

**Ação dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis*
Malme na musculatura lisa do canal deferente
isolado de rato**

Maria Edlene Felix de Lima

FC-00002656-0

**Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Farmacologia
da Universidade Federal do Ceará, em cumprimento às
exigências para obtenção do grau de Mestre.**

FORTALEZA - 1996

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FORTALEZA - 1996**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará. Encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que feita de conformidade com as normas da ética científica.

Maria Edlene Felix de Lima

Dissertação Aprovada Em 29 / 02 / 96

Prof. Francisco Ruy Capaz

Prof. Dr. José Henrique Cardoso

Prof. Dra. Glauce Barros Viana

“Os prêmios da vida estão no fim de cada jornada, não próximos do começo; não me é dado saber quantos passos são necessários a fim de alcançar o objetivo. O fracasso pode ainda se encontrar no milésimo passo. O êxito, contudo, se esconde atrás da próxima curva da estrada. Jamais saberei a que distância está, a não ser que dobre a curva.”

O.G. Mandino

Dedico este trabalho à Otacilio, meu esposo, pela compreensão, amizade e ajuda durante a execução deste trabalho, e a meu filho, Igor, pelo carinho e alegria de sua infância, proporcionando em mim um sentimento de esperança nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me possibilitar a realização deste trabalho

Meu mais profundo agradecimento ao meu orientador Prof.Dr. Francisco Ruy Capaz pela confiança, colaboração e principalmente amizade, auxiliando-me nos momentos mais difíceis da execução desta Dissertação, proporcionando-me assim, maior segurança.

À Prof^a Eliane Menezes Nóbrega do Departamento de Química Orgânica, pelo fornecimento dos alcalóides da planta em estudo, mas também e sobretudo pela atenção e orientação sempre presentes quando necessário.

Aos meus colegas da Pós-graduação especialmente Juvênia Fontenele, Socorro Nogueira , Ivany Maria do Socorro Carvalho pela amizade nos momentos mais difíceis da elaboração deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Vietla Satyanayna Rao por ter sido um incansável conselheiro e motivador.

Ao meu esposo Otacílio da Mota Almeida pela grande ajuda, pela motivação e pelo interesse em colaborar com a execução deste trabalho.

Aos funcionários Omar Nobre de Andrade e Vilany Rodrigues pelo auxílio técnico sempre presentes.

Aos bolsistas do laboratório Mardônio Parente de Menezes e Suy Anne Rebouças Martins que muito ajudaram no decorrer da fase experimental.

Ao Vasco, Secretário da pós -graduação, que com simpatia e boa vontade sempre nos ajudou em momentos difíceis.

Ao Paulo e Samuel pela constante gentileza e atenção.

Às bibliotecárias da Biblioteca Setorial do CCS-UFC pela valiosa contribuição.

À todos que direta e indiretamente, participaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações Gerais	1
1.2. A Planta	4
1.2.1. Descrição Botânica e Considerações Ecológicas	4
1.2.2. Substâncias isoladas	7
1.3. Estudos Farmacológicos	9
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Material Vegetal	13
3.2. Animais	13
3.3. Canal deferente isolado	13
3.4. Curvas Concentração-efeito (CCE)	14
3.5. Antagonistas de canais de cálcio	16
3.6. Avaliação dos resultados e Análise Estatística	16
3.7. Fármacos sais e soluções	17

4. RESULTADOS	18
4.1. Efeitos dos alcalóides totais de <i>Schultesia guyanensis</i> Malme (ATSg) sobre a resposta contrátil do canal deferente isolado de rato à noradrenalina	18
4.2. Efeitos dos ATsg sobre a resposta contrátil do canal deferente Isolado de rato à acetilcolina	19
4.3. Efeitos dos ATsg sobre a resposta contrátil do canal deferente Isolado de rato ao KCl	20
4.4. Efeitos dos ATsg sobre a resposta contrátil do canal deferente Isolado de rato ao CaCl ₂	21
4.5. Avaliação da interferência da nifedipina e do verapamil, no aumento da resposta contrátil à acetilcolina induzido pelos ATsg, em canais deferentes isolados de ratos	22
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para a noradrenalina obtidas com o mesmo canal deferente.
- Figura 2 Curvas concentração-efeito para a noradrenalina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme.
- Figura 3 Aumento induzido na resposta máxima obtida para a noradrenalina, pela adição de diferentes concentrações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme ao líquido de incubação.
- Figura 4 Reta de regressão obtida relacionando-se a concentração de alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, adicionados ao líquido de incubação, e a porcentagem de aumento na resposta máxima detectada para a noradrenalina, em relação ao grupo controle.
- Figura 5 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para a acetilcolina obtidas com o mesmo canal deferente.
- Figura 6 Curvas concentração-efeito para a acetilcolina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme.
- Figura 7 Curvas concentração-efeito para a acetilcolina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos reserpinizados na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme.

- Figura 8 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio obtidas com o mesmo canal deferente.
- Figura 9 Curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme.
- Figura 10 Curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme adicionando previamente fenoxibenzamina.
- Figura 11 Curvas concentração-efeito para o cloreto de cálcio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme.
- Figura 12 Ação da nifedipina sobre o aumento da reatividade à acetilcolina, induzida pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme em canais deferentes isolados de ratos.
- Figura 13 Ação do verapamil sobre o aumento da reatividade à acetilcolina, induzida pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme em canais deferentes isolados de ratos.

LISTA DE TABELAS

- Tabela I Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato, através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela II Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato.
- Tabela III Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela acetilcolina no canal deferente isolado de rato através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela IV Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de ratos, reserpinizados ou não.
- Tabela V Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente de rato, através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela VI Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente isolado de rato na presença ou não de fenoxibenzamina.

LISTA DE TABELAS

- Tabela I Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato, através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela II Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato.
- Tabela III Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela acetilcolina no canal deferente isolado de rato através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela IV Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de ratos, reserpinizados ou não.
- Tabela V Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente de rato, através da CE50 e da Resposta Máxima.
- Tabela VI Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente isolado de rato na presença ou não de fenoxibenzamina.

Tabela VII Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme na resposta contráctil induzida pelo CaCl_2 no canal deferente isolado de rato em meio despolarizante.

Tabela VIII Avaliação da interferência do verapamil e da nifedipina, no aumento da resposta contráctil à acetilcolina, induzido pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, em canais deferentes isolados de ratos.

RESUMO

Schultesia guyanensis Malme, (*Schultesia stenophilla* Mart., *Exacum guianense* Aubl.) é uma planta da família Gentianaceae conhecida popularmente como mata-zombando. Sua ação mais conhecida, está ligada principalmente a sua toxicidade ao gado. O presente trabalho é um estudo das ações farmacológicas dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg), sobre a musculatura lisa do canal deferente isolado de rato. Os dados foram obtidos através da análise de curvas concentração-efeito (CCE) confeccionadas através de registro isotônico e isométrico.

Inicialmente foi testada a ação dos ATsg no sentido de identificar a amplitude da resposta contrátil induzida pela noradrenalina em três diferentes concentrações 35, 75 e 100 µg/ml. Verificou-se evidente incremento vertical da CCE obtida sem alteração significativa da CE50 (concentração que induz resposta igual a cinquenta por cento da Resposta Máxima). Detectou-se ainda incremento da Resposta Máxima proporcional à concentração de ATsg utilizada. Este incremento foi de 8, 22 e 37% respectivamente para as concentrações de 35, 75 e 100 µg/ml. de ATsg. A concentração de 100 µg/ml foi fixada para posteriores ensaios.

A seguir, portanto, os ATG na concentração de 100 µg/ml foram testados quanto a sua possível interferência nos efeitos contráteis induzidos pela acetilcolina. As CCE a acetilcolina na presença dos ATG apresentaram um significativo aumento no seu efeito contrátil, (contração ± EPM em cm) 2.41 ± 0.59 e 3.26 ± 0.56 respectivamente controle e com ATG, principalmente na fase terminal da curva acompanhado de alteração significativa ao nível da CE50 (CE50 ± LC) $2.7(1.09-6.70) \times 10^{-3}$ e $0.56(0.06-5.13) \times 10^{-3}$ respectivamente controle e com ATG ($p < 0.05$). Tal fenômeno persistiu mesmo após o pré-tratamento dos animais com reserpina (3mg/kg i.p. 24 hs, substância que depleta os estoques granulares neuronais de catecolaminas), mostrando ser este efeito independente da eventual liberação de noradrenalina.

Quando testados os ATG sobre as CCE obtidas para o KCl foi verificado um pequeno mas significativo aumento nas contrações induzidas pelas doses medianas da CCE sem alteração significativa ao nível da Resposta Máxima. Este efeito, no entanto, foi totalmente abolido adicionando-se fenoxibenzamina (10^{-5} M) ao líquido de incubação demonstrando estar esta ação ligada à liberação do mediador adrenérgico.

As CCE ao CaCl_2 apresentaram desvio significativo para a esquerda, quando analisadas ao nível da CE50, sem alteração da Resposta Máxima, caracterizando-se portanto como um típico desvio horizontal. Estes dados sugeriram um possível envolvimento do Ca^{2+}

nestes resultados. Baseados nesta hipótese, verificamos a possível ação de dois antagonistas seletivos de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes, verapamil e nifedipina (ambos 10^{-7} M), no aumento das respostas contrácteis da acetilcolina induzido pelos ATSG no canal deferente isolado de rato. Foi verificado que a nifedipina não foi efetiva em impedir o aumento de resposta induzido pelo ATSG enquanto que o verapamil bloqueou este efeito, mantendo a amplitude da CCE ao nível daquela obtida para o grupo controle.

Assim, em função do conjunto de dados apresentados neste trabalho, podemos sugerir, um possível desenvolvimento de mobilização diferencial de Ca^{2+} via canais voltagem dependentes, causado pelos ATSG, levando ao aumento das respostas contrácteis detectadas nas CCE obtidas para noradrenalina e acetilcolina no canal deferente isolado de rato. Estes resultados, entretanto, não descartam a possibilidade de estarem ocorrendo outras alterações concomitantemente. Conclusões a esse respeito, no entanto, não são permitidas à luz dos dados aqui apresentados.

ABSTRACT

Schultesia guyanensis Malme (*Schultesia stenophilla* Mart., *Exacum guianensis* Aubl.) is a herb that belongs to the family, Gentianaceae. It is popularly known as “mata-zombando”, since it is believed to be deadly toxic to cattle. The present study utilized *Schultesia guyanensis* total alkaloids (SgTA) and studied their pharmacological activity on isolated rat vas deferens. Isotonic and isometric contractile responses to agonists were registered in the absence and presence of SgTA and the data were collected through analysis of concentration-response curves (CRC).

Initially, we tested three different concentrations of SgTA (35, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$), on contractile responses evoked by noradrenaline. We observed a steep increase in the CRC, without any significant change in the CE_{50} (effective concentration for 50% maximal response) value. The increase in maximal response was found to be proportional to the concentration of SgTA used. The increases were in the order of 8, 22 and 37% for the respective concentration of 35, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$. Based on this, a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ was chosen for the subsequent studies.

At 100 µg/ml of SgTA, a significant increase in the maximal response: control (cm) 2.41 ± 0.59 and 3.26 ± 0.56 (with ATSG), as well as a change in the EC_{50} was observed on acetylcholine induced contractil responses ($.CE_{50} \pm IC$) control = $2.7(1.09-6.70) \times 10^{-3}$ with ATSG = $0.56(0.06-5.13) \times 10^{-3}$ with $p < 0.05$. These changes were unaffected even after pretreatment of animals with reserpine (3 mg/kg, i.p., 24 h), a compound that depletes catecholamines from their storage sites, indicating that the effect of SgTA is independent of noradrenaline release.

When SgTA effect was verified on the CRC obtained with KCl, a small but considerable increase in the EC_{50} was noted without much change in the maximal response. This effect was, however, totally abolished by the addition of phenoxybenzamine (10^{-5} M) to the incubation fluid, thus demonstrating that its action involves the release of an adrenergic mediator.

The CRC obtained to $CaCl_2$ showed a shift of the curve to the left in the presence of SgTA without a change in the maximal response. Such a typical horizontal shift is suggestive of Ca^{2+} involvement in this event. In order to confirm this, we verify the possible effects of two voltage dependent Ca^{2+} channel blockers, verapamil and nifedipine (10^{-7} M) on SgTA-induced increase in the contractile responses of acetylcholine. The results obtained show that verapamil but not nifedipine could counteract SgTA-induced increased responses.

Taken together, the results of this study suggest a possible Ca^{2+} mobilizing effect of SgTA in a differential way across the voltage dependent channels. These results, however, do not rule out the possibility of other biochemical alterations that might be occurring concomitantly.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

A investigação intensamente ativa e direcionada, para a descoberta de novas substâncias nos reinos animal, vegetal e inclusive no reino mineral, deve-se e está fortemente ligada, à busca através destas substâncias, da cura para os mais variados males, que afligem a espécie humana.

No processo evolutivo da arte de curar, atormentada pelos eternos sonhos de encontrar o elixir da longa vida, e sempre procurando evitar doenças, sofrimentos físicos e mentais, a espécie humana não mediu esforços em procurar no seu próprio meio, métodos que mitigassem o sofrimento (BOUISSON, 1973). O homem com seu poder observador combinado à experimentações e superstições, fez nascer a medicina popular, a qual adquiriu características de cada uma das diversas culturas existentes. Neste contexto, as plantas passaram a se constituir indiscutivelmente em um dos principais instrumentos da terapia popular.

