

ANA CRISTINA HANSAUL

**EFEITOS DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DA *Eupatorium littorale* Cabrera
E DOS FLAVONÓIDES HISPIDULINA E EUPAFOLINA NA MOBILIZAÇÃO DE
CÁLCIO EM MUSCULATURA LISA NÃO VASCULAR
E EM MUSCULATURA ESQUELÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Lia Rieck
Co-orientadora: Prof^ª. Maria Consuelo Andrade Marques

CURITIBA

2002

*Agradeço especialmente a Deus pela oportunidade da realização
deste trabalho e o dedico à toda minha família, pelo apoio,
pelo amor que recebi em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Às professoras Dr^a Lia Rieck e Dr^a Maria Consuelo Andrade Marques, por sua eficiente e constante orientação em todas as etapas deste trabalho.

À todos os professores do Departamento de Farmacologia pelo incentivo e colaboração.

Ao Professor Dr Brás Heleno de Oliveira do Departamento de Química da UFPR, assim como do acadêmico Rodrigo José L. Magalhães, pela obtenção e fornecimento do extrato bruto metanólico e dos flavonóides.

Ao Professor Dr. Rosalvo H. T. Fogaça, do Departamento de Fisiologia da UFPR, pela valiosa orientação nos protocolos realizados em musculatura esquelética de anfíbios, bem como por seu exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

À Professora Dr^a Ilana Kassouf-Silva e ao colega Edson Luiz de Oliveira, pela amizade, colaboração e incentivo.

Aos professores Dr. Antônio José Lapa, Dr^a Caden Souccar e Dr^a Maria Tereza Lima-Landman da UNIFESP/EPM pela orientação nos protocolos de musculatura esquelética de mamíferos e à Maria do Carmo Gonçalo, técnica de laboratório do Setor de Produtos Naturais do INFAR/UNIFESP, pelo auxílio na realização destes experimentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia, pela amizade, incentivo, companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Hospital Angelina Caron, em especial ao Sr. Licurgo Tadeu Marçal, ao farmacêutico Antônio Borges da Silva Neto e aos funcionários do Serviço de Farmácia Hospitalar que, através de seu apoio irrestrito, possibilitaram a realização deste mestrado.

*“Jamais considere seus estudos uma obrigação,
mas uma oportunidade invejável
para aprender a conhecer a influência libertadora,
da beleza, do reino, do espírito, para seu próprio prazer pessoal
e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.*

Albert Einstein

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
EPÍGRAFE.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XX
1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA	03
1.2 USOS POPULARES DO GÊNERO	06
1.3 ESTUDOS REALIZADOS COM A <i>Eupatorium littorale</i>	09
1.4 FLAVONÓIDES DA <i>E. littorale</i>	12
2 – OBJETIVO.....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 – MATERIAL.....	17
3.1 MATERIAL BOTÂNICO	17
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO	17
3.2.1 Ratos (<i>Ratus norvegicus</i> variedade: Wistar)	17
3.2.2 Camundongos (<i>Mus musculus</i>)	18
3.2.3 Rãs (<i>Rana catesbeiana</i>)	18
4 – METODOLOGIA.....	19
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO	19
4.2 PURIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES HISPIDULINA E EUPAFOLINA	19
4.3 PREPARO DO EXTRATO E DOS FLAVONÓIDES PARA O USO EM ANIMAIS	20
4.4 ATIVIDADE NA MUSCULATURA LISA NÃO VASCULAR	20
4.4.1 Jejuno e íleo de rato	20
4.4.2 Útero de rata	21
4.5 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE ANFÍBIO	22
4.5.1 Músculo sartório intacto de rã:	22
4.5.1.1 Efeito do extrato bruto na contratura potássica	22
4.5.1.2 Efeito do extrato bruto na contratura cafeínica	23
4.5.1.3 Efeito do extrato bruto na contratura cafeínica em meio despolarizado	23
4.5.1.4 Efeito do extrato na contratura cafeínica em meio despolarizado com 0- Ca ⁺⁺ nominal	24
4.5.2 Músculo cutâneo-peitoral intacto de rã:	24
4.5.1.2 Efeito dos flavonóides hispidulina e eupafolina na contratura cafeínica	24
4.6 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE MAMÍFERO	25
4.6.1 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> em diafragma de mamífero com estimulação elétrica	25
4.6.1.1 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> e do veículo Tween no diafragma estimulado eletricamente	26
4.6.1.2 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> na presença de dantrolene e do veículo propilenoglicol no diafragma com estimulação direta	27

4.6.2 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> em diafragma de mamífero sem estimulação elétrica	28
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 – RESULTADOS	30
5.1 ATIVIDADE NA MUSCULATURA LISA NÃO VASCULAR	30
5.1.1 Efeitos do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em jejuno de ratas	30
5.1.2 Efeitos do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em íleo de ratas	36
5.1.3 Efeitos do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio em útero isolado de ratas	41
5.1.4 Efeitos dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em jejuno de ratas	46
5.1.5 Efeitos dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio em útero isolado de ratas	57
5.2 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE ANFÍBIO	61
5.2.1 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> na contratura potássica	61
5.2.2 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> e do Tween 80 na contratura cafeína	62
5.2.3 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> na contratura cafeína em meio com 100 mM de K ⁺	64
5.2.4 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> na contratura cafeína em meio 0- Ca ⁺⁺ nominal e com 100 mM de K ⁺	65
5.2.5 Efeito do flavonóide eupafolina na contratura cafeína	66
5.2.6 Efeito do flavonóide hispidulina na contratura cafeína	67
5.3 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE MAMÍFERO	68
5.3.1 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> em diafragma de mamífero com estimulação elétrica	68
5.3.1.1 Efeito do tempo de estimulação direta sobre o diafragma	69
5.3.1.2 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> e do veículo Tween sobre o diafragma com estimulação direta	70
5.3.1.3 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> na presença de dantrolene e do veículo propilenoglicol sobre o diafragma com estimulação direta	76
5.3.2 Efeito do extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i> em diafragma de mamífero sem estimulação elétrica	79
6 – DISCUSSÃO.....	80
7 – CONCLUSÃO.....	96
8 – ANEXO	99
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mm – milímetros

µg/mL - micrograma por mililitro

DE₅₀ - dose efetiva para 50 % de um grupo de animais

DL₅₀ - dose letal para 50 % de um grupo de animais

g/kg – gramas por quilo

% - por cento

HSV-1 – vírus do herpes simplex do tipo 1

VSV – vírus da estomatite vesicular

C.C.D. - cromatografia em camada delgada

LPS – lipopolissacarídeo

S.N.C. – Sistema Nervoso Central

CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

mg/kg - miligrama por quilo

i.p. – intraperitoneal

M - molar

PAF – fator de agregação plaquetária

PGE1 – prostaglandina E1

µM – micromolar

mM – milimolar

CaCl₂ – cloreto de cálcio

EGTA –ácido glicol-éter-diamino tetracético

Ca⁺⁺ - íon cálcio

g - grama

°C - grau Celsius

kg – quilo

mL – mililitro

NaCl – cloreto de sódio

KCl – cloreto de potássio

MgCl₂ – cloreto de magnésio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato de sódio
CaCl₂ – cloreto de cálcio
cm – centímetro
n – número de amostras
K⁺ - íon potássio
HCl – ácido clorídrico
NaOH – hidróxido de sódio
mg/mL – miligrama por mililitro
mL/mL – mililitro por mililitro
TRISMA – tris – (hidroximetil) – aminometano
O₂ – oxigênio
CO₂ – gás carbônico
ms – milissegundos
Hz – hertz
TC – tempo de contração
TR₅₀ – tempo para 50 % de relaxamento
VC_{max} – velocidade máxima de contração
VR_{max} – velocidade máxima de relaxamento
g/s – grama por segundo
CE₅₀ – concentração efetiva 50 %
RN – Solução nutritiva de Ringer com 4 mM de potássio
R40 – Solução nutritiva de Ringer com 40 mM de potássio
R100 – Solução nutritiva de Ringer com 100 mM de potássio
EBM – extrato bruto metanólico
EPM – erro padrão das médias
Caf 2 – cafeína 2 mM
min – minuto
DTR – dantrolene
PEG – propilenoglicol
DAG – diacilglicerol
InsP₃ – trifosfato de inositol
RS – retículo sarcoplasmático

[Ca⁺⁺]_i – concentração intracelular de cálcio
VOC – canal de cálcio voltagem-dependente
RyR – receptor rianodínico
CIRC – liberação de cálcio induzida por cálcio
MLC₂₀ – cadeia leve de miosina
Na⁺ - íon sódio
mL/L – mililitro por litro
DHPR – receptor dihidropiridínico
DNAC – DNA complementar
AEC – acoplamento excitação-contração
kDa – quilodalton
ATP – adenosina trifosfato
Mg⁺⁺ - íon magnésio
[K⁺] – concentração de potássio
mV – milivolts
Sr⁺⁺ - íon estrôncio
Ba⁺⁺ - íon bário
Li⁺ - íon lítio
Rb⁺ - íon rubídio
Cs⁺ - íon cézio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Aspecto geral da <i>E. littorale</i> Cabrera	05
FIGURA 2 - Aspectos das inflorescências da <i>E. littorale</i>	05
FIGURA 3 - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> nas concentrações de 6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos	31
FIGURA 4 – Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> na concentração de 6 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste ‘t’ de Student.....	32
FIGURA 5 – Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> na concentração de 12 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste ‘t’ de Student.....	33
FIGURA 6 – Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> na concentração de 25 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste ‘t’ de Student.....	34
FIGURA 7 - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> na concentração de 50 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 8 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste ‘t’ de Student.....	35
FIGURA 8 - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença do extrato bruto metanólico de <i>Eupatorium litoralle</i> nas concentrações de 6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 a 7 experimentos ..	36

- FIGURA 9** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 6 µg/mL e após 30 minutos da lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 37
- FIGURA 10** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 12 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 38
- FIGURA 11** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 25 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 3 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 39
- FIGURA 12** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, obtidas, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 50 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 40
- FIGURA 13** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca⁺⁺) em útero isolado de ratas em meio despolarizante, obtidas na ausência e na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* nas concentrações de 6 µg/mL, 12 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos..... 41
- FIGURA 14** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca²⁺) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K⁺ 80 mM), obtidas na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 6 µg/mL e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 8 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste ‘t’ de Student..... 42
- FIGURA 15** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca²⁺) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K⁺ 80 mM), obtidas na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 12 µg/mL e após a lavagem e retirada

- do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student..... 43
- FIGURA 16** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student..... 44
- FIGURA 17** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência, na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student..... 45
- FIGURA 18** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 a 7 experimento... 47
- FIGURA 19** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste 't' de Student..... 48
- FIGURA 20** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste 't' de Student..... 49
- FIGURA 21** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência, na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos. 50

- FIGURA 22** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência, (A) na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 1,0 µg/mL e após a retirada dos flavonóides do meio de perfusão mediante a lavagem da preparação (B) no tempo de 30 minutos, (C) 60 minutos, (D) 90 minutos e (E) 120 minutos. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 52
- FIGURA 23** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 µg/mL e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste ‘t’ de Student..... 53
- FIGURA 24** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência, na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 µg/mL e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos..... 54
- FIGURA 25** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência, na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 µg/mL e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (A) no tempo de 30 minutos, (B) 60 minutos, (C) 90 minutos e (D) 120 minutos. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste ‘t’ de Student 56
- FIGURA 26** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{++}) em útero isolado de ratas mantido em meio despolarizante, obtidas na ausência e na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos..... 57
- FIGURA 27** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas mantido em líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência, na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) na concentração de 0,5 µg/mL e após a lavagem e retirada destes flavonóides do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste ‘t’ de Student..... 58
- FIGURA 28** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas mantido em líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência, na presença dos flavonóides hispidulina

e eupafolina (1:1) na concentração de 1,0 µg/mL e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student..... 59

- FIGURA 29** - Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência, na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) na concentração de 1,0 µg/mL e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de (A) 30 minutos e (B) 60 minutos. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student..... 60
- FIGURA 30** - (A) Contrações isotônicas induzidas por 40 e 100 mM de potássio, na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias ± EPM de 5 experimentos. Os dados expressos em percentuais estão normalizados para a contração obtida com 100 mM de K^+ que foi considerada como sendo 100 % (n = 5). A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 61
- FIGURA 31** - (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias ± EPM de 5 experimentos. Os dados estão normalizados para os valores de encurtamento (em percentual) obtidos com 100 mM de K^+ que foi considerada como sendo 100 %. A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 62
- FIGURA 32** - (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína. Contrações cafeínicas induzidas na presença e na ausência de 0,1 mL/mL de Tween 80 e na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias ± EPM de 4 experimentos. Os dados estão normalizados para os valores de encurtamento (em percentual) obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 63
- FIGURA 33** - (A-B) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, em meio despolarizante contendo 100 mM de potássio, na ausência e na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (C) Contração cafeínica induzida por 4 mM de cafeína em meio contendo 100 mM de potássio. As colunas representam as médias ± EPM de 3 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 64
- FIGURA 34** - (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, em meio isento de cálcio e na presença de 100 mM de potássio, na ausência e na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As

colunas representam as médias \pm EPM de 3 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 65

FIGURA 35 - (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, na ausência e na presença de 100 μ g/mL do flavonóide eupafolina. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 6 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 66

FIGURA 36 - (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, na ausência e na presença de 100 μ g/mL do flavonóide hispidulina. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 6 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey..... 67

FIGURA 37 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após adição de d-tubocurarina ao banho de perfusão. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g; (C) registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 5 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 69

FIGURA 38 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença e após a retirada de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* do meio de perfusão e na presença de Tween 80. (A) amplitude de contração: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 a 5 experimentos..... 70

FIGURA 39 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após adição de d-tubocurarina ao banho de perfusão e 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student 71

FIGURA 40 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após a retirada do extrato bruto do meio de perfusão. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos

no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 72

FIGURA 41 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença de Tween 80. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 73

FIGURA 42 - Registro original das contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença de 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, em diferentes tempos, registrados em osciloscópio e fotografados com o auxílio de uma máquina fotográfica digital (n = 5)..... 74

FIGURA 43 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, na presença de 12,5 μ g/mL de dantrolene e de igual volume de propilenoglicol 2 %. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 3 a 5 experimentos..... 76

FIGURA 44 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de 12,5 μ g/mL de dantrolene. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 a 5 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 77

FIGURA 45 - Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de propilenoglicol 2 %. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 3 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 78

FIGURA 46 - Contrações isométricas induzidas na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* (A) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (B) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 2 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student..... 79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição das soluções utilizadas nos protocolos experimentais (em mM).....	25
TABELA 2 - Propriedades contráteis do músculo diafragma de mamíferos (camundongos) na presença de 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico da <i>Eupatorium littorale</i>	75

RESUMO

O trabalho descrito nesta dissertação refere-se ao estudo do extrato bruto metanólico da espécie *Eupatorium littorale* e dos flavonóides hispidulina e eupafolina isolados, na mobilização de cálcio em musculatura lisa não vascular e em musculatura esquelética. Pudemos verificar que o extrato bruto metanólico, na musculatura lisa não vascular, apresentou pelo menos um componente com ação colinolítica competitiva reversível e um ou mais componentes não-competitivos, que provavelmente, não estão envolvendo o bloqueio de canais de cálcio do tipo L. O extrato bruto, na musculatura esquelética de anfíbios, parece estar atuando sobre os receptores dihidropiridínicos, sobre os receptores rianodínicos ou em ambos e, possivelmente, a presença do cálcio extracelular é um fator importante para sua atividade. O extrato bruto metanólico em diafragma de camundongos aumentou a amplitude de contração e as contraturas isométricas induzidas eletricamente. Estas contrações foram praticamente anuladas após a adição de dantrolene, um inibidor da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. O extrato manteve seu efeito quando incubado com o músculo sem estimulação elétrica.

Os flavonóides hispidulina e eupafolina em mistura na proporção de 1:1, na musculatura lisa não vascular, demonstraram atividade antagonista competitiva, sendo que após a retirada e lavagem da preparação houve deslocamento da curva concentração-efeito de acetilcolina para a esquerda. Os efeitos observados com os flavonóides parecem não envolver os canais de cálcio do tipo L. Os flavonóides, testados separadamente, no músculo esquelético de anfíbio, potencializaram a contratura cafeínica, podendo indicar envolvimento com a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático.

ABSTRACT

The work described in this dissertation refers to the study of the methanolic crude extract of *Eupatorium littorale* and of the isolated flavonoids hispidulin and eupafolin, on the mobilization of calcium in not vascular smooth musculature and in skeletal muscle. We verified that the methanolic crude extract, in not vascular smooth musculature, presented at least a component with cholinergic reversible competitive action and one or more non-competitive components, that probably, are not involved with the blockade of L-type calcium channels. The crude extract, in skeletal muscle of amphibians, seems to be acting on the dihydropyridine receptors, on the ryanodine receptors or in both and, possibly, the presence of extracellular calcium is an important factor for its activity. The methanolic crude extract in diaphragm of mice, increased the contraction and the isometric contractures induced electrically. These contractions were practically canceled after the dantrolen addition, an inhibitor of the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. The extract maintained its effect when incubated with the muscle without electric stimulation.

The flavonoids hispidulin and eupafolin in mixture in the proportion of 1:1, in not-vascular smooth musculature, demonstrated competitive antagonistic activity, and after the wash of the preparation had displaced the acetylcholine concentration-effect curve for the left. The effects observed with the flavonoids seem not to be involved with L-type calcium channels. The flavonoids, tested separately, in the skeletal muscle of amphibian, potencialized the caffeine contracture, that could indicate involvement with the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.

1 – INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde a mais remota antigüidade, segundo relatam os testemunhos históricos pertencentes às diferentes civilizações e culturas, entre eles, os egípcios, os babilônicos, os assírios e os gregos.

Com a evolução da química, a partir do século XIX, modificou-se a forma de utilização das plantas, do uso direto destas e seus preparados. Passou-se a utilizar as moléculas ativas nelas contidas chegando-se a reproduzir artificialmente a substância ativa isolada. Em conseqüência, relegou-se à um segundo plano as plantas que originavam estas substâncias.

Os principais obstáculos ao emprego universal dos medicamentos industrializados são o custo elevado das pesquisas que levam à sua descoberta e dos ensaios relativos à segurança de seu uso, o custo elevado da fabricação propriamente dita e o nível tecnológico exigido para este processo.

Diante destes fatos, as plantas medicinais passaram a ser cogitadas novamente como recurso terapêutico viável e sua importância vem sendo resgatada através de estudos científicos, devidos principalmente à crescente demanda por produtos medicamentosos à base de plantas medicinais pela população e conseqüentemente, o interesse pelas indústrias do setor farmacêutico.

Foi então que nas últimas décadas do século XX, ocorreram dois fatos importantes que já produziram mudanças fundamentais na atitude do público e dos cientistas em relação à fitoterapia. Em primeiro lugar, a população descobriu a utilidade dos medicamentos de origem vegetal. A insatisfação com a eficácia e o custo da medicina moderna, aliada à admiração pelas coisas 'naturais', levou milhões de pessoas em todo o mundo a apreciar melhor o uso de medicamentos naturais clássicos para o tratamento de muitas doenças, geralmente de origem

benigna. Em segundo lugar, as principais indústrias farmacêuticas reconheceram que certas plantas, que o povo sempre considerou 'remédios', provavelmente eram as melhores fontes de componentes para novos medicamentos ou talvez pudessem servir-lhes de protótipo (ROBBERS et al., 1997).

Os compostos de origem vegetal desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética é difícil, se não impossível. Entre eles estão grupos tão diversificados de substâncias como os alcalóides da papoula produtora de ópio, do esporão do centeio e das plantas solanáceas, os glicosídeos cardiotônicos da digital, a maioria dos antibióticos e todos os soros, vacinas e produtos afins. De fontes naturais também são retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tornarem-se mais eficazes ou menos tóxicos; exemplos disso são as numerosas variações da molécula da morfina. O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é sua utilidade como protótipo ou modelo para medicamentos sintéticos que tenham atividades biológicas semelhantes às dos originais; a procaína e os anestésicos locais similares costumam ser citados como representantes dessa categoria (ROBBERS et al., 1997).

Há um quarto papel desempenhado pelos produtos naturais, bem diferente dos acima citados, mas não menos importante. Alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas que podem ser modificados por métodos químicos ou biológicos para produzir drogas potentes, não obtidas facilmente por outros métodos. Por exemplo, o tratamento químico e biológico do estigmasterol, que ocorre em abundância no óleo de soja, permite a produção em larga escala da hidrocortisona ou de corticosteróides afins, compostos estes que ocorrem em pequenas quantidades na natureza.

Não se poderá estimar devidamente o valor dos produtos naturais como precursores de medicamentos importantes (ROBBERS et al., 1997).

1.1 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

A *Eupatorium littorale* é classificada botanicamente, segundo CRONQUIST (1981):

Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Sub-classe:	Asteridae
Ordem:	Asterales
Família:	Asteraceae
Gênero:	Eupatorium
Espécie:	<i>E. littorale</i> Cabrera

A *Eupatorium littorale* Cabrera pertence à família Asteraceae, que apresenta cerca de 1.100 gêneros e 20.000 espécies (CRONQUIST, 1968).

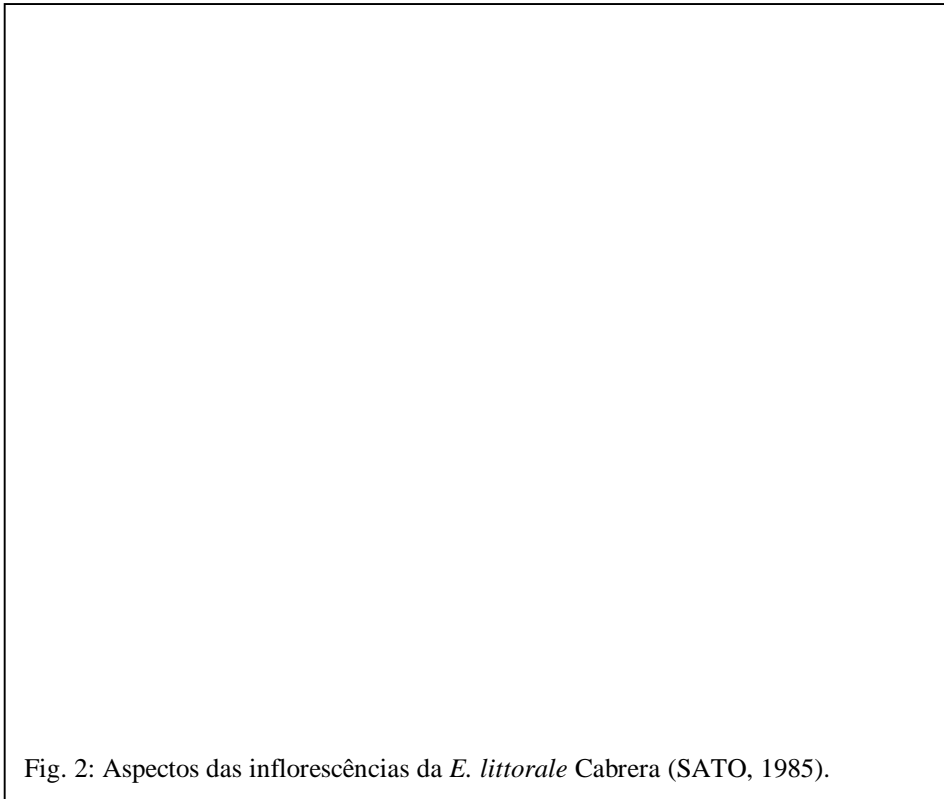
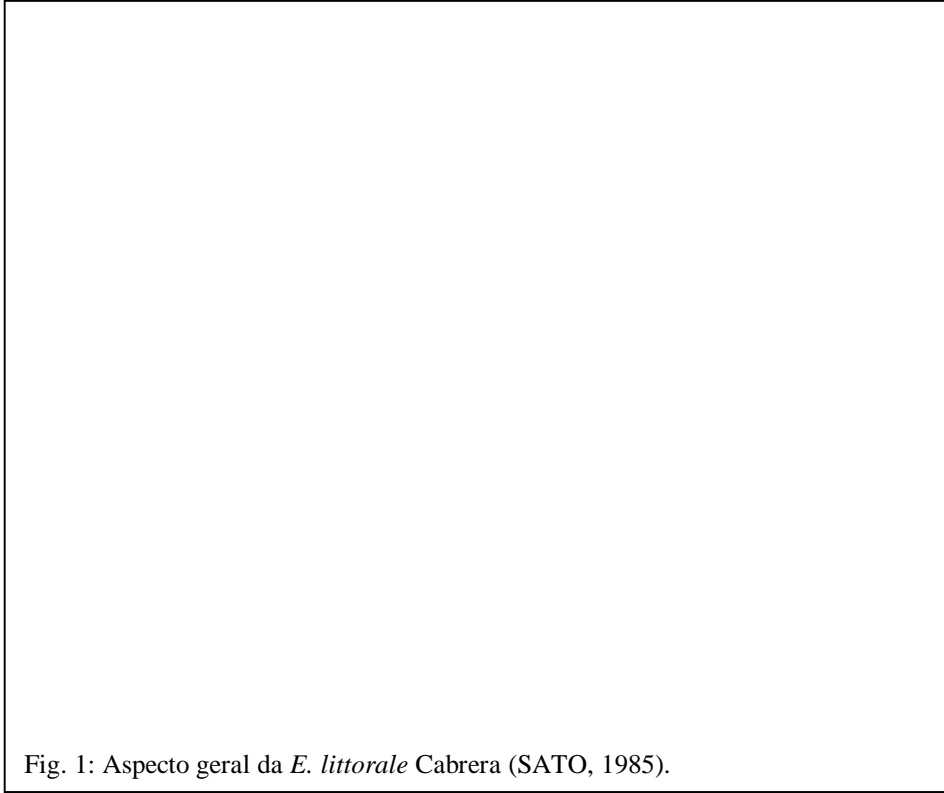
As espécies do gênero *Eupatorium*, são plantas vivazes, originárias na sua maior parte das zonas tropicais da América, sendo que no Brasil existem cerca de 300 espécies, que, para seu melhor desenvolvimento preferem os lugares úmidos (CRUZ, 1985). A grande maioria é composta por plantas de pequeno porte, ervas, sub-arbustos, trepadeiras e excepcionalmente árvores (JOLY, 1985).

O gênero *Eupatorium* possui flores sempre reunidas em inflorescência característica, o capítulo. As flores são pentâmeras, com cálice profundamente modificado, transformado no papilho ('pappus') e servindo à disseminação do fruto. Androceu formado por 5 estames

férteis com filetes e antenas introrsas, soldadas em um tubo que é atravessado pelo estilete. Ovário ínfero, bicarpelar, unilocular, com um só óvulo erecto. Os capítulos contêm flores tubulosas iguais e todas são hermafroditas (JOLY, 1985).

A *Eupatorium littorale* é um arbusto de aproximadamente 1 metro de altura, com caules arredondados, de 2 a 3 mm de diâmetro, densamente cobertos por pêlos finos, curtos, macios e erectos. Estes caules apresentam-se densamente folhosos até a inflorescência. Possuem folhas alternas (entre-nós de 2-5 mm de distância), com fascículos de folhas em suas axilas, sésseis, lineares, agudas no ápice e atenuadas na base.

Seus capítulos são numerosos, dispostos em cumes corimbiformes, densos no ápice dos caules. Possuem receptáculos levemente côncavos. As flores são rosadas com corola tubulosa de 3,5 mm de largura, com ápice pentadenteado (dentes triangulares de 0,5 mm de largura) (CABRERA, 1959).



1.2 USOS POPULARES DO GÊNERO

O gênero *Eupatorium* possui muitas outras espécies, que vêm sendo estudadas em diferentes partes do mundo.

Existe uma ampla utilização do gênero *Eupatorium* em diferentes áreas, o que torna o estudo da *E. littorale* bastante promissor. No Vietnã, a pomada de eupolina, feita a partir do extrato aquoso das folhas da *E. odoratum*, é muito utilizada no tratamento de ferimentos superficiais e de queimaduras. Estudos clínicos do extrato demonstraram efeitos antimicrobianos e anticoagulantes, tanto quanto a promoção da recuperação do tecido no processo de cicatrização da ferida. Porém, o mecanismo pelo qual o extrato afeta as células envolvidas no processo de cicatrização é desconhecido. Foram usados fibroblastos e células epiteliais para investigar alguns dos efeitos *in vitro* do extrato da *E. odoratum*, pois estas células possuem papel crucial na cicatrização. O crescimento celular foi avaliado por meio de ensaio colorimétrico em intervalos de tempo diferentes (PHAN et al., 1998).

O aumento do crescimento de fibroblastos e de células epiteliais foi observado em concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL do extrato, enquanto que a concentração de 250 µg/mL foi considerada tóxica para os fibroblastos, porém sem ocasionar danos significativos para as células epiteliais. O resultado do estudo demonstrou que o extrato da *E. odoratum* aumentou o crescimento de fibroblastos e de células epiteliais, o que poderia explicar em parte os efeitos clínicos benéficos que tem sido descritos e observados (PHAN et al., 1998).

Outro grupo de pesquisadores que estudaram a *E. odoratum* isolou e purificou o composto 4',5,6,7 – tetrametoxiflavona, um de seus princípios ativos. A *E. odoratum* é uma planta indígena da Tailândia que há muito tem sido utilizada popularmente para estancar

hemorragias. Este composto foi estudado *in vitro* devido à atividade na coagulação sanguínea. Os resultados demonstraram que o composto acelerou o tempo de coagulação pela ativação através da via intrínseca de coagulação, que envolve a reação dos fatores XII, XI, IX e VIII (TRIRATANA et al., 1991).

O extrato clorofórmico das partes aéreas da *E. odorata*, *in vitro*, (cepa CA-9KB), demonstrou atividade citotóxica: $DE_{50} = 20 \mu\text{g/mL}$, enquanto que os flavonóides isolados dessa planta não demonstraram atividade farmacológica (ARENE et al., 1978).

O extrato aquoso das folhas e caules da *E. odorata* apresentou atividade espasmogênica sobre o íleo de cobaia *in vitro*. Outros trabalhos indicam que o extrato metanólico das partes aéreas (1:1) possui atividade antiespasmódica sobre o íleo de cobaia, *in vitro*, quando estas contrações foram induzidas por histamina (FENG et al., 1962; BHAKUNI et al., 1969).

A DL_{50} do mesmo extrato por via intraperitoneal em camundongos é igual a 1 g/kg (FENG et al., 1962; BHAKUNI et al., 1969). Foi registrada a presença de lactonas sesquiterpênicas com propriedades citotóxicas no gênero *Eupatorium* (GUPTA, 1995).

No Brasil (no estado de Minas Gerais), CARVALHO et al. (1991), desenvolvem estudos na atividade de plantas medicinais da flora brasileira contra a malária. A pesquisa foi iniciada com o extrato bruto de 33 plantas brasileiras escolhidas ao acaso e de 15 plantas medicinais. Os extratos foram testados *in vivo*, na dose de 1 g/kg, por 4 dias, em ratos infectados com a forma sanguínea do *Plasmodium berghei* e a parasitemia foi determinada no 5º dia. Dessas 33 plantas, seis (*Vernonia brasiliensis*, *Eupatorium squalidum*, *Acanthospermum australe*, *Esenbeckia febrifuga*, *Lisianthus speciosus* e *Tachia guianensis*) foram parcialmente ativas contra a malária, inibindo entre 40 e 50 % a multiplicação do *P. berghei*. A percentagem

de resultados positivos obtidos neste estudo, comprovou a efetividade do conhecimento etnofarmacológico na pesquisa de plantas medicinais (CARVALHO et al., 1991).

A *Eupatorium laevigatum* Lam. é uma planta comum na região central do Brasil, onde é vastamente utilizada em lesões tais como a afta bucal. Esta úlcera inflamatória afeta cerca de 50 % da população. O estudo realizado por PAULO FILHO (2000), na Universidade de Brasília, se desenvolveu em duas fases. Para a primeira fase uma preparação fitoterapêutica do extrato da *E. laevigatum* foi formulada em orabase, base apropriada para a mucosa bucal. O estudo avaliou a segurança toxicológica da preparação em 20 voluntários sadios, através de valores bioquímicos, hematológicos e de urinálise e através de exame intrabucal. Na segunda fase do estudo foi realizada uma comparação duplo-cega com a triamcinolona 0,01 % em orabase, com 60 pacientes. Os pacientes sadios toleraram bem a preparação fitoterapêutica e nenhum efeito adverso pôde ser atribuído ao seu uso. Nos estudos clínicos, após 5 dias de tratamento, 40 % dos pacientes que utilizaram a preparação e 26,7 % que utilizaram a triamcinolona obtiveram completa cura das úlceras. A dor foi aliviada em 70 % dos pacientes do grupo fitoterapêutico e em 33,3 % do grupo triamcinolona.

