

VÍVIEN PATRÍCIA GARBIN

**AÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO  
DE *Salvia officinalis* (Linneu 1753) SOBRE A  
MUSCULATURA LISA VASCULAR E NÃO VASCULAR**

Monografia desenvolvida no Departamento de Farmacologia, do Setor de Ciências Biológicas, e apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques.

Co-orientadora: Ms. Yanna Dantas Rattmann.

Curitiba

2006

"A felicidade às vezes é uma benção - mas geralmente é uma conquista. O instante mágico do dia nos ajuda a mudar, nos faz ir em busca de nossos sonhos. Vamos sofrer, vamos ter momentos difíceis, vamos enfrentar muitas decepções - mas tudo é passageiro, e no futuro, podemos olhar para trás com orgulho, e fé em nós mesmos."  
(Paulo Coelho)

## DEDICATÓRIA

Dizem que não é no fim da história que devemos agradecer quem nos ajuda a caminhar, mas sim durante o andar pelo caminho. Acredito que deve-se agradecer antes, durante e depois. Por isso, sei que não vou expressar o quanto estou grata àqueles que estiveram comigo, mas espero que fique para sempre registrado meu afeto.

À minha orientadora, Prof. Dra. Maria Consuelo Marques, por acreditar que eu conseguiria ir até o fim, e pela ajuda incondicional.

À minha co-orientadora, Yanna Dantas Rattmann, que "me apadrinhou" todo este tempo, sempre com um sorriso no rosto e otimismo no coração...

Às meninas do laboratório: Elisângela (ô saudades de casa!!!!), Sandra ("Calma...tudo vai dar certo!"), Kelly (mamãe fofa...), Daniela (sorrisão!) e Larissa (ratinho bonito...) e Fernanda (miss simpatia!), pela ajuda, tanto no trabalho quanto no cotidiano...

À Sílvia e Nair, duas mulheres maravilhosas, que sempre me ajudaram com muito carinho...

Ao Luiz e ao Cândido, do Biotério, que me apoiaram muito e me "salvaram" várias vezes, sempre muito gentis e queridos comigo e com as meninas.

À todos do Departamento de Farmacologia, que ficaram na torcida pelo tão esperado resultado.

À minha família, que esteve longe, mas sempre esteve ali pertinho...

À Malin, Carol, Rhicardo, Paty, Solange, Nana, e todos meus amigos que muitas vezes deixei de lado por causa do trabalho exaustivo.

Ao Fábio, que massageou minhas costas doídas, digitou os textos que eu ditei, agüentou choros e risadas, pesadelos e muitos sonhos, mas ficou firme, me dando apoio ao máximo...

E ao Destino, este sapeca, que me aprontou várias, mas no fim acabou me fazendo dar muita risada...

# SUMÁRIO

	PÁGINA
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vi
<b>RESUMO</b>	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	8
1.1. <i>Salvia officinalis</i> , Linneu 1753	10
1.1.1. Classificação botânica	11
1.1.2. Descrição botânica	12
1.1.3. Parte utilizada	14
1.1.4. Uso popular	14
1.1.5. Composição química	15
1.1.6. Ações farmacológicas	16
<b>1.2. MECANISMOS DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DOS MÚSCULOS LISOS</b>	20
1.2.1. Efeitos da acetilcolina sobre o tônus da musculatura lisa	22
<b>2. OBJETIVOS</b>	26
2.1. GERAIS	26
2.2. ESPECIFICOS	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>Salvia officinalis</i> (EHS)	27
3.2. DROGAS E REAGENTES	27
3.3. MATERIAL BIOLÓGICO	28
3.4. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS TECIDOS	28
3.4.1. Isolamento de traquéia de rato	28
3.4.2. Isolamento de aorta torácica de rato	29
3.4.3. Isolamento de jejuno de rato	30