Denomina-se "medicina popular" o conjunto de técnicas de tratamento empregado pelos "especialistas", como

curandeiros, “erveiros” e/ou pais de santo, não reconhecidos pela medicina oficial. Este procedimento é visto muitas vezes, com razoável parcela de razão, como um artifício folclórico do passado ou como prática de comunidades rurais, isoladas e atrasadas. No entanto observa-se que a "medicina popular" é extensamente praticada atualmente no meio urbano, sendo amplamente utilizada como alternativa à medicina oficial (LOYOLA, 1987).

Certamente os primeiros agentes terapêuticos utilizados pelo homem eram de origem vegetal, animal ou ambos (MAGALHÃES, 1966). Bouisson (1973), sugeriu que o homem primitivo teria passado a explorar este arsenal terapêutico, pela observação da conduta dos animais com os quais convivia intimamente.

Com os avanços da fitoquímica, foi possível a identificação de substâncias oriundas de plantas, permitindo assim estudos mais acurados destas frações ao nível bioquímico e/ou farmacológico. A intensificação da busca da informação popular no sentido de converter o empírico em científico, proporcionou o lançamento de novas drogas no mercado terapêutico. Assim, várias substâncias ativas do reino vegetal foram usadas como modelo químico, permitindo a síntese de compostos semi-sintéticos por meios mais econômicos (SILVA, 1991).

Um grande número de drogas em uso atualmente, é derivado de medicamentos nativos como a nicotina, retinona e piretrinas, que são usadas como pesticidas, além de alcalóides como a atropina e a hiosciamina. Cascas de Quina são utilizadas em função dos princípios ativos que contém, especialmente, quinina e quinidina. As folhas do digital encerram como princípios ativos glicosídeos cardiotônicos (digoxina, digitoxina) (OLIVEIRA, 1991).

Mesmo metabólitos secundários de plantas são utilizados como instrumentos farmacológicos de inestimável valia no estudo de vários processos bioquímicos. Podem ser citados como exemplo os ésteres de forbol, um grupo de diterpenos pró-inflamatórios e promotores de tumor, que foram inicialmente isolados de espécies do gênero cróton, pertencente a família euphorbiaceae. Estas substâncias tem sido valiosas no estudo das funções biológicas, propriedades e distribuição da proteína quinase C, bem como na carcinogênese química (NISHIUZUKA, 1986).

O interesse pelas plantas com utilidade terapêutica no Brasil remonta aos tempos coloniais. Assim, desde os primeiros dias de sua estada no Brasil os portugueses tentaram obter dos índios tais informações (GOTTLIEB & MORS, 1978). O Brasil, país tropical com clima quente e úmido, é dotado de uma exuberante flora nativa tão rica e variada como nenhum como

nenhum outro país do mundo (CHEVALIER, 1931). Estima-se que o Brasil possui mais de 120 mil espécies de plantas, porém, poucas foram cientificamente classificadas (PENHA, 1978).

Baseado nos resultados obtidos nos estudos das mais variadas espécies de plantas, podemos observar que este conhecimento se faz basicamente através de estudos integrados nas áreas da botânica sistemática, da química orgânica e farmacologia de produtos naturais, ao lado de outras matérias correlatas mais especializadas. Embora no Brasil estas ciências tenham alcançado separadamente, níveis elevados de desenvolvimento, a inter-relação entre elas, condição "sine qua non" para resultados plenos e satisfatórios, ainda não está ocorrendo com relevância e produtividade adequadas.

1.2. A Planta

1.2.1. Descrição Botânica e Considerações Ecológicas.

Schultesia guyanenses Malme, (*Schultesia stenophylla* Mart., *Exacum guianense* Aubl.) popularmente conhecida por mata-zombando, pertence a família Gentianaceae. É uma pequena erva que chega a atingir em média 30 cm de altura. Apresenta folhas opostas, sésseis, oblongo-lanceoladas, glabras. As flores

são amarelas e róseas e apresentam-se em cimeiras ramosas (BRAGA, 1976). *Schultesia guyanensis* Malme representa uma das espécies da família Gentianaceae existente no Brasil, Podendo ser encontrada em toda a América e África tropicais (BRAGA 1976). Ao todo a família compreende cerca de 70 gêneros e 8000 espécies distribuídas em todo o mundo (JOLY, 1977; DOMÍNGEZ, 1973). Possui ainda sabor amargo, é tônica e febrífuga e tem sido usada popularmente como depurativo na Costa Rica, onde é conhecida como "Conchalagua". O mesmo tem ocorrido em outros países da América central (CORREIA, 1931). Conhecida como "Fel da Terra" na Bahia, no Ceará recebeu o nome de "Mata-zombando" por ser considerada extremamente tóxica ao gado.

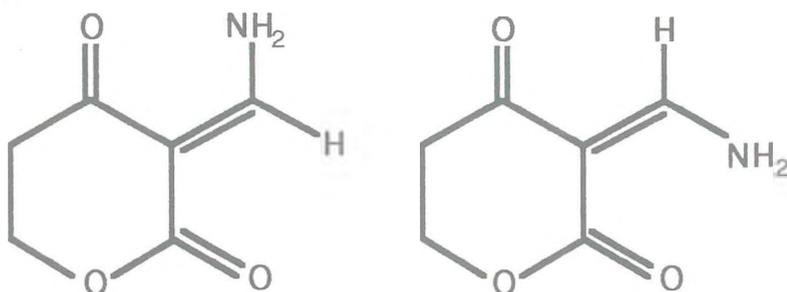
A família Gentianaceae é subdividida em duas sub-famílias: *Gentianoideae*, cujas plantas são terrestres com folhas opostas, e *Menyanthoideae*, constituída de plantas paludosas ou aquáticas com folhas alternantes (NÓBREGA, 1989). A sub família *Gentianoideae*, reúne cerca de 800 espécies de plantas em sua maioria herbáceas, estando presentes principalmente em países temperados, sendo mais freqüentes nas regiões mais elevadas das montanhas. Suas flores são muito bonitas e bastante azuladas, porém de pouco cultivo apesar de serem consideradas ornamentais. (QUER, 1962)

Estudos experimentais revelaram que muitas espécies da família Gentianaceae contém alcalóides e xantonas polioxigenadas como constituintes principais, os quais parecem ser responsáveis pelo grande número dos efeitos farmacológicos atribuídos a estas plantas (NÓBREGA, 1989).

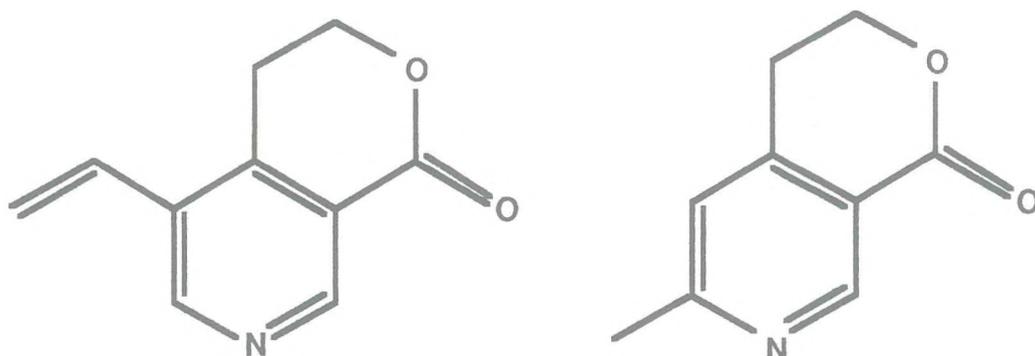
A toxicidade desta planta para os animais teria sido baseada em informações verbais colhidas no estado do Ceará. Braga (1960) considerou esta planta de extrema toxicidade e de ação violenta de onde viria o "expressivo" nome popular.

1.2.2. Substâncias isoladas.

O estudo químico desta espécie da família Gentianáceas foi realizado pela primeira vez por (NÓBREGA, 1989). Sete substâncias foram isoladas por métodos cromatográficos. Algumas eram inéditas no gênero *schultesia*. Da fração básica foram identificados os seguintes alcalóides: A Gencianina (Lactona do ácido 4-C2-Hidroxietil)-5-Vinilnicotínico; Uma mistura *cis-trans* do alcalóide Genciocrucina [3-(aminometileno)-dihidropiran-2-4 diona], Gencianidina (Lactona do ácido 4-(2-hidroxietil)-6-metilnicotínico e um alcalóide dilactâmico, inédito de fórmula molecular $C_{18}H_{22}N_2O_4$ (correspondente ao (4bS, 5S, 6R, 10bR, 12R) - 3, 4, 4b, 5, 6, 7, 8, 9, 10b, 12 - decahidro -12 - hidroxil - 5 - metil - 6 - vinil - 1H - pirido [4',3' :4,5] pirano [3, 2 - h] isoquinolina - 1, 10(2H- diona o qual foi denominado de "Schultesina"(NÓBREGA 1989) .

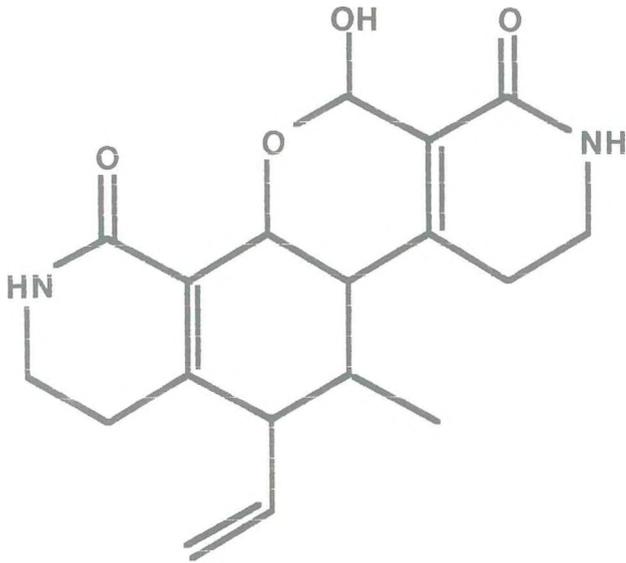


GENCIOCRUCINA
Mistura de Estereoisômeros *cis-trans*



GENCIANINA

GENCIANIDINA



SCHULTESINA

1.3. Estudos Farmacológicos

Não existem muitos dados na literatura referentes a atividade farmacológica das substâncias extraídas de "mata-zombando". Relata-se entre outros pequena atividade antiinflamatória apresentada pela genciocrucina. No entanto estudos realizados com a gencianina, o alcalóide mais abundante nas plantas da família Gentianaceae, resultaram na observação de diversas ações exercidas por este alcalóide, como as citadas a seguir (PELLETIER, 1983): 1) Quando submetido a teste de

atividade antimalárica, foi demonstrado efeito sobre o *Plasmodium gallinaceum* em mosquito sem afetar a atividade do *Plasmodium berghei* em camundongos; 2) Sobre o sistema nervoso central, estimulou em doses baixas e deprimiu em doses altas. Testes realizados, administrando 20 mg/Kg via intraperitoneal, houve diminuição da mobilidade espontânea, sedação, ptose e hipotermia. A mesma dose potenciou o sono causado pelo hexobarbital e diminuiu a estereotipia e a toxicidade causada pela anfetamina; 3) Em testes de avaliação de comportamento, a gencianina inibiu a habilidade do camundongo permanecer sobre o bastão em rotação. Diminuiu o comportamento de luta, bem como respostas a estímulos condicionados; 4) Apesar de não exercer atividade analgésica ou anticonvulsivante em doses de 20 mg/Kg, este alcalóide potenciou o efeito analgésico da morfina e o efeito anticonvulsivante da fenitoina. Doses maiores, 50-100 mg/Kg produziram paralisia dos membros posteriores, catalepsia e sedação; 5) A toxicidade aguda e crônica da gencianina em roedores, girou em torno de uma dose letal da ordem de 300-400 mg/Kg. A letalidade foi precedida por convulsões espasmódicas.

A fração básica foi submetida a "screening" farmacológico, no qual Marques & Leal Cardoso, (1991) realizaram estudo comparativo do efeito dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg) com a ação da gencianina

no coração e concluíram que tanto os ATG na concentração de 100 µg/ml como a gencianina isolada aumentavam consideravelmente a força de contração de corações de sapos e cobaias, sem induzir alteração significativa na frequência. Em resultados anteriores foi demonstrado em nosso laboratório a presença de efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos induzidos pelo ATG em átrios direito e esquerdo isolados de ratos (BATISTA et al., 1990; KASSOUF SILVA et al., 1991).

Estes resultados nos levaram a continuar este estudo utilizando agora a musculatura lisa. Para tal escolhemos o canal deferente de rato, uma preparação clássica, a qual apresenta extrema sensibilidade contrátil tanto a agonistas adrenérgicos (DE MORAES & CAPAZ, 1977), quanto colinérgicos (SABAN et al., 1981), além de ser formado, praticamente em quase sua totalidade, por células musculares lisas.