Extratos etanólicos da *Eupatorium capillifolium* apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento do *Bacillus subtilis* quando em meio de cultura quimicamente definido, mas não em meio natural complexo. O princípio ativo foi isolado e o estudo de suas propriedades, com auxílio da espectrometria de massa, determinou que se tratava de um ácido sesquiterpênico (RAO et al., 1981).

A inatividade observada contra o *B. subtilis* em um meio natural complexo, deve-se à presença do ácido glutâmico no meio, que é capaz de inibir em 90 % a atividade do ácido sesquiterpênico (RAO et al., 1981).

HABTEMARIAM et al., em 2000, na Universidade de Greenwich (Londres) investigaram a atividade citotóxica e antibacteriana do extrato etanólico das folhas da *Eupatorium perfoliatum*. Este extrato demonstrou potente atividade citotóxica com valores de CE_{50} (12-14 $\mu\text{g/mL}$) comparáveis ao agente citotóxico padrão, o clorambucil. O extrato apresentou atividade antibacteriana fraca contra os organismos gram-positivos testados (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus megaterium*).

A atividade anti-viral de 10 plantas medicinais da América do Sul foram estudadas por ABAD et. al. (1999), entre elas a *Eupatorium articulata* e a *E. glutinosum*. Foi realizado um ‘screening’ de atividade anti-viral *in vitro* contra o vírus do herpes simplex tipo I (HSV-1), o vírus da estomatite vesicular (VSV) e o poliovírus tipo 1. O extrato da *E. articulata* apresentou boa atividade contra o HSV-1 e o VSV com 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato aquoso da *E. glutinosum* (50-125 $\mu\text{g/mL}$) também inibiu a replicação do VSV, mas nenhuma das plantas testadas teve qualquer efeito na replicação do poliovírus.

1.3 ESTUDOS REALIZADOS COM A *E. littorale*

No Brasil, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), três trabalhos com a *Eupatorium littorale* foram realizados. O primeiro foi desenvolvido por SATO (1985) no Departamento de Botânica, com parceria do Departamento de Farmácia, e aprofundou os conhecimentos na área fitoquímica. Várias substâncias químicas foram isoladas das partes aéreas da *E. littorale*, porém as maiores evidências foram relativas à presença dos flavonóides. A identificação foi efetuada por Cromatografia em Camada Delgada (C.C.D.) analítica. O isolamento e a purificação foram efetuados por C.C.D. preparativa e por coluna cromatográfica. Algumas frações revelaram a presença de rutina que foi posteriormente

confirmada por C.C.D. analítica, ponto de fusão e espectrometria de absorção no ultra-violeta. A aglicona foi identificada por C.C.D. analítica e pelo ponto de fusão do material hidrolisado, como sendo a quercetina. Os açúcares componentes da rutina, foram identificados por C.C.D. analítica, como sendo a glicose e ramnose. O flavonóide isolado é provavelmente a quercetina 3-rutinosídeo (SATO, 1985).

A rutina é encontrada em muitas plantas, juntamente com o bioflavonóide cítrico hesperidina, também chamada de vitamina P ou fator de permeabilidade. Ambas têm história de uso no tratamento de vários quadros caracterizados por sangramento capilar e fragilidade capilar. As evidências da eficácia terapêutica da rutina e dos bioflavonóides cítricos não são conclusivas, e os produtos que os contêm não são comercializados com fins medicinais nos Estados Unidos, somente estão incluídos em algumas preparações como suplemento alimentar (ROBBERS et al., 1997).

Considerando estes dados, um segundo trabalho desenvolvido na UFPR foi realizado por MORIKAWA (1995) no Departamento de Farmácia com contribuição do Departamento de Farmacologia para investigar alguns dos efeitos farmacológicos. Neste trabalho foram verificadas as substâncias químicas presentes na *E. littorale* (ácidos fixos, esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos antociânicos e flavônicos, taninos condensados e hidrolisáveis) através de 'screening' fitoquímico, confirmando a significativa presença de flavonóides (MORIKAWA, 1995).

Os flavonóides compreendem um vasto grupo de compostos de carbono - hidrogênio - oxigênio (C₆-C₃-C₆) incluindo as flavonas, flavonóis, flavononas e seus derivados (GEISSAMN, 1962); estão largamente distribuídos na natureza e mais de 33 atividades biológicas já foram descritas para este grupo de substâncias (FARNSWORTH, 1966). Revisões publicadas na década de 50 já relatavam esta grande variedade de ações

farmacológicas dos flavonóides (BIGGERS, 1959; BARDBURY e WHITE, 1954; CHENG et al., 1955; BOHM, 1959) e ainda existem trabalhos descrevendo a atividade citotóxica dos flavonóides (AMBROSE et al., 1952), tornando este grupo de compostos de grande interesse para Químicos e Farmacologistas.

Atualmente existem novas linhas de pesquisa envolvendo flavonóides, tais como a quercetina e a rutina. Na Alemanha, MELZIG e LOOSE (1998) examinaram os efeitos citotóxicos do lipopolissacarídeo (LPS) na proliferação das células endoteliais aórticas bovinas *in vitro*. A citotoxicidade induzida pelo LPS foi atenuada por alguns flavonóides, tais como a catequina, a miricetina, a quercetina, a hesperidina e a rutina. A hipótese foi estruturada no fato de que a inibição da citotoxicidade, induzida pelo LPS em cultura de células, pelos flavonóides poderia estar sendo mediada via inibição de tirosina-quinases (MELZIG e LOOSE, 1998).

Na área farmacológica MORIKAWA (1995) realizou testes gerais de atividade, edema de pata induzido por carragenina, permeabilidade vascular e indução do sono barbitúrico. Nos testes gerais foram observados sinais indicativos de leve depressão do Sistema Nervoso Central (S.N.C.), porém o resultado sobre o sono barbitúrico e os demais testes realizados não confirmaram a sugestão de efeito depressor sobre o S. N. C. .

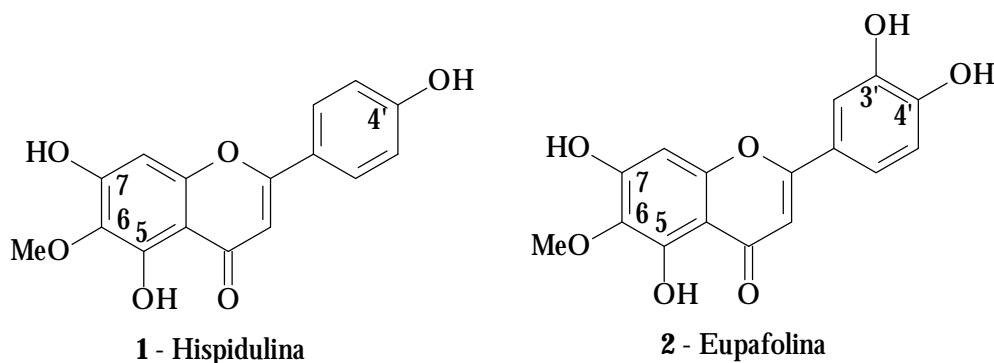
No Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná, FREHSE (1999) isolou os flavonóides hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi-flavona) e eupafolina (5,7,3',4',-tetraidroxi-6-metoxi-flavona) já descritos por possuírem atividade citotóxica (KUPCHAN, S.M. et al., 1969) e pela primeira vez descritos nesta espécie (FREHSE, 1999).

Utilizando o método do disco de acordo com Kirby e Bauer (KONEMAN et al., 1994), foi testada a atividade antimicrobiana do extrato frente às cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* (n° ATCC 29.212), *Staphylococcus aureus* (n° ATCC 25.923), *Shigella*

flexneri (n° ATCC 12.022), *Escherichia coli* (n° ATCC 25.922) e *Pseudomonas aeruginosa* (n° ATCC 27.853). O extrato metanólico das folhas de *Eupatorium littorale* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, o que sugere a presença de substância(s) com propriedade(s) antimicrobiana(s) nesta planta (FREHSE, 1999).

1.4 FLAVONÓIDES DA *E. littorale*

Através do uso de CLAE-FR, foi realizada a quantificação dos flavonóides hispidulina e eupafolina no extrato metanólico das folhas de *E. littorale* e, desta maneira, ficou determinado que no material botânico pesquisado, a eupafolina está presente na concentração de 0,29% e a hispidulina em 0,21% (FREHSE, 1999).



Na China, TAN et al. (1999), isolaram várias substâncias, entre elas a hispidulina, das partes aéreas de espécies de *Artemisia* e realizaram testes relacionados à atividade anti-fúngica. Verificaram que a hispidulina possui atividade inibitória sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Geotrichum candidum*, *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*.

FERRANDIZ et al. (1994) investigaram os efeitos do flavonóide hispidulina na hepatotoxicidade induzida por bromobenzeno em ratos. Este agente tóxico causa lesão

hepática, peroxidação lipídica no fígado, além de uma grande depleção de glutathion. A hispidulina, administrada em doses entre 50 e 150 mg/kg i.p., tendo como padrão a N-acetil-L-cisteína, que inibe a lesão e a peroxidação lipídica hepática, na maior dose testada, foi capaz de reduzir a depleção de glutathion induzida pelo bromobenzeno. Este efeito hepatoprotetor pode estar relacionado com as propriedades antioxidantes da hispidulina (FERRANDIZ et al., 1994).

A atividade da hispidulina como varredora de ânions superóxidos e como antioxidante foram estudadas por CHEN (1990) e SANZ et al. (1994). Os ânions superóxidos foram gerados em um sistema de fenazina metossulfato - NADH e foram desenvolvidos através da redução do 'nitroblue tetrazolium'. Os valores de concentração que alcançaram 50 % da inibição da peroxidação lipídica em fígado de rato homogeneizado foram na ordem de 10^{-5} M para a hispidulina (CHEN, 1990).

Estudos na atividade da hispidulina na agregação plaquetária foram realizados por BOURDILLAT et al., em 1988. A hispidulina e a teofilina inibem a agregação plaquetária mediada pela adenosina-5'-monofosfato, ácido araquidônico, PAF e colágeno. A hispidulina foi 100 vezes mais potente que a teofilina. A PGE1 não modificou o efeito anti-agregante da hispidulina, mas potencializou o efeito da teofilina. A hispidulina não teve efeito na ação inibitória da teofilina. A hispidulina (100 μ M) e a teofilina (10 mM) aumentaram os níveis de controle do AMPc nas plaquetas em 4 vezes. O PGE1 teve um pequeno efeito nos níveis de AMPc induzidos pela hispidulina, mas aumentaram em 3 vezes os níveis de AMPc induzidos pela teofilina. Os níveis de AMPc induzidos pela teofilina (10mM) não foram alterados pela hispidulina. Foi demonstrada uma correlação entre a inibição da agregação plaquetária e o aumento dos níveis de AMPc induzidos pela hispidulina. Esses dados sugerem que a

hispidulina pode inibir a agregação plaquetária através da elevação dos níveis de AMPc por um mecanismo diferente daquele da teofilina ou da PGE1 (BOURDILLAT et al., 1988).

Na musculatura lisa não vascular, a hispidulina em baixas concentrações (10^{-7} a 3×10^{-6} M) causa contração dependente da concentração em íleo isolado de cobaia e apenas um leve relaxamento dos anéis traqueais de cobaia. Em concentrações mais elevadas (até 3×10^{-4} M), causa relaxamento dependente da concentração do íleo e da traquéia, esses efeitos são reversíveis após a remoção do composto. Em concentrações de 10^{-7} a 3×10^{-4} M, a hispidulina não tem nenhum efeito sobre o tônus de contração induzido pela epinefrina em artéria pulmonar de cobaia (ABDALLA et al., 1988).

A hispidulina causa um desvio para a direita nas curvas concentração-resposta cumulativas induzidas pela acetilcolina em íleo e traquéia e inibe significativamente a contração máxima induzida pela acetilcolina (ABDALLA et al., 1988).

Em solução despolarizante, isenta de cálcio, a hispidulina causa tanto um desvio para direita, quanto uma redução da contração máxima, das curvas de concentração-resposta cumulativas induzidas pelo CaCl_2 no íleo, na traquéia e nas artérias pulmonares. Em solução contendo EGTA, isenta de cálcio, a hispidulina causa inibição concentração-dependente das contrações induzidas pela epinefrina em artérias pulmonares e pela histamina no íleo (ABDALLA et al., 1988).

Os autores sugerem que a hispidulina pode interferir com a ligação do Ca^{++} aos receptores do Ca^{++} , nas células musculares lisas e/ou com a liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares induzidos por agonistas. Menos provavelmente, a hispidulina pode interferir com o influxo de Ca^{++} através da membrana da célula muscular lisa (ABDALLA et al., 1988).

HAZEKAMP et al. (2001), observou a atividade espasmolítica do extrato etanólico do *Clerodendrum petasites*, de forma dependente da concentração no músculo liso traqueal

isolado de cobaias, quando exposto a concentrações crescentes de histamina. O princípio ativo isolado foi identificado como sendo a hispidulina. A partir desse resultado os autores sugerem que a hispidulina pode ser benéfica no tratamento da asma.

A eupafolina foi citada em alguns trabalhos por possuir atividade citotóxica, porém ainda existem poucos estudos envolvendo este flavonóide (KUPCHAN, 1969; TAN et al., 1999; ELEMA et al., 1989).

Tendo em vista a presença de flavonóides na *Eupatorium littorale*, considerando que estes flavonóides apresentam uma grande variedade de efeitos farmacológicos, entre eles, citotoxicidade, atividades anti-fúngicas, anti-oxidantes e anti-hepatotóxicas, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato bruto metanólico da espécie *Eupatorium littorale* e de seus dois flavonóides isolados, a hispidulina e a eupafolina, na mobilização de cálcio na musculatura lisa não vascular e na musculatura esquelética.

2 - OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos farmacológicos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e de seus flavonóides isolados e purificados, hispidulina e eupafolina, na mobilização de cálcio na musculatura lisa não vascular e na musculatura esquelética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Estudar os efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura lisa não vascular;

2.2.2 Estudar os efeitos dos flavonóides isolados, hispidulina e eupafolina, na musculatura lisa não vascular;

2.2.3 Estudar os efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura esquelética;

2.2.4 Estudar os efeitos do flavonóide hispidulina na musculatura esquelética;

2.2.5 Estudar os efeitos do flavonóide eupafolina na musculatura esquelética.

3 - MATERIAL

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

As partes aéreas da *Eupatorium littorale* foram coletadas no Município de Piraquara, Região Metropolitana de Curitiba, próximo à Serra do Mar, na primeira quinzena de abril de 1997.

Exemplares, do material estudado, foram comparados com o material botânico depositado no herbário do Departamento de Botânica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, sob número UPCB 12.400, de 05 de janeiro de 1984 (FREHSE,1999).

Os flavonóides isolados e purificados do extrato bruto metanólico, a hispidulina e a eupafolina, foram fornecidos pelo Professor Dr. Brás Heleno de Oliveira, do Departamento de Química, da Universidade Federal do Paraná.

3.2 MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1 Ratos (*Ratus norvegicus* variedade: Wistar):

Foram utilizadas ratas fêmeas, adultas, pesando entre 180 e 200 g, da colônia do biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, tratados com água e ração balanceada “ad libitum”.

3.2.2 Camundongos (*Mus musculus* – linhagem obtida do cruzamento entre Black 10 e Swiss):

Foram utilizados camundongos fêmeas, adultas, pesando entre 20-25 g, da colônia do biotério da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, tratados com água e ração balanceada “ad libitum”.

3.2.3 Rãs (*Rana catesbeiana*):

Foram utilizadas rãs de ambos os sexos, adultas, pesando de 100 a 200 g, fornecidas pelo Ranário Ranaluz, de São José dos Pinhais (PR), criadas com ração de peixe industrializada. Estes animais foram mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, à temperatura ambiente, em local gradeado contendo um tanque e sendo alimentados esporadicamente com neonatos de camundongos.

4 - METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO

As folhas do vegetal, após a coleta, foram separadas das flores e caules. As folhas (1,0 kg) foram secas a 40°C, trituradas e extraídas duas vezes com metanol a 25°C. O solvente foi evaporado à pressão reduzida produzindo o extrato bruto metanólico (132,57 g) (OLIVEIRA et al., 2001).

4.2 PURIFICAÇÃO DOS FLAVONÓIDES HISPIDULINA E EUPAFOLINA

Após a obtenção do extrato bruto, iniciou-se a partição do mesmo com solventes de polaridades crescentes. O fracionamento inicial foi realizado por cromatografia líquida a vácuo. O extrato bruto (5,0 g) foi incorporado em sílica gel (5,0 g) e depois aplicado em uma coluna de sílica (40 X 300 mm) empacotada com 85,0 g de sílica (Merck art. N°. 7736). A eluição foi feita por gradiente com frações de 100 mL de misturas de hexano/acetato de etila (100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70; 20:80; 10:90; 0:100) e finalmente com acetato de etila/metanol (1:1).

A fração 7 (1,0 g) foi refracionada por cromatografia em camada fina centrífuga (Chromatotron). Metade da mistura foi aplicada a um rotor com uma camada de 1 mm de espessura de sílica (Merck art. N°. 7749). A eluição foi realizada com clorofórmio/metanol (97:3) e frações de 10 mL foram coletadas. A hispidulina e a eupafolina foram dessa forma isoladas e caracterizadas (OLIVEIRA et al., 2001).

4.3 PREPARO DO EXTRATO E DOS FLAVONÓIDES PARA O USO EM ANIMAIS

O extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e os flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), foram dissolvidos em Tween 80 e água bidestilada (1:10).

4.4 ATIVIDADE NA MUSCULATURA LISA NÃO VASCULAR

4.4.1 Jejuno e íleo de rato:

Para o estudo da atividade do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e dos flavonóides, hispidulina e eupafolina, na musculatura lisa não vascular, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical com barra metálica. A cavidade abdominal foi aberta com auxílio de material cirúrgico e o órgão foi localizado, retirado e imerso em solução nutritiva de Tyrode (mM, NaCl 136,9; KCl 2,68; MgCl₂ 0,53; NaHCO₃ 11,9; NaH₂PO₄ 0,33; CaCl₂ 1,8; glicose 5,6), aquecido a 37°C e constantemente aerado. A luz do segmento também foi lavada com solução de Tyrode, para limpeza e retirada de qualquer resíduo alimentar.

O jejuno e o íleo foram cortados em porções de aproximadamente 1,5 cm e as extremidades foram amarradas. Os órgãos foram encaixados em haste de vidro do banho de perfusão, através de uma das extremidades, enquanto que a outra foi conectada à alavanca de inscrição frontal para registro do tônus, ampliado em 6 vezes em cilindro de papel enfumaçado, e registrada a motilidade espontânea no quimógrafo (CARLINI, 1973).

As preparações permaneceram em estabilização por 30 minutos, trocando-se o Tyrode da cuba a cada 10 minutos.

Foram induzidas curvas concentração-resposta cumulativas com a acetilcolina (10^{-9} a 10^{-2} M), repetidas na presença do extrato bruto metanólico da *E. littorale* nas concentrações

de 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e induzidas novamente após 30 minutos da retirada do extrato, procedendo da mesma forma com os flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos foram representados em relação à porcentagem da contração máxima (n = 6 a 8).

4.4.2 Útero de rata:

Para o estudo da atividade do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e dos flavonóides, hispidulina:eupafolina (1:1), na musculatura lisa não vascular as ratas receberam tratamento com estradiol 100 $\mu\text{g/kg}$, 24 horas antes do experimento, por via subcutânea, com objetivo de padronizar o ciclo estral e desta forma, padronizar as contrações musculares a serem obtidas. Foram sacrificadas por deslocamento cervical com barra metálica. A cavidade abdominal foi aberta com auxílio de material cirúrgico e o órgão foi localizado, retirado e imerso em líquido nutritivo para vesícula LNV despolarizante, contendo 80 mM de K^+ e sem Ca^{2+} (mM, NaCl 64; KCl 81,7; NaHCO_3 15; NaH_2PO_4 0,36; glicose 5,5), aquecido a 30°C e constantemente aerado.

O útero foi cortado em porções de aproximadamente 1,5 cm e as extremidades foram amarradas. O órgão foi encaixado em haste de vidro do banho de perfusão, através de uma das extremidades, enquanto que a outra foi conectada à alavanca de inscrição frontal para registro do tônus (contração isotônica), ampliado em 6 vezes em cilindro de papel enfumaçado e registrada a motilidade espontânea no quimógrafo (CARLINI, 1973).

A preparação permaneceu em estabilização por 60 minutos, trocando-se o líquido nutritivo da cuba a cada 10 minutos.

Foram induzidas curvas concentração-resposta cumulativas com o cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M), repetidas na presença do extrato bruto metanólico da *E. littorale* nas concentrações de 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e induzidas novamente após 30 minutos da retirada do extrato, procedendo da mesma forma com os flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados obtidos foram representados em relação à porcentagem da contração máxima ($n = 6$ a 8).

4.5 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE ANFÍBIO

4.5.1 Músculo sartório intacto de rã:

Os animais foram sacrificados, o músculo foi isolado e imerso em solução nutritiva de Ringer normal (tabela 1), com pH ajustado para 7,4 com HCl 1M ou NaOH 1M. Nas soluções contendo 40 ou 100 mM de potássio, o NaCl foi substituído isosmoticamente pelo KCl.

Os músculos isolados foram amarrados por suas extremidades, uma fixada na câmara de 15 mL e outra à alavanca conectada a um sistema de registro em quimógrafo. As preparações foram mantidas imersas em solução de Ringer normal, à temperatura ambiente, constantemente aerada, permanecendo em estabilização por 15 minutos.

4.5.1.1 Efeito do extrato bruto na contratura potássica

Após o tempo de estabilização em Ringer normal, os músculos foram expostos às soluções de Ringer 40 (tabela 1) ou Ringer 100 (tabela 1). Entre cada contratura os músculos ficaram em solução de repouso (ringer normal) por 15 minutos. As contraturas potássicas

foram repetidas após 40 minutos de incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*.

4.5.1.2 Efeito do extrato bruto na contratura cafeínica

Foram induzidas contraturas potássicas com Ringer 100 (tabela 1) com 15 minutos de intervalo entre cada contratura. Foi induzida contração com cafeína 2 mM, e após a contratura o músculo foi mantido em repouso durante 30 minutos.

A contratura cafeínica foi repetida após incubação com o extrato bruto metanólico da *E. littorale* na concentração de 1,0 mg/mL e/ou com 0,1 mL/mL do solvente Tween 80. Como o Tween 80 foi empregado como agente solubilizante do extrato, realizaram-se experimentos em idênticas condições experimentais às do extrato, com o objetivo de verificar possíveis ações deste composto.

4.5.1.3 Efeito do extrato na contratura cafeínica em meio despolarizado

Foram induzidas 3 (três) contraturas potássicas com Ringer 100 (tabela 1) e contraturas com 2 e 4 mM de cafeína. Entre as contraturas potássicas os músculos ficaram em repouso por 15 minutos e após a terceira contratura potássica os músculos ficaram imersos em solução Ringer 100.

Após 30 minutos da realização da contratura com 2 mM de cafeína e sem que a cafeína fosse retirada do meio, os músculos foram incubados com 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. No final dos experimentos as contraturas com 4 mM de cafeína foram utilizadas como controle.

4.5.1.4 Efeito do extrato na contração cafeínica em meio despolarizado com 0 - Ca⁺⁺ nominal

Foram induzidas contrações potássicas com Ringer 100 na ausência de Ca⁺⁺ (tabela 1) e contração cafeínica (2mM). Entre as contrações potássicas os músculos ficaram em repouso por 15 minutos e após a terceira contração estes ficaram imersos em solução de Ringer contendo 100 mM de K⁺, na ausência total de Ca⁺⁺ onde adicionou-se 5 mM de EGTA (ácido glicol-éter-diamino tetracético). Após 30 minutos da contração induzida por cafeína, os músculos foram incubados durante 40 minutos com 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. Dessa forma, nova contração foi induzida pela cafeína na presença do extrato.

4.5.2 Músculo cutâneo-peitoral intacto de rã:

Os animais foram sacrificados, os músculos isolados e colocados imersos em solução nutritiva de Ringer normal (tabela 1), com pH ajustado para 7,4 com HCl 1M ou NaOH 1M. Estes foram fixados por uma de suas extremidades à um transdutor de força (Scientific Instruments G.M.B.H., Heidelberg, República Federal da Alemanha) mantidos em posição estacionária e a outra extremidade a um braço móvel. Um conjunto de câmaras contendo diferentes soluções construídas num bloco de acrílico móvel permitiu que a fibra muscular fosse submetida a diferentes protocolos experimentais.

4.5.2.1 Efeito dos flavonóides hispidulina e eupafolina na contração cafeínica

Foram induzidas contrações potássicas com Ringer 100 (tabela 1) com 15 minutos de intervalo entre cada contração. Foi induzida contração com cafeína 2 mM, e após a contração os músculos foram mantidos em repouso durante 30 minutos. A contração induzida por

caféina foi repetida após incubação por 40 minutos com o flavonóide hispidulina ou com a eupafolina na concentração de 100 µg/mL.

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas nos protocolos experimentais (em mM)

Componente	Ringer normal	Ringer 40	Ringer 100	Ringer 100 – 0 Ca ⁺⁺ nominal
NaCl	110	74	14	14
KCl	4	40	100	100
MgCl ₂	1,8	1,8	1,8	1,8
CaCl ₂	2	2	2	0
TRISMA	10	10	10	10
EGTA	0	0	0	5

TRISMA = tris - (hidroximetil) – aminometano

EGTA = ácido glicol-éter-diamino tetracético

4.6 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE MAMÍFERO:

4.6.1 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em diafragma de mamífero com estimulação elétrica:

Para o estudo da atividade do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura esquelética de mamíferos, foram utilizados camundongos fêmeas, anestesiadas previamente com éter e sacrificadas em seguida por deslocamento cervical. As cavidades abdominal e torácica foram abertas e o diafragma foi localizado, retirado e colocado imerso em solução nutritiva de Tyrode (mM, NaCl 136,9; KCl 2,68; MgCl₂ 0,53; NaHCO₃ 11,9;

NaH₂PO₄ 0,33; CaCl₂ 1,8; glicose 5,6), mantido a temperatura ambiente e constantemente aerado com carbogênio (mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂).

Os diafragmas isolados foram amarrados pela extremidade costal a uma haste de vidro do banho de perfusão (capacidade para 2,5 mL), enquanto que a extremidade tendinosa foi conectada a um transdutor de força (Grass FT 03) para registro das contrações isométricas em polígrafo (Beckman). A temperatura do banho foi mantida em 35°C.

As contrações musculares foram induzidas por estimulação elétrica direta das fibras com pulsos de 0,5 ms de duração, com frequência de 0,5 Hz e voltagem supramáxima, aplicados através de eletrodos de platina presentes nos banhos de perfusão.

As preparações permaneceram em estabilização por 30 minutos após a adição de 10 µM de d-tubocurarina, adicionada ao banho objetivando a exclusão das contrações induzidas por estimulação das terminações nervosas.

Foi determinado por 40 minutos a contratura e o encurtamento induzidos eletricamente na ausência de drogas do meio de perfusão. Esses registros foram utilizados como controles para os demais protocolos.

4.6.1.1 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e do veículo Tween sobre o diafragma estimulado eletricamente:

Foram observadas a contratura e a amplitude dos abalos musculares induzidos por estimulação elétrica durante 40 minutos anteriores e posteriores à adição de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico ao banho de perfusão e durante 45 minutos após a retirada do extrato bruto do meio.

O veículo utilizado para a solubilização do extrato (Tween 80), foi adicionado e mantido no banho durante 40 minutos, registrando-se a contratura e o encurtamento muscular.

Estes registros foram realizados para determinar possíveis influências do solvente nas respostas observadas, servindo, portanto, como um novo controle dos resultados.

Os registros das contrações isométricas realizadas na presença do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* foram realizados simultaneamente em polígrafo (Beckman R411) e em osciloscópio (Tektronik), do qual foram fotografados com auxílio de uma câmera fotográfica digital e posteriormente analisados quanto:

- Ø Tempo de contração (TC): tempo necessário para atingir a contração máxima;
- Ø Tempo de relaxamento 50% (TR₅₀): tempo necessário para atingir 50% de relaxamento;
- Ø Velocidade máxima de contração (VC_{max}): velocidade instantânea máxima atingida pelo músculo durante a contração;
- Ø Velocidade máxima de relaxamento (VR_{max}): velocidade instantânea máxima atingida pelo músculo durante o relaxamento.

Estes dois últimos parâmetros foram determinados através de um circuito diferenciador ligado em paralelo à entrada do sinal do osciloscópio e registrados no segundo canal deste.

4.6.1.2 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de dantrolene e do veículo propilenoglicol sobre o diafragma com estimulação direta:

Foi adicionado 12,5 µg/mL de dantrolene, droga inibidora da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, ao banho de perfusão e 10 minutos após esta adição, o músculo foi incubado com 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico. A contratatura e o encurtamento do músculo foram observados durante 40 minutos consecutivos.

Este protocolo foi repetido substituindo-se o dantrolene por seu veículo, o propilenoglicol (2 %), e os registros obtidos foram utilizados como controle.

4.6.2 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em diafragma de mamífero sem estimulação elétrica:

A preparação permaneceu em estabilização por 30 minutos após a adição de 10 μM de d-tubocurarina. Foi observada a contratura do músculo, durante 60 minutos na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e 70 minutos após a sua retirada do banho de perfusão. Os registros foram realizados com auxílio de um transdutor de força (Grass FT 03) acoplados a um polígrafo (Beckman). A temperatura do banho foi mantida em 35°C.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes de atividade na musculatura lisa não vascular, os resultados dos experimentos foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. Os valores de pD_2 e limites de confiança das curvas concentração-resposta foram calculadas após a determinação da CE_{50} . As diferenças em relação aos valores controle foram determinadas através do teste 't' de Student.

Os resultados obtidos na atividade da musculatura esquelética de anfíbios foram representados como média \pm erro padrão da média e foram normalizados aos valores expressos em porcentagem da contratura obtida com 100 mM de K^+ . Para a comparação de resultados obtidos em uma única condição e no mesmo experimento em relação ao controle, empregou-se o teste 't' pareado e entre experimentos diferentes, o não pareado. Para múltiplas condições experimentais utilizou-se análise de variância para medidas no mesmo experimento e para análise dos contrastes empregou-se o teste de Tukey (TUKEY, 1949).

Os resultados, de contratura obtidos na musculatura esquelética de mamíferos, foram obtidos em milímetros e convertidos para gramas (g) de tensão, enquanto que o encurtamento do músculo foi expresso como porcentagem, considerando como 100 % a amplitude antes da adição das drogas. Os resultados foram representados como média \pm erro padrão da média. As diferenças em relação aos valores controle foram determinadas através do teste 't' de Student.

Os dados foram considerados significativamente diferentes quando a possibilidade de ocorrência da hipótese nula foi igual ou inferior a 5% ($p < 0,05$).

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas de software GraphPad Prism versão 2.00, 1995 e o GraphPad InStat versão 02.05a, 1990-1994.

5 – RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE NA MUSCULATURA LISA NÃO VASCULAR

5.1.1 Efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em jejuno de ratas:

Para a avaliação dos efeitos de extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura lisa não vascular, primeiramente utilizamos o jejuno isolado de ratas. Foram utilizadas concentrações de 6, 12, 25 e 50 µg/mL do extrato bruto para a avaliação da resposta muscular frente à acetilcolina adicionada em concentrações crescentes (10^{-9} à 10^{-2} M), obtendo-se desta forma uma curva concentração resposta.

Na figura 3 representamos a curva controle de acetilcolina em concentrações crescentes (10^{-9} à 10^{-2} M) e nas demais curvas demonstramos o efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em diferentes concentrações (6, 12, 25 e 50 µg/mL) incubadas por 5 minutos na curva concentração-efeito de acetilcolina (n = 6 a 8). Pela análise verificamos que o extrato deslocou a curva induzida por concentrações crescentes de acetilcolina para a direita e diminuiu seu efeito contrátil máximo (fig. 4, 5, 6 e 7).

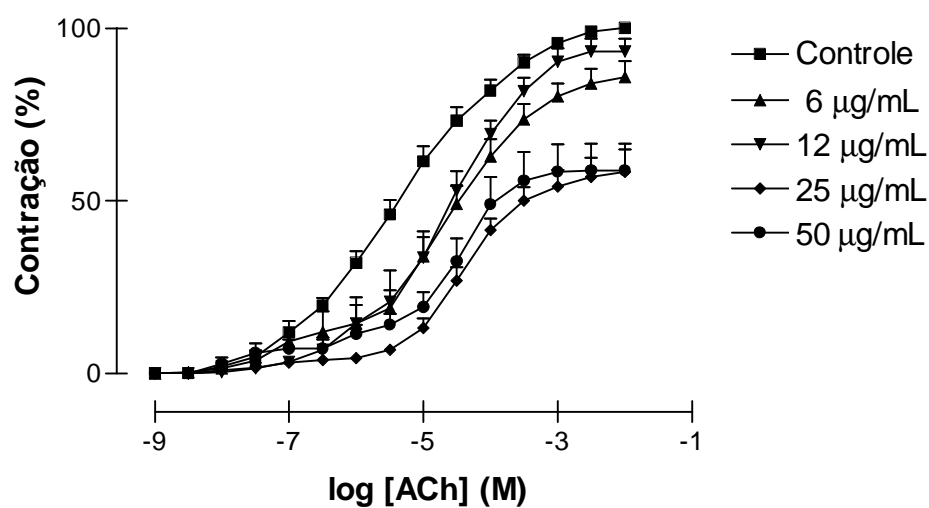


Figura 3: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* nas concentrações de 6 µg/mL (▲), 12 µg/mL (▼), 25 µg/mL (U) e 50 µg/mL (~). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos.