<b>3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b>	<b>30</b>
3.5.1. Caracterização dos efeitos do EHS sobre traquéia isolada de rato	31
3.5.2. Caracterização dos efeitos do EHS sobre aorta torácica isolada de rato	31
3.5.3. Caracterização dos efeitos do EHS sobre tónus de jejuno isolado de rato	32
<b>3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>32</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>33</b>
4.1. EFEITO DO EHS SOBRE TRAQUÉIA ISOLADA DE RATO	33
4.2. EFEITO DO EHS SOBRE AORTA ISOLADA DE RATO	33
4.3. EFEITO INIBITÓRIO DO EHS SOBRE AS CONTRAÇÕES CUMULATIVAS INDUZIDAS PELA ACETILCOLINA EM JEJUNO ISOLADO DE RATO	34
4.3.1. Reversão do efeito contrátil induzido pela acetilcolina após exposição ao EHS em jejuno isolado de rato	35
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>40</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>41</b>

# LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1:</b> Desenho descritivo de <i>S. officinalis</i> .	13
<b>Figura 2:</b> Folhas em detalhe de <i>S. officinalis</i> .	13
<b>Figura 3:</b> Inflorescência em detalhe de <i>S. officinalis</i> .	13
<b>Figura 4:</b> Aspecto geral de <i>S. officinalis</i> .	13
<b>Figura 5:</b> Via de sinalização envolvida na contração muscular	22
<b>Figura 6:</b> Produção de acetilcolina.	22
<b>Figura 7:</b> Curva concentração-resposta (3 – 3000 µg/ml) induzida pelo extrato hidroalcoólico de <i>S. officinalis</i> (EHS) em traquéia isolada de rato, e o controle com DMSO 5% (veículo) utilizado nos mesmos volumes das concentrações do EHS administrado.	33
<b>Figura 8:</b> Curva concentração-resposta induzida pelo extrato hidroalcoólico de <i>S. officinalis</i> (3 – 1000 µg/ml) em anéis de aorta de rato, e o controle com DMSO 5% (veículo) utilizado nos mesmos volumes das concentrações do EHS administrado.	34
<b>Figura 9:</b> Efeito do EHS sobre as curvas concentração-resposta induzidas pela acetilcolina ( $10^{-9}$ a $10^{-4}$ M).	35
<b>Figura 10:</b> Curva de reversão das contrações induzidas por acetilcolina ( $10^{-9}$ a $10^{-4}$ M) 90 minutos após remoção do EHS nas diferentes concentrações (10, 30, 60 e 100 µg/ml), em relação ao controle com solução de DMSO 5% utilizado no mesmo volume da maior concentração do EHS administrado.	36

# LISTA DE ABREVIATURAS

var.	variedade
nl/mg	nanolitro/miligrama
DPPH	radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
SNC	Sistema Nervoso Central
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
IP <sub>3</sub>	Triosfato de Inositol
DAG	Diacilglicerol
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
VOCs	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem
RyRS	Rianodina
CIRC	liberação de cálcio induzida por cálcio
MLCK	Miosinacinaase de Cadeia Leve
TGI	Trato Gastrointestinal
GMPc	Monofosfato de Guanosina Cíclico
PKG	Proteinocinase Dependente do GMPc
DMSO	dimetilsulfóxido
O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
mM	milimolar
µM	micromolar
µg/ml	microgramas/mililitro
M	molar
EHS	Extrato Hidroalcoólico de <i>S. officinalis</i>