Schultesia guianensis Malme

Local de coleta: Município de Itapiúna - Estado do Ceará

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Estudar a interferência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme nas respostas contráteis da musculatura lisa do canal deferente isolado de rato induzidas pela noradrenalina, acetilcolina, cloreto de potássio e cloreto de cálcio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

No presente trabalho foram utilizados os alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, conhecida no Ceará como mata-zombando. O material foi fornecido pelo Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará. A planta foi coletada em Itapiúna; Ceará (Longitude 38° 50' W, latitude 4° 35 S, altitude 133 m). As excicatas devidamente registradas sob os números 13.214 e 15.235, encontram-se no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (NÓBREGA, 1989).

3.2. Isolamento do material vegetal

Após secagem de 20 Kg da planta fresca foram obtidos 6,1 g da planta seca, utilizando-se estufa com circulação forçada de ar quente à aproximadamente 70° C em extrator do tipo soxhlet semi-industrial. Após evaporação do solvente, o extrato etanólico foi tratado com HCl 1N (6,0 l), filtrado a vácuo, e extraídos com clorofórmio, produzindo 47,4 g de

alcalinizada com NH_4OH e extraída com clorofórmio, produzindo 23 g das bases brutas após a concentração a vácuo à temperatura de 60°C . Das bases brutas, 20 g foram fracionadas em coluna de sílica gel, usando-se como eluentes hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol. A recromatografia das frações obtidas em coluna de sílica gel produziram 400 mg de Gencianina, 78 mg de uma mistura *cis-trans* do alcalóide Genciocrucina, 245 mg de Gencianidina e 31 mg do composto denominado de "Schultesina" (NÓBREGA, 1989).

3.3. Animais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, machos, pesando entre 220 e 280g, provenientes do Biotério Central e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia de Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

3.4. Canal deferente isolado

Os animais foram sacrificados com um golpe na cabeça e seus canais deferentes isolados e imersos em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 115,0;

Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 115,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5 ; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0. A seguir os órgãos foram amarrados pelas extremidades e transferidos para cubas com capacidade de 10 ml, contendo solução de Krebs-Henseleit a 36,5±0,1 °C, borbulhada continuamente com 95% O₂-5% CO₂. A resposta contráctil em registro isotônico foi obtida através de uma alavanca inscritora acoplada a um quimógrafo com velocidade de 0,052 mm/seg. Uma tensão inicial de 0,5 g foi aplicada e o tempo de equilíbrio foi de 60 min com trocas do líquido de incubação a intervalos de 15 min.

3.5. Curvas Concentração-efeito (CCE)

Após o período de equilíbrio, foram obtidas CCE à noradrenalina, acetilcolina, KCl, CaCl₂ utilizando-se o método cumulativo (VAN ROSSUM & VAN DEN BRING, 1963). Para estabilização da resposta foram obtidas duas curvas controles iniciais com intervalo de 20 min. entre as mesmas. Após este procedimento, bem como entre uma e outra curva, o líquido de incubação foi trocado várias vezes (10 a 15 vezes) para “lavar” a preparação. Em seguida foi adicionado ATsg nas concentrações de 35, 75 ou 100 µg/ml e após 20 min confeccionada uma nova CCE na presença do ATsg. Uma quarta CCE foi confeccionada

na ausência do ATSG, visando verificar a integridade do tecido ao fim do experimento, agindo portanto também como “contra prova” dos efeitos eventualmente observados. O efeito máximo do agonista foi estabelecido quando ao compararmos uma dada resposta, com a resposta obtida para uma dose imediatamente anterior, havia redução ou incremento inferior a 10% (CAPAZ & DE MORAES, 1988).

As CCE ao CaCl_2 foram obtidas também pelo método cumulativo, para tal a extremidade proximal do canal deferente foi ligada a um miógrafo isométrico Narco (Narco Biosystems), acoplado a um sistema computadorizado. A aquisição de dados foi realizada através de um programa específico para registro de contrações musculares lisas e cardíacas. Este sistema foi inteiramente desenvolvido no decorrer deste trabalho de forma que os recursos implementados facilitaram a obtenção e registro dos dados pesquisados. Os canais deferentes foram equilibrados por 60 min em solução de Krebs-Henseleit e a seguir as CCE foram obtidas após despolarização com Ringer-KCl apresentando a seguinte composição (mM): KCl 164,2; KH_2CO_3 3,5; glicose 5,4 (EDMAN & SCHILD, 1962).

Em outros grupos de animais foram confeccionadas CCE à acetilcolina em canais deferentes isolados de ratos previamente reserpinizados (24 hs antes do experimento 3 mg/Kg i.p.), e ao KCl na presença de fenoxibenzamina (10^{-5} M, 10 min

de contacto, CAPAZ & DE MORAES, 1988) visando reduzir a participação da noradrenalina endógena na resposta contrátil obtida para estes agonistas.

3.6. Antagonistas de canais de cálcio

Objetivando esclarecer a participação do Ca^{2+} nos nossos resultados, foram realizadas novas CCE à Ach na presença e na ausência de dois bloqueadores de canais de cálcio, nifedipina e verapamil (SPEDDING, 1984; FERRANTE & TRIGGLE, 1990; DOGAN et al., 1991). Tal como anteriormente citado, para estabilização da resposta foram obtidas duas curvas controles iniciais com intervalo de 20 min. entre as mesmas. Vinte minutos após o término da segunda CCE de estabilização, foi adicionado verapamil ou nifedipina 10^{-7}M (MEDEIROS & CALIXTO 1991) e após 30 min confeccionada uma nova CCE à Ach na presença destes antagonistas. A seguir foi realizada uma quarta CCE na presença destes antagonistas mas adicionando agora previamente ATG (100 ug/ml, 20 min de contacto). Após exaustiva lavagem da preparação uma quinta CCE foi obtida na ausência de quaisquer antagonistas bem como do ATG, agindo assim como “contra prova” do experimento.

3.7. Avaliação dos resultados e Análise Estatística

Mudanças na sensibilidade foram avaliadas pela determinação da CE50, ou seja, da concentração molar do agonista que determina, em experimentos individuais, um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50 são apresentadas como média geométrica com seus respectivos intervalos de confiança para 95% (FLEMING et al., 1972).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste "t" de Student para amostras pareadas e não pareadas e análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1967). As regressões lineares foram obtidas pelos métodos dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação determinados segundo SNEDECOR & COHRAN (1967).

3.8. Fármacos sais e soluções.

Todas as soluções foram preparadas diariamente em água desionizada e conservadas em gelo durante o experimento, quando necessário. A nifedipina foi diluída em álcool absoluto e mantida protegida da luz. O verapamil foi diluído em água desionizada. Os seguintes fármacos foram utilizados: bitartarato de noradrenalina (Sigma Co.), noradrenalina base-livre (Sigma Co.) preparada em HCl 0,1 N e diluída antes do uso, iodeto de

3.7. Avaliação dos resultados e Análise Estatística

Mudanças na sensibilidade foram avaliadas pela determinação da CE50, ou seja, da concentração molar do agonista que determina, em experimentos individuais, um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50 são apresentadas como média geométrica com seus respectivos intervalos de confiança para 95% (FLEMING et al., 1972).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste "t" de Student para amostras pareadas e não pareadas e análise de variância (SNEDECOR & COCHRAN, 1967). As regressões lineares foram obtidas pelos métodos dos mínimos quadrados e os coeficientes de correlação determinados segundo SNEDECOR & COHRAN (1967).

3.8. Fármacos sais e soluções.

Todas as soluções foram preparadas diariamente em água desionizada e conservadas em gelo durante o experimento, quando necessário. A nifedipina foi diluída em álcool absoluto e mantida protegida da luz. O verapamil foi diluído em água desionizada. Os seguintes fármacos foram utilizados: bitartarato de noradrenalina (Sigma Co.), noradrenalina base-livre (Sigma Co.) preparada em HCl 0,1 N e diluída antes do uso, iodeto de

acetilcolina (Sigma Co.), reserpina (CEME), cloridrato de fenoxibenzamina (SKF Labs.), nifedipina (Sintofarma), Verapamil (Sanval) Todos os sais utilizados tinham padrão analítico (ACS).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. Efeitos dos ATG sobre a resposta contrátil do canal deferente isolado de rato à noradrenalina.

A Figura 1 apresenta as duas curvas concentração-efeito (CCE) à noradrenalina, realizadas após um intervalo de 20 minutos entre uma e outra, com canais deferentes isolados de ratos. Pode-se verificar que a segunda CCE não diferiu estatisticamente da primeira quando analisada ao nível da CE50 e Resposta Máxima (Figura 1 e Tabela I).

Os ATG induziram aumento significativo na resposta contrátil da musculatura lisa do canal deferente isolado de rato à noradrenalina fato este evidenciado nas Figuras 2, 3 e 4 bem como na Tabela II. Pode-se notar que os ATG na concentração de 100 µg/ml provocaram aumento de magnitude considerável na resposta contrátil induzida pela noradrenalina, principalmente na porção final da curva ($P < 0.01$). Por outro lado nenhuma das três concentrações de ATG utilizadas (35, 75 e 100 µg/ml) foi eficaz em provocar alteração nas curvas ao nível da CE50 (Tabela II). Pode-se ainda verificar, pela Figura 2, que a

CCE obtida após a retirada dos ATG do líquido de incubação (curva de recuperação) retornou aos valores da CCE controle.

O aumento da Resposta Máxima induzida pelos ATG nas CCE obtidas para a noradrenalina, não só foi evidentemente significativo, mas também dose-dependente, tal como demonstrado nas Figuras 3 e 4. Os aumentos induzidos nas Respostas Máximas pelas concentrações de 35, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$ de ATG foram respectivamente de 8, 23 e 38 % sendo apenas o último valor referenciado significativo quando comparado estatisticamente.

4.2. Efeitos dos ATG sobre a resposta contrátil do canal deferente Isolado de rato à acetilcolina.

Da mesma forma que para a noradrenalina, as curvas concentração-efeito (CCE) à acetilcolina, realizadas com canais deferentes isolados de ratos, apresentaram reprodutibilidade quando avaliada, através da comparação entre a primeira e segunda CCE obtidas (Figura 5 e Tabela III).

Os ATG na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, induziram significativo aumento na resposta contrátil, da musculatura lisa do canal deferente isolado de rato à acetilcolina, como pode ser

verificado através das Figuras 6, 7 e Tabela IV. Evidencia-se novamente aqui, também da mesma forma que para a noradrenalina, um aumento marcante na resposta contrátil induzida pela acetilcolina, principalmente na porção final da curva (aumento da Resposta Máxima = 36 %). Por outro lado, os ATSG provocaram também diminuição significativa das CE50 obtidas, evidenciando um aparente "desvio horizontal" de aproximadamente meia casa log (4,2 vezes).

A reserpinização dos animais (reserpina 3 mg/kg, i.p. 24 hs antes do experimento) não aboliu a potencialização da resposta colinérgica provocada pelos ATSG nos canais deferentes isolados de ratos. Assim os ATSG, mesmo em canais deferentes oriundos de animais reserpinizados, induziram aumento significativo, nas respostas obtidas pela adição de acetilcolina ao líquido de incubação, ao longo de praticamente toda a curva (Figura 7). O aumento da Resposta Máxima detectado foi de 42% e o "desvio horizontal" aparente de 7,2 vezes.

As CCE de recuperação, obtidas para a acetilcolina após a retirada dos ATSG do líquido de incubação, retornaram aos níveis do controle nos dois grupos (reserpinizados ou não) (Figuras 6 e 7)

4.3. Efeitos dos ATSG sobre a resposta contrátil do canal deferente isolado de rato ao KCl.

A Figura 8 e a Tabela V também evidenciam para o KCl tal como para os agonistas anteriores, a reprodutibilidade das CCE obtidas. Assim podemos notar pela Figura 8 a ocorrência de praticamente superposição entre a primeira e a segunda curvas. A Tabela V, por sua vez, expõe a ausência de diferença significativa, tanto ao nível da CE50 como da Resposta Máxima.

Apesar de pequeno, os ATSG na concentração de 100 µg/ml, provocaram aumento significativo nas respostas contrácteis induzidas pelo KCl. Assim as concentrações de 10^{-2} e 3×10^{-2} M desencadearam respectivamente respostas de $0,05 \pm 0,05$; $0,82 \pm 0,06$ cm (controle) e de $0,22 \pm 0,06$; $1,25 \pm 0,17$ cm (com ATSG) ($P < 0,05$). Não houve no entanto diferença significativa na Resposta Máxima. Os ATSG induziram também pequeno desvio horizontal ao nível da CE50, significativo no entanto (1,2 vezes $P < 0,05$) (Figura 9 e Tabela VI).

A administração prévia ao líquido de incubação de fenoxibenzamina (10^{-5} M, 10 minutos de contacto) aboliu a

potencialização da resposta ao KCl, provocada pelos ATSg nos canais deferentes isolados de ratos (Figura 10 e Tabela VI).

