, S. D.; PARK, C. S.; BAEK, H. M.; BAEK, S. H.; HWANG, S. Y.; CHUNG, W. G. Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo,

a herbal anti-diarrheal formula. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 75-80, 2004.

SÁNCHEZ DE ROJAS, V. R.; ORTEGA, T. V. A. Inhibitory effects of *Cistus populifolius* on contractile responses in the isolated rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 59-62, 1995.

SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicas**, v.13, n. 4, p. 486-491, 2001.

SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R. R.; TRAVASSOS, R. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FERREIRA, A. T.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J.; RIGONI, V. L. S.; SILVA, B. A. Ent-7 α -acetoxyltrachyloban-18-oic acid and ent-7 α -hydroxyltrachyloban-18-oic acid from *Xylopia langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate K⁺ and Ca₂⁺ channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, p. 39-47, 2012.

SATO, Y.; HE, J. X.; NAGAI, H.; TANI, T.; AKAO, T. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145-49, 2007.

SCHLEMPER, V.; RIBAS, A.; NICOLAU, M.; V. CECHINEL, V. F. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*, v. 3, n. 2, p. 211-216, 1996.

SHAH, A. J.; ZAIDI, M. A.; SAJJAD, H.; HAMIDULLAH., GILANI, A. H. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Vincetoxicum stocksii* are mediated through calcium channel blockade. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 6, p. 46-50, 2011.

SHIROLE, R. L.; SHIROLE, N. L.; SARAF, M. N. In vitro relaxant and spasmolytic effects of essential oil of *Pistacia integerrima* Stewart ex Brandis Galls. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 61-65, 2015.

SHOWALTER, H. D. H. Progress in the Synthesis of Canthine Alkaloids and Ring-Truncated Congeners. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 455-467.

SILVA, E.C.C.; AMORIM, R.C.N.; POHLIT, A.M. Gram-scale isolation of isobrucein B and neosergeolide from *Picrolemma sprucei* Hook. f. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 229-232, 2009.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.

SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potencial therapeutic benefits os some medicinal plants from de caatinga (semi-arid) vegetation of the northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org); **Farmacognosia - Da planta ao Medicamento**; 1 ed., Editora da UFSC, 1999.

SOARES, A.A.D. Estudo comparativo das matérias-primas de origem vegetal utilizadas em Homeopatia em farmacopéias homeopáticas. Disponível em: <<http://lamasson.com.br/biblioteca/biblioteca/pesquisahomeopatica/artigogigio.htm>>. Acesso em 04 fev. 2015.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca_2^+ Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A.V. Signal Transduction and Regulation in Smooth Muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOUZA, R. K. D.; DA SILVA, M. A. P.; DE MENEZES, I. R.A.; RIBEIRO, D. A. R.; BEZERRA, L.R.; SOUZA, M. M. A. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco,northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p.99-104, 2014.

TAYLOR, L: **The healing power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinal**. New York: SquareOne publishers, 2005. 520p.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion Channels in Smooth Muscle: Regulators of Intracellular Calcium and Contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.

TOMA, W.; GRACIOSO, J. S.; DE ANDRADE, F. D. P.; LIMA, C. A. H.; VILELAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic Activity of Four Extracts Obtained from the Bark Wood of Quassia amara L. (Simaroubaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n. 9, p. 1151-1155, 2002.

TULP, M.; BOHLIN, L. Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? **Trends Pharmacology Science**, v. 23, n. 5, p. 225-231, 2002.

UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium Sensibilization of Smooth Muscle Mediated by a Rho-associated Protein Kinase in Hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-994, 1997.

VAN DER BRINK, F. G. General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters. In: Van Rossum, JM (ed.) Kinetics of Drug Action. New York: Springer-Verlag, p. 169-254, 1977.

VEIGA JR., V. F.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, n. 28, p. 519-528, 2005.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P. M.; POSER, G. L.; LANGELOH, A.; RATES, S. M. K. Efeito de Hypericum caprifoliatum Cham. & Schltdl. (Guttiferae) sobre as contrações em ileo de cobaio induzidas por diferentes agonistas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 378-383, 2007.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The Role of Sphingosine-1-phosphate in Smooth Muscle Contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289-298, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v.27, p. 201-206, 2003.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium Signalling in Smooth Muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407, 2005.

YANG, J. M.; IP, P. S. P.; CHE, C. T.; YEUNG, J. H. K. Relaxant effects os Schisandra chinensis and its major lignans on agonists-induced contraction in guinea pig ileum. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1153-1160, 2011.

YUNES, R. A., PEDROSA R. C., FILHO, V. C. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 2001.