## RESUMO

O gênero *Salvia* é um dos maiores gêneros da família Lamiaceae, sendo cultivada desde os tempos antigos. Do latim *salvere* (salvar), a sálvia guarda sua reputação de “erva da longevidade”. Desta planta comumente faz-se uso das folhas, que são utilizadas em forma de infusão. Empregada popularmente, sem comprovação científica, para ansiedade, irritabilidade, dispepsia, problemas hepáticos e digestivos, menopausa, como redutora de lactação, tônico, em casos de sudorese e como antiglicemiante. Como algumas das ações do extrato de *S. officinalis* descritas na literatura apresentam interações com o sistema colinérgico, exploramos neste estudo as ações do extrato hidroalcoólico da sálvia em músculos lisos vascular e não vascular. Foram utilizados músculo liso vascular isolado (aorta) e músculo liso não vascular isolado (traquéia e jejuno) de ratos (*Ratus norvegicus* variedade Wistar) machos, adultos e pesando entre 200 a 250g. Os ratos foram mortos por deslocamento cervical ou concussão cerebral, e tiveram seus órgãos de interesse retirados, limpos e seccionados em porções. Posteriormente estes foram acondicionadas em cubas contendo líquido nutritivo apropriado, a 37° C, aerado com carbogênio. Os registros foram obtidos por meio de transdutores acoplados a um sistema computadorizado ou em quimógrafos. Em anéis de aorta providos de endotélio vascular e previamente contraídos com fenilefrina 1  $\mu\text{M}$ , o EHS não promoveu relaxamento significativo. O mesmo ocorreu para anéis de traquéia previamente contraídos com acetilcolina 10  $\mu\text{M}$ . Em jejuno, o EHS apresentou um aumento da resposta máxima em torno de 12,2% quando exposta em concentração de 10  $\mu\text{g/ml}$ . Nas demais concentrações, houve uma redução na resposta máxima sem deslocamento da curva concentração-efeito, quando comparada ao controle. As reduções mais significativas foram observadas nas concentrações de 60 e 100  $\mu\text{g/ml}$  (respectivamente 23% e 66,9%). Houve total reversão 90 minutos após a exposição ao EHS. O conjunto dos resultados obtidos indica a existência de efeito antiespasmódico induzido pelo extrato hidroalcoólico da *Salvia officinalis* (EHS) em musculatura lisa de jejuno de rato. Este mecanismo ainda não está elucidado, mas constitui uma perspectiva de continuidade deste estudo, o qual será direcionado inicialmente para a investigação da ação do EHS sobre os canais de cálcio da musculatura lisa do jejuno.

## 1. INTRODUÇÃO

Desde o começo da civilização humana, o homem utiliza plantas com o objetivo de tratar de seus males, segundo relatam os testemunhos históricos pertencentes a diferentes religiões, culturas e civilizações. O ser humano começou a utilizar ervas para aliviar enfermidades imitando o comportamento dos animais, e as tentativas de descobrimento de substâncias ativas a partir das plantas ocorrem há séculos. Há evidências de que o homem de Neandertal, que viveu há mais ou menos 60.000 anos, já fazia uso de plantas medicinais (LAWRENCE, 1992). Este conhecimento passou a ser então parte da cultura dos povos; inicialmente com os curandeiros, que atuavam como médicos da população, depois com o conhecimento passado de geração a geração, mesmo após a descoberta dos medicamentos de síntese (LAWRENCE, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Com a evolução da química, a partir do século XIX, modificou-se a forma de uso das plantas, tanto em uso direto quanto de seus produtos. Passou-se a utilizar suas moléculas ativas, chegando à reprodução artificial de compostos isolados. Conseqüentemente, as plantas perderam muito espaço na pesquisa terapêutica. A descrença que ocasiona a redução do uso de produtos "in natura" na maioria das vezes é conseqüência da não compreensão de seus efeitos, do controle da produção (plantio, coleta, etc.) e das concentrações adequadas dos princípios ativos. A indústria farmacêutica reconheceu que algumas plantas medicinais eram as melhores fontes de componentes para outros medicamentos, ou podiam até substituir alguns alopáticos com igual eficácia e sem efeitos colaterais (ROBBERS *et al.*, 1997). Diante da demanda crescente por produtos naturais ou medicamentos de

origem vegetal pela população, além do conseqüente interesse das indústrias do setor farmacêutico, a pesquisa de plantas medicinais passou a ser essencial e urgente e muitas plantas têm sido pesquisadas. Encontramos na flora brasileira um material riquíssimo de espécies, tendo mais de 55.000 espécies registradas, o que corresponde à cerca de 15 a 20% da diversidade biológica do planeta, e posiciona o Brasil como a nação com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contendo plantas que desempenham as mais variadas atividades, sendo algumas já comprovadas (CALIXTO, 2003). As plantas medicinais são utilizadas em todos os países, podendo servir de matéria prima, para produção industrial de derivados químicos puros, ou tendo grande aplicação no arsenal terapêutico, sendo empregados para o preparo de diversas formas farmacêuticas (BRUNETON, 1991).