Na figura 4 representamos as curvas induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina na ausência e na presença de 6 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e após 30 minutos da lavagem da preparação. Observamos pela análise destes dados que a curva induzida por concentrações crescentes de acetilcolina na presença do extrato não foi deslocada [CE_{50} controle = $1,29 \cdot 10^{-5}$ M ($2,78 \cdot 10^{-6}$ – $6,02 \cdot 10^{-5}$ M); CE_{50} com extrato = $2,76 \cdot 10^{-5}$ M ($1,39 \cdot 10^{-5}$ – $5,45 \cdot 10^{-5}$ M)], porém houve redução em 18,3 % da capacidade máxima contrátil do órgão ($t = 7,590$, $\text{df} = 7$). Após a lavagem da preparação a capacidade contrátil máxima retornou aos níveis obtidos nas condições controle.

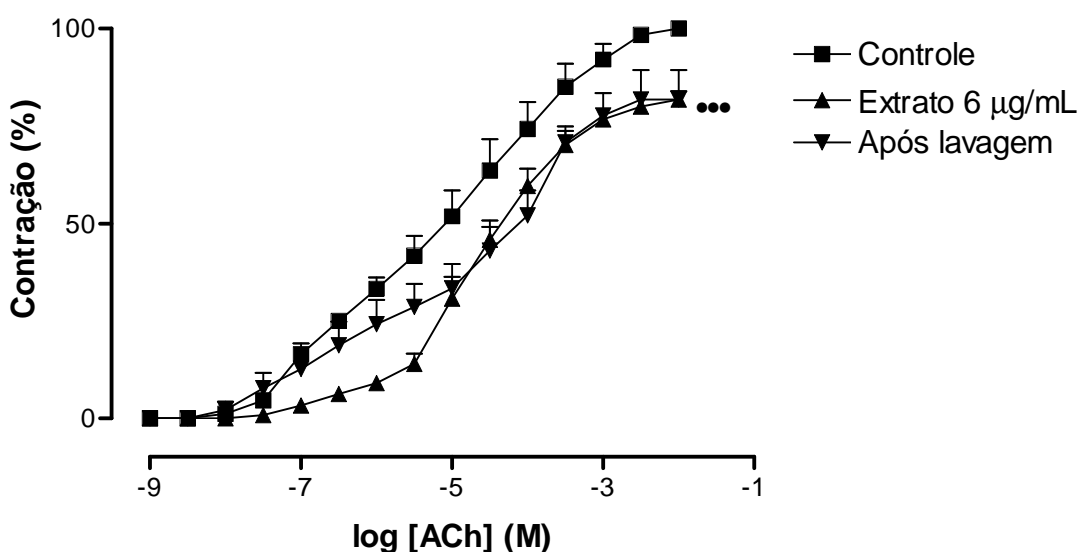


Figura 4: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de $6\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste ‘t’ de Student.

*** $p < 0,001$ - controle x extrato

Pela análise dos dados representados na figura 5 observamos que a CE_{50} da curva controle de acetilcolina foi de $3,04 \cdot 10^{-6}$ M ($2,11 \cdot 10^{-6}$ – $5,47 \cdot 10^{-6}$ M) quando na presença da concentração de $12 \mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* a CE_{50} foi deslocada para $2,23 \cdot 10^{-5}$ M [$(7,52 \cdot 10^{-6}$ – $6,64 \cdot 10^{-5}$ M) ($t=3,078$; $df = 10$)], retornando aos níveis semelhantes aos do controle após 30 minutos de lavagem da preparação.

Essa concentração do extrato quando incubado por 5 minutos, não foi capaz de alterar a resposta contrátil máxima do órgão à acetilcolina, tanto na presença como após a retirada do extrato.

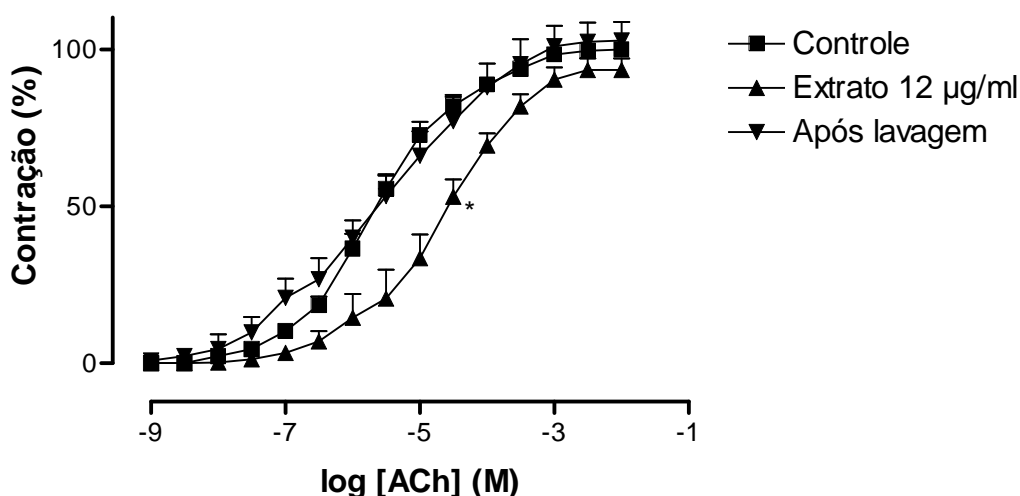


Figura 5: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de $12 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

A figura 6 representa os dados obtidos após incubação com concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} até 10^{-2} M) na presença ou na ausência de 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* em jejuno isolado de rato. A curva induzida por concentrações crescentes de acetilcolina na presença do extrato não foi deslocada. Assim, a CE_{50} da curva controle foi de $3,07 \cdot 10^{-5}$ M ($3,94 \cdot 10^{-6}$ – $24,03 \cdot 10^{-5}$ M) e a CE_{50} na presença do extrato foi de $2,38 \cdot 10^{-5}$ M ($1,62 \cdot 10^{-5}$ – $3,50 \cdot 10^{-5}$ M). Foi observada também a redução de 41,6 % na contração máxima induzida pela acetilcolina, quando na presença do extrato ($t = 3,556$, $df = 6$). O efeito contrátil máximo do órgão foi revertido após 30 minutos da lavagem da preparação.

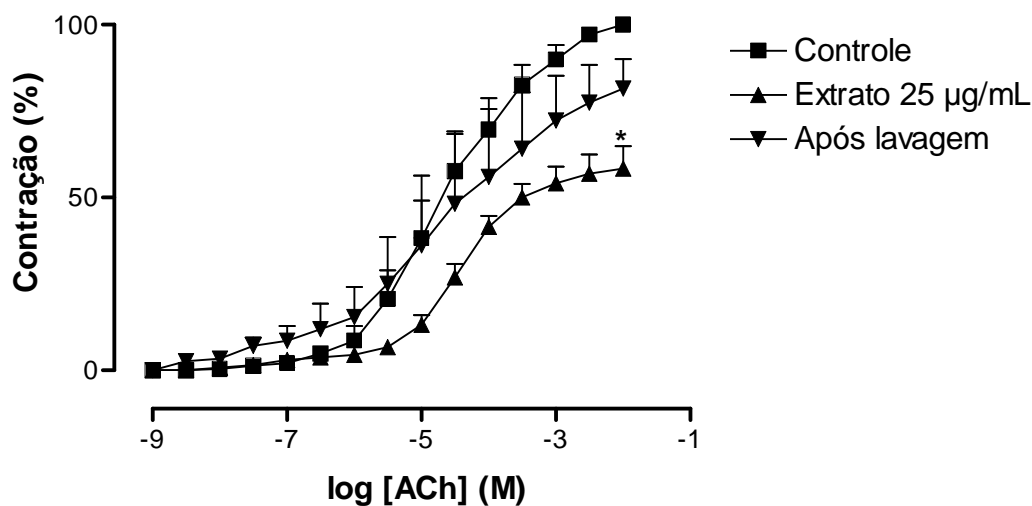


Figura 6: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

A acetilcolina (10^{-9} até 10^{-2} M) produziu contração do jejuno isolado de rato com CE_{50} controle de $3,52 \cdot 10^{-6}$ M ($2,69 \cdot 10^{-6}$ - $4,61 \cdot 10^{-6}$ M). Na presença de $50 \mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium litoralle*, esta curva foi significativamente deslocada para a direita, sendo que o cálculo da CE_{50} foi de $2,09 \cdot 10^{-5}$ M [$(1,12 \cdot 10^{-5}$ - $3,89 \cdot 10^{-5}$ M) ($t = 2,545$, $df = 8$)]. A contração máxima deste órgão foi reduzida em 41,3 % quando adicionado ao banho o extrato bruto, em comparação à condição controle ($t = 2,518$, $df = 8$). Após 30 minutos da lavagem da preparação, tanto a redução da resposta máxima do órgão como o deslocamento da curva, retornaram parcialmente aos valores semelhantes ao controle.

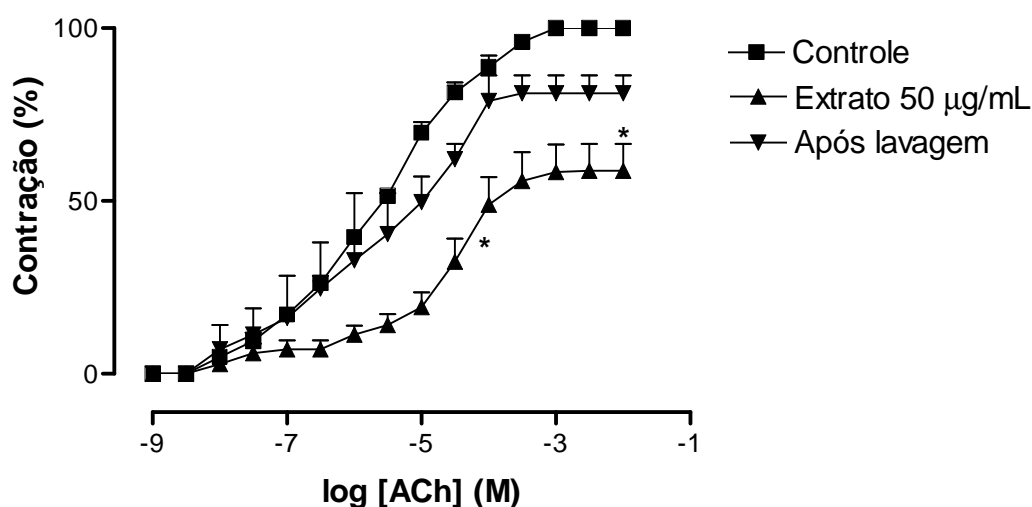


Figura 7: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 8 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

5.1.2 Efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em íleo de ratas:

Para a avaliação dos efeitos do extrato bruto metanólico sobre a musculatura lisa não vascular, foi utilizado também o íleo isolado de ratas fêmeas. Realizamos curvas induzidas pelo agonista clássico acetilcolina em concentrações crescentes de 10^{-9} até 10^{-2} M no banho de perfusão.

Na figura 8, representamos a curva de acetilcolina (10^{-9} até 10^{-2} M) e as curvas induzidas por concentrações crescente de acetilcolina na presença de 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. Pela análise destes dados pudemos observar um deslocamento da curva concentração efeito de acetilcolina para a direita, além de uma diminuição da resposta máxima contrátil do íleo (fig. 9, 10, 11 e 12).

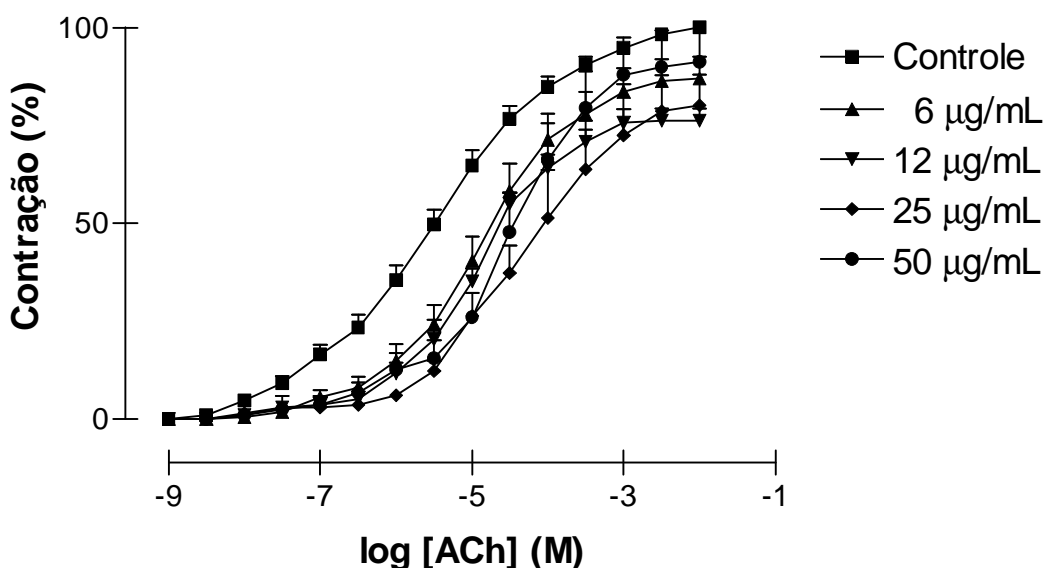


Figura 8: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* nas concentrações de 6 $\mu\text{g/mL}$ (▲), 12 $\mu\text{g/mL}$ (▼), 25 $\mu\text{g/mL}$ (◼) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (●). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 a 7 experimentos.

O íleo isolado de rata contraiu com a adição de acetilcolina, apresentando respostas proporcionais às concentrações no intervalo de 10^{-9} até 10^{-2} M. A CE_{50} do controle foi de $2,85 \cdot 10^{-6}$ M ($6,33 \cdot 10^{-7}$ – $1,28 \cdot 10^{-5}$ M). Na presença de $6 \mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* a CE_{50} foi de $9,98 \cdot 10^{-6}$ M ($5,91 \cdot 10^{-6}$ – $1,68 \cdot 10^{-5}$ M). Houve redução de 13,1 % da resposta contrátil máxima do órgão em relação às condições controle ($t = 2,305$, $df = 10$). Após a lavagem da preparação e conseqüente retirada do extrato, houve retorno dos níveis contráteis do órgão frente a acetilcolina, chegando a respostas semelhantes ao controle.

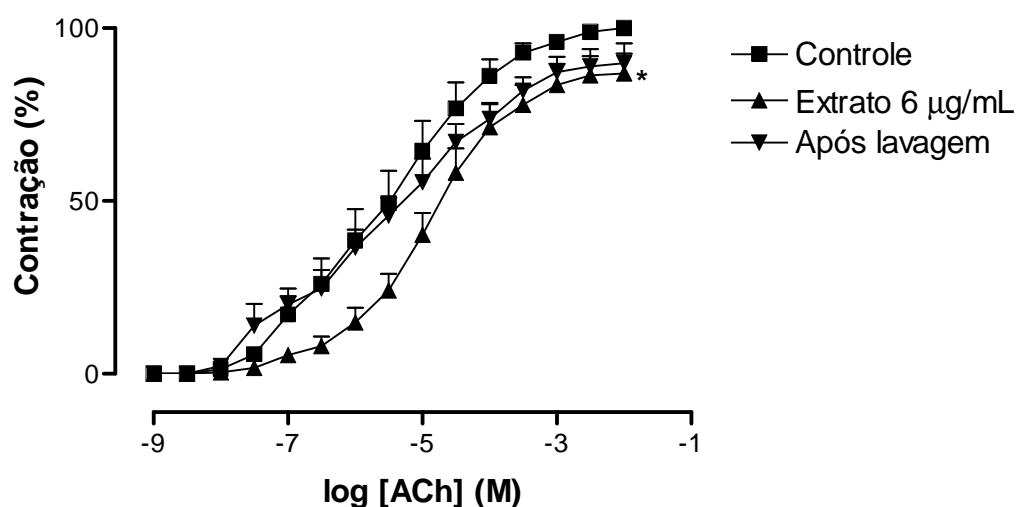


Figura 9: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de $6 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após 30 minutos da lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste 't' de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

Pela análise dos dados apresentados na figura 10, observamos que 12 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* deslocou significativamente as contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina para a direita [CE_{50} controle = $4,30 \cdot 10^{-6}$ M ($2,75 \cdot 10^{-6}$ – $6,71 \cdot 10^{-6}$ M); CE_{50} na presença do extrato = $2,12 \cdot 10^{-6}$ ($1,06 \cdot 10^{-6}$ – $4,25 \cdot 10^{-6}$ M), ($t = 2,293$; $\text{df} = 10$)]. O extrato também reduziu em 23,9 % a resposta contrátil máxima do órgão frente às concentrações crescentes de acetilcolina ($t = 7,384$, $\text{df} = 10$). Após 30 minutos da lavagem da preparação houve retorno da atividade contrátil do órgão induzida pela acetilcolina, semelhante aos valores obtidos pelas condições controle.

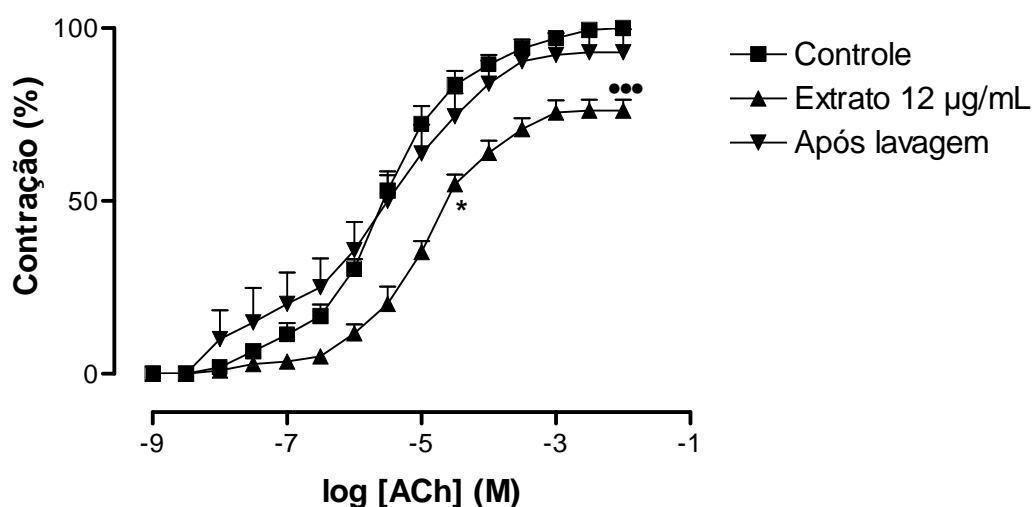


Figura 10: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de 12 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

●●● $p < 0,001$ - controle x extrato

Na figura 11, representamos o efeito de concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} até 10^{-2} M) em íleo isolado de rata na presença e na ausência de 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*.

Não houve deslocamento da curva concentração efeito da acetilcolina para a direita na presença do extrato [CE_{50} controle = $5,40 \cdot 10^{-6}$ M ($5,01 \cdot 10^{-8}$ – $5,81 \cdot 10^{-4}$ M); CE_{50} na presença do extrato = $4,82 \cdot 10^{-5}$ ($2,63 \cdot 10^{-5}$ – $8,83 \cdot 10^{-5}$ M); CE_{50} após lavagem da preparação = $3,08 \cdot 10^{-6}$ M ($9,10 \cdot 10^{-8}$ – $1,04 \cdot 10^{-4}$ M)]. Não foi observada redução da resposta contrátil máxima do órgão induzido pela acetilcolina, tanto na presença como após a retirada do extrato do banho de perfusão.

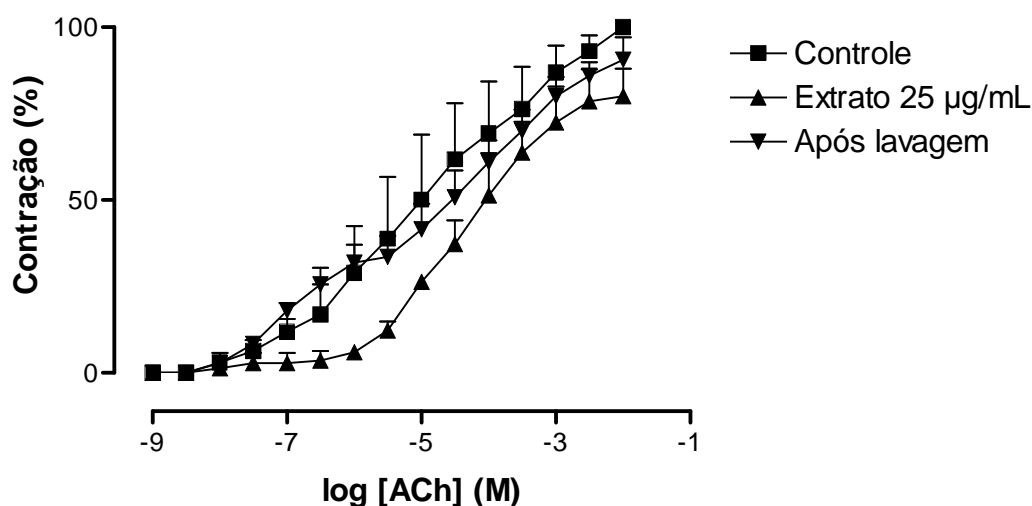


Figura 11: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 3 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste 't' de Student.

A figura 12 demonstra que o íleo isolado de rato contraiu quando da adição de acetilcolina, com respostas proporcionais às concentrações de 10^{-9} até 10^{-2} M com CE_{50} de $2,21 \cdot 10^{-6}$ M ($7,17 \cdot 10^{-7}$ – $6,86 \cdot 10^{-6}$ M). Após a adição ao banho, da concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, as contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina foram deslocadas significativamente para a direita [$CE_{50} = 3,35 \cdot 10^{-5}$ M ($2,29 \cdot 10^{-5}$ – $4,88 \cdot 10^{-5}$ M), $t = 4,041$, $df = 11$], não ocorrendo redução da resposta máxima contrátil do órgão. Após a lavagem da preparação (30 minutos) a CE_{50} foi de $6,57 \cdot 10^{-6}$ M ($1,82 \cdot 10^{-6}$ – $2,37 \cdot 10^{-5}$ M), mantendo a resposta máxima de contração do órgão.

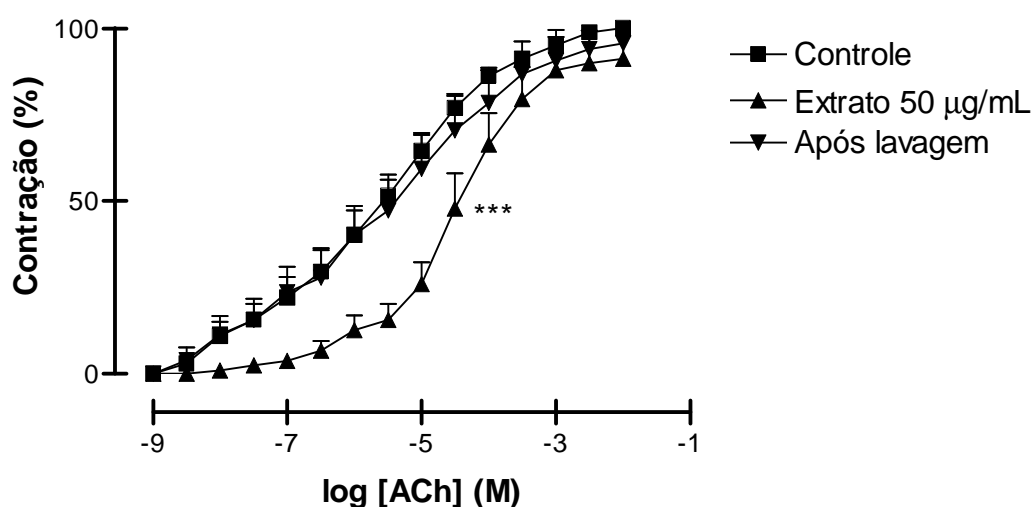


Figura 12: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em íleo isolado de ratas, obtidas (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student.

*** $p < 0,005$ - controle x extrato

5.1.3 Efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio em útero isolado de ratas:

O útero de ratas foi isolado e colocado em solução nutritiva despolarizante para verificação dos efeitos contráteis de concentrações cumulativas de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M).

Na figura 13, representamos a curva controle de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M) e as contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio na presença de 6, 12, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. Pela análise destes dados pudemos observar uma diminuição da resposta contrátil máxima do útero mantido em meio despolarizante, sem deslocamento da curva concentração efeito de cálcio (fig. 14, 15, 16 e 17).

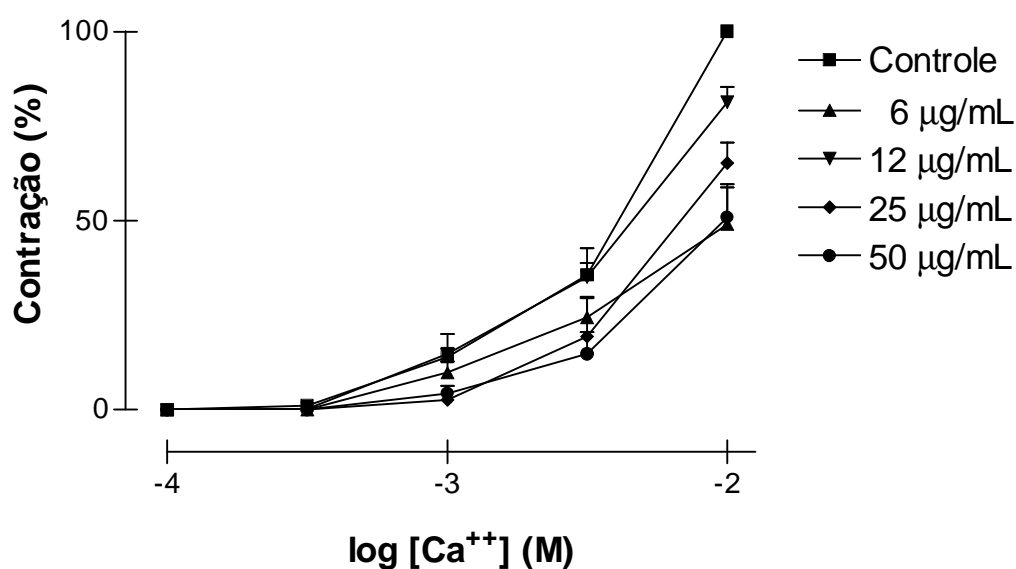


Figura 13: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{++}) em útero isolado de ratas em meio despolarizante, obtidas na ausência (■) e na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* nas concentrações de 6 $\mu\text{g/mL}$ (▲), 12 $\mu\text{g/mL}$ (▼), 25 $\mu\text{g/mL}$ (⊣) e 50 $\mu\text{g/mL}$ (●). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 a 8 experimentos.

Na figura 14 demonstramos o efeito da concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* sobre as contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio. Observamos que houve deslocamento das contrações na presença do extrato [$\text{CE}_{50} = 2,48 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($2,02 \cdot 10^{-3} - 3,03 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)] em comparação ao controle [$\text{CE}_{50} = 3,41 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($2,83 \cdot 10^{-3} - 4,12 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), ($t = 2,173$; $\text{df} = 14$)]. O extrato também foi capaz de reduzir em 51 % a resposta contrátil máxima do órgão após adição do cálcio ($t = 5,221$, $\text{df} = 14$). Essa resposta foi mantida após 30 minutos da lavagem da preparação ($t = 5,886$, $\text{df} = 14$).

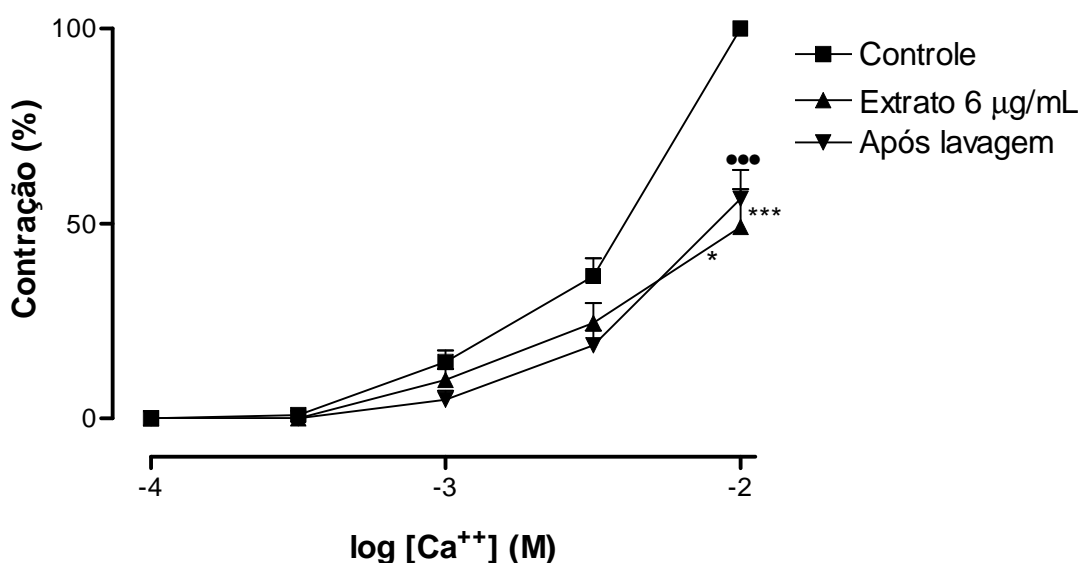


Figura 14: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium littorale* na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 8 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

* $p < 0,05$ - controle x extrato

*** $p < 0,005$ - controle x extrato

●●● $p < 0,001$ - controle x após lavagem

Na figura 15, demonstramos a contração do útero imerso em líquido nutritivo despolarizante frente às concentrações cumulativas de cálcio (10^{-4} à 10^{-2} M). A concentração de $12 \mu\text{g/mL}$ do extrato reduziu em 18,7 % ($t = 4,599$, $df = 10$) a resposta contrátil máxima do órgão induzido pelo cálcio, e após 30 minutos da lavagem da preparação, a redução foi ampliada para 36,9% ($t = 3,394$, $df = 10$). Não houve deslocamento das curvas induzidas por concentrações cumulativas de cálcio após a adição do extrato [(CE_{50} extrato = $3,02 \cdot 10^{-3}$ M ($2,13 \cdot 10^{-3}$ – $4,29 \cdot 10^{-3}$ M)] quando comparado ao controle [(CE_{50} controle = $2,98 \cdot 10^{-3}$ M ($1,94 \cdot 10^{-3}$ – $4,59 \cdot 10^{-3}$ M)].

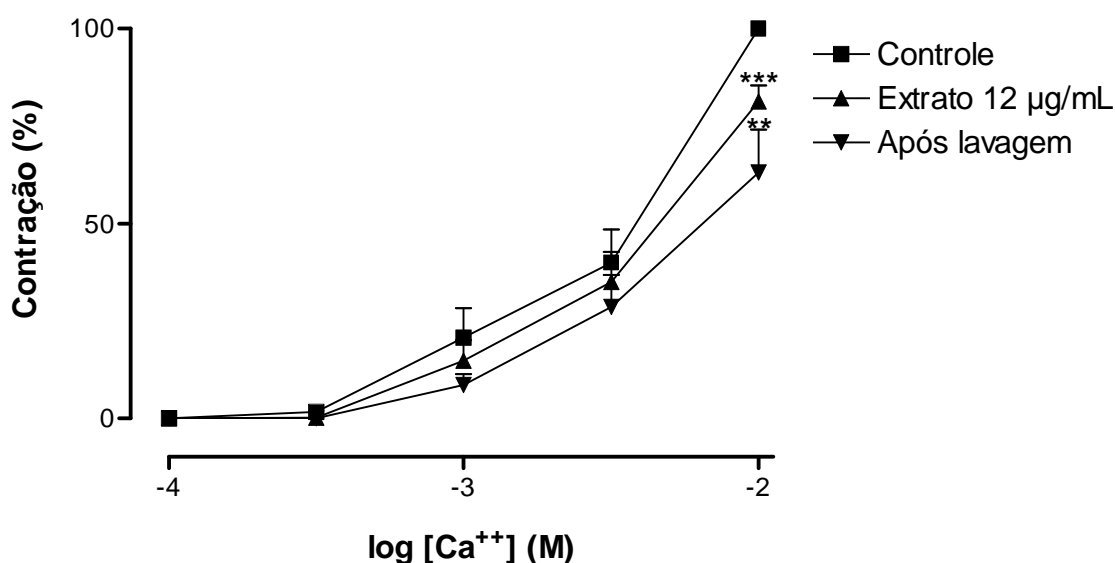


Figura 15: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de $12 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

*** $p < 0,005$ - controle x extrato

** $p < 0,01$ - controle x após lavagem

Na figura 16 demonstramos o efeito de concentrações crescentes de cálcio sobre o útero isolado de ratas mantido em líquido nutritivo despolarizante. A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto metanólico da *Eupatorium litoralle* não foi capaz de deslocar significativamente a CE_{50} induzido pelo cálcio [$(\text{CE}_{50} = 4,40 \cdot 10^{-3} \text{ M } (3,31 \cdot 10^{-3} - 5,86 \cdot 10^{-3} \text{ M}))$] quando comparado às condições controle [$(\text{CE}_{50} = 3,67 \cdot 10^{-3} \text{ M } (2,82 \cdot 10^{-3} - 4,76 \cdot 10^{-3} \text{ M}))$] mantendo esse mesmo efeito após a lavagem e a retirada do extrato da preparação [$(\text{CE}_{50} = 4,22 \cdot 10^{-3} \text{ M } (3,06 \cdot 10^{-3} - 5,81 \cdot 10^{-3} \text{ M}))$]. Essa concentração do extrato foi capaz de reduzir significativamente a resposta contrátil máxima do órgão frente ao cálcio em 34,8 % ($t = 6,425$, $\text{df} = 10$), que foi mantida em 39,8 % após 30 minutos da retirada do extrato ($t = 5,872$, $\text{df} = 10$).