4.4. Efeitos dos ATSg sobre a resposta contrátil do canal deferente isolado de rato ao Ca^{2+} .

As CCE obtidas para o CaCl_2 em meio despolarizante (Ringer de Schild, KCl 167,7 mM) apresentaram um desvio horizontal à esquerda de 2,18 vezes quando confeccionadas na presença dos ATSg na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 11 e Tabela VII). O CaCl_2 nas concentrações de 10^{-2} e 3×10^{-2} M determinou respectivamente respostas em grama/força de $0,17 \pm 0,03$; $0,29 \pm 0,04$ (controle) e de $0,32 \pm 0,06$; $0,54 \pm 0,08$ (com ATSg) ($P < 0,05$). Os ATSg, no entanto, não induziram alteração significativa ao nível da Resposta Máxima. (Figura 11 e Tabela VII).

4.5. Avaliação da interferência da nifedipina e do verapamil, no aumento da resposta contrátil à acetilcolina induzido pelos ATSg, em canais deferentes isolados de ratos.

A administração prévia ao líquido de incubação de nifedipina (10^{-7} M) não aboliu a potencialização da resposta colinérgica provocada pelos ATSg nos canais deferentes isolados de ratos. Assim os ATSg, mesmo na presença de nifedipina,

induziram aumento significativo, nas respostas obtidas pela adição de acetilcolina ao líquido de incubação, ao longo de praticamente toda a curva (Figura 12). O aumento da Resposta Máxima detectado foi de 51% e o "desvio horizontal" aparente de 4.3 vezes.

No entanto a administração prévia ao líquido de incubação de verapamil (10^{-7} M) foi eficaz em abolir a potencialização da resposta colinérgica provocada pelos ATG nos canais deferentes isolados de ratos. Desta forma os ATG na presença de verapamil, não induziram aumento significativo ao nível da Resposta Máxima e não provocaram desvio nas CCE ao nível das CE50. (Figura 13 e Tabela VII).

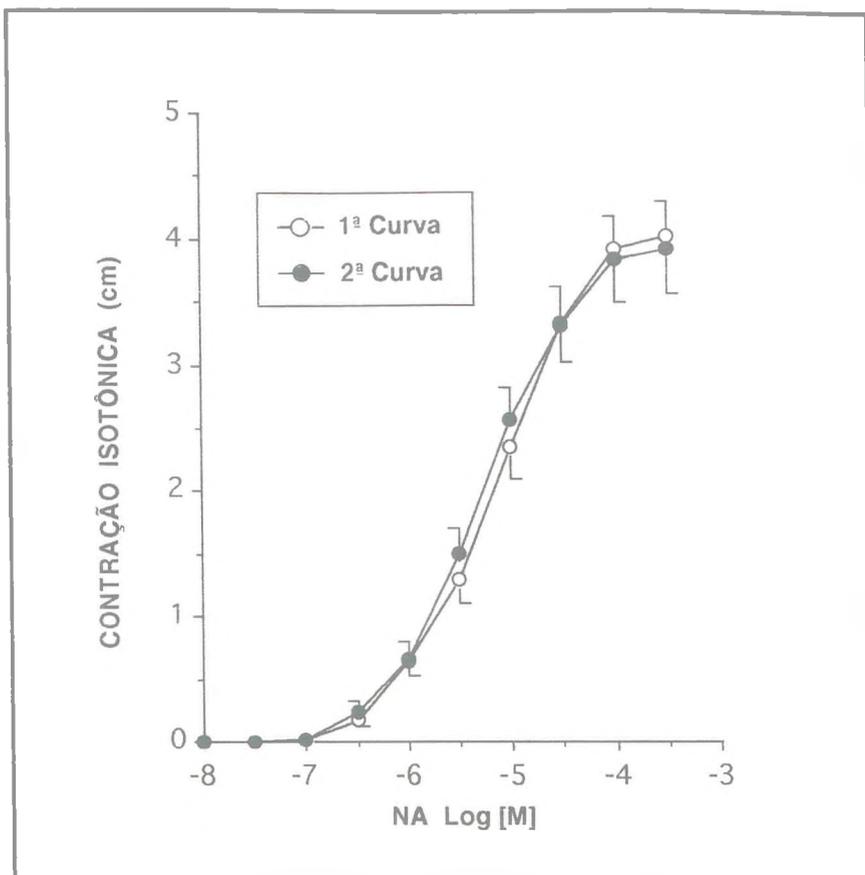


Figura 1 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para a noradrenalina obtidas com o mesmo canal deferente. O intervalo entre as curvas foi de 20 minutos. Cada ponto é média resultante de 18 experimentos. As barras verticais representam os erros padrões das médias.

Tabela I Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato, através da CE50[†] e da Resposta Máxima (R_{max}).

	CE50 (x10 ⁻⁶ M) [‡] (I.C.)	R _{max} (cm) (EPM)	n
1a Curva [‡]	5,93 (4,01-8,78)	4,03 (0,38)	18
2a Curva	4,87 (3,28-7,18)	3,92 (0,36)	18

[†] Concentração molar de noradrenalina que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

[‡] O intervalo entre a primeira e a segunda curva foi de 20 minutos.

[‡] Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n) .

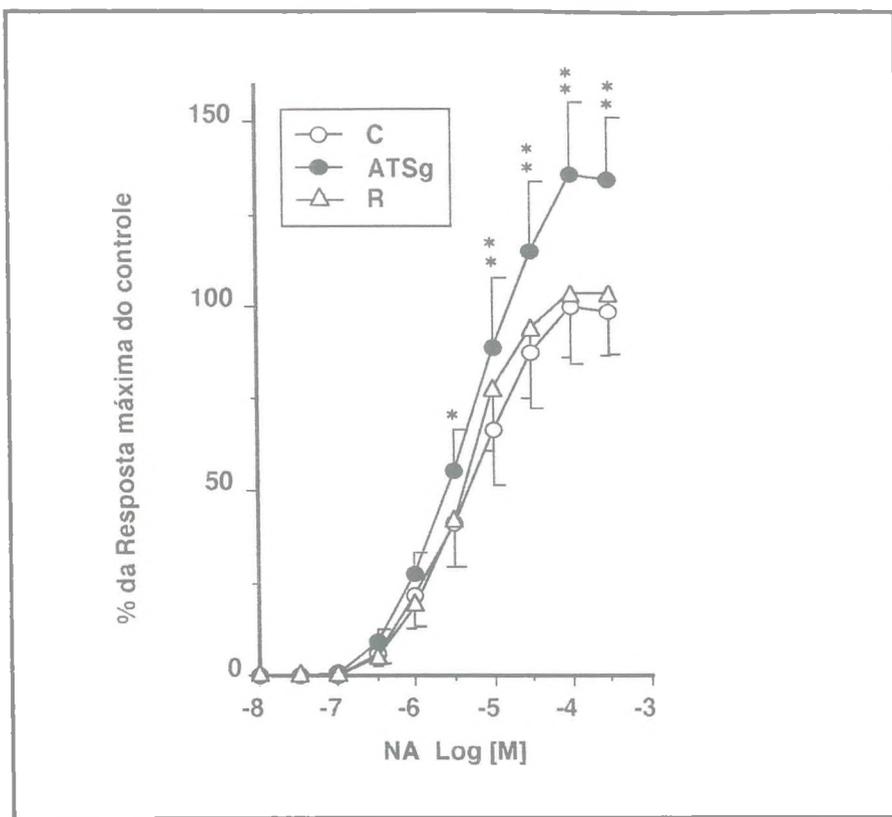


Figura 2 Curvas concentração-efeito para a noradrenalina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg)
C = Curva controle antes da adição dos ATSg
ATSg = Curva experimental realizada na presença de ATSg 100 µg/ml
R = Curva de recuperação realizada após a retirada de ATSg
 As barras verticais representam os erros padrões das médias. cada ponto representa a média de 6 experimentos. * P< 0,05 ** P< 0,01

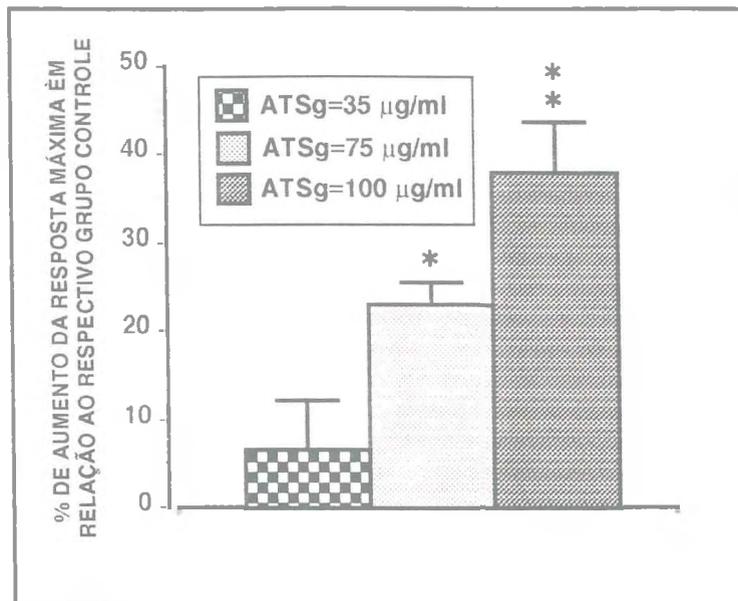


Figura 3 Aumento induzido na resposta máxima obtida para a noradrenalina, pela adição de diferentes concentrações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATsg) ao líquido de incubação. Cada ponto é a média resultante de 6 experimentos. As barras verticais representam os erros padrões das médias.

* P<0,05 ** P<0,001

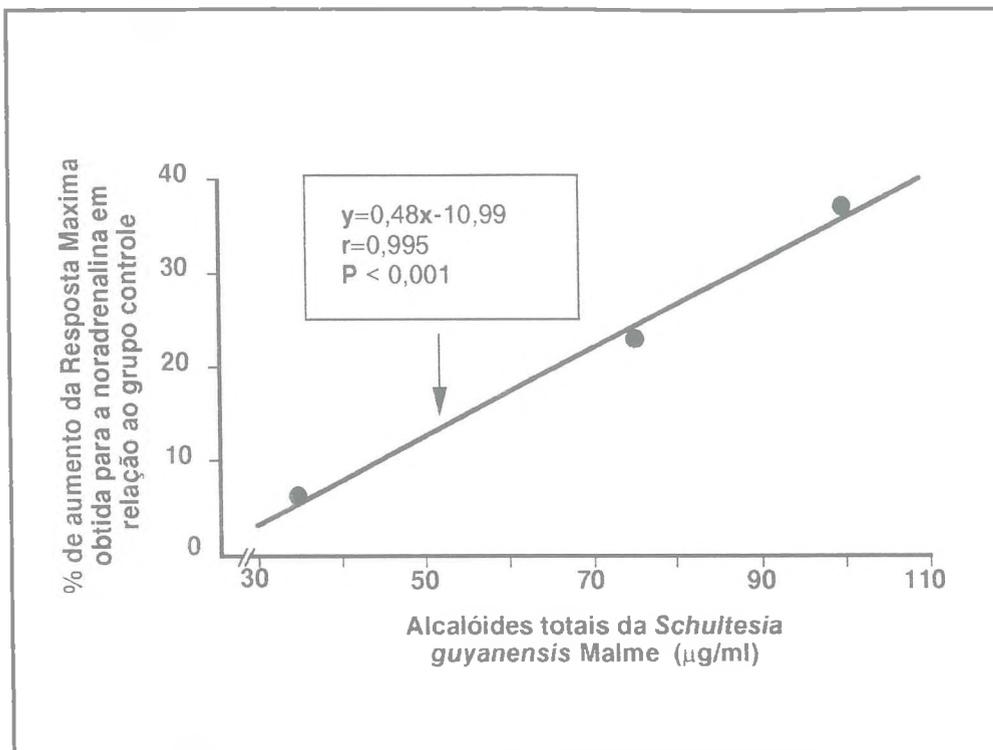


Figura 4 Reta de regressão obtida relacionando-se a concentração de alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg), adicionados ao líquido de incubação, e a porcentagem de aumento na resposta máxima detectada para a noradrenalina, em relação ao grupo controle. Cada ponto representa a média de 6 experimentos.

Tabela II Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg) na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de rato.