A fitoterapia pode ser entendida como o uso de material vegetal na cura de doenças. Para a elaboração de um fitoterápico, são necessários vários estudos, tais como: caracterização dos compostos químicos, determinação da toxicidade, da potência, da eficácia e a concentração do princípio ativo. Todas as drogas de origem vegetal são inscritas na Farmacopéia Brasileira para receberem o reconhecimento de droga oficial, com isso permitindo seu uso como remédio (SANTOS, 1926). Todas as plantas registradas neste compêndio passam por pesquisas em relação as suas propriedades terapêuticas. As técnicas de testes químicos, toxicológicos e farmacológicos nos informam a composição e o mecanismo de ação das plantas a serem utilizadas, proporcionando segurança em seu uso. Entretanto sabe-se que o uso das plantas medicinais antecede em muito a pesquisa científica, sendo por isso longo o caminho para a sua validação, se considerarmos a falta de padrões de qualidade, segurança e eficácia, que tem seu início no processo agrônomo até o produto final (BRUNETON, 1991).

A maioria dos testes efetuados até a década de 70 não obedeciam às normas éticas que foram estabelecidas a partir desta época. A descrição das ações consistia quase que exclusivamente em observações individuais, que no máximo poderiam servir como base de pesquisa e não como resultado conclusivo (RANG *et al.*, 2004).

No Departamento de Farmacologia, o grupo de pesquisa em Farmacologia e Toxicologia Pré-Clinica de Produtos Naturais procura contribuir para a validação de plantas medicinais através da determinação de seus efeitos, eficácia e toxicidade.

Com o objetivo de iniciar os estudos dos extratos e princípios ativos de diferentes plantas do estado do Paraná, e baseados nos dados da literatura sobre ação espasmolítica e antihipertensiva de extratos de *S. officinalis* (TODOROV *et al.*, 1984), testamos o extrato hidroalcoólico da mesma espécie em músculo liso vascular e não vascular de ratos.

#### 1.1. *Salvia officinalis*, Linneu 1753

O gênero *Salvia* é um dos maiores gêneros da família Lamiaceae, com mais de 900 espécies amplamente distribuídos pelo globo terrestre. Sendo um gênero temperado e subtropical, é na maior parte encontrada em regiões de montanha (COLE, 1992). A *S. officinalis* foi descrita por Linneu em 1753. No Brasil *S. officinalis* foi aclimatada e é cultivada na região sul do País (ANDREAZZA, 2000).

*Salvia officinalis* é cultivada desde os tempos antigos, sendo sagrada para gregos e romanos. Do latim *salvere* (salvar), a sálvia guarda sua reputação de “erva da longevidade”. Muito valorizada pelos chineses, eles trocavam, com comerciantes holandeses e ingleses, três baús de chá por um de sálvia. Os egípcios utilizavam

esta erva para promover e aumentar a fertilidade, e o povo romano ingeria como estimulante. Árabes associavam a erva à imortalidade e longevidade, e era costume, antes de criarem outros meios de higiene bucal, esfregar nos dentes folhas frescas de sálvia, e usarem uma decocção em enxágües para evitar sangramentos das gengivas e cáries. Hipócrates descreveu suas propriedades para cura de feridas e chagas através de cataplasmas. Foi introduzida na América do Norte no Século XVII (ALONSO, 2004).

Esta planta apresenta muitos nomes populares, dentre eles: sálvia real, salva, chá da Grécia, erva sagrada, chá-da-França, sabiá, sal-das-boticas, salva-comum, salva-das-boticas, salva-de-remédio, salva-dos-jardins, salva-ordinária, sálvia-comum (ALONSO, 2004; LORENZI & MATOS, 2002). Muito usada em aromaterapia, onde apresenta uma infinidade de indicações, sendo as mais relevantes: antifúngica, antimicrobiana, anti-infecciosa, antioxidante, anti-séptica, antiinflamatória, antiespasmódica, bactericida, emenagoga, expectorante, febrífuga, laxativa, estimulante, colagoga, colerético, cicatrizante, depurativa e digestiva (EAA, 2006). Reforçamos a informação que estes usos não apresentam ainda comprovação científica, sendo utilizadas por sua indicação popular.