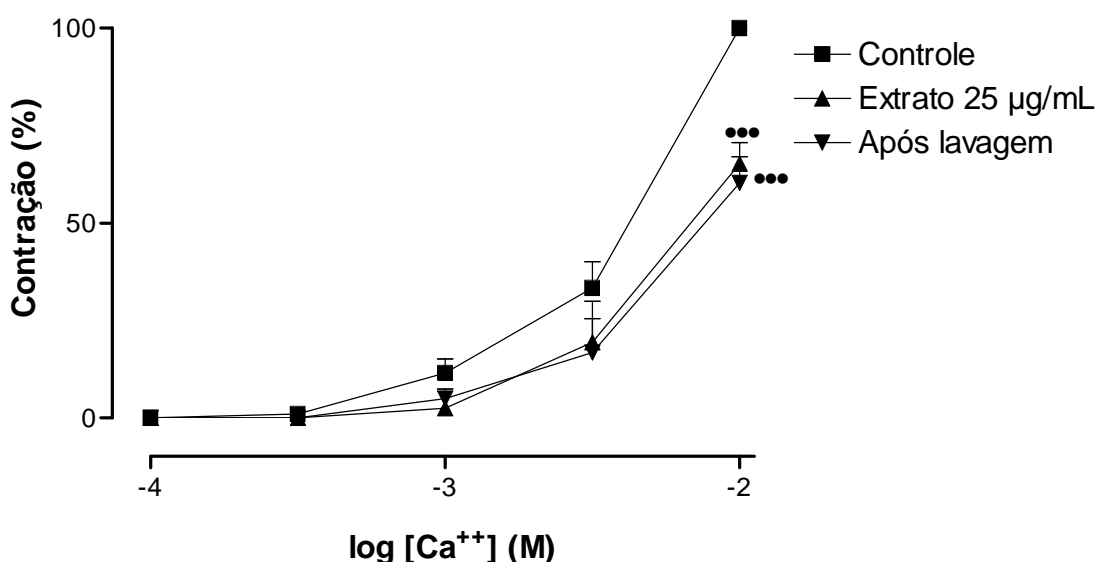


Figura 16: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litoralle* na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

- $p < 0,001$ - controle x extrato
- $p < 0,001$ - controle x após lavagem

Pela análise dos dados obtidos com a incubação de 50 µg/mL do extrato ao banho (figura 17), observamos efeitos semelhantes aos já descritos anteriormente, isto é, não houve deslocamento das contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio tanto na presença como após a retirada do extrato [CE_{50} controle = $3,78 \cdot 10^{-3}$ M ($3,10 \cdot 10^{-3}$ – $4,61 \cdot 10^{-3}$ M); CE_{50} extrato = $4,22 \cdot 10^{-3}$ M ($3,38 \cdot 10^{-3}$ – $5,26 \cdot 10^{-3}$ M); CE_{50} após lavagem = $4,54 \cdot 10^{-3}$ ($4,01 \cdot 10^{-3}$ – $5,14 \cdot 10^{-3}$ M)]. No entanto, esta concentração do extrato bruto foi capaz de reduzir a resposta contrátil máxima do órgão em 49,1 % ($t = 5,606$, $df = 10$), sendo que após 30 minutos da lavagem da preparação, houve aumento desta redução para 68,7 % ($t = 13,07$, $df = 10$), quando comparados aos valores obtidos pela condição controle de cálcio.

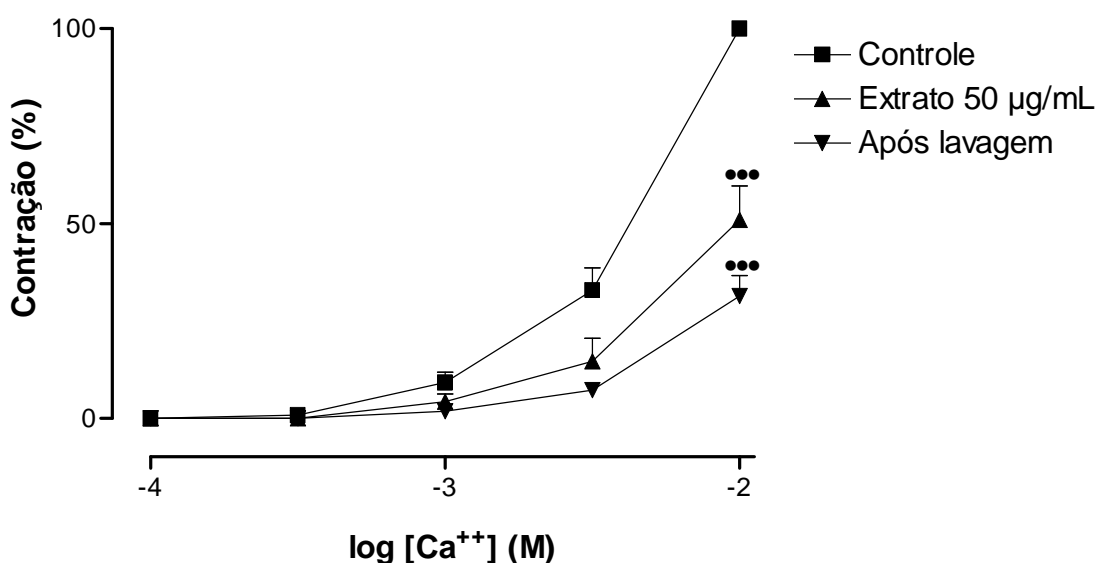


Figura 17: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença do extrato bruto metanólico de *Eupatorium litorale* na concentração de 50µg/mL (▲) e após a lavagem e retirada do extrato do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste ‘t’ de Student.

- $p < 0,001$ - controle x extrato
- $p < 0,001$ - controle x após lavagem

5.1.4 Efeitos dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina em jejuno de ratas:

Para a avaliação dos efeitos da mistura dos flavonóides hispidulina e eupafolina na proporção de 1:1 na musculatura lisa não vascular, utilizamos o jejuno isolado de ratos. Foram utilizadas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 µg/mL desta mistura de flavonóides para avaliação da resposta muscular frente à acetilcolina adicionada em concentrações crescentes (10^{-9} à 10^{-2} M), obtendo-se desta forma uma curva concentração resposta.

Na figura 18 representamos a curva controle das contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} à 10^{-2} M) e nas demais curvas demonstramos o efeito da mistura de flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) em diferentes concentrações incubadas por 5 minutos nas contrações induzidas pela acetilcolina (n = 6). Pela análise destes dados, verificamos que os flavonóides não foram capazes de deslocar as contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina, porém após a retirada dos flavonóides do meio de perfusão, houve deslocamento das curvas para a esquerda. Os flavonóides foram capazes de reduzir o efeito contrátil máximo do órgão de maneira concentração dependente. Estes resultados serão demonstrados nas figuras 19 a 25.

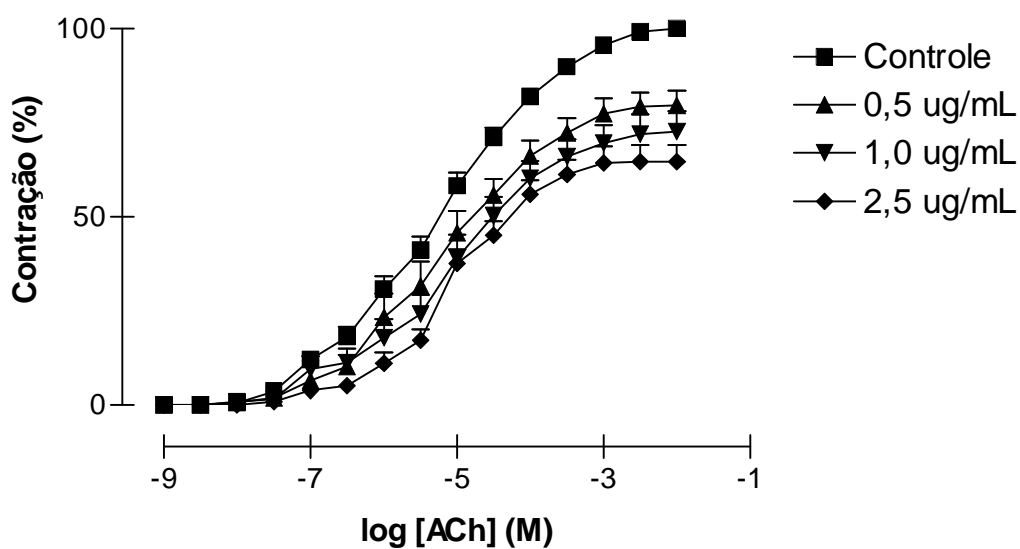


Figura 18: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5 µg/mL (▲), 1,0 µg/mL (▼) e 2,5 µg/mL (◩). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias ± erro padrão das médias de 6 a 7 experimentos.

Analisando os resultados representados na figura 19 observamos que a CE_{50} da curva controle de acetilcolina foi de $3,81 \cdot 10^{-6}$ M ($8,34 \cdot 10^{-7}$ – $1,74 \cdot 10^{-5}$ M). Quando na presença de $0,5 \mu\text{g/mL}$ da mistura dos dois flavonóides (1:1), a CE_{50} foi de $4,75 \cdot 10^{-6}$ M ($1,85 \cdot 10^{-6}$ – $1,22 \cdot 10^{-5}$ M), não diferindo da condição controle, além de manter-se após 30 minutos da lavagem da preparação com CE_{50} de $4,40 \cdot 10^{-6}$ M ($2,26 \cdot 10^{-6}$ – $8,57 \cdot 10^{-6}$ M). No entanto, essa concentração de hispidulina e eupafolina (1:1) adicionada ao banho, reduziu significativamente a resposta contrátil máxima do órgão, na presença ($t = 5,282$, $df = 10$), que foi mantida após a retirada dos flavonóides ($t = 8,474$, $df = 10$).

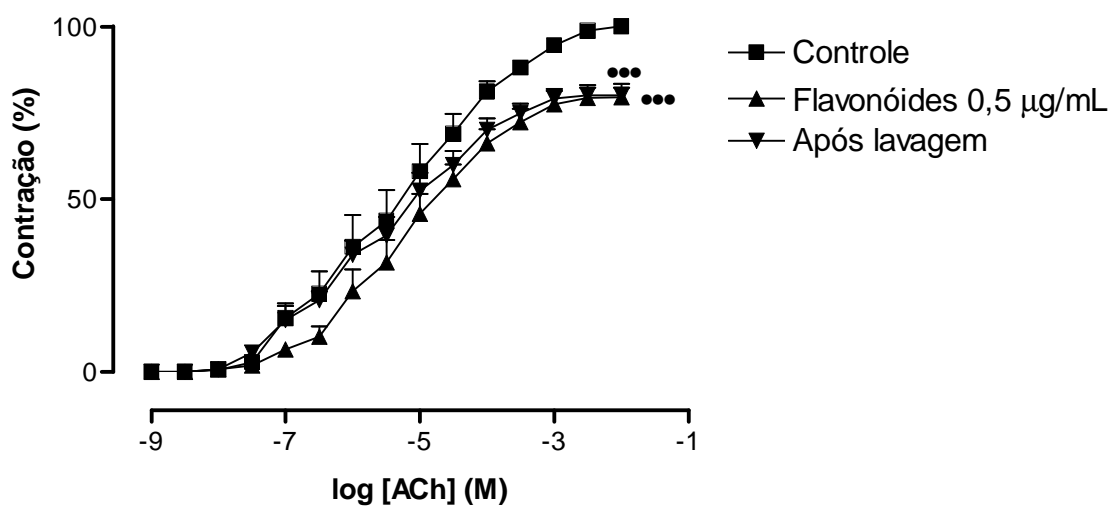


Figura 19: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de $0,5 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste ‘t’ de Student.

- $p < 0,001$ - controle x flavonóides (1:1)
- $p < 0,001$ - controle x após lavagem

Na figura 20 observamos as curvas induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina, a CE_{50} do controle de acetilcolina foi de $9,12 \cdot 10^{-6}$ M ($4,24 \cdot 10^{-6}$ – $1,96 \cdot 10^{-6}$ M) em jejuno isolado de rato. Após a incubação ao banho de perfusão para órgão isolado da concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ da mistura de hispidulina e eupafolina (1:1), não houve alteração da CE_{50} da curva de acetilcolina [$CE_{50} = 8,16 \cdot 10^{-6}$ M ($2,62 \cdot 10^{-6}$ – $2,54 \cdot 10^{-5}$ M)], mantendo esta resposta após a lavagem da preparação [$CE_{50} = 6,55 \cdot 10^{-6}$ M ($1,94 \cdot 10^{-6}$ – $2,21 \cdot 10^{-5}$ M)]. Houve, no entanto, redução significativa da resposta máxima contrátil do órgão em 27,4 % na presença dos flavonóides ($t = 4,966$, $df = 12$), mantendo-se esta redução em 31,9 % após 30 minutos da retirada dos flavonóides da preparação ($t = 6,156$, $df = 12$).

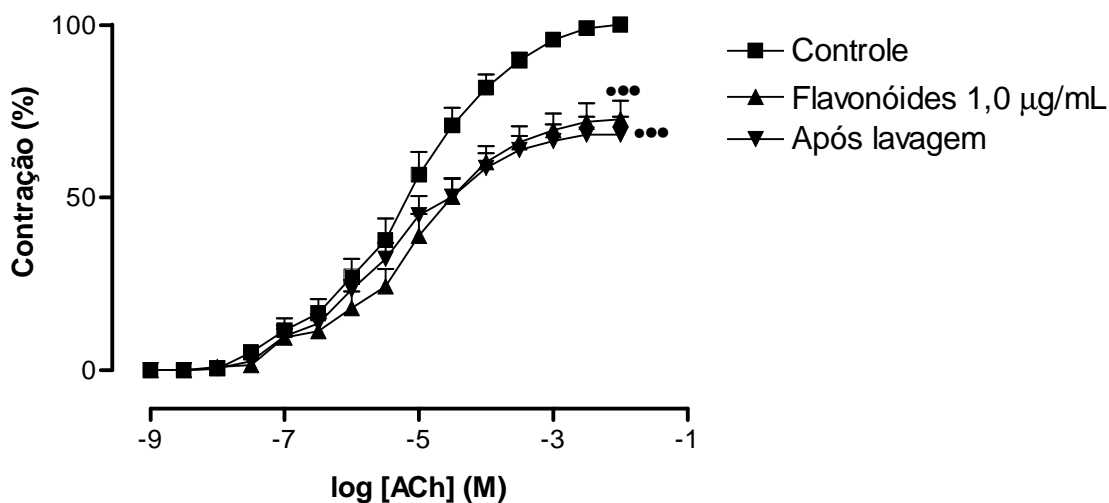


Figura 20: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise estatística foi obtida através do teste 't' de Student.

●●● $p < 0,001$ - controle x flavonóides (1:1)

●●● $p < 0,001$ - controle x após lavagem

Na figura 21 representamos a curva induzida por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} à 10^{-2} M), na ausência e na presença de $1,0 \mu\text{g/mL}$ da mistura de hispidulina e da eupafolina (1:1). Nas demais curvas demonstramos o efeito deste agonista após a retirada dos flavonóides em diferentes tempos de lavagem (30, 60, 90 e 120 minutos) ($n = 6$). Pela análise destes dados verificamos que as contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina são deslocadas para a esquerda. Este deslocamento foi proporcional ao tempo de lavagem, iniciando em 90 minutos. Estes resultados podem ser visualizados na figura 22.

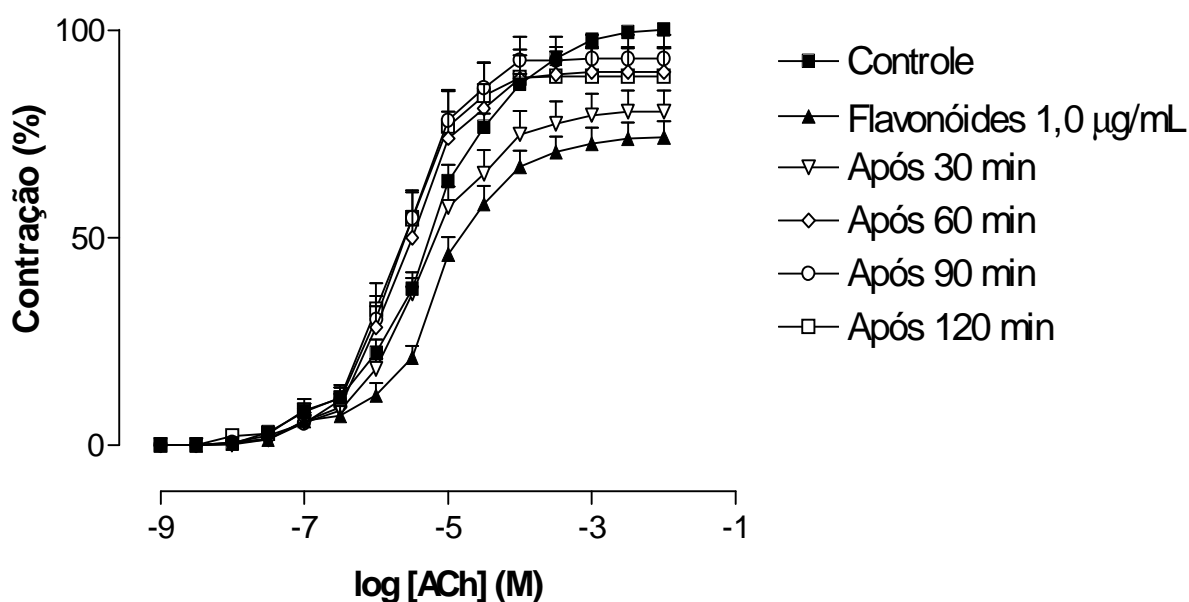


Figura 21: Contrações induzidas por concentrações cumulativas acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■), na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de 30 (▽), 60 (◇), 90 (○) e 120 minutos (□). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos.

Na figura 22 representamos as curvas induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} à 10^{-2} M), sendo que a CE_{50} do controle foi de $7,29 \cdot 10^{-6}$ M ($4,86 \cdot 10^{-6}$ – $1,09 \cdot 10^{-5}$ M). Após a adição ao banho de perfusão para órgão isolado dos flavonóides (1:1) na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$, não houve deslocamento da curva de acetilcolina [$CE_{50} = 8,34 \cdot 10^{-6}$ M ($4,57 \cdot 10^{-6}$ – $1,52 \cdot 10^{-6}$ M) e a resposta contrátil máxima do órgão foi reduzida em 25,9 % ($t = 6,558$, $df = 26$). Após 60 minutos da lavagem da preparação a CE_{50} foi de $3,33 \cdot 10^{-6}$ M ($2,03 \cdot 10^{-6}$ – $5,47 \cdot 10^{-6}$ M). Após 90 minutos da lavagem da preparação houve deslocamento significativo da curva para a esquerda [$CE_{50} = 2,97 \cdot 10^{-6}$ M ($2,02 \cdot 10^{-6}$ – $4,37 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 2,507$, $df = 19$)]. O deslocamento também pôde ser observado após 120 minutos da lavagem [$CE_{50} = 2,57 \cdot 10^{-6}$ M ($1,69 \cdot 10^{-6}$ – $3,90 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 2,734$, $df = 18$)]. As respostas máximas contráteis dos órgãos após os tempos de 30 ($t = 1,352$, $df = 26$), 60 ($t = 2,609$, $df = 19$) e 120 minutos ($t = 2,523$, $df = 18$) não retornaram aos níveis semelhantes ao controle mesmo após a retirada dos flavonóides ($n = 7$) do banho de perfusão.

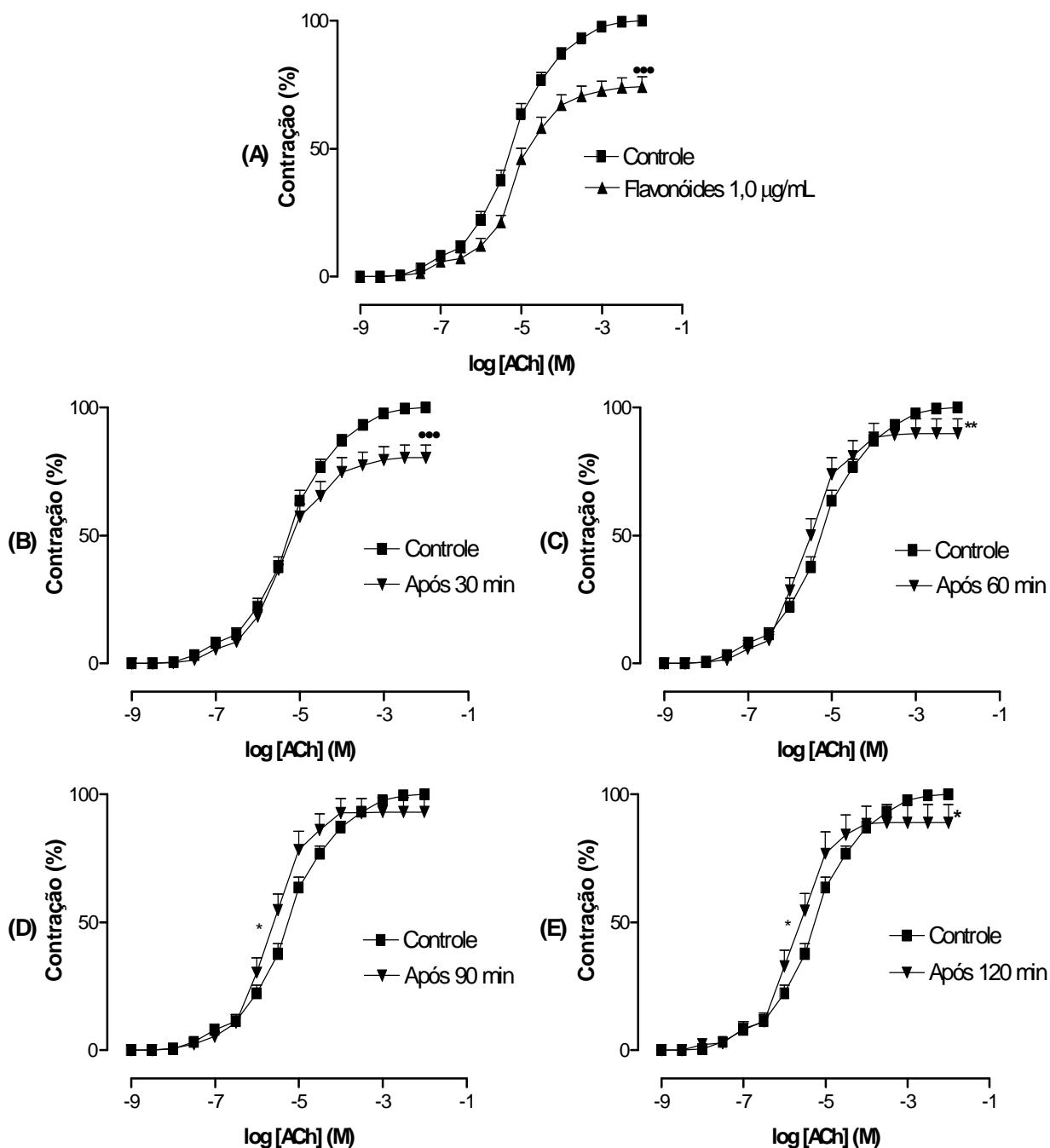


Figura 22: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■), (A) na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 1,0 µg/mL (▲) e após a retirada dos flavonóides do meio de perfusão mediante a lavagem da preparação (B) no tempo de 30 minutos (▼), (C) 60 minutos (▼), (D) 90 minutos (▼) e (E) 120 minutos (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 7 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste 't' de Student (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

Com a incubação de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de hispidulina e eupafolina (1:1) ao banho, observamos que não houve deslocamento das contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina na presença dos flavonóides quando comparados aos valores obtidos nas condições controle [CE_{50} controle = $5,46 \cdot 10^{-6}$ M ($2,89 \cdot 10^{-6}$ – $1,03 \cdot 10^{-5}$ M); CE_{50} flavonóides = $1,03 \cdot 10^{-6}$ M ($7,35 \cdot 10^{-6}$ – $1,44 \cdot 10^{-5}$ M)]. Porém, após 30 minutos da retirada dos flavonóides e repetição das contrações induzidas por acetilcolina, foi verificado um desvio da curva para a esquerda [CE_{50} após lavagem = $2,00 \cdot 10^{-6}$ M ($1,13 \cdot 10^{-6}$ – $3,54 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 2,281$, $\text{df} = 10$)]. Os flavonóides na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a resposta máxima contrátil do órgão em 35,4 % ($t = 8,069$, $\text{df} = 10$). Após 30 minutos da retirada dos flavonóides do banho de perfusão, a redução da força foi mantida em 33,8 % ($t = 5,214$, $\text{df} = 10$).

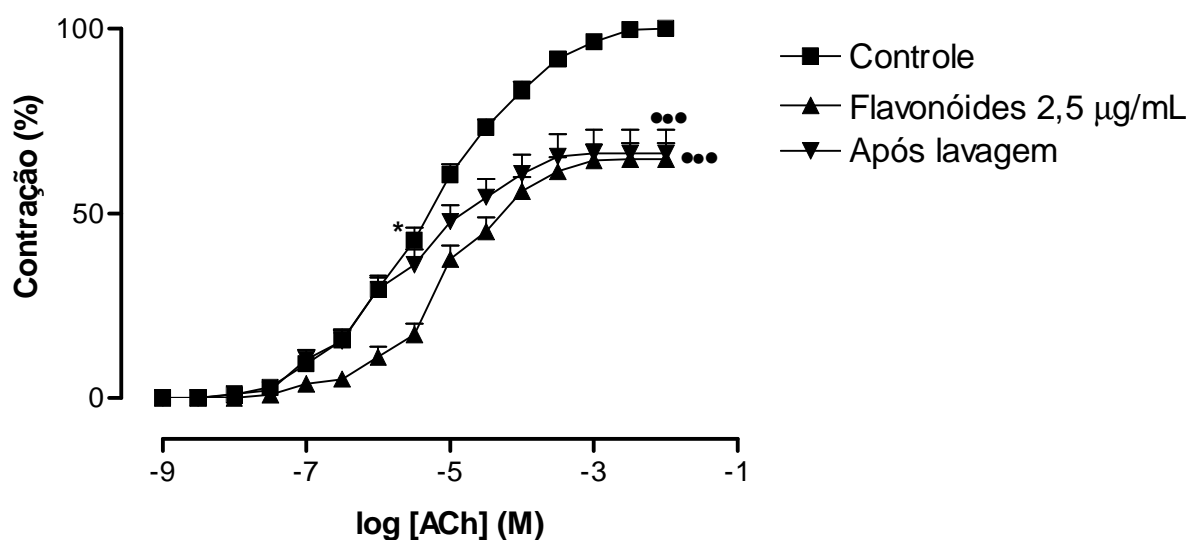


Figura 23: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■) e na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste 't' de Student.

- $p < 0,001$ - controle x flavonóides
- $p < 0,001$ - controle x após lavagem
- * $p < 0,05$ - controle x após lavagem

Na figura 24 representamos em jejuno isolado de ratos, as contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} à 10^{-2} M), tanto na presença como na ausência de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hispidulina e eupafolina na proporção de 1:1. As demais curvas representam o efeito da acetilcolina após a retirada dos flavonóides, mediante a lavagem da preparação, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos ($n = 6$). Pela análise dos resultados obtidos, verificamos que as contrações induzidas pela acetilcolina são deslocadas para a esquerda, com redução do efeito contrátil máximo. Estes resultados serão detalhadamente observados na figura 25.

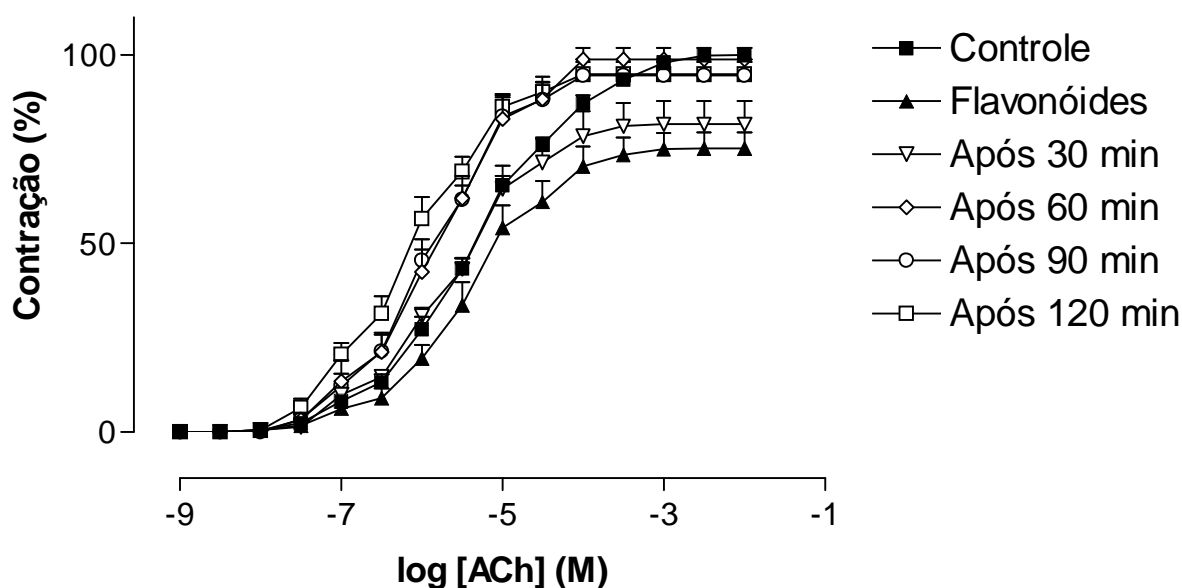


Figura 24: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratos, obtidas na ausência (■), na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de 30 (▽), 60 (◇), 90 (○) e 120 minutos (□). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos.

A preparação para órgão isolado incubada com concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} à 10^{-2} M), produziu CE_{50} de $5,29 \cdot 10^{-6}$ M ($3,74 \cdot 10^{-6}$ – $7,47 \cdot 10^{-6}$ M), conforme pode ser visualizado na figura 25. Após a adição de $2,5 \mu\text{g/mL}$ dos flavonóides (1:1), a curva de acetilcolina manteve-se semelhante aos valores controle [$CE_{50} = 4,80 \cdot 10^{-6}$ M ($2,60 \cdot 10^{-6}$ – $8,85 \cdot 10^{-6}$ M)], porém a resposta contrátil máxima foi reduzida em 24,8 % ($t = 5,796$, $df = 22$). Após 30 minutos da retirada dos flavonóides e repetição das contrações induzidas por acetilcolina, houve deslocamento para a esquerda de forma significativa [$CE_{50} = 2,93 \cdot 10^{-6}$ M ($2,11 \cdot 10^{-6}$ – $4,07 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 2,203$, $df = 22$)]. Esta resposta foi mantida após 60 minutos [$1,99 \cdot 10^{-6}$ M ($1,27 \cdot 10^{-6}$ – $3,10 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 3,058$, $df = 16$)], 90 minutos [$CE_{50} = 1,67 \cdot 10^{-6}$ M ($1,21 \cdot 10^{-6}$ – $2,29 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 3,8430$, $df = 16$)] e 120 minutos [$CE_{50} = 6,87 \cdot 10^{-6}$ M ($3,26 \cdot 10^{-6}$ – $1,44 \cdot 10^{-6}$ M) ($t = 5,336$, $df = 16$)]. Houve redução da resposta contrátil máxima do jejuno frente a acetilcolina após a lavagem e a retirada dos flavonóides do banho de perfusão nos tempos de 30 ($t = 2,971$, $df = 22$) e 90 minutos ($t = 2,219$, $df = 16$) ($n = 6$).