	35 µg/ml		75 µg/ml		100 µg/ml	
	CE50 [†] (x10 ⁻⁶ M) [‡] (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	CE50 (x10 ⁻⁶ M) (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	CE50 (x10 ⁻⁶ M) (I.C.)	Rmax (cm) (EPM) _n
Controle ^N	5,31 (2,09-13,47)	4,88 (0,58)	4,73 (3,08-7,30)	3,78 (0,48)	5,18 (2,53-10,60)	2,85 (0,45)
Experimental (com ATSG [‡])	5,35 (1,52-18,74)	5,15 (0,52)	4.40 (1,82-10,60)	4,62 * (0,56)	5,78 (3,41-9,83)	3,95 ** (0,54)

† Concentração molar de noradrenalina que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

‡ Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

N Em todos os grupos, n=6

‡ ATSG na concentração de 100 µg/ml

* P<0,05

** P<0,01

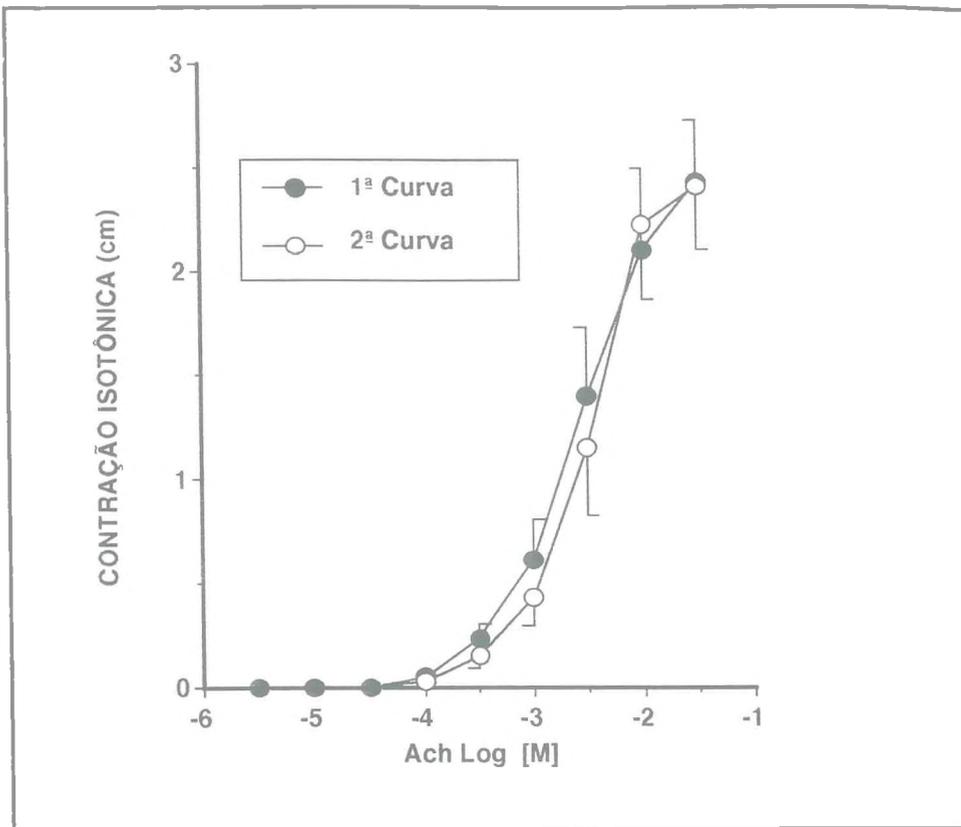


Figura 5 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para a acetilcolina obtidas com o mesmo canal deferente. O intervalo entre as curvas foi de 20 minutos. Cada ponto é média resultante de 5 experimentos. As barras verticais representam os erros padrões das médias.

Tabela III Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pela acetilcolina no canal deferente isolado de rato através da CE50[†] e da Resposta Máxima (Rmax).

	CE50 ($\times 10^{-3}$ M) [‡] (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n
1a Curva [‡]	2,85 (1,20-6,87)	2,43 (0,53)	6
2a Curva	2,70 (1,09-6,76)	2,41 (0,59)	6

[†] Concentração molar de acetilcolina que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

[‡] Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

[‡] O intervalo entre a primeira e a segunda curva foi de 20 minutos.

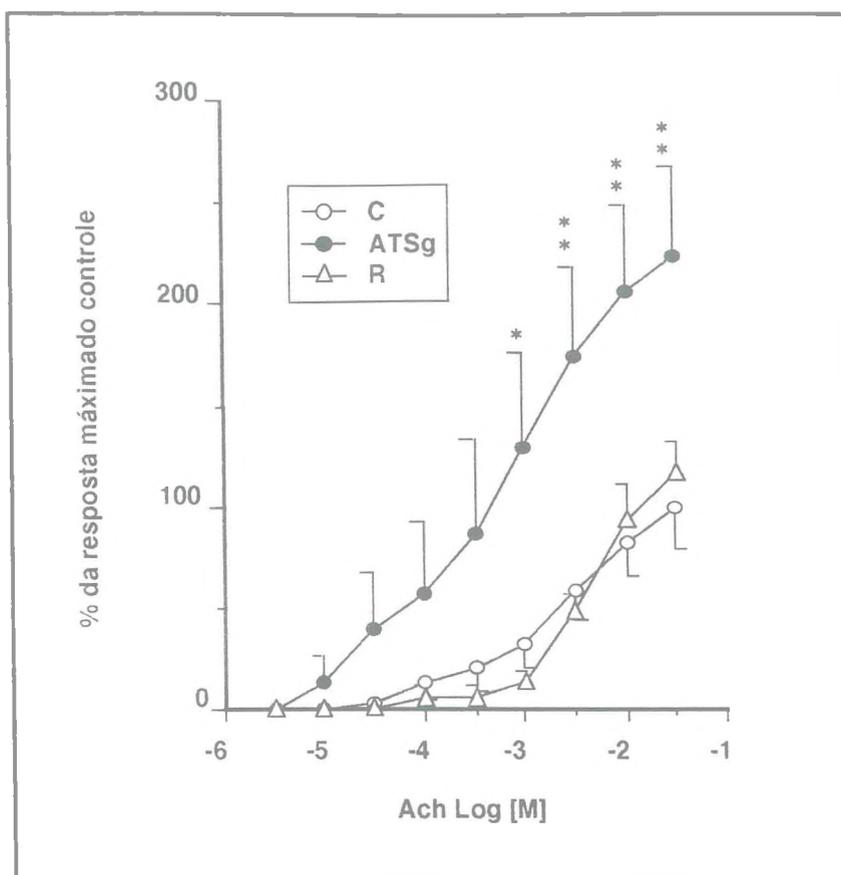


Figura 6 Curvas concentração-efeito para a acetilcolina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg)
C = Curva controle antes da adição dos ATSg
ATSg = Curva experimental realizada na presença de ATSg 100 µg/ml
R = Curva de recuperação realizada após a retirada de ATSg
 As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 5 experimentos. * P<0,05 ** P<0,01

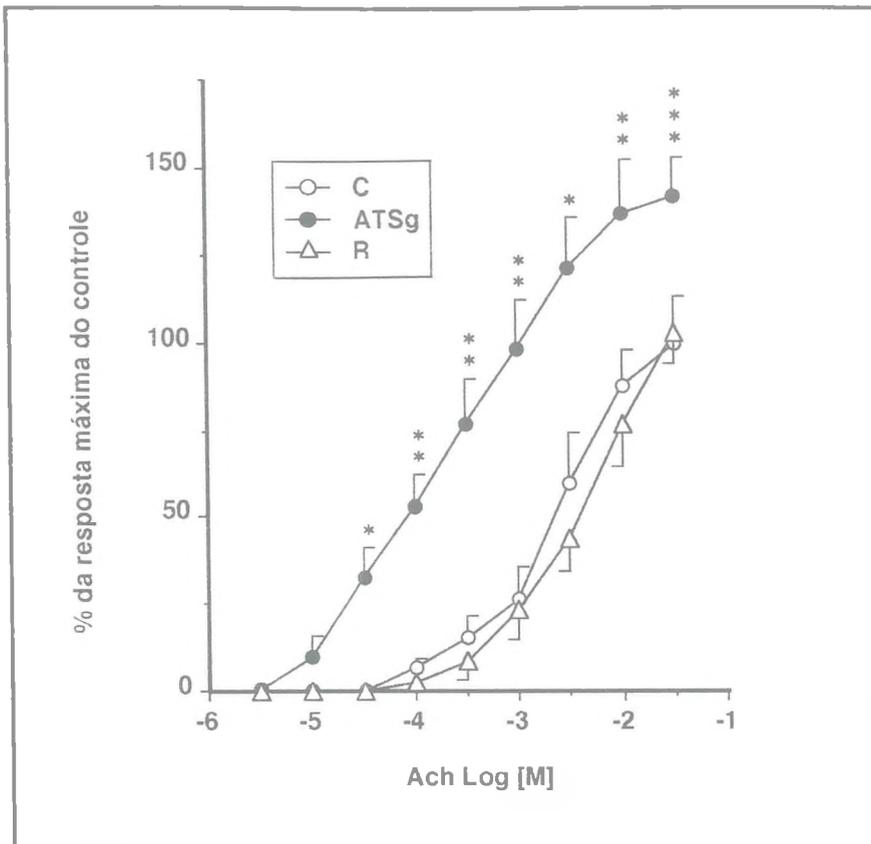


Figura 7 Curvas concentração-efeito para a acetilcolina, obtidas em canais deferentes isolados de ratos reserpinizados (reserpina 3 mg/kg, 24 hrs antes do experimento) na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg)

C = Curva controle antes da adição dos ATSg

ATSg = Curva experimental realizada na presença de ATSg 100 µg/ml

R = Curva de recuperação realizada após a retirada de ATSg

As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 6 experimentos. * P<0,05 ** P<0,01 *** P<0,001

Tabela IV Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg). na resposta contráctil induzida pela noradrenalina no canal deferente isolado de ratos, reserpinizados ou não.

	SEM RESERPINIZAÇÃO			RESERPINIZADOS ♦		
	CE50 [†] (x10 ⁻³ M) [⊗] (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n	CE50 (x10 ⁻³ M) (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n
Controle	2,70 (1,09-6,70)	2,41 (0,59)	5	2,34 (0,86-6,31)	5,14 (0,68)	6
Experimental (com ATSG [‡])	0,56 * (0,06-5,13)	3,26 ** (0,56)	5	0,32 ** (0,09-1,04)	7,30 ** (0,56)	6

† Concentração molar de acetilcolina que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

♦ 3 mg/kg i.p. 24 horas antes do experimento.

⊗ Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

‡ ATSG na concentração de 100 µg/ml

* P<0,05

** P<0,01

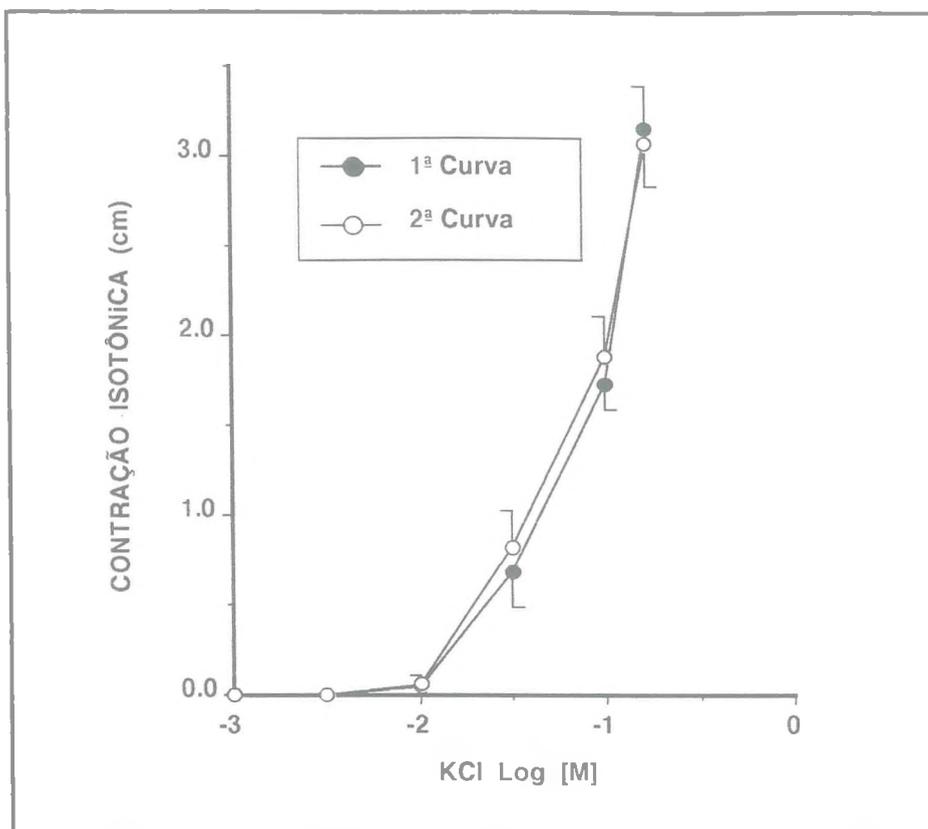


Figura 8 Primeira e segunda curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio obtidas com o mesmo canal deferente. O intervalo entre as curvas foi de 20 minutos. Cada ponto é média resultante de 9 experimentos. As barras verticais representam os erros padrões das médias.

Tabela V Avaliação da reprodutibilidade da resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente de rato, através da CE50[†] e da Resposta Máxima (R_{max}).

	CE50 (x10 ⁻² M) [‡] (I.C.)	R _{max} (cm) (EPM)	n
1a Curva [‡]	6,85 (3,61-12,29)	3,15 (0,31)	9
2a Curva	4,61 (3,68-5,98)	3,07 (0,33)	9

[†] Concentração molar de KCl que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

[‡] Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n) .

[‡] O intervalo entre a primeira e a segunda curva foi de 20 minutos.