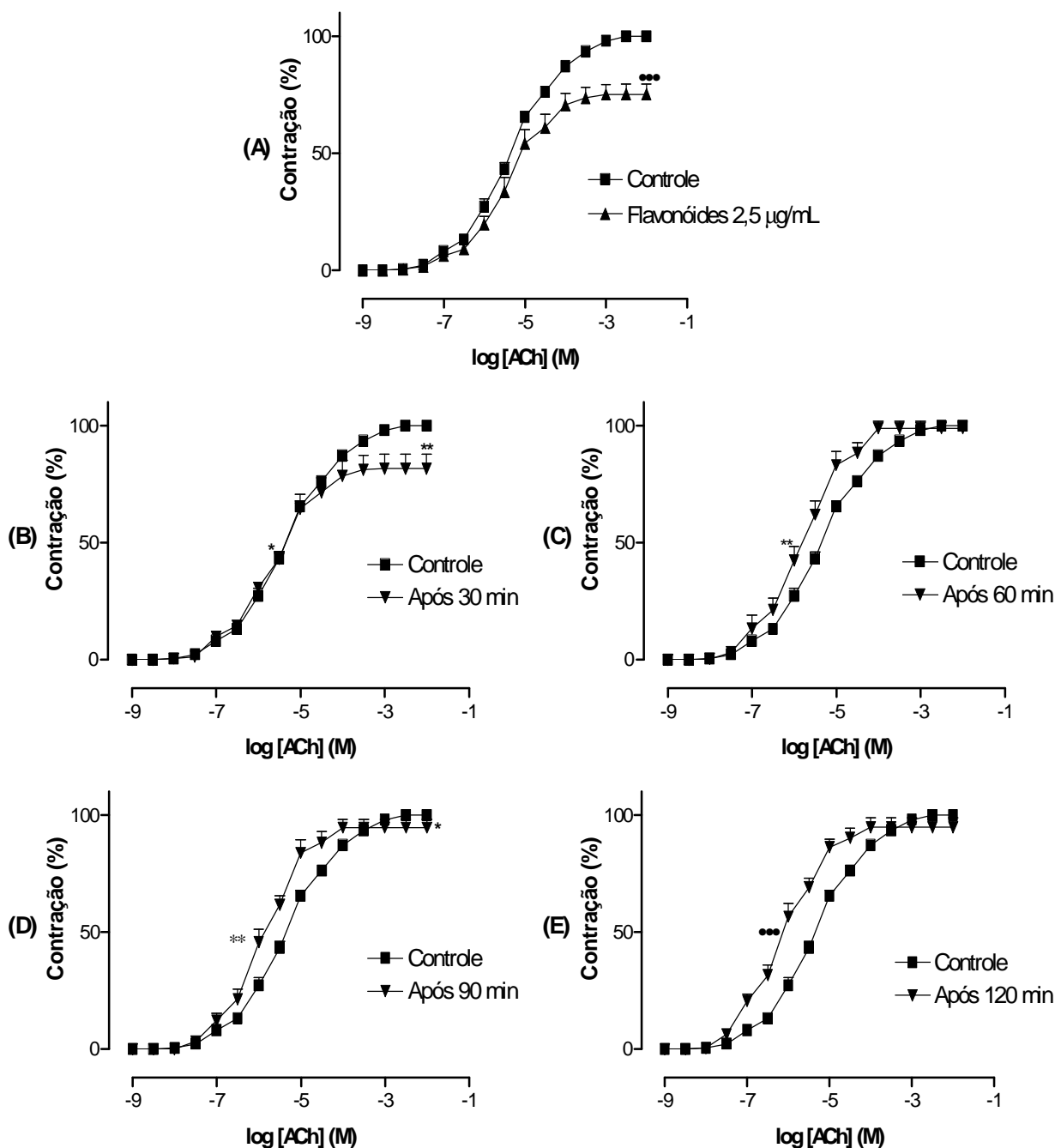


Figura 25: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (ACh) em jejuno isolado de ratas, obtidas na ausência (■), (A) na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (B) no tempo de 30 minutos (▼), (C) 60 minutos (▼), (D) 90 minutos (▼) e (E) 120 minutos (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise dos resultados foi obtida através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ●●● $p < 0,001$).

5.1.5 Efeitos dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) nas contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio em útero isolado de ratas:

O útero de ratas foi isolado e colocado em solução nutritiva despolarizante para verificação dos efeitos contráteis de concentrações cumulativas e crescentes de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M).

Na figura 26, representamos a curva resultante da adição de concentrações cumulativas de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M) e as contrações induzidas por cálcio na presença de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ da mistura de flavonóides, hispidulina e eupafolina na proporção de 1:1. Pela análise destes dados não foi houve deslocamento da curva concentração efeito de cálcio, tampouco diminuição da resposta máxima contrátil do útero ao cálcio em meio despolarizante. Tais resultados serão melhores demonstrados nas figuras 27 a 29.

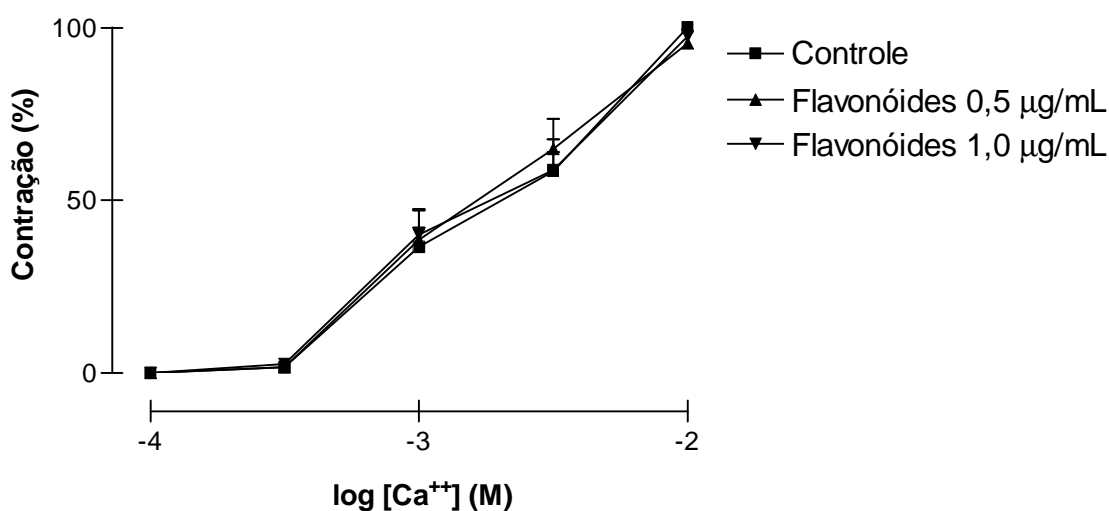


Figura 26: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{++}) em útero isolado de ratas mantido em meio despolarizante, obtidas na ausência (■) e na presença dos flavonóides, hispidulina e eupafolina (1:1), nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos.

Na figura 27 demonstramos que os flavonóides na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (1:1) não foram capazes de deslocar significativamente a CE_{50} do cálcio em útero isolado de ratas mantido em meio despolarizante [$\text{CE}_{50} = 1,62 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($1,08 \cdot 10^{-3} - 2,42 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)] quando comparado à condição controle [$\text{CE}_{50} = 1,84 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($1,40 \cdot 10^{-3} - 2,42 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)], e tampouco após a retirada dos flavonóides mediante a lavagem da preparação [$\text{CE}_{50} = 2,17 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($1,61 \cdot 10^{-3} - 2,92 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)]. Essa concentração dos flavonóides também não foi capaz de alterar a contração máxima do órgão, resposta que foi mantida mesmo após 30 minutos da retirada dos flavonóides.

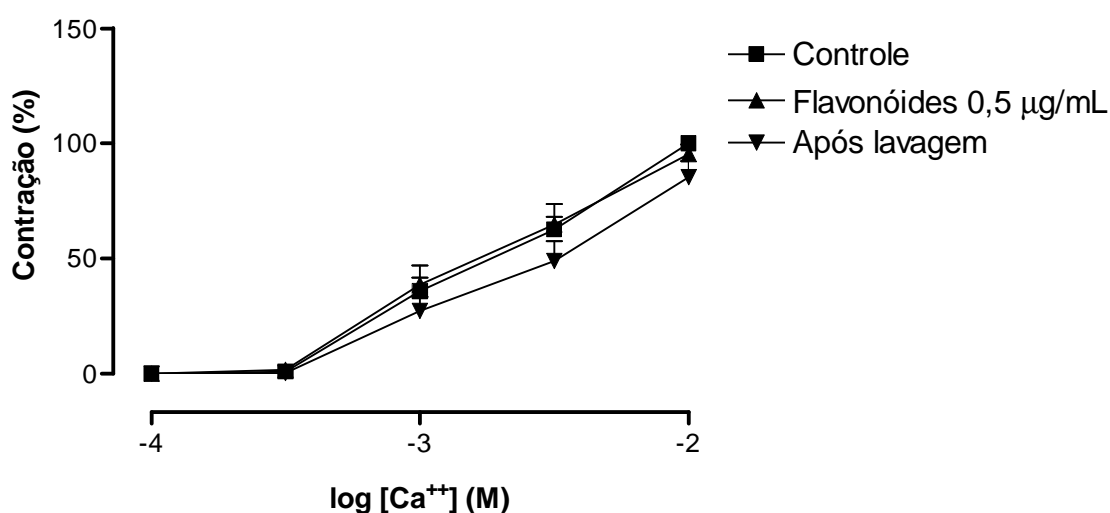


Figura 27: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas mantido em líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada destes flavonóides do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

Na figura 28 demonstramos a contração do útero imerso em líquido nutritivo despolarizante frente às concentrações cumulativas de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M). A concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ da hispidulina e da eupafolina (1:1) não alterou a resposta contrátil máxima do órgão frente ao agonista, porém 30 minutos após a lavagem da preparação, observamos potencialização da resposta contrátil máxima do útero em 22,3 %, não sendo, no entanto possível a obtenção de significância estatística quando da comparação com o controle. Não houve deslocamento da curva concentração efetiva de cálcio após a adição dos flavonóides e tampouco após 30 minutos da retirada destes do meio de perfusão [CE_{50} controle = $2,01 \cdot 10^{-3}$ M ($1,18 \cdot 10^{-3}$ – $3,42 \cdot 10^{-3}$ M), CE_{50} flavonóides = $1,77 \cdot 10^{-3}$ M ($1,18 \cdot 10^{-3}$ – $2,65 \cdot 10^{-3}$ M), CE_{50} após lavagem = $2,18 \cdot 10^{-3}$ M ($1,25 \cdot 10^{-3}$ – $3,82 \cdot 10^{-3}$ M)].

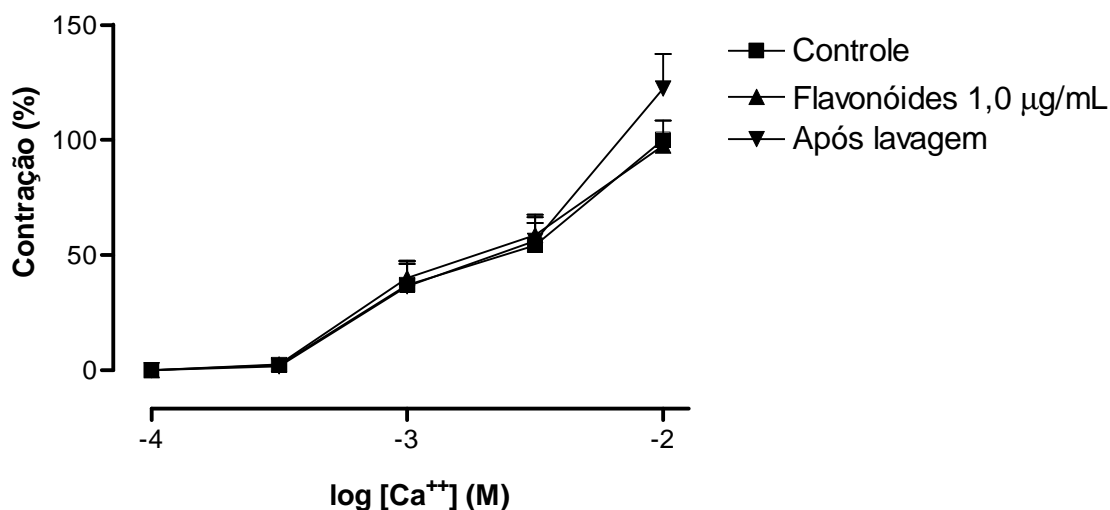


Figura 28: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas mantido em líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

Na figura 29 representamos a curva controle de cálcio (10^{-4} a 10^{-2} M), na presença e na ausência de $1,0 \mu\text{g/mL}$ da mistura de flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1). Nas demais curvas demonstramos o efeito do cálcio após a lavagem e retirada dos flavonóides após os tempos de 30 e 60 minutos ($n = 6$). Pela análise estatística realizada, verificamos que as contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio não foram deslocadas, apesar de existir uma tendência de aumento da resposta máxima contrátil do útero após 60 minutos da lavagem da preparação.

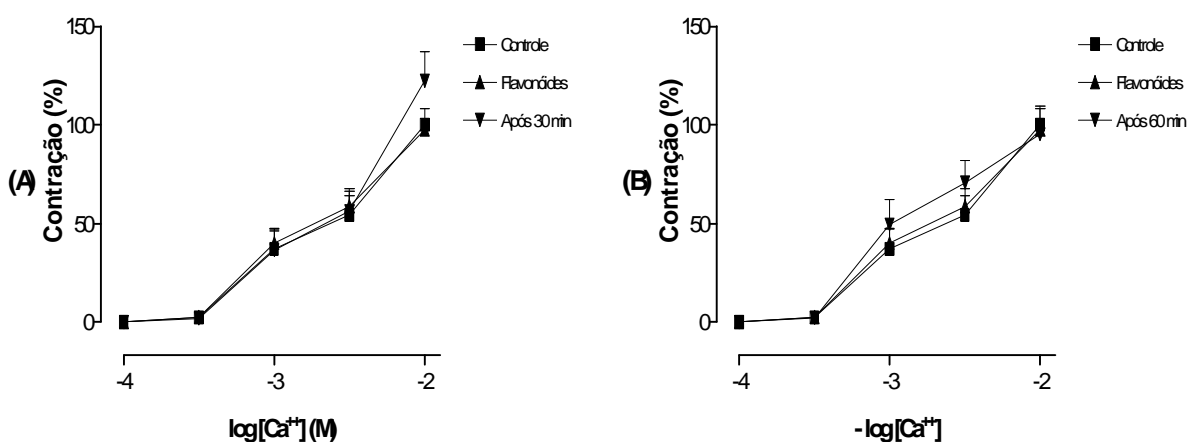


Figura 29: Contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio (Ca^{2+}) em útero isolado de ratas com líquido nutritivo despolarizante (K^+ 80 mM), obtidas na ausência (■), na presença dos flavonóides hispidulina e eupafolina (1:1) na concentração de $1,0 \mu\text{g/mL}$ (▲) e após a lavagem e retirada dos flavonóides do meio de perfusão nos tempos de (A) 30 minutos (▼) e (B) 60 minutos (▼). Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 6 experimentos. A análise estatística aplicada foi o teste 't' de Student.

5.2 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE ANFÍBIO

5.2.1 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na contração potássica

Para o estudo da atividade do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura esquelética, foram realizadas, no músculo sartório intacto de rã, contrações potássicas induzidas por 40 mM e por 100 mM de K^+ , anteriores e posteriores à incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto. Na figura 30, observamos que após a exposição do músculo ao extrato bruto metanólico, houve uma potencialização da contração potássica induzida por 40 mM e por 100 mM K^+ . A potencialização quando analisadas em relação à contração induzida por 100 mM de K^+ foi de 5,36 e 6,81 vezes, respectivamente. Verifica-se também que o extrato bruto induziu, durante o período de incubação, 84,6% da contração obtida com 100 mM de K^+ .

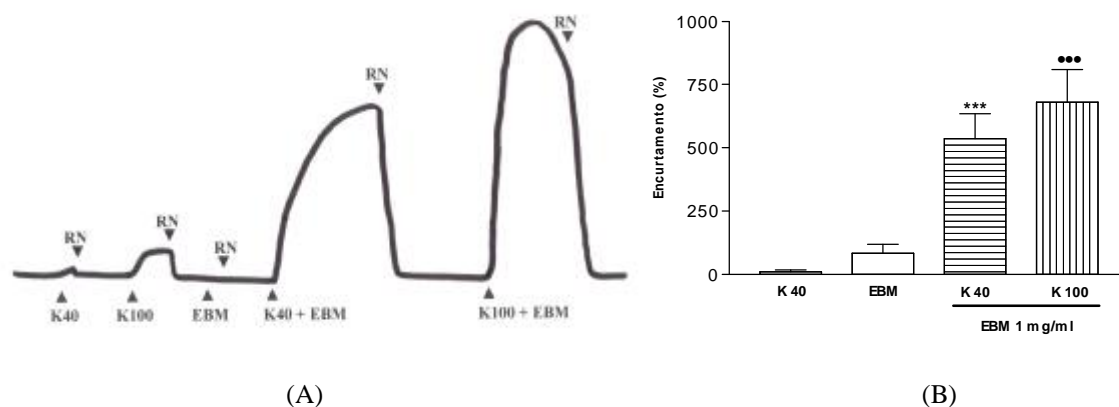


Figura 30: (A) Contrações isotônicas induzidas por 40 e 100 mM de potássio, na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 5 experimentos. Os dados expressos em percentuais estão normalizados para a contração obtida com 100 mM de K^+ que foi considerada como sendo 100 % ($n = 5$). A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

*** $p < 0,01$ – controle (100 mM K^+) x EBM/40 mM K^+

●●● $p < 0,001$ – controle (100 mM K^+) x EBM/100 mM K^+

5.2.2 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e do Tween 80 na contratura cafeínica

Na figura 31, observamos o efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na contratura cafeínica em músculo sartório intacto de rã. Contraturas controle foram induzidas por cafeína (2 mM) e repetidas após 40 minutos de incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico. Houve aumento significativo da contratura induzida pela cafeína em 11,4 vezes após a incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto, quando normalizado pela contratura potássica induzida por 100 mM de K⁺.

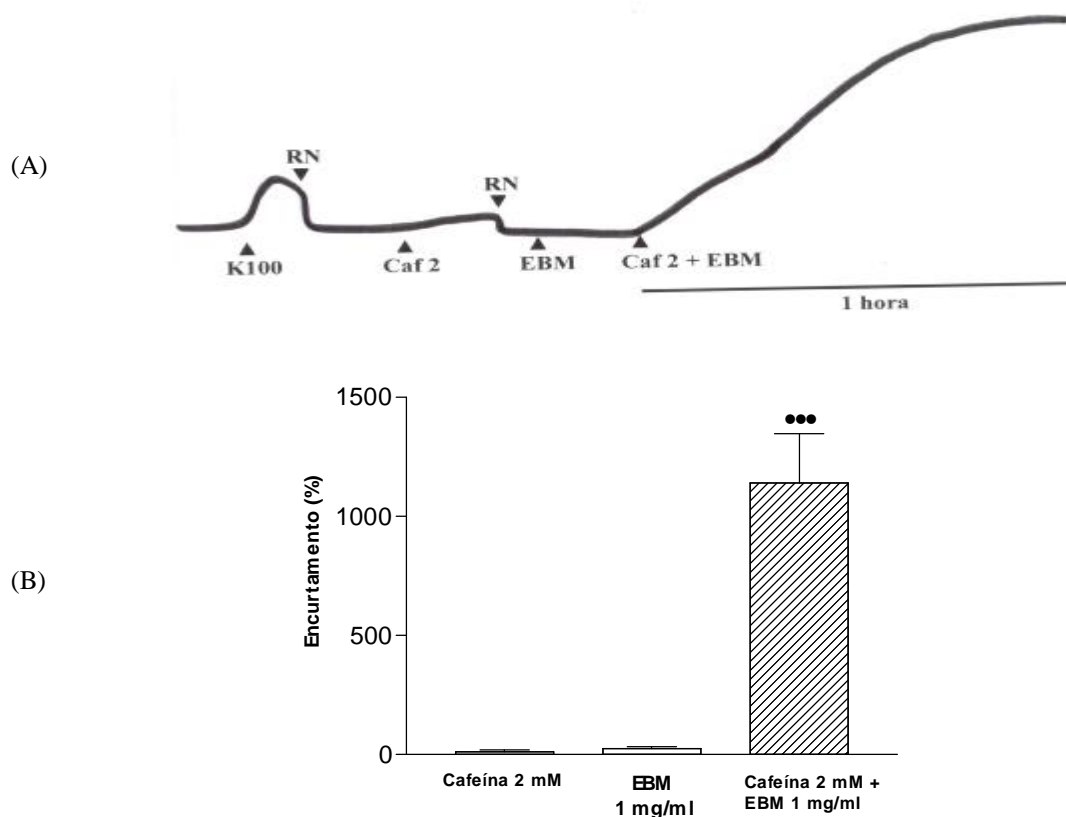


Figura 31: (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 5 experimentos. Os dados estão normalizados para os valores de encurtamento (em percentual) obtidos com 100 mM de K⁺ que foi considerada como sendo 100 %. A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

*** p < 0,001 – controle (cafeína 2 mM) x EBM/cafeína 2 mM

Na figura 32, verificamos o efeito do solvente Tween 80 que foi utilizado como auxiliar na solubilidade do extrato bruto e do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, na contração cafeínica em músculo sartório intacto de rã. Contrações controle foram induzidas por cafeína (2 mM) e repetidas após 40 minutos de incubação com 0,1 mL/mL do solvente e repetidas após 40 minutos de incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto. Verificamos que o Tween 80 não interferiu na contração induzida pela cafeína, demonstrando que este solvente não é o responsável pela contração observada. Enquanto que, após a exposição do músculo ao extrato bruto, houve potencialização da contração induzida pela cafeína em 5,74 vezes, quando comparada à contração induzida pelo potássio 100 mM.

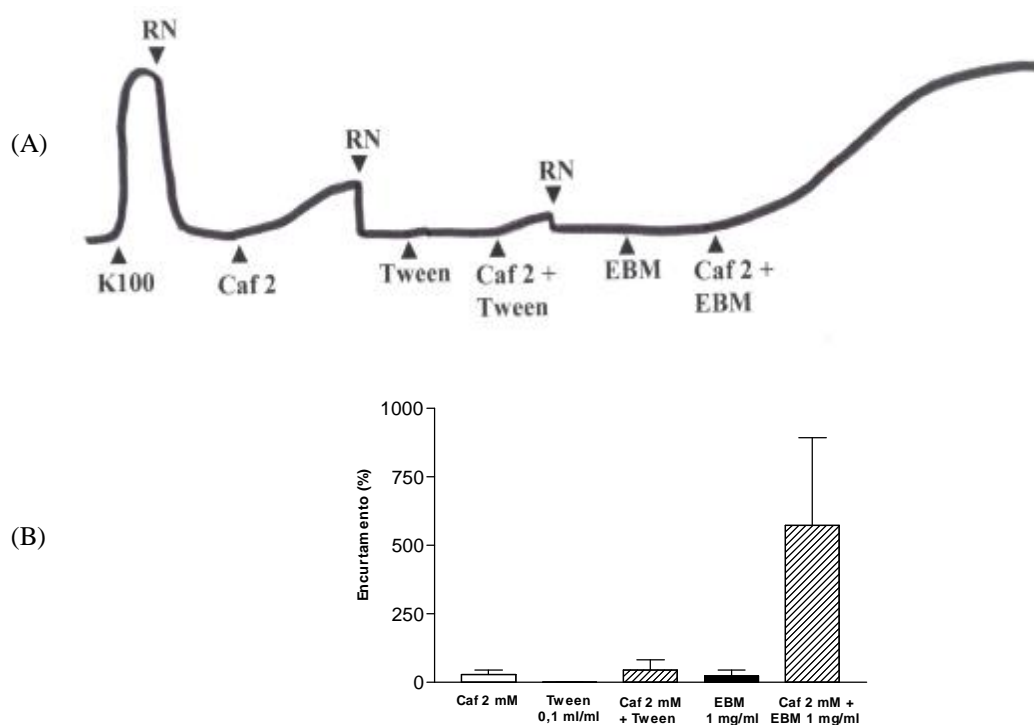


Figura 32: (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína. Contrações cafeínicas induzidas na presença e na ausência de 0,1 mL/mL de Tween 80 e na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 4 experimentos. Os dados estão normalizados para os valores de encurtamento (em percentual) obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

5.2.3 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na contratatura caféinica em meio com 100 mM de K⁺

Na figura 33, observamos o efeito de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico na contratatura induzida por 2 mM de cafeína, em músculo sartório de rã mantido em líquido nutritivo despolarizante. Verificamos que o extrato potencializou a contratatura caféinica em 3,13 vezes quando normalizado pela contratatura induzida por 100 mM de potássio (A-B).

De maneira a confirmar a independência da cafeína em induzir contrações em meio despolarizante, realizamos um protocolo utilizando 4 mM de cafeína (C), para ser considerado controle positivo.

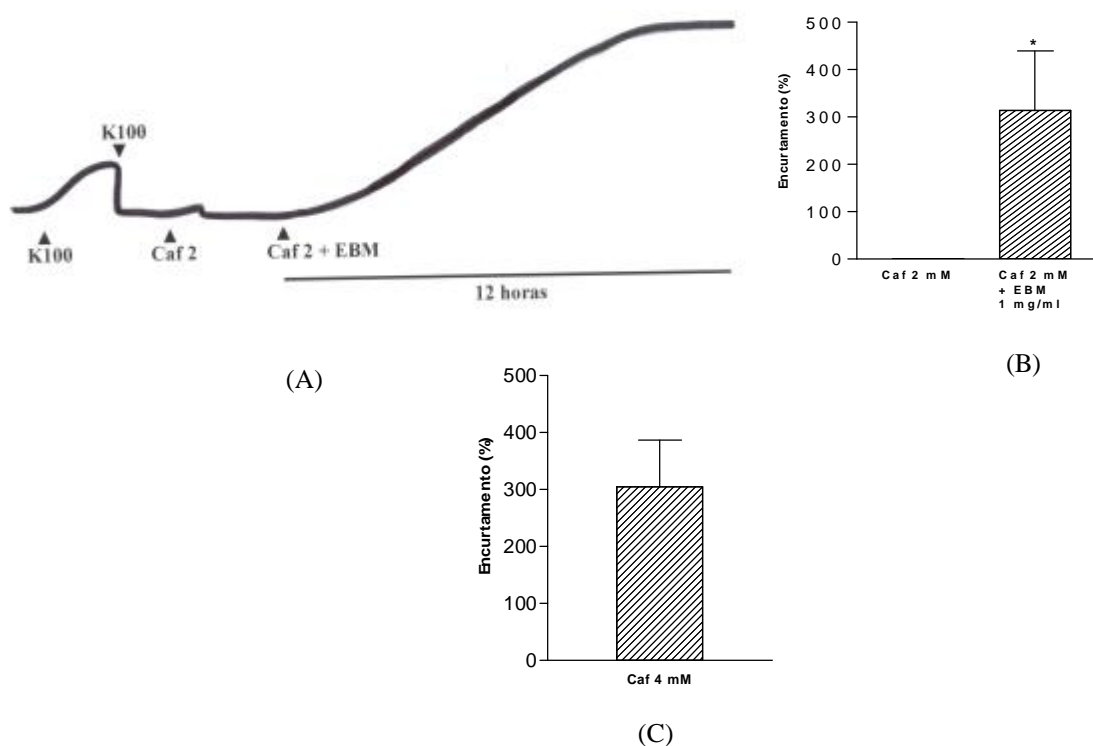


Figura 33: (A-B) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, em meio despolarizante contendo 100 mM de potássio, na ausência e na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (C) Contração caféinica induzida por 4 mM de cafeína em meio contendo 100 mM de potássio. As colunas representam as médias \pm EPM de 3 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K⁺. A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

* $p < 0,05$ – controle (cafeína 2 mM) x EBM/cafeína 2 mM

5.2.4 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na contratura cafeínica em meio 0 - Ca⁺⁺ nominal e com 100 mM de K⁺

Para avaliar a atividade do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na contratura cafeínica, utilizamos também soluções isentas de Ca⁺⁺ e com 100 mM de K⁺, de forma a possibilitar a verificação de uma possível interferência do cálcio extracelular e da despolarização na potencialização da contratura cafeínica quando na presença de 1,0 mg/mL do extrato. Dessa forma, após 30 minutos da contração muscular induzida por 2 mM de cafeína, o extrato foi adicionado ao meio e verificamos que a potencialização da contração foi na ordem de 25% da contratura potássica, como pode ser verificado na figura abaixo.

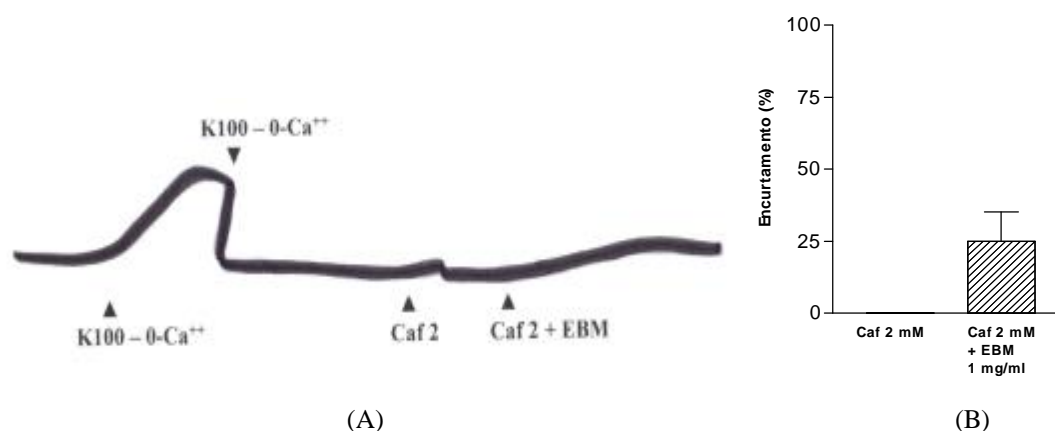


Figura 34: (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, em meio isento de cálcio e na presença de 100 mM de potássio, na ausência e na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 3 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K⁺. A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

5.2.5 Efeito do flavonóide eupafolina na contratura cafeínica

Na figura 35, verificamos o efeito do flavonóide eupafolina na contratura induzida pela cafeína em músculo cutâneo-peitoral intacto de rã. As curvas controles foram realizados com 100 mM de K^+ e com cafeína 2 mM. O flavonóide eupafolina, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado ao banho de perfusão contendo cafeína e foi capaz de induzir contração de 2 formas distintas. Em um primeiro momento foi observada uma contração fásica, seguida de relaxamento. Logo após, o músculo voltou a contrair, porém agora de forma tônica. Verificamos aumento significativo da contratura cafeínica em 47,7% da contratura potássica após a adição de 100 $\mu\text{g/mL}$ do flavonóide eupafolina.

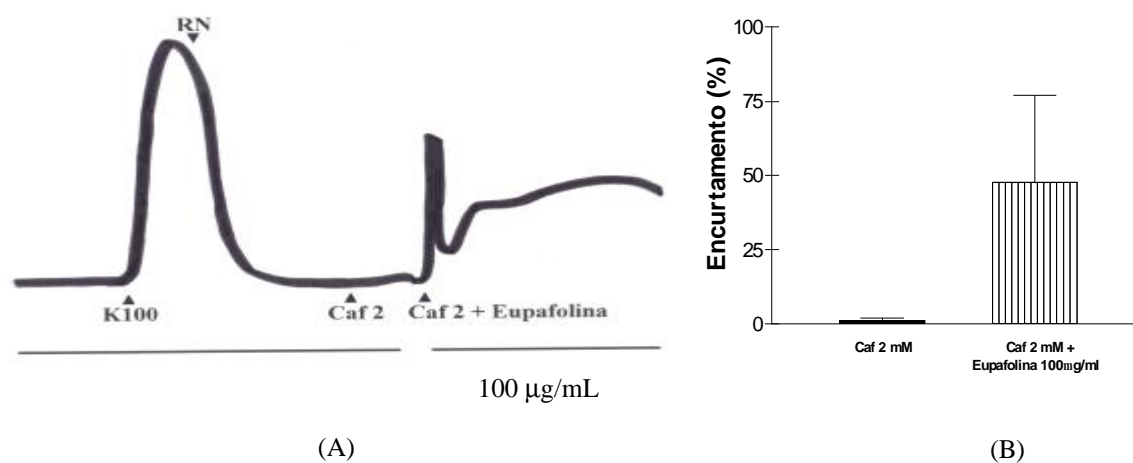


Figura 35: (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, na ausência e na presença de 100 $\mu\text{g/mL}$ do flavonóide eupafolina. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 6 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

5.2.6 Efeito do flavonóide hispidulina na contratura cafeínica

Observamos, na figura 36, o efeito do flavonóide hispidulina na contratura cafeínica em músculo cutâneo-peitoral intacto de rã. Contratura controle foi induzida por 2 mM de cafeína, na ausência e na presença de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da hispidulina. Semelhante ao observado na figura anterior, houve primeiramente uma contração fásica, seguida de uma contração tônica, o que representou uma potencialização da contratura induzida pela cafeína em 94,5 % quando normalizada pela contratura potássica.

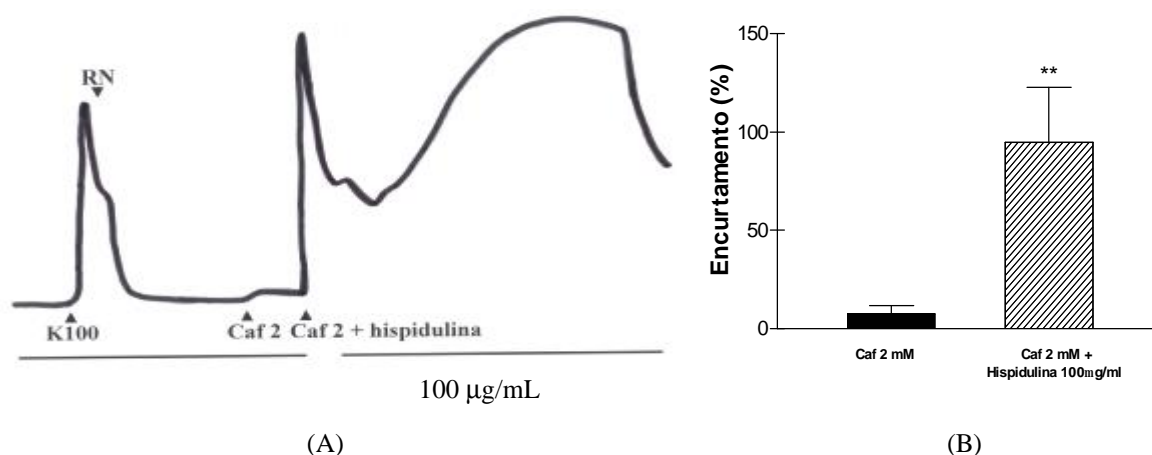


Figura 36: (A) Contrações isotônicas induzidas por 2 mM de cafeína, na ausência e na presença de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do flavonóide hispidulina. (B) As colunas representam as médias \pm EPM de 6 experimentos. Os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos com 100 mM de K^+ . A análise estatística aplicada foi o de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey.

** $p < 0,01$ – controle (cafeína 2 mM) x hispidulina/cafeína 2 mM

5.3 ATIVIDADE NA MUSCULATURA ESQUELÉTICA DE MAMÍFERO

5.3.1 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em diafragma de mamífero com estimulação elétrica:

Para verificarmos a interferência do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura esquelética, utilizamos o músculo diafragma de camundongos. Estes foram mantidos imersos em solução nutritiva de Tyrode, à temperatura de 35°C e constantemente aerado com carbogênio (mistura de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂).

Os músculos foram conectados a um transdutor de força e as contrações isométricas foram induzidas por estimulação direta das fibras musculares.

5.3.1.1 Efeito do tempo de estimulação direta sobre o diafragma:

Foi adicionado ao banho de perfusão, 10 μM de d-tubocurarina, objetivando excluir as contrações induzidas pelas terminações nervosas. Este músculo permaneceu em estabilização por 30 minutos, onde foram analisados a contratura e o encurtamento do músculo, como pode ser observada na figura 37. Este tempo de contração muscular, induzido eletricamente, foi utilizado como controle da preparação, já que não foi possível verificar qualquer alteração na contratura ou no encurtamento do músculo neste tempo de 30 minutos.

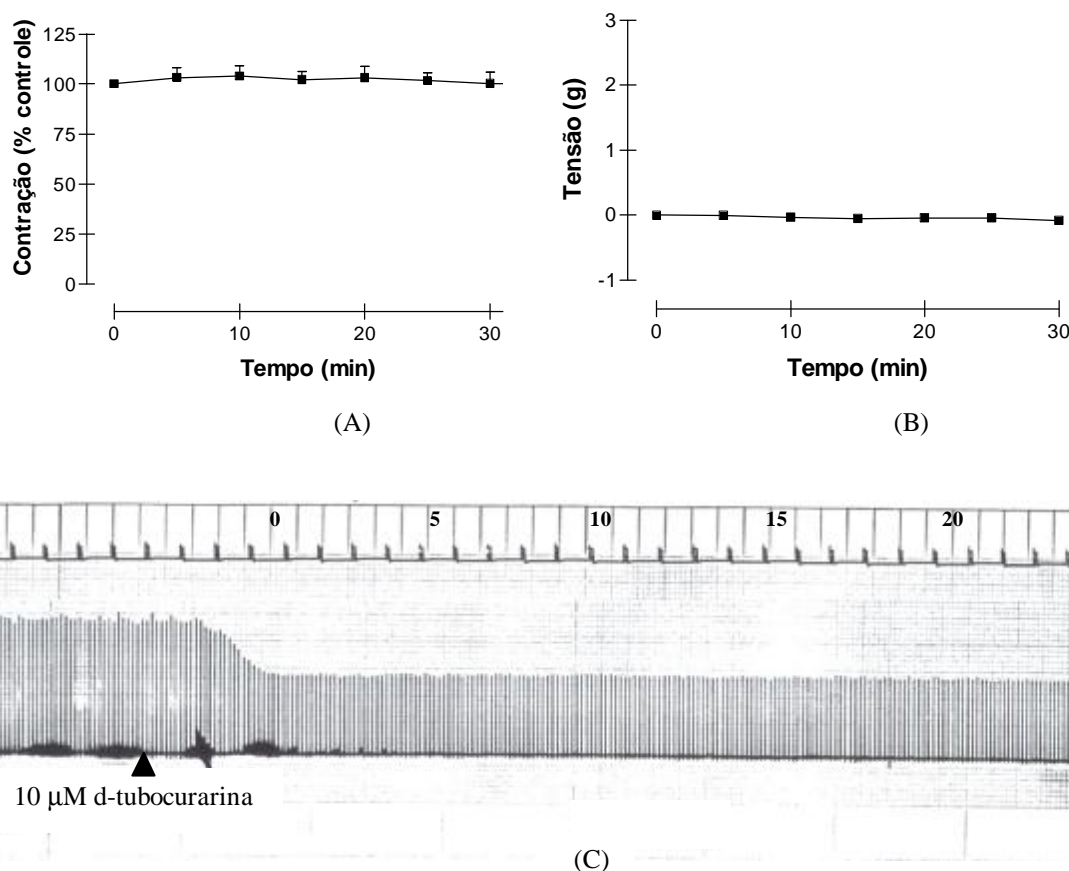


Figura 37: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após adição de d-tubocurarina ao banho de perfusão. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g; (C) registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 5 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student.

5.3.1.2 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e do veículo Tween sobre o diafragma com estimulação direta:

Após estabilização do músculo isolado, foi adicionado ao banho de perfusão, 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e foram avaliados os efeitos na musculatura esquelética de mamíferos, quanto à contratura e ao encurtamento do músculo durante 40 minutos, após este período a preparação foi lavada com o líquido nutritivo e foram observados os efeitos após a retirada do extrato, durante 40 minutos. O mesmo protocolo foi realizado, paralelamente, adicionando-se o veículo do extrato bruto, o Tween 80, que foi mantido durante 40 minutos no banho de perfusão. Observamos que o Tween 80 não foi capaz de interferir nas contrações induzidas eletricamente, conforme ilustrado na figura 38.

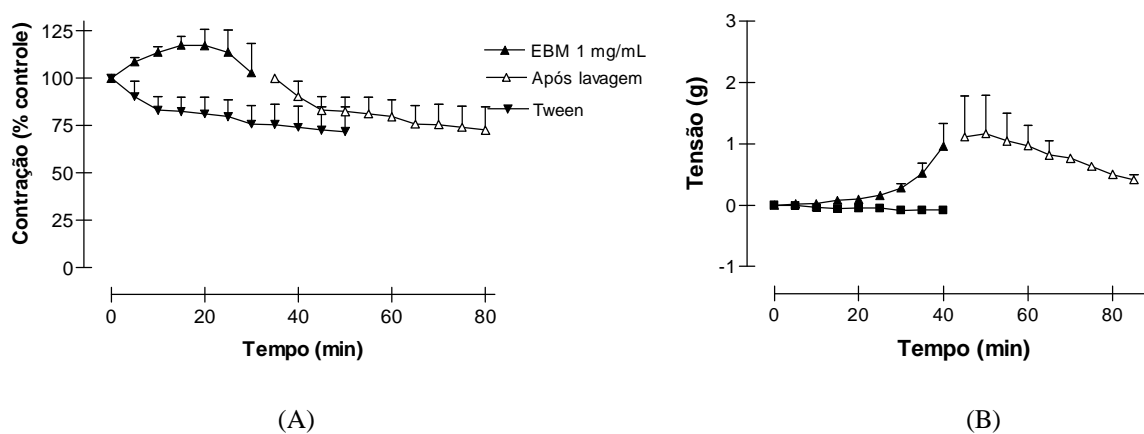


Figura 38: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença e após a retirada de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* do meio de perfusão e na presença de Tween 80. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 a 5 experimentos.

Na presença do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, utilizando o tempo zero como controle, observamos aumento do encurtamento do músculo nos tempos de 5, 10 e 15 minutos, em 8,6 % ($t = 3,984$, $df = 8$), 13,8 % ($t = 4,565$, $df = 8$) e 17,4 % ($t = 3,639$, $df = 8$), respectivamente. Observamos, também, aumento da tensão a partir de 10 minutos de incubação com o extrato. Estes dados estão demonstrados na figura 39.

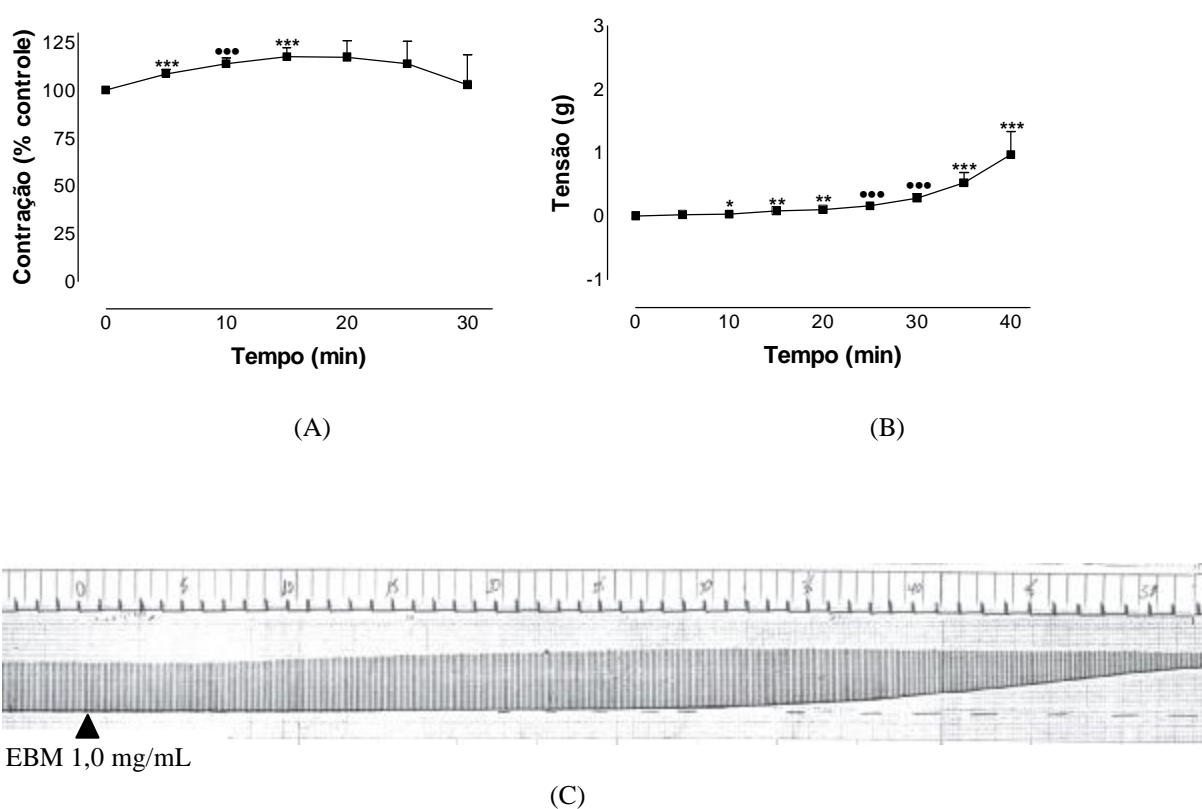


Figura 39: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após adição de d-tubocurarina ao banho de perfusão e 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ●●● $p < 0,001$).

Após 40 minutos de incubação com o extrato bruto, a preparação foi lavada com líquido nutritivo e o encurtamento do músculo e a contratura foram avaliados durante 40 minutos. Observamos, após este tempo, que ocorreu redução significativa do encurtamento do músculo a partir de 20 minutos da lavagem da preparação. No entanto, a tensão muscular manteve-se aumentada, não retornando aos níveis normais mesmo após a lavagem. Estes resultados podem ser observados na análise da figura 40.

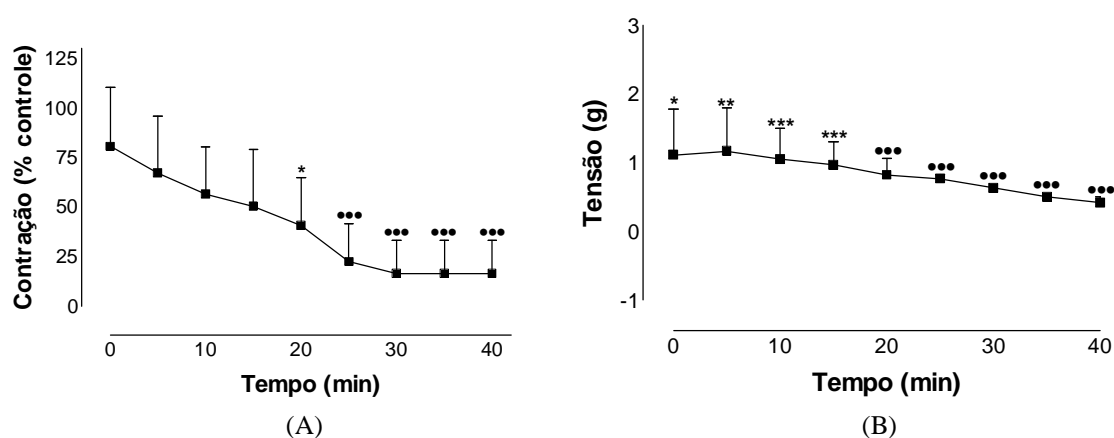


Figura 40: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, após a retirada do extrato bruto do meio de perfusão. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ●●● $p < 0,001$).

Após estabilização do músculo por 30 minutos, foi adicionado ao banho de perfusão, 0,1 mL/mL de Tween 80, já que este foi utilizado para solubilizar o extrato bruto metanólico. Os efeitos deste diluente foram observados durante 40 minutos, registrando-se continuamente a contração e o encurtamento do músculo diafragma. Não foi possível verificar qualquer alteração nesses parâmetros, indicando que o efeito observado com o extrato bruto não foi em decorrência da presença desse solvente.

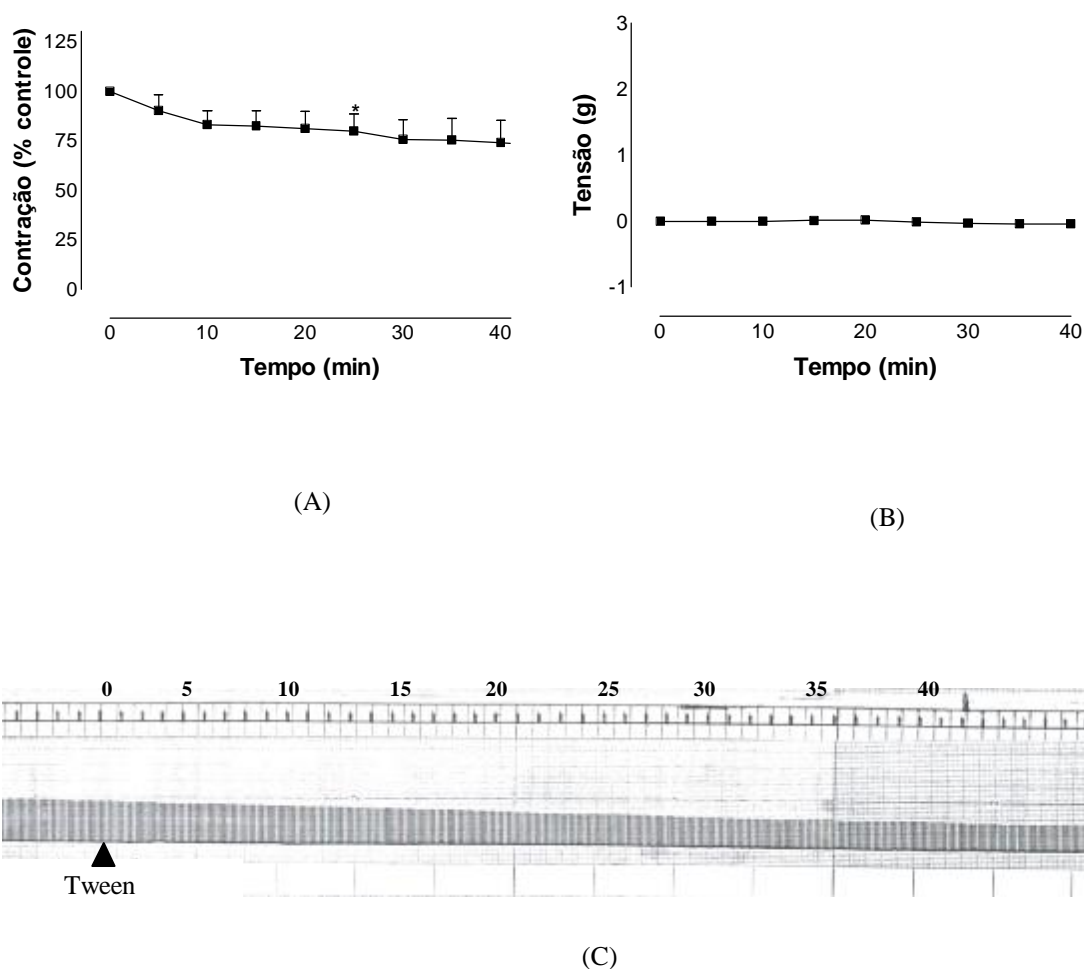


Figura 41: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença de Tween 80. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contração: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$).

Quando adicionamos ao banho de perfusão 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* para registrarmos as contrações isométricas em músculo diafragma de camundongos, usamos simultaneamente um polígrafo (Beckman) e um osciloscópio (Tektronik). Este procedimento permitiu que fotografássemos, com auxílio de uma câmera fotográfica digital, estas contrações (figura 42) para que pudéssemos posteriormente analisar e calcular o tempo e a velocidade de contração, além de possibilitar a avaliação da capacidade do músculo em produzir 50% de relaxamento, como pode ser avaliado na tabela 2.

Pudemos observar que houve um leve aumento no encurtamento deste músculo na presença de 1,0 mg/mL do extrato até o tempo de 30 minutos. Porém depois deste tempo, houve diminuição da mesma devido à contratura do músculo, como pode ser visualizado no registro original da figura 42.

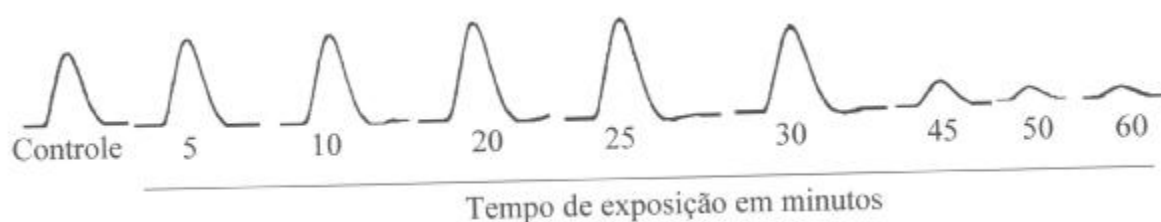


Figura 42: Registro original das contrações isométricas induzidas por estimulação direta, na presença de 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, em diferentes tempos, registrados em osciloscópio e fotografados com o auxílio de uma máquina fotográfica digital (n = 5).

Na tabela 2, verificamos que 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico reduziu o tempo de contração do músculo após 20 minutos de incubação ($t = 4,477$, $df = 6$). Além disso, houve aumento nas velocidades de contração nos tempos de 20 ($t = 13,07$, $df = 6$) e 25 minutos ($t = 6,582$, $df = 6$) e de relaxamento após 20 ($t = 2,532$, $df = 6$) e 25 minutos ($t = 4,193$, $df = 6$) de incubação.

Tabela 2: Propriedades contráteis do músculo diafragma de mamíferos (camundongos) na presença de 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*.

Tempos	TC (ms)	TR ₅₀ (ms)	VC _{máx} (g/s)	VR _{máx} (g/s)
0 min	23,6 ± 0,41	16,3 ± 0,41	40,6 ± 2,27	52,3 ± 1,04
5 min	22,4 ± 0,75	16,2 ± 0,51	46,4 ± 5,91	59,4 ± 3,37
20 min	20,8 ± 0,40 ^{***}	16,0 ± 0,20	54,8 ± 6,45 [*]	71,4 ± 0,63 ^{***}
25 min	21,8 ± 0,94	15,6 ± 0,34	63,1 ± 6,05 ^{***}	71,2 ± 3,43 ^{***}
30 min	23,5 ± 0,28	16,3 ± 0,28	45,3 ± 2,96	55,6 ± 0,07

TC = tempo de contração; TR₅₀ = Tempo para 50% do relaxamento; VC_{máx} = velocidade máxima de contração; VR_{máx} = velocidade máxima de relaxamento. Resultados representados como médias ± erro padrão das médias de 5 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$; ●●● $p < 0,001$).

5.3.1.3 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de dantrolene e do veículo propilenoglicol sobre o diafragma com estimulação direta:

Foram adicionados 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de dantrolene ao banho de perfusão e 5 minutos após, 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico. O dantrolene é usado experimentalmente como antagonista da liberação de Ca^{++} pelos receptores rianodínicos. A contratatura e o encurtamento do músculo foram observados durante 35 minutos. Este protocolo foi repetido substituindo-se o dantrolene por seu veículo, o propilenoglicol a 2 % na presença do extrato bruto e os registros obtidos foram utilizados como controle.

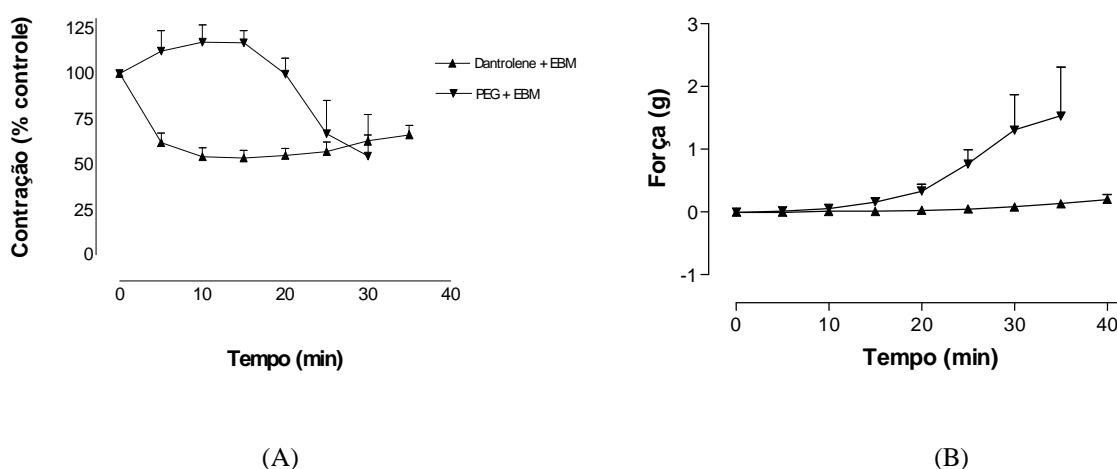


Figura 43: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, na presença de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de dantrolene e de igual volume de propilenoglicol 2 %.(A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratatura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 3 a 5 experimentos.

Após adicionarmos ao banho de perfusão 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de dantrolene houve redução do encurtamento do músculo, em decorrência da inibição da liberação de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático. Após 5 minutos, adicionamos 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico, e observamos que inicialmente o extrato bruto não foi capaz de reverter este efeito de forma significativa. Este dado pode estar indicando que a ação do extrato bruto pode estar envolvida com a liberação de Ca^{++} do retículo. Porém, a tensão foi alterada significativamente a partir de 25 minutos de incubação com o extrato bruto. Estes resultados estão demonstrados na figura 44.

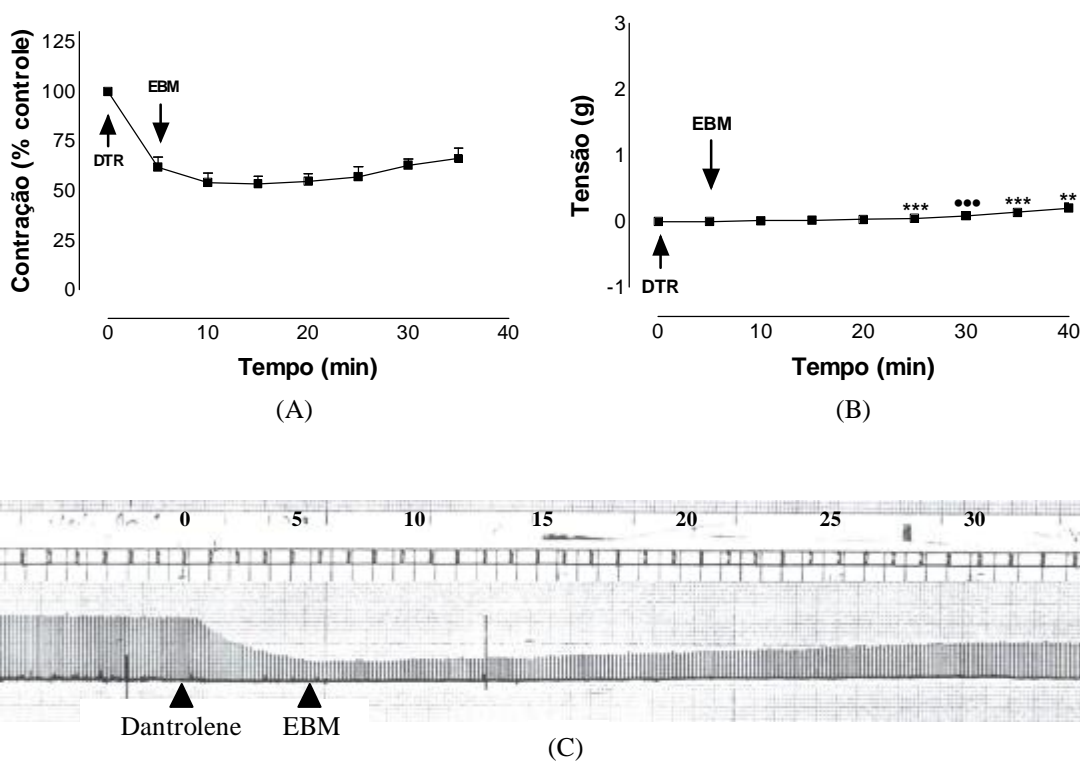


Figura 44: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de dantrolene. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 4 a 5 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; ●●● $p < 0,001$).

Foi adicionado ao banho de perfusão o veículo utilizado para solubilização do dantrolene, o propilenoglicol 2 % e 5 minutos após, adicionamos 1,0 mg/mL de extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* (figura 45). Observamos que na presença do solvente não houve alteração de resposta do extrato bruto, indicando que o propilenoglicol não é o agente responsável pelos resultados observados na figura de número 44 e, portanto, não é o agente responsável pelo bloqueio de resposta observada com o dantrolene.

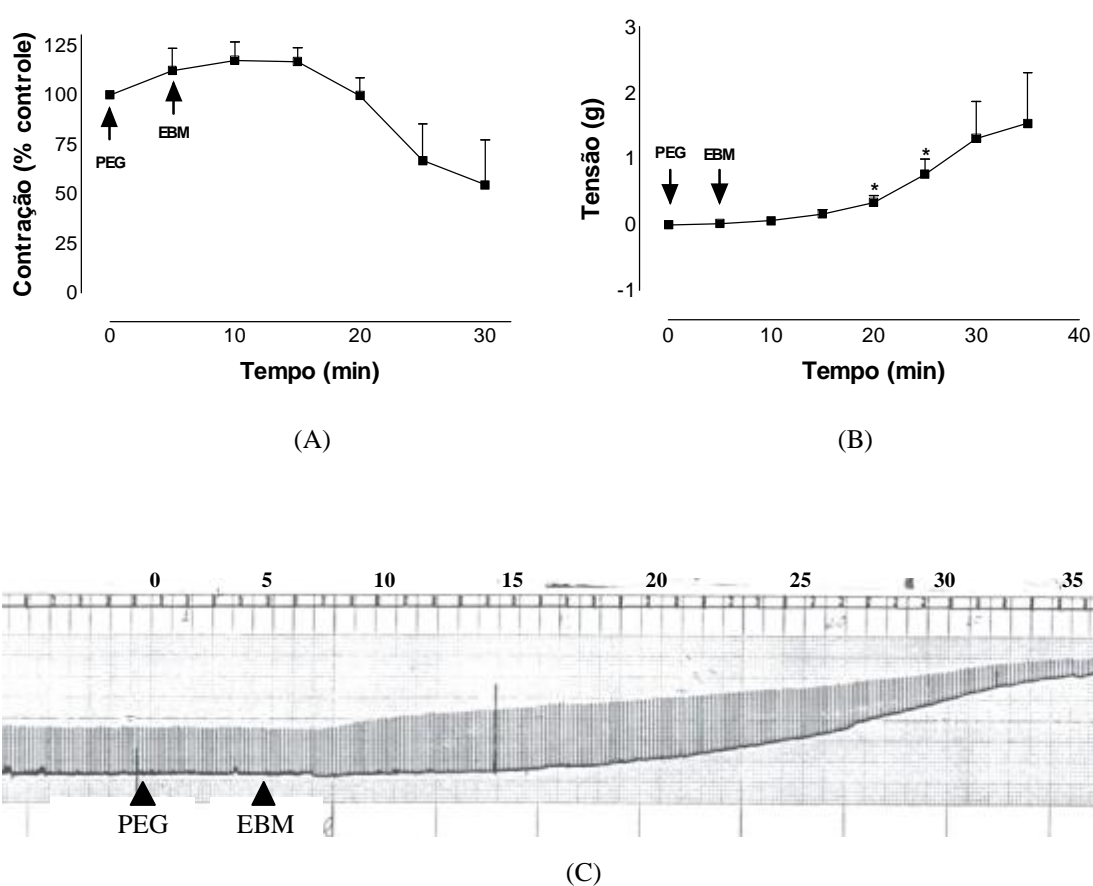
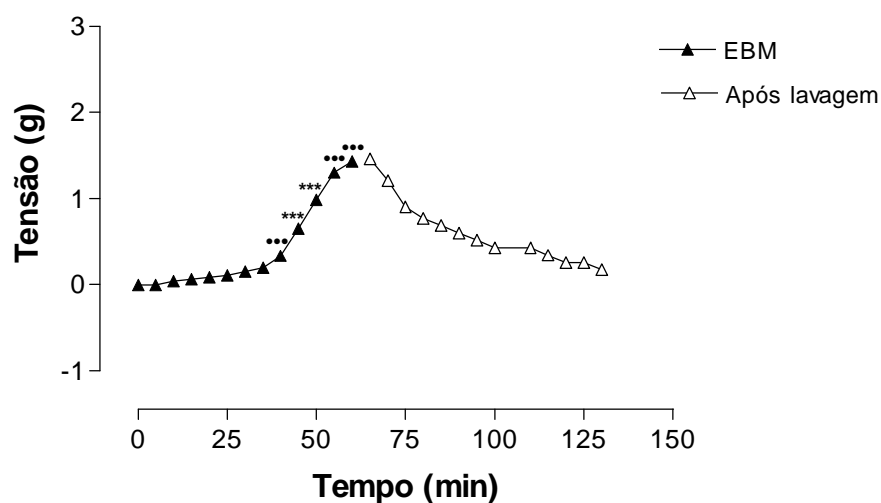


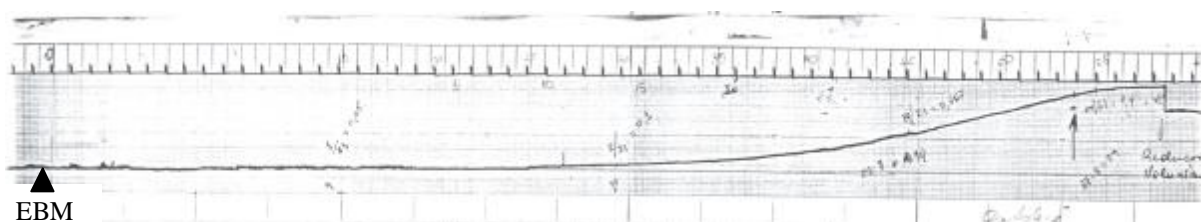
Figura 45: Contrações isométricas induzidas por estimulação direta de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na presença de propilenoglicol 2 %. (A) encurtamento: os dados estão expressos em percentuais e foram normalizados para aqueles obtidos no tempo zero, que foi considerado como 100 %. (B) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (C) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 3 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (* $p < 0,05$).