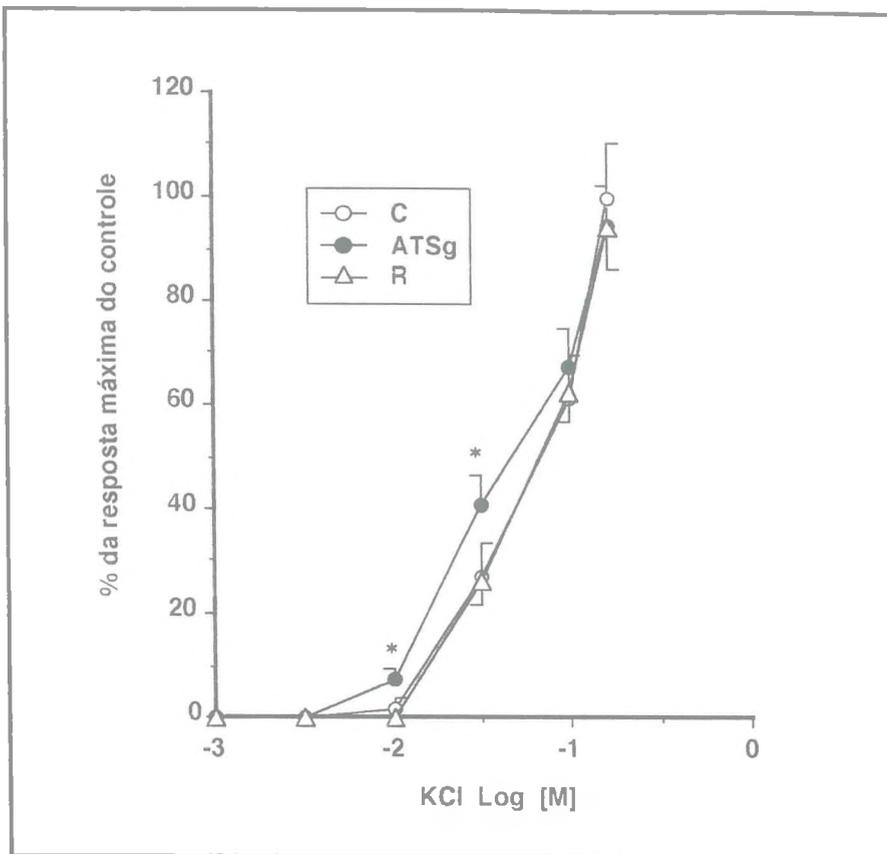


Figura 9 Curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg)
C = Curva controle antes da adição dos ATSg
ATSg = Curva experimental realizada na presença de ATSg 100 µg/ml
R = Curva de recuperação realizada após a retirada de ATSg
 As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 9 experimentos. * P< 0,05

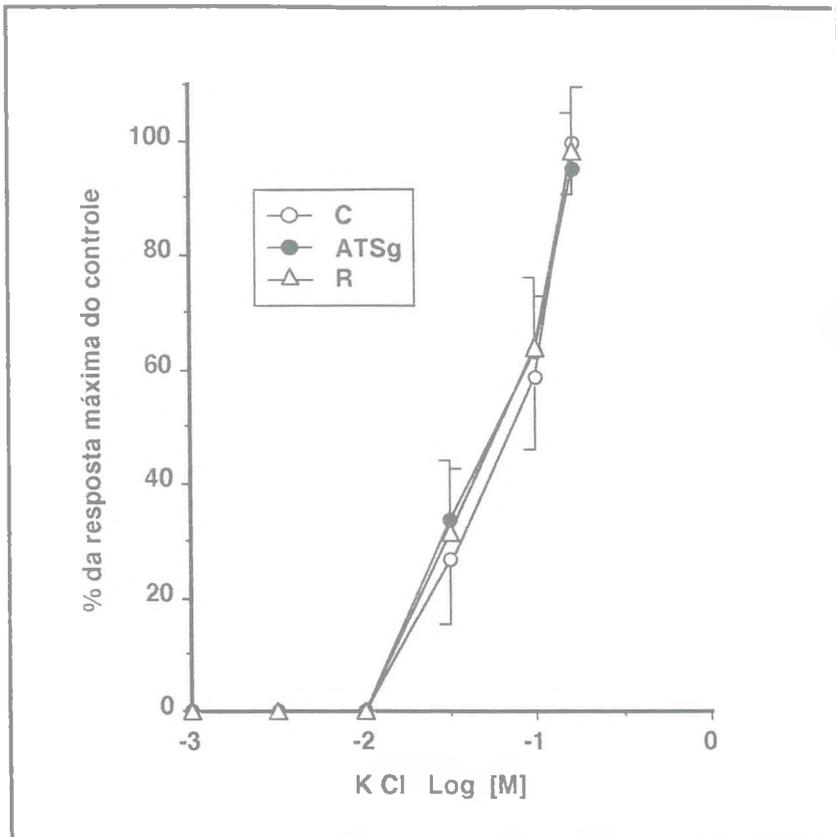


Figura 10 Curvas concentração-efeito para o cloreto de potássio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg=100ug/ml), adicionando previamente fenoxibenzamina 10 μ M.

C = Curva controle antes da adição dos ATSg

ATSg = Curva experimental realizada na presença de ATSg 100 μ g/ml

R = Curva de recuperação realizada após a retirada de ATSg

As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 6 experimentos.

Tabela VI Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg) na resposta contráctil induzida pelo KCl no canal deferente isolado de rato na presença ou não de fenoxibenzamina (FENX).

	SEM FENX			com FENX ♦		
	CE50 † (x10 ⁻² M) * (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n	CE50(x10 ⁻² M) (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n
Controle	4,61 (3,68-5,98)	3,07 (0,32)	9	7,40 (3,81-14,4)	2,72 (0,25)	6
Experimental (com ATSG ‡)	3,57 ** (2,94-4,39)	2,91 (0,29)	9	4,63 (2,59-8.26)	2,60 (0,26)	6

† Concentração molar de KCl que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

♦ FENX 10⁻⁵ M

* Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

‡ ATSG na concentração de 100 µg/ml

** P<0,01

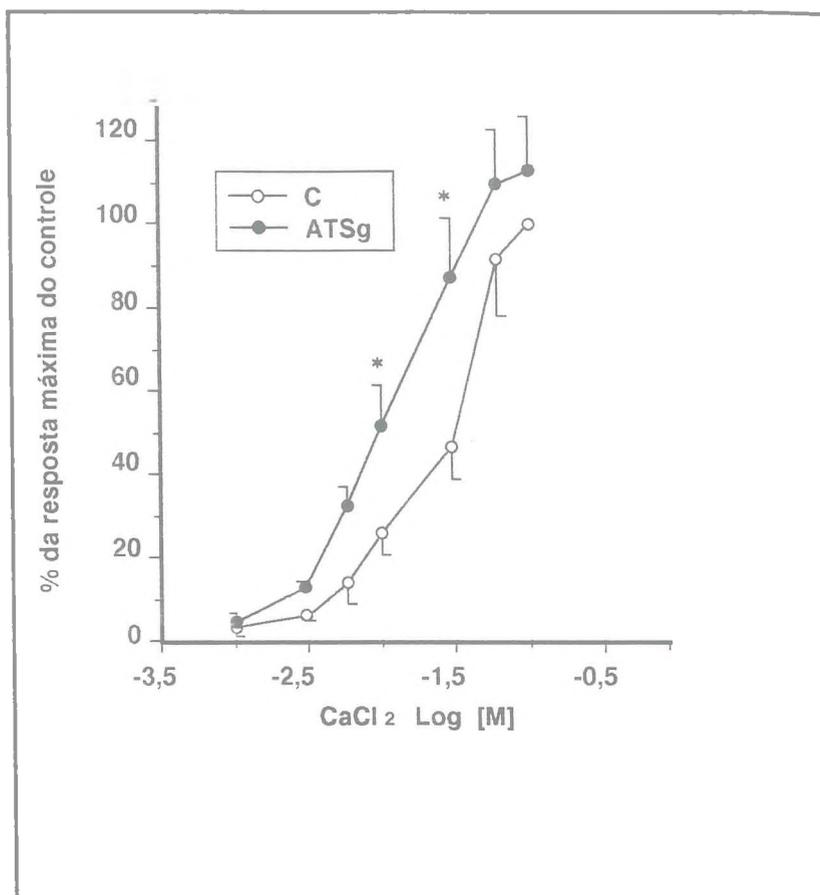


Figura 11 Curvas concentração-efeito para o cloreto de cálcio, obtidas em canais deferentes isolados de ratos na presença e na ausência dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg 100 µg/ml). Os experimentos foram realizados com grupos não pareados. As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 7 e 8 experimentos, grupos controle e experimental respectivamente. * P<0,05

Tabela VII Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg) na resposta contráctil induzida pelo CaCl₂ no canal deferente isolado de rato em meio despolarizante.

	CE50 † (x10 ⁻² M) ‡ (I.C.)	Rmax (gF) (EPM)	n
Controle	2,82 (1,62-4,91)	5,9 (0,89)	7
Experimental (com ATSG ‡)	1,29 ** (0,90-1,86)	7,1 (0,78)	8

† Concentração molar de CaCl₂ que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

‡ Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

‡ ATSG na concentração de 100 µg/ml

** P<0,01

Tabela VII Avaliação das ações dos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg) na resposta contráctil induzida pelo CaCl_2 no canal deferente isolado de rato em meio despolarizante.

	CE50 † ($\times 10^{-2}\text{M}$) ‡ (I.C.)	Rmax (gF) (EPM)	n
Controle	2,82 (1,62-4,91)	5,9 (0,89)	7
Experimental (com ATSG ‡)	1,29 ** (0,90-1,86)	7,1 (0,78)	8

† Concentração molar de CaCl_2 que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

‡ Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

‡ ATSG na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$

** $P < 0,01$

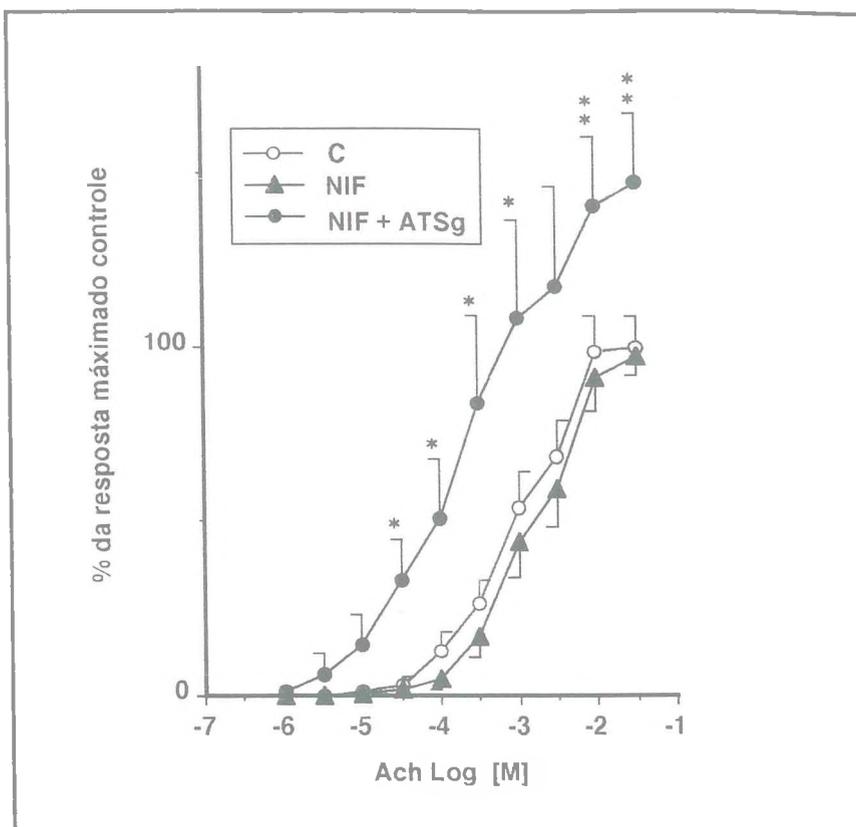


Figura 12 Ação da nifedipina (NIF) sobre o aumento da reatividade à acetilcolina, induzida pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSG) em canais deferentes isolados de ratos.

C = Curva controle antes da adição de ATSG e NIF

NIF = Curva realizada na presença de NIF (10^{-7} M)

NIF + MZ = Curva realizada na presença de NIF + ATSG (100 μ g/ml)

As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 5 experimentos. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

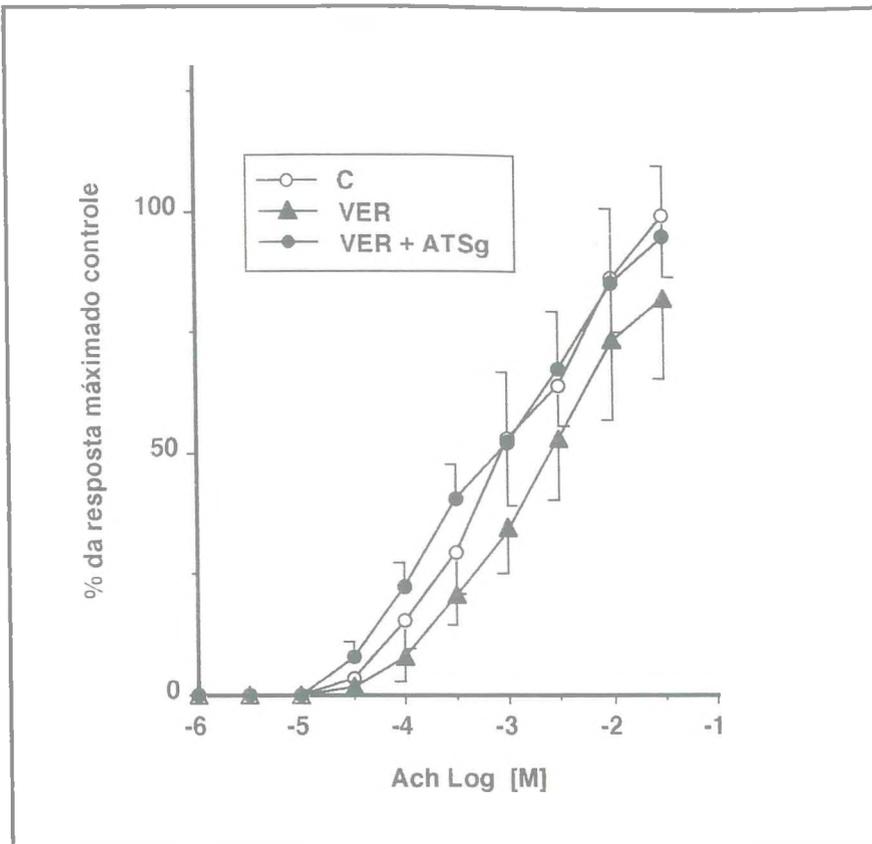


Figura 13 Ação do verapamil (VER) sobre o aumento da reatividade à acetilcolina, induzida pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSG) em canais deferentes isolados de ratos.
C = Curva controle antes da adição de ATSG e NIF
VER = Curva realizada na presença de VER ($10^{-7}M$)
VER + MZ = Curva realizada na presença de VER + ATSG (100 $\mu g/ml$)
 As barras verticais representam os erros padrões das médias, cada ponto representa a média de 5 experimentos.