5.3.2 Efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em diafragma de mamífero sem estimulação elétrica:

A preparação permaneceu em estabilização por 30 minutos após a adição de 10 μ M de d-tubocurarina. Foi observada a contratura do músculo, durante 60 minutos na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e 70 minutos após a sua retirada do banho de perfusão. Observamos que o extrato bruto foi capaz de aumentar significativamente a tensão deste músculo. Após a lavagem da preparação, a contração do músculo retornou aos níveis normais.



(A)



(B)

Figura 46: Contrações isométricas induzidas na presença e na ausência de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* (A) contratura: os dados estão expressos em gramas (g) de tensão, normalizados para o valor obtido com 1 g. (B) Registro original. Os pontos e barras verticais representam respectivamente as médias \pm erro padrão das médias de 2 experimentos. A análise estatística foi realizada através do teste 't' de Student (***) $p < 0,005$; ●●● $p < 0,001$).

6 - DISCUSSÃO

Alguns estudos já foram realizados com diferentes espécies do gênero *Eupatorium*, demonstrando muitos efeitos farmacológicos de interesse. Considerando a existência de dados fitoquímicos que comprovam a existência de grupos químicos, tais como os flavonóides, realizamos este trabalho com o objetivo de estudar os efeitos da *Eupatorium littorale* na mobilização de cálcio, utilizando, para tanto, a musculatura lisa não vascular de ratos e também a esquelética de anfíbios e camundongos.

Os testes quantitativos de atividade farmacológica na musculatura lisa não vascular foram realizados em jejuno, íleo e útero de ratos, sendo realizadas curvas concentração resposta cumulativas com acetilcolina (jejuno e íleo) e com cálcio (útero). O extrato metanólico da *Eupatorium littorale* apresentou atividade colinolítica envolvendo um componente não competitivo revelado pela diminuição do efeito contrátil máximo da acetilcolina em jejuno nas concentrações de 6, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ e em íleo nas de 6 e 12 $\mu\text{g/mL}$. Este efeito foi revertido após 30 minutos da lavagem das preparações com o líquido nutritivo. Além disso, o extrato bruto deslocou a CE_{50} da acetilcolina para a direita, tanto em jejuno como em íleo isolado de ratos com as concentrações de 12 e 50 $\mu\text{g/mL}$, indicando a presença de, pelo menos, um componente colinolítico com atividade competitiva.

O deslocamento da CE_{50} está relacionado a uma interação com receptores muscarínicos. Os receptores muscarínicos sensíveis à acetilcolina são subdivididos em 5 subtipos (M_1 - M_5) (BARNES, 1989). A ativação dos receptores muscarínicos M_1 , M_3 e M_5 estimulam a transformação do fosfatidilinositol em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (InsP_3), enquanto que a ativação dos receptores expressos por M_2 e M_4 diminuem a síntese de AMPc (BIRNBAUMER, 1990). Assim, os receptores M_1 e M_3 estão associados com a

ativação da proteína $G_{q/11}$ (síntese de InsP_3) e o M_2 e M_4 estão associados com a ativação da $G_{i/o}$ (inibição da síntese de AMPc, ativação direta de canais de potássio e outras ações) (BONNER, 1989; BUCKLEY, 1990; DÖRJE et al., 1990; HULME et al., 1990).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para caracterizar os subtipos de receptores muscarínicos existentes na musculatura lisa não vascular. Farmacologicamente são utilizados antagonistas seletivos, tais como, para o receptor M_1 , a pirenzepina e telenzepina, para o receptor M_2 , a metoctramina e a himbacina, para o M_3 , hexahidrosiladifenidol e p-hurohexahidrosiladifenidol e para o M_4 , a tropicamida. Um antagonista seletivo para o receptor M_5 ainda não foi introduzido (KURIYAMA et al., 1998).

A maior parte da musculatura lisa não vascular de muitas espécies exibe uma população heterogênea de receptores muscarínicos (ENTZEROTH e MAYER, 1991; FORD et al., 1991; GIRALDO et al., 1987; MAEDA et al., 1988; MICHEL e WHITING, 1988, 1990; OKTAY et al., 1998) e em muitos existe preponderância de receptores M_2 , com uma população menor de M_3 que medeiam as respostas contráteis (CANDELL et al., 1990; EGLIN et al., 1994; ENTZEROTH et al., 1990; HERAWI et al., 1988; LUCARBACHOLESI et al., 1990; ZHANG et al., 1991). AKBULUT (1999) demonstrou através de ensaios com radioligantes, que as células duodenais de ratos contêm tanto o subtipo M_2 quanto o M_3 , sendo este último o mediador das contrações colinérgicas diretas (PFAFF et al., 1995). O papel dos receptores M_2 nas contrações de muitos músculos lisos tem sido descrito (THOMAS e EHLERT, 1996), porém sua contribuição nas respostas contráteis no duodeno de ratos necessita melhor investigação (AKBULUT, 1999).

A acetilcolina, um agonista muscarínico não seletivo, foi utilizada em concentrações cumulativas (10^{-9} a 10^{-2} M), nos protocolos de jejuno e íleo isolados de rato, com objetivo de induzir a contração do músculo. Este agonista se liga aos receptores muscarínicos,

provavelmente ao subtipo M_3 , induzindo a formação do $InsP_3$ que atua sobre receptores específicos no retículo sarcoplasmático (RS) levando à liberação de Ca^{++} . O aumento na concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{++}]_i$) têm efeitos secundários sobre outros canais modulados ou ativados pelo cálcio, por exemplo, canais de potássio, cloreto e, por vezes, canais de cátions. O aumento da probabilidade de abertura desses canais pode causar despolarização de membrana, que permite a entrada de maior quantidade de cálcio através da abertura de canais de cálcio voltagem dependente (VOCs) (CARL et al., 1996). Além disso, o cálcio pode atuar sobre os receptores do $InsP_3$ e da rianodina (RyRs) presentes no RS, induzindo uma maior liberação de cálcio. Este último mecanismo é conhecido como 'liberação de cálcio induzida por cálcio' (CIRC) (ISHII et al., 1986; CARDFOLI, 1987; CARSTEN e MILLER, 1987; Van BREEMEN, 1989; IINO, 1989; GAFFIN, 1999).

A elevação da concentração citosólica de cálcio resulta em maior ligação do cálcio à calmodulina. Este complexo ativa as quinases da cadeia leve de miosina que, por sua vez, fosforilam a serina na posição 19 da cadeia leve de miosina (MLC_{20}) (HARTSHORNE, 1987). A fosforilação da Ser_{19} da MLC_{20} permite que a ATPase da miosina possa ser ativada pela actina possibilitando a contração do músculo (BOLTON, 1979; ABDEL-LATIF, 1986; ISHII et al., 1986; CARDFOLI, 1987; CARSTEN e MILLER, 1987; Van BREEMEN, 1989, SWEENEY et al., 1994). Alterações no influxo de cálcio extracelular e/ou liberação intracelular deste íon influenciam no processo contrátil e no tônus muscular (Van BREEMEN et al., 1987).

Considerando que o extrato bruto da *Eupatorium littorale* apresentou atividade colinolítica competitiva e que esta atividade está relacionada à ligação com receptores muscarínicos, podemos concluir que existe um ou mais componentes que ao se ligar a estes

receptores diminuem a produção de InsP_3 , diminuindo, em consequência, a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático.

Porém, o extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* também promoveu um bloqueio não competitivo na contração muscular de jejuno e íleo induzida por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} a 10^{-2} M). Este efeito poderia ser explicado pela interação do extrato com canais de cálcio. Sabe-se que bloqueadores de canais de cálcio em preparações isoladas de musculatura lisa comportam-se como antagonistas não competitivos a vários agonistas, inclusive a acetilcolina e a noradrenalina (KARASAWA, et al., 1988; VESPERINAS et al., 1989).

Os canais de cálcio operados por voltagem (VOC), se abrem em resposta à despolarização da membrana, permitindo a entrada de cálcio. Os VOCs na musculatura lisa, são classificados como: tipo-L (longa duração, ativado por alta voltagem) e tipo-T (transiente, ativado por baixa voltagem). Em geral, o canal de cálcio do tipo-L é considerado como a principal via de entrada do cálcio na célula muscular lisa após a geração de um potencial de ação, já que a função dos canais do tipo-T ainda é pouco compreendida (KURIYAMA, 1998). Os canais do tipo-L da musculatura lisa têm as mesmas características daqueles encontrados no músculo cardíaco e na musculatura lisa vascular, tais como a ativação em potenciais de membrana altos, o bloqueio por antagonistas de canais de cálcio e a inativação tanto por despolarização quanto pela concentração de cálcio intracelular (FERRONI et al., 1996; ITO e TAKEDA, 1981).

Para verificármos se os efeitos produzidos pelo extrato tanto no jejuno como no íleo poderia estar envolvendo a inibição do influxo de cálcio através de canais de cálcio ativados por voltagem, o extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* foi também testado na

preparação de útero isolado de ratas, mantido em meio despolarizado por K^+ e isento de cálcio (EDMAN e SCHILD, 1962; SPEDDING, 1982).

Nesta preparação, a despolarização da membrana aumenta inicialmente a mobilização de cálcio que é gradativamente eliminado do meio por trocas sucessivas do líquido nutritivo do banho de perfusão. Na ausência de cálcio, o músculo volta à sua tensão basal, mesmo permanecendo despolarizado. Nesta condição, a adição de íons cálcio ao meio faz contrair o músculo proporcionalmente às concentrações adicionadas. De acordo com os estudos realizados por FUSSLE et al. (1981) e IKIGAI e NAKAE (1987), a concentração mínima de cálcio que produz a contração é de aproximadamente, 200 nM, e a contração máxima é produzida por 0,8 a 1,0 μ M.

As contrações máximas produzidas pelo cálcio no útero isolado de ratas em meio despolarizante foram reduzidas significativamente na presença de 6, 12, 25 e 50 μ g/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, sendo mantidas após 30 minutos da retirada do extrato bruto do meio de perfusão mediante a lavagem da preparação. O extrato deslocou as contrações induzidas por concentrações cumulativas de cálcio para a direita na concentração de 6 μ g/mL. Estes resultados sugerem que o efeito colinolítico do extrato bruto observado em jejuno e íleo de rato, provavelmente não está envolvido com o bloqueio de canais de cálcio do tipo L.

A redução da resposta máxima após incubação do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* em útero de ratas, ao contrário do que foi observado no jejuno e no íleo, foi irreversível, podendo ser um indicativo de lesão de membrana.

Em conclusão, os resultados do estudo dos efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na musculatura lisa não vascular, indicam a presença de um ou mais

princípios ativos com atividade antagonista não competitiva para a acetilcolina e para o cálcio e de pelo menos um princípio ativo antagonista competitivo para a acetilcolina.

A partir do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* foram isolados por FREHSE (1999), no Departamento de Química da UFPR, dois flavonóides, a hispidulina e a eupafolina em uma mistura na proporção de 1:1. Com o objetivo de verificármos possíveis atividades farmacológicas que justificassem o isolamento químico dos flavonóides, primeiramente realizamos testes preliminares em musculatura lisa não vascular (jejuno e útero) com esta mistura (1:1).

Alguns estudos já haviam sido realizados com a hispidulina, onde foram verificadas atividade inibitória sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Geotrichum candidum*, *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum* (TAN et al., 1999), efeito hepatoprotetor que pode estar relacionado com suas propriedades antioxidantes (FERRANDIZ et al., 1994; CHEN, 1990; SANZ et al., 1994) e inibição da agregação plaquetária mediada pela adenosina-5'-monofosfato, ácido araquidônico, PAF e colágeno (BOURDILLAT et al., em 1988). Na musculatura lisa não vascular, ABDALLA et al. (1988), observaram que a hispidulina causa um desvio para a direita nas contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina em íleo e traquéia além de inibir significativamente a contração máxima induzida pela acetilcolina. Em solução despolarizante isenta de cálcio, a hispidulina causou tanto um desvio para direita, quanto uma redução da contração máxima, das contrações induzidas por CaCl_2 no íleo, na traquéia e nas artérias pulmonares. Em solução contendo EGTA isenta de cálcio, a hispidulina causa inibição concentração-dependente das contrações induzidas pela epinefrina em artérias pulmonares e pela histamina no íleo. Os autores sugerem que a hispidulina pode interferir com a ligação do Ca^{++} aos receptores protéicos do Ca^{++} nas células musculares lisas e/ou com a liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares induzidos por agonistas. Menos

provavelmente, a hispidulina pode interferir com o influxo de Ca^{++} através da membrana da célula muscular lisa (ABDALLA et al., 1988).

Apesar de existirem vários estudos envolvendo a hispidulina, a eupafolina somente foi citada por possuir atividade citotóxica (KUPCHAN, 1969; TAN et al., 1999; ELEMA et al., 1989), considerando que existem poucos estudos envolvendo este flavonóide, seu estudo torna-se bastante promissor.

Nos estudos realizados com a mistura de eupafolina e hispidulina (1:1) na musculatura lisa não vascular (utilizando o jejuno), os flavonóides, apresentaram atividade antagonista não competitiva, que foi observada através da redução da resposta máxima do órgão frente às contrações induzidas por concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-9} a 10^{-2} M) com as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, não sendo no entanto, reversíveis após a retirada dos flavonóides mediante a lavagem da preparação. Estes resultados sugerem que os flavonóides não estão atuando sobre os receptores muscarínicos de membrana.

Para verificarmos a possível atividade dos flavonóides sobre os canais de cálcio do tipo-L, foram realizadas preparações em úteros isolados de ratas, mantidos em meio despolarizante e isento de cálcio. O cálcio foi adicionado ao meio, em concentrações cumulativas (10^{-4} a 10^{-2} M) para a obtenção de contrações induzidas pelo cálcio. Os flavonóides, nas concentrações de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram efeito sobre canais de cálcio do tipo L.

Devido ao deslocamento da curva induzida por concentrações cumulativas de acetilcolina após 30 minutos da retirada de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ do extrato bruto para a esquerda, repetimos os experimentos observando a contração muscular após a retirada dos flavonóides (1,0 $\mu\text{g/mL}$) tanto no útero (contraído pelo cálcio), nos tempos de 30 e 60 minutos quanto no

jejuno com 1,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ dos flavonóides, nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, realizando curvas induzidas pela acetilcolina.

Nos experimentos realizados em jejuno, houve deslocamento significativo das contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina para a esquerda após 30, 60, 90 e 120 minutos da retirada dos flavonóides. Este efeito não foi observado nos experimentos realizados em útero isolado de ratas.

A contração muscular é proporcional à concentração de cálcio intracelular. A homeostase de cálcio no músculo liso é mantida através do influxo e do efluxo de cálcio através da membrana sarcoplasmática e pela liberação e recaptação do cálcio pelo RS.

Os principais fatores que levam ao aumento da $[\text{Ca}^{++}]_i$ e da tensão são: entrada de cálcio através dos VOCs abertos devido à despolarização e a liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares pela ação do InsP_3 ou pela ‘liberação de cálcio induzido por cálcio’ (CIRC) (SOMLYO, e SOMLYO, 1968, SOMLYO, et. al., 1969, BECKER et al., 1989; GANITKEVICH e ISENBERG, 1995; KAMISHIMA e McCARRON, 1996, KAMISHIMA e McCARRON, 1997, HIROSE et al., 1998).

A diminuição da $[\text{Ca}^{++}]_i$ ocorre em consequência ao efluxo de cálcio que acontece através de bombas de cálcio presentes no sarcolema e/ou através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ou ainda através da recaptação de cálcio pelo RS (FURUKAWA et al., 1988; BLAUSTEIN et al., 1992).

Considerando que houve deslocamento para a esquerda das contrações induzidas por concentrações crescentes de acetilcolina após 30 minutos da retirada de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e após 90 minutos da retirada de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ dos flavonóides (1:1) do meio de perfusão, podemos incluir a hipótese de aumento da concentração de cálcio intracelular por:

- a) diminuição do efluxo (inibição da bomba de cálcio ou do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$);

- b) diminuição da recaptação pelo RS (inibição da bomba de cálcio);
- c) aumento da liberação de cálcio do RS (induzido por cálcio ou pelo InsP_3);
- d) aumento da entrada de cálcio através dos VOCs.

Tendo como objetivo dar continuidade aos estudos dos efeitos do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* e dos flavonóides, eupafolina e hispidulina, na mobilização de Ca^{++} , realizamos estudos utilizando a musculatura esquelética, mais especificamente os músculos sartório e cutâneo-peitoral intactos de rã e o diafragma de camundongos.

O extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, na concentração de 1,0 mg/mL, em protocolo utilizando-se o músculo sartório intacto de rã, potencializou a contratura potássica (nas concentrações de 40 e 100 mM), mas não alterou o tônus muscular *per se*. A contratura induzida pela cafeína (2 mM) também foi potencializada mesmo após despolarização prévia do músculo com potássio 100 mM, porém de forma mais lenta. Quando o cálcio extracelular foi retirado do líquido nutritivo, praticamente anulou-se a potencialização da contratura cafeínica.

Os resultados obtidos sobre o músculo sartório intacto de rã nos indicam possibilidades quanto ao mecanismo de ação do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, portanto, para aprofundar os estudos e procurar esclarecer o mecanismo de ação envolvido, desenvolvemos alguns protocolos utilizando o diafragma de camundongos.

As contrações musculares isométricas foram induzidas por estimulação elétrica direta das fibras, tendo-se o cuidado de excluir as contrações induzidas por estimulação das terminações nervosas através da adição de d-tubocurarina ao banho de perfusão, 30 minutos antes da realização de todos os protocolos experimentais.

Na presença do 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, observamos aumento da amplitude de contração e contratura, sendo que após a retirada e

lavagem da preparação, a contratatura manteve-se elevada. Verificamos que houve redução no tempo de contração do músculo e aumento nas velocidades de contração e relaxamento na presença do extrato bruto.

Após a adição de dantrolene (12,5 µg/mL), os efeitos do extrato bruto metanólico foram parcialmente anulados, porém a contratatura foi aumentada significativamente a partir de 25 minutos de incubação. O veículo utilizado para solubilização do dantrolene, foi o propilenoglicol 2 %. Este solvente não foi capaz de anular os efeitos do extrato bruto, indicando que não é o agente responsável pelo bloqueio da resposta observada com o dantrolene.

Outro protocolo realizado foi o diafragma de camundongos, com adição de 1,0 mg/mL do extrato bruto, sem estimulação elétrica. Observamos que o extrato bruto foi capaz de aumentar significativamente a contratatura deste músculo. Após a lavagem da preparação, a contratatura do músculo retornou aos níveis semelhantes aos do controle.

Para a diluição do extrato bruto metanólico, foi utilizado o detergente não-iônico Tween 80 na concentração de 0,1 mL/mL. Em alguns protocolos experimentais seus efeitos já foram estudados, como por exemplo, na neuropsicofarmacologia onde sua indicação de uso é de no máximo 1,0 mL/kg, quando administrados por via oral ou intraperitoneal (VARMA et al., 1985), enquanto que em preparações isoladas de músculo liso a indicação é de 10 mL/L (BRAAK e FREY, 1990). Considerando que não foram encontrados dados na literatura que comprovassem a ausência de efeitos na musculatura esquelética, verificamos o efeito do Tween 80, em musculatura esquelética de anfíbios e de mamíferos.

Nos resultados obtidos, verificamos que o Tween 80 não alterou as respostas nem induziu contração muscular *per se*. Destes resultados pudemos concluir que o solvente

utilizado na concentração de 1:10, não alterou as respostas obtidas pelo extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*.

Quando uma fibra muscular esquelética de um vertebrado é ativada por um impulso nervoso, um potencial de ação se propaga por toda a fibra. Este potencial entra pelos túbulos T e induz a liberação de cálcio a partir das cisternas do retículo sarcoplasmático (RS), levando à contração muscular (MELZER et al., 1995). Este processo é definido como acoplamento excitação-contração (AEC) (RIOS et al., 1992; MELZER et al., 1995; OBA et al., 1997).

As estruturas envolvidas no processo do AEC são formadas por dois sistemas de membrana justapostos, um no túbulo T e outro na membrana do RS, separados por uma distância de, aproximadamente, 12 nm (BLOCK et al., 1988). Os dois principais elementos do processo de acoplamento, o sensor de voltagem no túbulo T e o canal de liberação de cálcio no RS, são caracterizados por sítios de ligação específicos para as dihidropiridinas (DHPs; antagonistas de cálcio) e para a rianodina (alcalóide natural obtido da *Ryania speciosa*), respectivamente (rev. MELZER et al., 1995).

O receptor da DHP (DHPR) tem duas funções, uma como sensor de voltagem e outra como canal de cálcio do tipo-L voltagem-dependente (SCHNEIDER, 1994; LÜTTGAU, 2000), porém o influxo de cálcio através deste não está envolvido na ativação da liberação de cálcio do RS no músculo esquelético (SCHNEIDER, 1994). Os DHPRs são responsáveis pelo movimento de cargas e pelo início do AEC no músculo esquelético (ADAMS et al., 1990; RIOS e BRUM, 1987; TANABE et al., 1988).

Os DHPRs possuem 5 subunidades (α_1 , α_2 , β , δ e γ) e é a subunidade α_1 que forma o sensor de voltagem do canal, que é o sensor da molécula do receptor (CATTERALL, 1991). A subunidade α_1 contém o sítio receptor para as dihidropiridinas e outros antagonistas de Ca^{++} (GLOSSMANN e STRIESSNIG, 1990) e é estruturalmente similar aos canais de Na^+

voltagem-dependente, com 4 domínios transmembrana (I-IV) (MIKAMI et al., 1989; TANABE et al., 1987). TANABE et al. (1990), demonstraram que a alça II-III do DHPR está envolvida na transmissão do sinal para os canais de liberação de Ca^{++} do RS do músculo esquelético, mas não ficou definido ainda como ocorre esta interação.

No músculo esquelético, os DHPRs estão em conjunto, em grupos de 4 ou tétrades. Estas tétrades estão posicionadas em exata correspondência com o domínio citoplasmático do RyR, de forma que cada DHPR está localizado imediatamente sobre uma subunidade do RyR e, portanto, disponível para uma interação direta (BLOCK et al., 1988; FRANZINI-ARMSTRONG e KISH, 1995).

O complexo RyR inclui 4 monômeros, cada um consistindo em mais de 5.000 resíduos de aminoácidos, deduzidos por clonagem e sequenciamento do DNAc, tendo uma massa molecular calculada em torno de 565 kDa (TAKESHIMA et al., 1989). O RyR é um canal de Ca^{++} do RS com um domínio citoplasmático muito grande, que parece conectar diretamente o RS às membranas externas (FRANZINI-ARMSTRONG e PROTASI, 1997).

Os RyRs têm sequência e similaridade estrutural com outros canais intracelulares, como o receptor do inositol 1,4,5-trifosfato (InsP_3), com o qual dividem o papel de liberação de Ca^{++} dos estoques intracelulares (NIXON, MIGNERY e SOMLYO, 1994). Os RyRs porém têm maior condutividade que os receptores do InsP_3 e são utilizados em situações que necessitam de liberação de Ca^{++} em maiores quantidades, como durante o AEC no músculo esquelético.

Várias substâncias podem regular o RyR. Ativadores ou potenciadores incluem o Ca^{++} (em concentrações micromolares), o ATP, o InsP_3 (em alguns tecidos), cafeína e xantinas relacionadas, peptídeos, rianodina (em concentrações micromolares), halotano e reagentes sulfidrílicos, enquanto que o Ca^{++} (em concentrações milimolares), o Mg^{2+} , a calmodulina, a rianodina (em concentrações milimolares), anestésicos locais e o 'rutenium red' são inibidores

conhecidos (CORONADO et al., 1994; FLEISCHER e INUI, 1989; MEISSNER, 1994; PALADA et al., 1989).

Para o estudo da atividade do extrato bruto metanólico, utilizamos o músculo sartório intacto de rã e, também, o músculo diafragma de mamíferos. Uma vantagem de trabalhar com fibras intactas é o fato de que o meio interno mantém-se inalterado (MELZER et al., 1995).

Os resultados obtidos, em musculatura esquelética de anfíbios, sugerem que o extrato bruto metanólico pode estar exercendo seus efeitos atuando somente nos DHPRs, demonstrado pela potencialização da contratura potássica (40 e 100 mM), somente nos canais de liberação de cálcio do RS, demonstrado pela potencialização da contratura cafeínica (2 mM) ou em ambos.

A contratura potássica foi aumentada significativamente após incubação do músculo sartório com 1,0 mg/mL do extrato bruto na presença de 40 e 100 mM de K^+ . O aumento da $[K^+]$ leva à despolarização e inicia a contratura muscular. A força contrátil logo alcança seu efeito máximo, e é mantida por alguns segundos (platô) (GOMOLLA et al., 1983; GRABOWSKI et al., 1972).

A verificação do efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* na liberação de cálcio do RS foi desenvolvida através da indução da contratura pela cafeína (2 mM). A cafeína, um agente capaz de modular a atividade dos RyRs, tornou-se uma ferramenta muito importante para o estudo da fisiologia da contração muscular. É utilizada para diferenciar os processos que ocorrem na membrana externa do músculo dos processos de liberação intracelulares (MELZER, 1995; CORONADO et al., 1994; MEISSNER, 1994; OGAWA, 1994). Em concentrações milimolares, a cafeína ativa a liberação de cálcio, provavelmente pelo aumento da abertura do canal, sem alterar sua condutância. Considerando que a ativação pela cafeína foi observada na presença de concentrações nanomolares de Ca^{++} ,

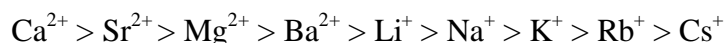
foi sugerido que a cafeína não só é capaz de potencializar, mas também de iniciar a liberação de cálcio (ROUSSEAU et al., 1988; DELAY et al., 1986; KLEIN et al., 1990; KOVACS e SZUCS, 1983).

O extrato bruto metanólico potencializou a contratatura induzida pela cafeína o que pode indicar que o mesmo tenha ação sobre os RyRs, induzindo a liberação de cálcio pelo RS. Com o objetivo de aprofundar os estudos e confirmar a influência do extrato bruto sobre os RyRs, o músculo foi mantido imerso em meio contendo 100 mM de K^+ . O aumento na $[K^+]$, que leva à despolarização e inicia a contratatura muscular, permite o relaxamento espontâneo levando a uma resposta fásica mesmo que a fibra continue despolarizada. Este relaxamento se deve a uma inativação do mecanismo de acoplamento na membrana do túbulo T. O processo de acoplamento permanece em um estado refratário e a fibra recupera lentamente sua habilidade para contrair após a despolarização (GOMOLLA et al., 1983; GRABOWSKI et al., 1972). Nessas condições, o extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* manteve a potencialização da contratatura cafeínica, porém a contratatura foi mais lenta, levando cerca de 12 horas para sua estabilização, indicando que a potencialização da contratatura cafeínica pelo extrato bruto provavelmente sofre influência da ação do mesmo sobre os DHPRs.

Dando continuidade ao estudo, realizamos um protocolo mantendo o meio com 100 mM de K^+ e isento de Ca^{++} . Vários trabalhos foram realizados demonstrando que o sensor de voltagem exibe um estado dependente da ligação aos íons metálicos. Em 1987, BRUM e RIOS demonstraram que o sensor de voltagem pode apresentar 4 conformações: R (repouso), A (ativo), I e I^* (inativo). Em um trabalho posterior, BRUM et al. (1988), demonstrou que na ausência de íons metálicos na solução externa, as alterações de conformação somente ocorrem entre os estados I e I^* , independentemente do potencial mantido (- 80 a 0 mV). Estes autores

explicaram suas descobertas pela teoria de que a ligação de Ca^{++} ao sensor de voltagem é um pré-requisito para a sua ativação.

Em 1989, PIZARRO et al., demonstraram que o Ca^{++} pode ser substituído por outros cátions metálicos, sem abolir a função do sensor de voltagem, estabelecendo também uma seqüência de afinidades como segue:



Em conclusão, os trabalhos demonstram que nas fibras musculares esqueléticas de vertebrados, o sensor de voltagem necessita ligar-se com o Ca^{++} ou com outro íon metálico para se manter ativável e que a indução da liberação de Ca^{++} do RS não necessita do influxo de Ca^{++} . Confirmando o mecanismo de ação do extrato bruto metanólico, verificamos que o dantrolene, no protocolo utilizando musculatura de mamíferos, comprometeu o efeito do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, indicando que provavelmente o mecanismo envolvido na ação do extrato bruto esteja relacionado com a liberação de cálcio do RS através dos RyRs. O dantrolene é um inibidor da liberação de Ca^{++} através dos RyRs, utilizado clinicamente na desordem farmacogênica conhecida como hipertermia maligna (XU et al., 1998, ZUCCHI e RONCA-TESTONI, 1997), sendo muito útil como ferramenta experimental interesse em verificar se este efeito poderia ser devido à presença da eupafolina e da hispidulina.

A eupafolina foi adicionada ao meio, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, após indução da contratura cafeínica (2 mM). Os efeitos foram observados durante 60 minutos. A eupafolina, em um primeiro momento, induziu uma contração fásica, seguida de relaxamento e contração tônica. A contração máxima obtida foi 47,7 % da contratura obtida com 100 mM de K^+ (controle).

Seguindo o mesmo protocolo a hispidulina foi testada também na concentração de 100 µg/mL na contratura cafeínica. Observamos efeitos semelhantes aos obtidos com a eupafolina, porém a contração máxima obtida neste órgão foi de 94,5 % da contratura potássica (100 mM).

Os efeitos observados com a eupafolina e com a hispidulina foram bastante semelhantes e podem estar indicando que os flavonóides em um primeiro momento podem estar promovendo uma despolarização da membrana (fase fásica) e em um segundo momento, induzindo a liberação de Ca^{++} do RS (fase tônica). A despolarização da membrana pode ser estudada através de protocolos utilizando solução contendo 100 mM de potássio, que provoca a despolarização da membrana e conseqüente anulação da resposta induzida pelos flavonóides no caso do efeito ser dependente da despolarização.

Estes resultados indicam que os flavonóides podem ter participação efetiva na potencialização da contratura cafeínica induzido pelo extrato bruto metanólico, porém é possível que outras substâncias também podem estar participando na resposta observada com a adição do extrato bruto metanólico, pois a resposta teve características diferentes.