Tabela VIII Avaliação da interferência do verapamil e da nifedipina, no aumento da resposta contráctil à acetilcolina, induzido pelos alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme (ATSg), em canais deferentes isolados de ratos.

	NIFEDIPINA (10 ⁻⁷ M)			VERAPAMIL (10 ⁻⁷ M)		
	CE50 † (x10 ⁻³ M) ‡ (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n	CE50 (x10 ⁻³ M) (I.C.)	Rmax (cm) (EPM)	n
Controle	1,48 (0,43-5,15)	3,98 (0,24)	6	1,57 (0,42-5,85)	3,06 (0,63)	6
Experimental (com ATSG ‡)	0,34 *** (0,05-1,21)	6,03 ** (0,78)	6	0,68 (0,29-1,23)	3,53 (0,63)	6

† Concentração molar de acetilcolina que induz resposta cuja magnitude é de cinquenta por cento da resposta máxima obtida.

‡ Os valores representam a média geométrica com 95 % de intervalo de confiança (I.C.) do número de experimentos indicado (n).

‡ ATSG na concentração de 100 µg/ml

** P<0,01

*** P<0,001

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Dentre os possíveis mecanismos envolvidos com a variação de sensibilidade as drogas. Fleming (1975) propôs que a ocorrência exclusiva de desvio horizontal na CCE, sem alteração da Resposta Máxima, caracterizaria um fenômeno localizado pré-juncionalmente e que estaria relacionado aos seguintes fatos:

- 1) Diminuição da eficácia funcional da captação neuronal (catecolaminas);
- 2) Inibição da captação extraneuronal e/ou metabolismo extraneuronal de aminas simpatomiméticas;
- 3) Redução da atividade da colinesterase (em se tratando de acetilcolina e/ou parassimpatomiméticos correlatos);
- 4) De uma forma geral qualquer alteração em sítios de perda e/ou produção que proporcione um maior "aporte" de moléculas do agonista ao receptor.

A presença dos ATSG no líquido de incubação provocou evidente incremento vertical nas CCE obtidas para o efeito contrátil induzido pela noradrenalina e pela acetilcolina. Assim ocorreu não só um aumento nas respostas, quando feita a comparação entre a maioria das doses utilizadas, mas também e principalmente, no que concerne a Resposta Máxima. Assim não conseguimos demonstrar através dos nossos resultados, exclusivamente desvio horizontal ao nível da CE50. Além disso, atentando-se ao fato que os ATSG tiveram ação similar no que diz respeito a noradrenalina e acetilcolina, torna-se improvável e

ilógico pensar-se em uma possível interferência dos ATSG ao mesmo tempo ao nível do metabolismo de ambos os mediadores, principalmente tendo em vista a diversidade enzimática existente entre os procedimentos metabólicos ligados a estes dois sistemas.

LINDAMOOD et al., (1978) verificaram que no canal deferente de camundongo, tecido pertencente ao tipo A, tal como o de rato (BURNSTOCK, 1970), concentrações relativamente baixas de Ach (menores do que 10^{-4} M) contraem o tecido através de uma interação direta com receptores muscarínicos. Respostas contráteis obtidas com concentrações de acetilcolina maiores que 10^{-4} M podem liberar noradrenalina, após interação do agonista muscarínico com receptores nicotínicos situados nas terminais adrenérgicas. Assim sendo o aumento de sensibilidade provocado pelos ATSG nas CCE à acetilcolina poderia estar mascarando um aumento de sensibilidade, obtido na realidade, para a noradrenalina liberada das terminais nervosas. Nossos resultados demonstraram no entanto que mesmo canais deferentes isolados de animais tratados com reserpina, uma substância que depleta os estoques neuronais de catecolaminas (FLEMING & TRENDELENBURG, 1960) apresentaram um aumento evidente na sensibilidade à acetilcolina quando na presença dos ATSG.

Em conseqüência desde que se torna difícil atribuir-se aos ATSG, uma ação localizada pré-juncionalmente que explique o aumento das respostas obtidas tanto para a acetilcolina, quanto para a noradrenalina, a outra hipótese seria a possibilidade de uma

atuação ao nível pós-juncional, ou seja na célula muscular lisa propriamente dita.

As seguintes alterações e/ou mecanismos podem ser levados em consideração no que diz respeito a uma ação localizada pós-juncionalmente:

1) Alterações na afinidade e/ou densidade de receptores pós-juncionais (VARMA, 1966; THESLEFF, 1974); 2) Alterações na "cascata" bioquímica após a interação droga-receptor (WESTFALL et al., 1975 a); c) Despolarização parcial da membrana da célula efetuidora (URQUILLA et al., 1978); d) Alterações na disponibilidade funcional e/ou na permeabilidade da membrana a íons, principalmente o cálcio. (WESTFALL, 1970); e) Alterações morfológicas nas conexões célula-célula, levando a uma maior sincronização das respostas contrácteis (BURNSTOCK, 1970).

A possibilidade dos resultados aqui apresentados, refletirem uma alteração na densidade e/ou na conformação de receptores pós-juncionais, nos parece ser pouco provável, tendo em vista pelo já exposto acima, que estas alterações deveriam estar ocorrendo, ao mesmo tempo, tanto para os receptores muscarínicos colinérgicos como para os adrenoceptores alfa.

Uma das principais características da ultraestrutura do canal deferente de rato é a presença de um contacto próximo entre suas células musculares, representado pela íntima aproximação de membranas e denominado "nexus" (BURNSTOCK, 1970). Aparentemente existe uma relação inversa entre a ocorrência de

"nexus" e a densidade da inervação (BURNSTOCK, 1970). Assim sendo, tecidos densamente inervados como o canal deferente de rato, possuem uma pequena incidência de "nexus". Lee et al., (1975) demonstraram que a desnervação crônica aumenta o número de "nexus" em cada célula muscular lisa do canal deferente de rato e sugeriram que o aumento de resposta máxima a NA observado após desnervação seria decorrente do aumento do número de "nexus". Esta possibilidade, ou seja, estarem induzindo os ATSG um aumento no número de nexus celulares, e conseqüentemente levando a um incremento nas respostas obtidas para a noradrenalina e acetilcolina, é pouco verossímil se atentarmos ao fato de que a desnervação cirúrgica para induzir as alterações detectadas por Lee et al., (1975) necessita de um período pós-operatório de 5 à 9 dias para a manifestação de supersensibilidade pós-juncional.. Nossos resultados foram obtidos *in-vitro* após um contacto dos ATSG de apenas 20 minutos, período de tempo extremamente curto portanto para induzir alterações morfológicas teciduais, tais como aquelas detectadas por Lee et al (1975).

Procedimentos como alteração da concentração de potássio ou adição de ouabaína aos líquidos de incubação, que induzam despolarização parcial da membrana do canal deferente de cobaia, de cerca de 8 a 10 mV, provocam aumento de sensibilidade destas estruturas à noradrenalina (URQUILLA & FLEMING, 1975; URQUILLA et al., 1978).

Nossos resultados obtidos com as CCE para o KCl confeccionadas após a adição de ATSG demonstraram claramente desvio horizontal à esquerda, portando com diminuição da CE50, sem no entanto ocorrer detecção de alteração significativa ao nível da Resposta Máxima. Estas alterações no entanto não foram reproduzidas, quando os experimentos eram conduzidos na presença do antagonista alfa adrenérgico fenoxibenzamina, demonstrando portanto, um possível envolvimento do mediador adrenérgico, eventualmente liberado pelo KCl nestes resultados (DE LIMA et al.,1994). Estes dados apesar de não descartarem totalmente a possibilidade da indução pelos ATSG de uma despolarização parcial da membrana celular apóiam fortemente a hipótese do não envolvimento deste fenômeno nos nossos resultados.

A tensão desenvolvida pelas proteínas contrácteis da célula muscular lisa normalmente é creditada principal e primariamente a concentração do íon Ca^{2+} presente no citoplasma celular (BOLTON, 1979). Assim alterações na mobilização e/ou disponibilidade de cálcio para a contração podem levar a um aumento das respostas contrácteis de agonistas ligados a estes dois processos. Um grande número de publicações apóiam a idéia de que a estimulação dos receptores muscarínicos tornaria disponível o cálcio ligado à célula em algum sítio não atingível, e portanto não passível de liberação, por altas concentrações de potássio (BOLTON, 1979). No entanto a noradrenalina apesar de agir em receptores diferentes da acetilcolina aparentemente libera cálcio do

mesmo "pool" que o mediador do parassimpático (BOLTON, 1979). O cálcio celular disponível para a contração de diversos tipos de músculos lisos dentre eles o canal deferente, pode advir da geração de potencial de ação (PA), como consequência da interação do agonista com o seu respectivo receptor farmacológico. Assim em músculos que geram potencial de ação como o canal deferente de rato os efeitos da ativação do receptor alfa adrenérgico no potencial de membrana é indistinguível dos efeitos de outros estimulantes como a acetilcolina (BULBRING & BURNSTOCK, 1960). A presença dos ATSG no líquido de incubação (Krebs despolarizante, livre de Ca^{2+}) foi capaz de induzir, quando avaliado ao nível da CE50, um desvio para esquerda nas CCE obtidas para o Ca^{2+} . Estes dados em conjunto nos levaram a pensar fortemente na possibilidade de um envolvimento do Ca^{2+} com o aumento de responsividade para a noradrenalina e acetilcolina induzido pelos ATSG (DE LIMA et al., 1995).

Assim o passo seguinte foi avaliarmos se a administração de bloqueadores de canais de cálcio, mais especificamente, incubando as preparações com verapamil ou nifedipina, reverteria o processo, ou seja, impediria o aumento de resposta induzido pelos ATSG nas CCE obtidas para a acetilcolina.

O Ca^{2+} age no músculo liso como segundo mensageiro para ativar a "miosina kinase de cadeia leve" e desenvolver tensão (SPERELAKIS, 1993). O influxo de cálcio ocorre através de dois canais distintos. O canal de cálcio voltagem dependente abre em

respostas as alterações da diferença de potencial induzida por uma despolarização da membrana plasmática . O canal de Ca^{2+} operado por receptor é ativado em resposta ao acoplamento agonista-receptor sem que haja alteração, de voltagem (DOGAN et al., 1991; SILVA, 1991).

Speeding & Paoletti (1991) relatam que muitos trabalhos foram realizados no sentido de definir e elucidar propriedades dos canais de cálcio voltagem dependentes, e observaram que existiam alguns tipos que diferiam entre si. Tendo sido detectadas diferenças, identificadas por estudos eletrofisiológicos e farmacológicos. Assim sendo os canais de cálcio voltagem dependentes foram classificados da seguinte forma: a) Tipo L (para terminação longa); b) Tipo T (para os transientes); c) Tipo N (para os neuronais nem L ou T) e d) Tipo P (para células Purkinje). O canal de Ca^{2+} tipo L é o predominante em tecidos, particularmente coração e músculo liso.

As drogas classificadas como antagonistas de canal de Ca^{2+} têm sido descritas segundo Speeding & Paoletti (1991), como inibidores da entrada de Ca^{2+} via canais tipo L, pela ação em determinados sítios do canal a saber: a1, b1 ou c1. Um dos grupos de drogas classificadas, foi denominado de Dihidropiriridine (DHP) o qual, apresentam sítio de ação de alta afinidade na subunidade a1 do canal tipo L. A nifedipina é um antagonista de canal de Ca^{2+} pertencente ao grupo dos DHPs e caracterizada como um potente e seletivo inibidor do canal tipo L (SHIBATA, 1989).

Outro grupo, foi denominado de agentes “verapamil like” o qual apesar dos estudos, sabe-se apenas que seu sítio de ativação nos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L é distinto do sítio dos DHPs , liguem-se talvez com os sítios 1a ou 1b (SPEEDING & PAOLETTI, 1991).

O segundo tipo de canal de Ca^{2+} , é o operado por receptor o qual é ativado por substâncias estimulantes. A literatura relata a existência deste canal o qual possui maior permeabilidade à outros íons do que ao Ca^{2+} . Algumas substâncias quando em concentração maiores, aumentam a ocupação de receptores produzindo a abertura deste canal aumentando como conseqüência o influxo de Ca^{2+} . Este processo de abertura de canais iônicos estimulado por receptores de drogas pode ser dependente de potencial de ação em alguns casos ou independente em outros (BOLTON, 1975; SPEEDING & PAOLETTI, 1991). Existem evidencias que o Ca^{2+} se encontra ligado a vários tipos de receptores como: adrenoceptores alfa, colinérgico muscarínico, histamínico e possivelmente outros, e pode ser deslocado pela ativação destes receptores. Este Ca^{2+} ligado parece exercer um importante papel apenas quando grandes concentrações do agonista, próximas àquelas capazes de produzir contração máxima, são usadas (BOLTON, 1979). A presença de diferentes canais de cálcio operados por receptor pode explicar a diferença nas respostas contráteis máximas produzidas por vários agonistas.

Neste trabalho utilizamos duas drogas bloqueadoras de canais de cálcio, verapamil e nifedipina. Ambas atuam nos canais de cálcio voltagem dependentes com alta afinidade para o tipo L. Observamos que a nifedipina não foi capaz de bloquear o aumento da resposta máxima induzida pelo ATG nas CCE obtidas para a acetilcolina. No entanto o verapamil bloqueou este aumento mantendo a amplitude da CCE na presença do ATG ao nível da curva controle.

Assim, em função do conjunto de dados apresentados neste trabalho, podemos sugerir, um possível desenvolvimento de mobilização diferencial de Ca^{2+} via canais voltagem dependentes, causado pelos ATG, levando ao aumento das respostas contráteis detectadas nas CCE obtidas para noradrenalina e acetilcolina no canal deferente isolado de rato.

Estes resultados, entretanto, não descartam a possibilidade de estarem ocorrendo outras alterações concomitantemente, como por exemplo, alterações bioquímicas pós acoplamento droga-receptor. Conclusões a esse respeito, no entanto, não são permitidas à luz dos dados aqui apresentados.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Os alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, induzem desvio vertical com aumento da Resposta Máxima à noradrenalina, nas CCE confeccionadas com canais deferentes isolados de ratos.
2. Os alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, induzem desvio vertical com aumento da Resposta Máxima à acetilcolina nas CCE confeccionadas com canais deferentes isolados de ratos, associado à diminuição da CE50.
3. Os alcalóides totais da *Schultesia guyanensis* Malme, induzem desvio horizontal à esquerda, nas CCE obtidas para o CaCl_2
4. O conjunto de dados obtidos, sugerem um possível desenvolvimento de mobilização diferencial de Ca^{2+} , via canais voltagem dependentes, causado pelos ATsg, levando ao aumento das respostas contrácteis detectadas nas CCE obtidas para a noradrenalina, e acetilcolina no canal deferente isolado de rato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

BATISTA, L.K.O., De ALBUQUERQUE, J.L.A., BROTTTO, M.A.P., CAPAZ, F.R. Efeitos dos Alcalóides de *Schultesia guyanensis* Malme no átrio direito isolado do rato. In: Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 1990, Caxambú-MG. **Resumos...** São Paulo: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1990. p. 26.

BOUISSON, R. As plantas medicinais. A **Saúde do Mundo**, set., 1973, p. 3-17.

BOLTON, T.B. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. **British medical bulletin**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1979a.

BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitters and others substances on smooth muscle. **Physiology Review**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979b.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste especialmente do Ceará, 3.ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1976. p. 365.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará 2.ed. Fortaleza: Centro de Divulgação Universitária, 1960.

* De acordo com :

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR-6023.

Referências Bibliográficas. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

- BULBRING, E., BURNSTOCK, G. Membrane potencial changes associated with tachyphylaxis and potentiation of response to stimulating drugs in smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 15, p. 611-624, 1960.
- BURNSTOCK, G. Structure of smooth muscle and its innervation. In: BULBRING, S., BRADING, A. , JONES, A., TOMITA, T. **Smooth Muscle**, London: Edward Arnold, 1970. v. 1, p. 1-66.
- CAPAZ, F.R., DE MORAES, S. Reduction by acute restrain stress of noradrenaline sensitivity in the isolated pacemaker of the rato. **European. J. Pharmacol.** v. 147, p. 295-298, 1988.
- CHEVALLIER, A. Prefácio In: CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.**, Rio de Janeiro: Min. da Agricultura, 1931. v. 2, p. 706
- CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Min. da Agricultura, 1931, v. 2, p. 433.
- DE LIMA, M.E.F, MARTINS S.A.R, NOBREGA, E.M., CAPAZ, F.R. Efeitos dos alcalóides de *Schultesia guyanensis* Malme no canal deferente isolado do rato. In: Congresso Brasileiro De Farmacologia e Terapêutica Experimental, 1994, Caxambú-MG. **Resumos...** São Paulo: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, 1994, p. 204.
- DE LIMA, M.E.F, MENEZES, M.P, NOBREGA, E.M., CAPAZ,F.R. Envolvimento de cálcio e noradrenalina nas ações dos alcalóides totais de *Schultesia guyanensis* Malme. In: Congresso Brasileiro De Farmacologia e Terapêutica Experimental, 1995, Serra Negra-SP. **Resumos...** São Paulo: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Serra Negra, 1995, p.255.

- DE MORAES, S., CAPAZ, F.R. An analysis of the effects of cocaine on the responsiveness of the isolated guinea pig vas deferens to noradrenaline and other agonists. **Pharmacology**, v. 15, p. 461-468, 1977.
- DOGAN, N., ÇIÇEK, A.G., SINGIRIK, E., KILIÇ, M. 5-Hydroxytryptamine-induced contraction of isolated umbilical artery and its dependence on cellular and extracellular Ca^{++} . **Arch. int. pharmacodyn.** v. 312, p. 79-85, 1991.
- DOMINGUEZ, X.A. **Métodos de investigacion fitoquímica**, 4^a ed. México, Limusa, 1973, p. 76-77.
- EDMAN, K.A.P, SCHILD, H.O. The need for calcium in the contractive responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus. **J. Physiol (London)** v. 161, p. 424-441, 1962.
- FEDAN, J.S., WESTFALL, D.P., FLEMING, W.W. Species differences in sodium-potassium adenosine triphosphatase activity in the smooth muscle of the guinea pig and rat vas deferens. **J. Pharmacol. exp. Ther.**, v. 206, n. 2, p. 356-63, 1978.
- FERRANTE, J., TRIGGLE, D.J. Drug and disease-induced regulation of voltage-dependent calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 42, n. 1, p. 299-44, 1990.
- FLEMING, W.W., WESTFALL, D.P.; De La LAND, J.S.; JELLET, L.B.; Log normal distribution of equieffective dose of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 181, p. 339-45, 1972.
- FLEMING, W.W., TRENDELENBURG, U. The development of supersensitivity to norepinephrine after pretreatment with reserpine. **J.Pharmacol. Exp.Ther.**, v. 133, p. 41-51, 1961.

- FLEMING, W.W. Supersensitivity in smooth muscle introduction and historical perspective. **Proc.Fed.Amer.Soc.exp.Biol**, v. 34, p. 1969-1970, 1975.
- GOTO, K., MILLECCHIA, L.L., WESTFALL, D.P., FLEMMING, W.W. A comparison of the electrical properties and morphological characteristics of the smooth muscle of the rat and guinea pigs vas deferens. **Pflugers Arch.Ges.Physiol**, v. 368, p. 253-61, 1977.
- GOTTILEB, O.R., MORS, W.B. Fitoquímica amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**, v. 3, n. 4, p. 252-263, 1978.
- JOLY, A.A. Botânica. introdução à Taxonomia Vegetal, 4ª ed. S. Paulo: Nacional, 1977. p. 554-552.
- KASSOUF, I.S., BROTTTO, M.A.P., BATISTA, L.K.O., CAPAZ, F.R. Efeitos dos alcalóides de *Schultesia guyanensis* Malme no átrio esquerdo isolado do rato. In: Congresso Brasileiro De Farmacologia e Terapêutica Experimental, 1990, Caxambú-MG. **Resumos...** São Paulo: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambú, 1991, p. 318.
- LEE, T.J.F., WESTFALL, D.P., FLEMING, W.W. The correlation between spontaneous contractions and postjunctional supersensitivity of the smooth muscle of the rat vas deferens. **J.Pharmacol. Exp.Ther**, v. 192, n. 1, p. 136-147, 1975.
- LINDAMOOD, C., JOHNSON, S.M., FLEMING, W.W. Dual excitatory effect of acetylcholine in the mouse vas deferens. **Proc. Soc.Exp.Biol.**, v. 157, p. 200-201, 1978.
- LOYOLA. M.A. Medicina popular. **Ciência Hoje**, v. 6, n.3 5, p. 33-34, 1987.

- MAGALHÃES, J. **Medicina Folclórica**, Fortaleza: Imprensa universitária do Ceará, 1966, p. 247.
- MARQUES, F.H.O., LEAL CARDOSO, J.H.. Effects of alkaloids of *Schultesia guianensis* Malme in the heart. **Revista de Medicina da UFC**. vol. 30/31, n. 1-2, p. 35-38, 1990/1991.
- MEDEIROS, I.S., CALIXTO, J.B. Influence of calcium entry blookers and calmodulin inhibitors on 5-hydroxytryptamine-potassium- and calcium-induced contractions in human umbilical artery in-vitro. **J. Pharmacol.**, v. 43, p. 411-416, 1991.
- NISHIIZUCA, Y. Studies and perspectives of protein Kinase C. **Science**, v. 233 n. 476, p. 305-312, 1986.
- NÓBREGA, E.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste: *Schultesia guyanensis* Malme**, Fortaleza :UFC, 1989, 146p. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 1989.
- OLIVEIRA, F, AKISUE, G., AKISUE, M.K. **Farmacognosia - São Paulo** : Atheneu, 1991. Cap.1, p. 1-4.
- PELLETIER, W. Alkaloids. **Chem. Biol. Persp.**, vol. 3, p. 15-16. 1983.
- PENHA, G.M. De La. A FINEP e O Programa De Pesquisas Em Produtos Naturais. **Ciência E Cultura**, 32 (Supl.), p. 217-220, 1978.
- QUER, P.F. **Plantas Medicinales**. Barcelona: Labor, 1962. p. 726.
- SABAN, R., CAPAZ, F.R., DE MORAES, S. Adrenoceptor supersensitivity in the isolated rat vas deferens during barbital withdrawal. **European. J. Pharmacol.**, v. 82, p. 37-45, 1982.

- SHIBATA, S. Role of calcium in the cardiac and vascular smooth muscle contraction overview. **Micrcirc. Endoth. Lymphatics**, v. 5, p. 3-11, 1989.
- SILVA, M.J.M. **Possível inibidor da fosfodiesterase para AMP cíclico em folhas e *Ageratum conyzoides***, Fortaleza : UFC, 1991. 166p. (Dissertação de mestrado). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1989.
- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. IOWA, WA (The IOWA State), University press. Ames, 1967.
- SPERELAKIS, N, Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth Muscle. in: SPERELAKIS, N, BANKS, R.O **Physiology**. Boston,. Little Brown, 1993. Cap. 15, p. 223-241.
- SPEEDING, M. Changing surface charge with salicylate difentiates between subgroups of calcium-antagonists. **Br.J.Pharmac.**, v. 83, p. 211-220, 1984.
- SPEEDING, M., PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmac. Rev.**, v. 44, n. 3, p. 363-376, 1991.
- THESLEFF, S. Physiological effects of denervation of muscle . **Sci. Ann. N.Y., Acad.** v. 228, p. 89-103, 1974.
- URQUILLA, P.R., WESTFALL, D.P., GOTO, K., FLEMMING, W.W. .The effects on ouabaina and alteration in ptassium concentration on the sensitivity to drugs and the membrane potential of the muscle of the guinea pig and rat vas deferens. **J. Pharmacol.Exp.Ther.**, v. 207, n. 2, p. 347-355, 1978.
- URQUILLA, P.R., FLEMING, W.W. Effects of low external potassium and ouabain on the sensitivity of the guinea pig vas

deferens to histamine. **Proc.Fed.Amer.Soc.exp.Biol.**, v. 34, p. 818 , 1975.

VAN ROSSUM, J.M., VAN DEN BRINK, F.V. Cumulative Dose-response curves. **Arch.Int.Pharmacodyn.Ther.**, v. 143 p. 240-246, 1963.

VARMA, D. Effects of sympathetic denervation on the alpha receptors of the cat nictating membrane. **J.Pharmacol.Exp.Ther.**, v. 153, p. 48-61, 1966.

WESTFALL, D.P., FEDAN, J.S. The effect of pretreatment with 6-hydroxydopamine on the norepinephrine concentration and sensitivity of the rat vas deferens. **Europ.J.Pharmacol**, v. 33, p. 413-417, 1975.

WESTFALL, D.P. Nonspecific supersensitivity of the guinea-pig vas deferens produced by decentralization and reserpine treatment. **Br.J.Pharmac.**, v. 39, p. 110-120, 1970.