7 – CONCLUSÃO

O estudo farmacológico do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* Cabrera, realizado no presente trabalho, contribuiu com as seguintes informações:

7.1 O extrato bruto metanólico apresentou atividade colinolítica reversível envolvendo, pelo menos, um componente não competitivo revelado pela diminuição do efeito contrátil máximo da acetilcolina em jejuno de ratos;

7.2 O extrato bruto deslocou a CE_{50} da acetilcolina para a direita, tanto em jejuno como em íleo isolado de ratos, indicando a presença de, pelo menos, um ou mais componentes colinolíticos com atividade competitiva;

7.3 O efeito colinolítico não competitivo do extrato bruto metanólico parece não envolver o bloqueio de canais de cálcio do tipo L, pois em preparações de útero isolado de ratas em meio despolarizante o extrato não foi capaz de deslocar a curva concentração-efeito de cálcio;

7.4 O extrato bruto reduziu a resposta contrátil máxima ao cálcio na preparação de útero isolado de rata, indicando a presença de um ou mais componentes com atividade não competitiva;

7.5 No músculo sartório de rã, o extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, potencializou a contratura potássica, sem alterar o tônus muscular *per se*;

7.6 A contratura induzida pela cafeína no músculo sartório de rã foi potencializada após incubação com 1,0 mg/mL do extrato bruto;

7.7 Após despolarização prévia do músculo sartório com potássio, o extrato bruto manteve a capacidade de potencializar a contratura cafeínica, porém, de forma mais lenta;

7.8 O extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale* não foi capaz de potencializar a contratura cafeínica do músculo sartório de rã, quando em líquido nutritivo despolarizante e isento de cálcio;

7.9 Os resultados obtidos sugerem que o extrato bruto metanólico pode estar exercendo seus efeitos sobre os DHPRs, demonstrado pela potencialização da contratura potássica; sobre os canais de liberação de cálcio do RS, demonstrado pela potencialização da contratura cafeínica ou em ambos. Possivelmente, a presença do cálcio extracelular seja um fator importante para sua atividade na musculatura esquelética;

7.10 Na presença de 1,0 mg/mL do extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, as contrações isométricas induzidas eletricamente em músculo diafragma de camundongos, sofreram aumento da amplitude e contratura;

7.11 O extrato bruto reduziu o tempo de contração do músculo diafragma de camundongos e aumentou as velocidades de contração e relaxamento;

7.12 Após a adição de dantrolene, os efeitos do extrato bruto metanólico foram parcialmente anulados, indicando que o efeito pode estar relacionado com a liberação de cálcio do RS, através dos RyRs;

7.13 O extrato bruto metanólico da *Eupatorium littorale*, em diafragma de camundongos sem estimulação direta, foi capaz de aumentar a amplitude e a contratura do músculo;

7.14 O solvente utilizado para a solubilização do extrato bruto (Tween 80) não foi capaz de induzir contração *per se* ou de potencializar a contratura cafeínica em músculo sartório de rã e de interferir nas contrações induzidas eletricamente no músculo diafragma de camundongos, indicando não ser o responsável pelas respostas obtidas com o extrato bruto;

7.15 O propilenoglicol 2 %, veículo utilizado para solubilização do dantrolene, não anulou os efeitos do extrato bruto no diafragma de camundongos, indicando que não é o agente responsável pelo bloqueio da resposta observada após a adição do dantrolene;

7.16 Houve deslocamento da curva concentração efeito de acetilcolina para a esquerda, após 30, 60, 90 e 120 minutos da retirada dos flavonóides (2,5 µg/mL) do meio de perfusão;

7.17 Em preparações de útero isolado de ratas, mantidos em meio despolarizante e isento de cálcio, os flavonóides apresentaram efeito antagonista não competitivo;

7.18 A hispidulina e a eupafolina, testadas separadamente no músculo cutâneo-peitoral de rã, potencializaram a contratatura cafeínica, em um primeiro momento, com uma contração fásica, seguida de relaxamento e contração tônica. Estes resultados sugerem que os flavonóides em um primeiro momento estão promovendo uma despolarização da membrana (fase fásica) e, em um segundo momento, induzindo a liberação de Ca^{++} do RS (fase tônica).

8 – ANEXO

8.1 EXEMPLO DOS CÁLCULOS DOS TEMPOS E DAS VELOCIDADES DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO

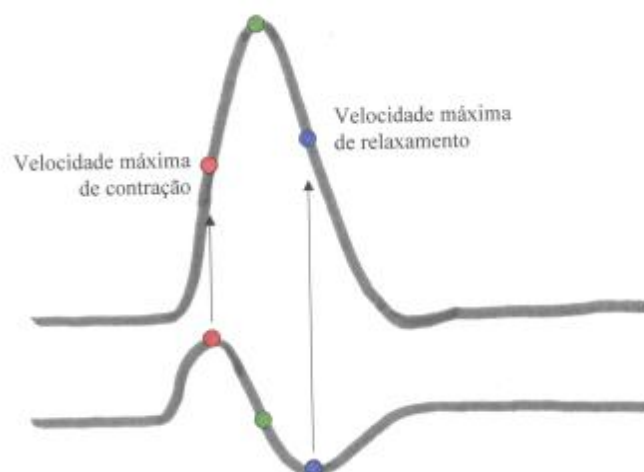
8.1.1 Passo 1:

Observar os dados de calibração obtidos durante o registro:

- Velocidade de registro: 50 ms a cada 15 mm;
- Tensão: 1 g = 40 mm (o peso de 1 g é colocado no transdutor de força e a tensão gerada é medida em milímetros);

8.1.2 Passo 2:

Na figura abaixo observamos a curva da cinética de contração do músculo na presença da substância testada (curva maior). Observamos também pela curva menor, obtida através de um circuito diferenciador ligado em paralelo à entrada do sinal do osciloscópio, dados que nos possibilitam a realização de cálculos relacionados à velocidade de contração e relaxamento:



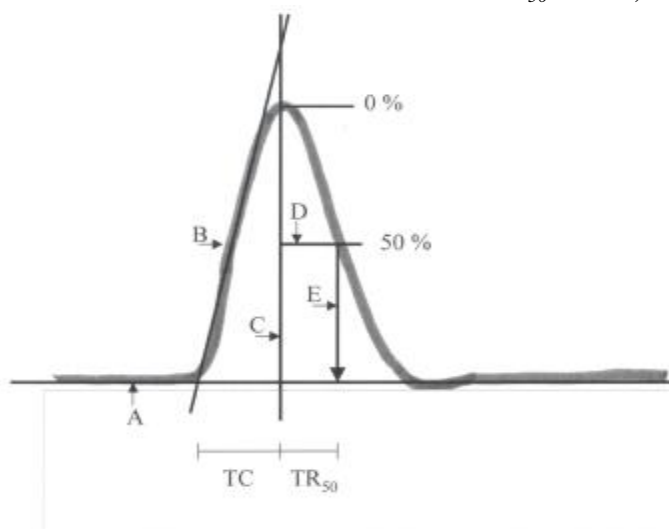
8.1.3 Passo 3:

Cálculo do tempo de contração (TC): inicialmente, traçar uma reta seguindo a base da curva, antes do início da contração (A). Em seguida, traçar a segunda reta passando pelo ponto de velocidade máxima de contração, seguindo a curva da cinética (B). A terceira reta deve ser traçada perpendicularmente à primeira e deve passar pelo ponto máximo de contração do músculo (C). O TC deve ser medido em milímetros, e em seguida, calculado utilizando a calibração inicial (15 mm = 50 ms):

Exemplo: TC = 10 mm	15 mm - 50 ms
	10 mm - TC
	$TC = 33,3 \text{ ms}$

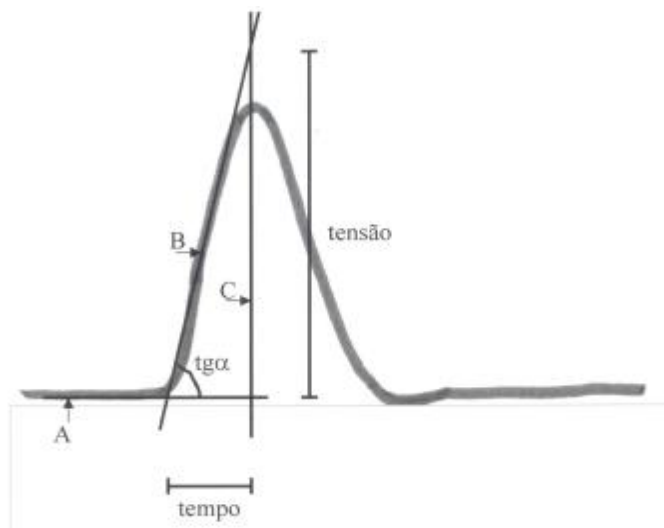
Cálculo do tempo de relaxamento (TR₅₀): utilizando as retas (A) e (C) traçadas, medir a curva C até o ponto máximo de contração (0 % de relaxamento), dividir este valor (em mm), por dois (50 % de relaxamento). A partir deste ponto, traçar horizontalmente uma reta até atingir a curva de contração (D) e novamente, traçar uma reta perpendicular a esta em direção à base, na reta A (E). O TR₅₀ deve ser medido em mm e calculado:

Exemplo: TR ₅₀ = 4 mm	15 mm - 50 ms
	4 mm - TR ₅₀
	$TR_{50} = 13,3 \text{ ms}$



8.1.4 Passo 4:

Cálculo da velocidade máxima de contração ($VC_{máx}$): é realizado através da determinação da tangente α . Para isso, deve-se traçar um triângulo, seguindo a linha de base (A), a curva de contração do músculo (B) e o ponto de contração máximo (C), como pode ser verificado na figura a seguir:



Primeiramente será medido o valor em milímetros do tempo e calculado com base nos dados fornecidos na calibração:

Exemplo: tempo = 17 mm

15 mm	-	50 ms
17 mm	-	tempo
		<i>tempo = 56,6 ms</i>

Em seguida, a tensão foi medida (em mm) e calculada:

Exemplo: tensão = 57 mm

1 g	-	40 mm
tensão	-	57 mm
		<i>tensão = 1,42 g</i>

Com a determinação dos valores de tempo (ms) e de tensão (g), podemos calcular o valor da tangente α , que é correspondente à velocidade máxima de contração:

$$\text{tg } \alpha = \frac{\text{tensão}}{\text{tempo}}$$

Substituindo o tempo e a tensão pelos valores calculados, temos:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1,42 \text{ g}}{56,6 \text{ ms}}$$

Em seguida, transformamos o tempo de milissegundos para segundos:

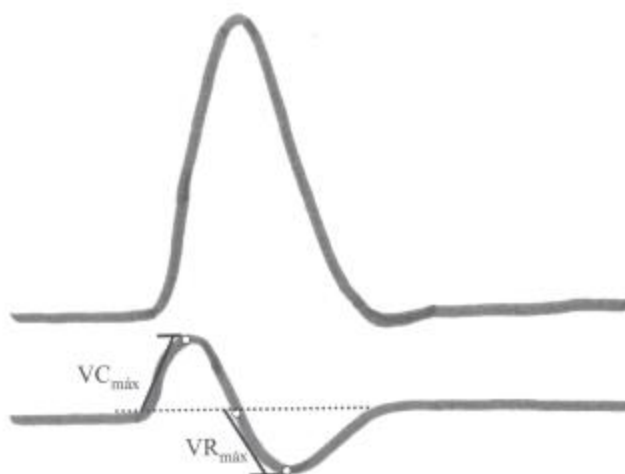
$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{1,42 \text{ g}}{56,6 \times 10^{-3} \text{ s}}$$

Obtendo assim o valor da velocidade máxima de contração em g/s:

$$VC_{\text{máx}} = 25,08 \text{ g/s}$$

8.1.5 Passo 5:

Cálculo da velocidade máxima de relaxamento ($VR_{\text{máx}}$): tendo o valor da $VC_{\text{máx}}$ previamente calculado, utilizamos a curva paralela, medindo o correspondente ao $VC_{\text{máx}}$ e ao $VR_{\text{máx}}$ (em mm) e realizamos uma regra de 3 simples:



Exemplo:	$VC_{\text{máx}}$	-	10 mm	-	25,08 g/s
	$VR_{\text{máx}}$	-	9 mm	-	x
					$x = 22,57 \text{ g/s}$

Portanto, a VR_{max} é de 22,57 g/s.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD M. J.; BERMEJO, P.; SANCHEZ-PALOMINO, S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. **Antiviral activity of some South American medicinal plants** *Phytother Res* 13(2):142-6, 1999.

ABDALLA, S.; ABU-ZARGA, M.; AFIFI, F.; AL-KHALIL, S.; SABRI, S. **Effects of hispidulin, flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle** *Gen Pharmacol*. 19 (4): 559-563, 1988.

ABDEL-LATIF, A. A. **Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers** *Pharmacol. Rev* 30:227-272, 1986.

ADAMS, B. A.; TANABE, T.; MIKAMI, A.; NUMA, S.; BEAM, K. G. **Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs** *Nature* 346: 569-572, 1990.

AKBULUT, H.; GOREN, Z.; ISKENDER, E.; ERASLAN, A.; OZDEMIR, O.; OKTAY, S. **Subtypes of muscarinic receptors in rat duodenum. A comparison with rabbit vas deferens, rat atria, guinea-pig ileum and gallbladder by using imperaline** *Gen Pharmacol*, 32: 505-511, 1999.

AMBROSE, A. M.; ROBBINS, D. J.; DEEDS, F. **Chronic and acute toxicities of some flavonoids** *J. Am. Pharm. Assoc.* , 41:119, 1952.

ARENE, E. O.; PETIT, G. R.; ODE, R. H. **The isolation of isosakuranetin methyl ether from *Eupatorium odoratum*** *Lloydia* 41: 68-70, 1978.

BARDBURY, R. B.; WHITE, D. E. **Vitamins and hormones** New York: Academic Press Inc., 1954.

BARNES, P. J. **Muscarinic receptor subtypes: implications for lung disease** *Thorax*: 44: 161-167, 1989.

BECKER, P. L.; SINGER, J. J.; WALSH, J. V.; FAY, F. S. **Regulation of calcium concentration in voltage-clamped smooth muscle cells** *Science* 244: 211-214, 1989.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. **Screening of Indian plants for biological activity** *Indian J. Exp. Biol.* 7: 250-262, 1969.

BHAKUNI, O. S.; DHAR, M. L.; DHAR, M. M.; DHAWAN, B. N.; MEHROTRA, B. N. BIGGERS, J. D. **The pharmacology of plant phenolics** New York: Academic Press Inc., 1959.

BIRNBAUMER L. G. **G proteins in signal transduction** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 675-705, 1990.

BLAUSTEIN, M. P.; AMBESI, A.; BLOCH, R. J.; GOLDMAN, W. F.; JUHASZOVA, M.; LINDENMAYER, G. E.; WEISS, D. N. **Regulation of vascular smooth muscle contractility: roles of the sarcoplasmic reticulum (SR) and the sodium/calcium exchanger** *Jpn. J. Pharmacol.* 58 *suppl. II*: 107P-114P, 1992.

BLOCK, B. A.; IMAGAWA, T.; CAMPBELL, K. P., FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle** *J Cell Biol* 107(6 Pt 2):2587-600, 1988.

BOHM, K. von **Die Flavonoide** *Arzneim. Forsch.*, 9: 540, 1959.

BOLTON, T. B. **Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle** *Physiol. Ver* 59: 606-718, 1979.

BONNER, T. I. **New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors** *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.* 10: 11-15, 1989.

BOURDILLAT, B.; DELAUTIER, D.; LABAT, C.; BENVENISTE, J.; POTIER, P.; BRINK, C. **Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels** *Eur J Pharmacol*, 16: 1-6, 1988.

BRAAK, K.; FREY, H. H. **Effects of solvents and detergents on the contraction of isolated smooth muscle preparations** *J Pharm Pharmacol* 42 (12): 837-841, 1990.

BRUM, G. e RIOS, E. **Intramembrane charge movement in frog skeletal muscle fibres. Properties of charge 2** J. Physiol 387: 489-517, 1987.

BRUM, G. et al. **Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling** J. Physiol. 398: 475-505, 1988.

BUCKLEY, N. J. **Molecular pharmacology of cloned muscarinic receptor** In: Transmembrane Signalling for Drug Development Ed. S.R. Nahorski, New York: Willey, 1990.

CABRERA, A. *Eupatorium* (Subimbricata) *littorale* nov. sp. **Boletín de la sociedad argentina de Botânica**, 7 (3-4): 1959.

CANDELL, L. M.; YUN, S. H.; TRAN, L. L.; EHLERT, F. J. **Differential coupling of subtypes of the muscarinic receptor to adenylate cyclase end phosphoinositide hydrolysis in the longitudinal muscle of the rat ileum** Mol. Pharmacol. 38, 689-697, 1990.

CARDFOLI, E. **Intracellular calcium homeostasis** Ann Ver Biochem, 56: 395-433, 1987.

CARL, A.; LEE, H. K.; SANDERS, K. M. **Regulation of ion channels in smooth muscle by calcium** Am. J. Physiol., 271: C9-34, 1996.

CARLINI, E. L. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem** SP: Sarvier, 1973.

CARSTEN, M. E.; MILLER, J. D. **A new look at uterine muscle contraction** American J. Obst and Ginecol, 157: 1303-1315, 1987.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L.; KRETTLI, A. U. **Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture.** Braz J. Med Biol. Res. 24 (11): 1113-1123, 1991.

CATTERALL, W. A. **Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels.** Cell 8;64(5):871-4, 1991.

CHEN, Y. T.; ZHENG, R. L.; JIA, Z. J.; JU, Y. **Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants** Free Radic Biol Med, 9 (1): 19-21 , 1990.

CHENG, E.W. et al. **Estrogenic activity of some naturally occurring isoflavonoids** Ann. N. Y. Acad. of Sci., 61: 652 , 1955.

CORONADO, R. et al. **Structure and function of ryanodine receptors** Amer. J. Physiol. 266: C1485-C1504, 1994.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants** New York: Columbia University Press, 1981. v.2

CRONQUIST, A. **The evolution and classification** Boston, Houghton Mifflin, 1968.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil** RJ: Civilização Brasileira, 1985. 3ed.

DELAY, M.; RIBALET, B.; VERGARA, J. **Caffeine potentiation of calcium release in frog skeletal muscle fibres** J Physiol Lond, 375: 535-559, 1986.

DÖRJE, F.; FRIEBE, T.; TACKE, R.; MUTSCHLER, E.; LAMBRECHT, G. **Novel pharmacological profile of muscarinic receptors mediating contraction of the guinea-pig uterus** Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 342: 284-289, 1990.

EDMAN, K. A. P.; SCHILD, H.O. **The need for calcium in the contractile responses induced by acetylcholine and potassium in the rat uterus** J. Physiol 161: 424-441, 1962.

EGLIN, R.M. et al. **Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle** Trends in Pharmacol. Sci., 15: 114-119, 1994.

ELEMA, E. T.; SCHRIPSEMA, J.; MALINGRE, T. M. **Flavones and flavonol glycosides from *Eupatorium cannabinum* L.** Pharm Weekbl., 11 (5): 161-164, 1989.

ENTZEROTH, M.; DOODS, H. N.; MAYER, N. **Characterization of porcine coronary muscarinic receptors** Naunyn-Schmied Arch Pharmacol, 341: 432-438, 1990.

ENTZEROTH, M.; MAYER, N. **The binding of [3H] AF-DX 384 to rat ileal smooth muscle muscarinic receptors** Recept Res, 11: 141-152, 1991.

FARNSWORTH, N. R. **Biological and phytochemical screening of plants** J. Pharmac. Sci. 55 (3):225, 1966.

FENG, P.C. et al. **Pharmacological screening of some west Indian medicinal plants** J. Pharm. Pharmacol. 14: 556-561, 1962.

FERRANDIZ, M. L.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. **Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice** Life Sci. 55 (8): 145-50, 1994.

FERRONI, A.; GALLI, A.; MAZZANTI, M. **Functional role of low voltage-activated dihydropyridine-sensitive Ca⁺⁺ channels during the action potential in adult rat sensory neurones** Pflügers Arch, 431: 954-963, 1996.

FLEISCHER, S. e INUI, M. **Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling** Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18: 333-364, 1989.

FORD, A.P.D.W. et al. **Pharmacological, biochemical and molecular characterization of muscarinic receptors in the guinea-pig ileum: a multidisciplinary study** Mol Neuropharmacol, 1: 117-127, 1991.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; KISH, J. W. **Alternate disposition of tetrads in peripheral couplings of skeletal muscle** J. Muscle Res. Cell Motil. 16: 319-324, 1995.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F. **Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions** Physiol Rev, 77(3): 699-729, 1997.

FREHSE, F. L. **Flavonóides de *Eupatorium littorale* Cabrera e biotransformação de (±) flavanona pela *Gibberella fujikuroi*** Curitiba, 1999 Tese (Pós Graduação em Química) Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

FURUKAWA, I.-I.; TAWADA, Y.; SHIGEKAWA, M. **Regulation of the plasma membrane Ca⁺⁺ pump by cyclic nucleotides in cultured vascular smooth muscle cells** J. Biol. Chem. 263: 8058-8065, 1988.

FUSSLE, R.; BHADKI, S.; SZIEGOLEIT, A.; TRANUM-JENSEN, J.; KRANZ, T.; WELLENSIEK, H. J. **On the mechanism of membrane damage by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin** J. Biol. Chem., 91: 83-94, 1981.

GAFFIN, S.L. **Simplified calcium transport and storage pathways** J Thermal Biol, 24: 251-264, 1999.

GANITKEVICH, V. Y.; ISENBERG, G. **Efficacy of peak Ca^{++} currents (I_{Ca}) as triggers of sarcoplasmic reticulum Ca^{++} release in myocytes from the guinea-pig coronary artery** J. Physiol. 484: 287-306, 1995.

GEISSMAN, T. A. **The chemistry of flavonoid compounds** New York, The Macmillan Co, 1962.

GIRALDO, E.; MONFERINI, E.; LADINSKY, H.; HAMMER, R. **Muscarinic receptor heterogeneity in guinea-pig intestinal smooth muscle: binding studies with AF-DX 116** Eur J Pharmacol, 114: 475-477, 1987.

GLOSSMANN, H.; STRIESSNIG, J. **Molecular properties of calcium channels** Rev Physiol Biochem Pharmacol 114:1-105, 1990.

GOMOLLA, M.; GOTTSCHALK, G.; LÜTTGAU, H. Ch. **Perchlorate-induced alterations in electrical and mechanical parameters of frog skeletal muscle fibres** J. Physiol. 343: 197-214, 1983.

GUPTA, M. P. **270 Plantas medicinales iberoamericanas** Colombia: CYTED-SECAB, 1995 1ed.

HABTEMARIAM, S.; MacPHERSON A. M. **Cytotoxicity and antibacterial activity of ethanol extract from leaves of a herbal drug, boneset (*Eupatorium perfoliatum*)** Phytother Res 14 (7): 575-577, 2000.

HARTSHORNE, D. J. **Biochemistry of the contractile process in smooth muscle** Physiol Gastroint Tract 423-482, 1987.

HAZEKAMP, A.; VERPOORTE, R.; PANTHONG, A. **Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*** J Ethnopharmacol 78(1):45-9, 2001.

HERAWI, M.; LAMBRECHT, G.; MUTSCHLER, E.; MOSER, U.; PFEIFFER, A. **Different binding properties of muscarinic M₂-receptor sub-types for agonists and antagonists in porcine gastric smooth muscle and mucosa** Gastroenterology, 94: 630-637, 1988.

HIROSE, K.; KADOWAKI, S.; IINO, M. **Allosteric regulation by cytoplasmic Ca⁺⁺ and IP₃ of the gating of IP₃ receptors in permeabilized guinea-pig vascular smooth muscle cells** J. Physiol. 506: 407-414, 1998.

HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J.; BUCLEY, N. J. **Muscarinic receptor subtypes** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 633-673, 1990.

IKIGAI, H.; NAKAE, T. **Assembly of the alpha-toxin-hexamer of *Staphylococcus aureus* in the liposome membrane** J. Biol. Chem., 262: 2156-2160, 1987.

IINO, M. **Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci.** J. Gen. Physiol., 94: 363-383, 1989.

ISHII, K.; KANO, T.; ANDO, J. **Calcium channel, Ca²⁺ mobilization, and mechanical reactivity of estrogen and progesterone treated rat uterus** Jpn J. Pharmacol 41: 47-54, 1986.

ITO, Y.; TAKEDA, K. **Non-adrenergic inhibitory nerver and putative transmitters in the smooth muscle of cat trachea** J Physiol, 330: 497-511, 1981.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal** SP: Nacional, 1985. 7ed.

KAMISHIMA, T.; McCARRON, J. G. **Depolarization-evoked increases in cytosolic calcium concentration in isolated smooth muscle cells of rat portal vein** J.Physiol. 492: 61-74, 1996.

KAMISHIMA, T.; McCARRON, J. G. **Regulation of cytosolic Ca⁺⁺ concentration by Ca⁺⁺ stores in single smooth muscle cells from rat cerebral arteries** J.Physiol. 501: 497-508, 1997.

KARASAWA, A.; KUBO, K.; SHUTO, K.; OKA, T.; NAKAMIZO, N. **Pharmacological Action of Benidipine Hydrochloride in Several Isolated Smooth Muscles and Myocardium** *Arzneim-Forsch-Drug Ver* 38: 1722-1730, 1988.

KLEIN, M. G.; SIMON, B. J.; SCHNEIDER, M. F. **Effects of caffeine on calcium release from the sarcoplasmic reticulum in frog skeletal muscle fibres** *J Physiol.Lond* 425: 599-626, 1990.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. São Paulo: Mc Will, 1994. 2ed.

KOVACS, L.; SZUCS, G. **Effects of caffeine on transmembrane charge movement and calcium transients in cut skeletal muscle fibres of the frog** *J Physiol.Lond* 341: 559-578, 1983.

KUPCHAN, S. M., KNOX, J. R., UDAYAMURTHY, M. S. **Tumour inhibitors – XXXIII. Cytotoxic flavones from Eupatorium species**. Great Britain: *Tetrahedron* v. 25 p.1603-1615, 1969.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; ITOH, T.; INOUE, R. **Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels** *Physiol Rev*, 78: 812-920, 1998.

LUCARBACHOLESI, P. A. **Ligand binding and G protein coupling of muscarinic receptors in airway smooth muscle** *Ann J Physiol*, 258: C730-C738, 1990.

LÜTTGAU, H. Ch. **Divergence in the behaviour of the dihydropyridine receptor in muscle** *J Physiol* 526.3, 2000.

MAEDA, A.; KUBO, T.; MISHINA, M.; NUMA, S. **Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes** *FEBS Lett*, 239: 339, 1988.

MEISSNER, G. **Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors** *Annu. Rev. Physiol.* 56: 485-508, 1994.

MELZER, W.; HERRMANN-FRANK, A.; LÜTTGAU, H. Ch. **The role of Ca⁺⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres** Bioch et Biophysica Acta, 1241: 59-116, 1995.

MELZIG, M. F.; LOOSE, R. **Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced endothelial cytotoxicity by selected flavonoids** Planta Med, Jun, 64:5, 397-9, 1998.

MICHEL, A. D.; WHITING, R. L. **Methoctramine reveals heterogeneity of M₂ muscarinic receptors in longitudinal ileal smooth muscle membranes** Eur J Pharmacol, 145: 305-311, 1988.

MICHEL, A. D.; WHITING, R. L. **The binding of [³H]4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methiodide to longitudinal ileal smooth muscle muscarinic receptors** Eur J Pharmacol, 176: 197-205, 1990.

MIKAMI, A. K. et al. **Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel** Nature 340: 230-233, 1989.

MORIKAWA, C. E. **Contribuição ao estudo da *Eupatorium littorale* Cabrera** Curitiba, 1995 Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

NIXON, G. F.; MIGNERY, G. A.; SOMLYO, A. V. **Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle** J. Muscle Res. Cell Motil. 15: 682-700, 1994.

OBA, T.; KOSHITA, M.; AOKI, T.; YAMAGUCHI, M. **BAY K 8644 and ClO₄⁻ potentiate caffeine contracture without Ca⁺⁺ release channel activation** Cell Physiol 41: C41-C47, 1997.

OGAWA, Y. **Role of ryanodine receptors** Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 29: 229-274, 1994.

OKTAY, S.; CABADAK, H.; ISKENDER, E.; GOREN, Z.; CALISKAN, E.; ORUN, O.; ASLAN, N.; KARAALP, A.; TOLUN, A.; ULUSOY, N. B.; LEVEY, A. I.; EL-FAKAHANY, E. E.; KAN, B. **Evidence for the presence of muscarinic M₂ and M₄ receptors in guinea-pig gallbladder smooth muscle** J Auton Pharmacol, 18: 195-204, 1998.

OLIVEIRA, B. H.; NAKASHIMA, T.; SOUZA FILHO, J. D.; FREHSE, F. L. **HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*** J. Braz. Chem. Soc. 12 (2): 243-246, 2001.

PALADE, P. et al. **Pharmacology of calcium release from sarcoplasmic reticulum** J. Bioenerg. Biomembr. 21: 295-320, 1989

PAULO FILHO, W.; RIBEIRO, J. E.; PINTO, D. S. **Safety and efficacy of *Eupatorium laevigatum* paste as therapy for buccal aphtae: randomized, double-blind comparison with triamcinolone 0,1 % orabase** Adv. Ther. 17 (6): 272-281, 2000.

PFUFF, O. et al. **Functional characterization of muscarinic receptors in rat duodenum** Life Sci, 56: 1038, 1995.

PHAN, T. T.; HUGHES, M. A.; CHERRY, G. W. **Enhanced proliferation of fibroblasts and endothelial cells treated with na extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (Eupolin), na herbal remedy for treating wounds.** Plast Reconstr Surg. 101 (3): 756-765, 1998.

PIZARRO, G. et al. **The voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. Ion dependence and selectivity** J. Gen. Physiol. 94 (3): 405-428, 1989.

RAO, K. V.; ALVAREZ, F. M. **Antibiotic principle or *Eupatorium capillifolium*** J Nat Prod 44 (3): 252-256, 1981.

RIOS, E.; BRUM, G. **Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction in skeletal muscle** Nature 325: 717-720, 1987.

RIOS, E.; PIZARRO, G.; STEFANI, E. **Charge movement and the nature of signal transduction in skeletal muscle excitation-contraction coupling** Annu. Rev. Physiol, 54: 109-133, 1992.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia** SP: Premier, 1997.

ROUSSEAU, E.; LADINE, J.; LIU, Q. Y.; MEISSNER, G. **Activation of the Ca⁺⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds** Arch Biochem Biophys, 267 (1): 75-86, 1988.

SANZ, M. J.; FERRANDIZ, M. L.; CEJUDO, M.; TERCENIO, M. C.; GIL, B.; BUSTOS, G.; UBEDA, A.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. **Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress** Xenobiotica 24 (7): 689-699, 1994.

SATO, M. E. O. **Flavonóides em *Eupatorium littorale* Cabrera** Curitiba, 1985 Tese (Pós graduação em Botânica) Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHNEIDER, M. F. **Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers** Annu. Rev Physiol 56: 463-484, 1994.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. **Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle** J. Pharmacol. Exp. Ther. 159: 129-145, 1968.

SOMLYO, A. V.; VINALL, P.; SOMLYO, A. P. **Excitation-contraction coupling and electrical events in two types of vascular smooth muscle** Microvasc. Res. 1: 354-373, 1969

SOMLYO, A. V. **Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle** J. Biol. Chem. 267 (21): 14662-14668, 1992.

SPEEDING, M. **Assessment of calcium antagonist. Effects of drug in potassium depolarized smooth muscle. Differentiation of antagonist subgroups** Maunyn-Schmied Arch Pharmacol, 318: 234-240, 1982.

SWEENEY, H. L.; YANG, Z.; ZHI, G.; STULL, J. T.; TRYBUS, K. M. **Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation** Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 91: 1490-1494, 1994.

TAKESHIMA, H. et al. **Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor** Nature 339 (6224): 439-4451 1989.

TAN, R. X.; LU, H.; WOLFENDER, J. L.; YU, T. T.; ZHENG, W. F.; YANG, L.; GAFNER, S.; HOSTETTMANN, K. **Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species** Planta Med, 65 (1): 64-7, 1999.

TANABE, T. et al. **Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle** Nature 328: 313-318, 1987.

TANABE, T.; BEAM, K. G.; POWELL, J. A.; NUMA, S. **Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA** Nature 336: 134-139, 1988.

TANABE, T. et al. **Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling** Nature 346: 567-569, 1990.

THOMAS, E. A.; EHLERT, F. J. **Involvement of the M₂ muscarinic receptor in contractions of the guinea-pig trachea, guinea-pig esophagus, and rat fundus** Biochem Pharmacol, 51: 770-788, 1996.

TRIRATANA, T.; SUWANNURAKS, R.; NAENGCHOMNONG, W. **Effect of *Eupatorium odoratum* on blood coagulation** J Med Assoc Thai 74 (5): 283-287, 1991.

TUKEY, J. W. **Comparing individual means in the analysis of variance** Biometrics, 5: 99-114, 1949.

Van BREEMEN, C. **Cellular mechanisms regulating (calcium) smooth muscle** Annu. Rev Physiol 51: 315-329, 1989.

Van BREEMEN, C.; CAUVIN, C.; YAMAMOTO, H.; ZSCHAUER, A. **Vascular smooth muscle calcium channels** J. Cardiovasc Pharmacol 10: S10-S15, 1987.

VARMA, R. K.; KAUSHAL, R.; JUNNARKAR, A. Y.; THOMAS, G. P.; NAIDU, M. U.; SINGH, P. P.; TRIPATHI, R. M.; SHRIDHAR, D. R. **Polysorbate 80: a pharmacological study** Arzneimittelforschung 35 (5): 804-804, 1985.

VESPERINAS, G.; FEDDERSEN, M.; LEWIN, J.; HUIDOBRO-TORO, J. P. **The use of ryanodine and calcium channel blockers to characterize intra and extracellular calcium pools mobilized by noradrenaline in the rat vas deferens** Eur. J. Pharmacol 165: 309-313, 1989.

XU, L.; TRIPATHY, A.; PASEK, D. A.; MEISSNER, G. **Potential for pharmacology of ryanodine receptor/calcium release channels** Ann N Y Acad Sci 853: 130-148, 1998

ZHANG, L.; HOROWITZ, B.; BUXTON, L. O. **Muscarinic receptors in canine colonic circular smooth muscle I. Coexistence of M₂ and M₃ subtypes** Mol Pharmacol, 40: 943-951, 1991.

ZUCCHI, R.; RONCA-TESTONI, S. **The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states** Pharmacol Rev 49(1):1-51, 1997.