#### 1.1.1. Classificação botânica

Reino: Plantae

Sub-reino: Tracheobionta

Superdivisão: Spermatophyta

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub-classe: Asteridae

Ordem: Lamiales

Família: Lamiaceae

Gênero: *Salvia* L.

Espécie: *Salvia officinalis* L. (NRCS, 2006).

### 1.1.2. Descrição botânica

A *S. officinalis* é um subarbusto perene, que pode alcançar entre 30 e 70 cm. Sua raiz é fusiforme e fibrosa, o talo é ereto, lenhoso e quadrangular na base, com numerosas ramificações (Figura 1). Suas folhas são opostas, inteiras, glandulares ou rugosas, finamente dentadas, sendo as inferiores pecioladas e as superiores sésseis, com leve tom esbranquiçado atrás e verdes na frente, recobertas por fina penugem (Figura 2). As flores são azul-violáceas, agrupadas em espigas terminais, em número de 7 a 10, com intenso aroma e abundante néctar (Figura 3). As características das flores variam conforme a variedade da Sálvia. O fruto é tetraquênio (ALONSO, 2004; INFOAGRO, 2006).

A *Salvia officinalis* (típica) alcança uma altura de 40 a 60 centímetros, apresenta folhas ovaladas e flores violetas, sendo a mais cultivada (Figura 4). A *Salvia officinalis* variedade alba apresenta folhas maiores e flores brancas. A *Salvia officinalis* variedade crispa tem folhas espessas, muito largas e onduladas. As flores são de cor azul lavanda. Existem ainda outras variedades como a sálvia de Moncayo, dos prados, sálvia-fina, sálvia-menor, romana, etc. (INFOAGRO, 2006).



**Fig. 1:** Desenho descritivo de *S. officinalis*. Fonte:

[http://www.toildepices.com/index.php?url=/fr/plantes/angio\\_dic/lamiacee/salvia/\\_sp.php](http://www.toildepices.com/index.php?url=/fr/plantes/angio_dic/lamiacee/salvia/_sp.php)  
Acesso em junho/2006



**Fig. 2:** Folhas em detalhe de *S. officinalis*.

Fonte:

<http://www.hort.cornell.edu/4hplants/Vegetables/Images/Sage-22.jpg>. Acesso em julho/2006



**Fig. 3:** Inflorescência em detalhe de *S. officinalis*. Fonte:

<http://www.hoku-iry-u.ac.jp/~yakusou/hyouhonen/sarubia.htm>  
Acesso em junho/2006



**Fig. 4:** Aspecto geral de *S. officinalis*.

[http://www.biokultura.org/kiadvanyok/biokultura\\_folyoiratok/2005/2005\\_1.htm](http://www.biokultura.org/kiadvanyok/biokultura_folyoiratok/2005/2005_1.htm). Acesso em junho/2006

A *Salvia officinalis* é originária do sul europeu na zona dos Balcãs, sendo amplamente cultivada na jardinagem. A *S. officinalis* pode crescer em solos secos, argilosos até os 750 metros de altitude (ALONSO, 2004). Toda a planta exala um agradável odor característico. Pela sua aparência vistosa e decorativa, a sálvia também é utilizada como ornamental.

#### 1.1.3. Parte utilizada

A fórmula comercializada mundialmente é constituída pelas folhas, porém algumas farmacopéias consideram também as inflorescências. As folhas são coletadas um pouco antes da floração, por apresentar uma maior concentração de óleo essencial. A droga apresenta odor aromático e balsâmico, porém o sabor é amargo e um pouco adstringente. O rendimento por destilação por vapor de água está em torno de 1,6% (ALONSO, 2004).

#### 1.1.4. Uso popular

A Sálvia é empregada popularmente, sem comprovação científica, para ansiedade, irritabilidade, dispepsia, problemas hepáticos e digestivos, menopausa, como redutora de lactação, como tônico, em casos de sudorese em excesso nas extremidades e antiglicemiante (ALONSO, 2004; OLIVEIRA & AKISSUE, 2000). Geralmente é utilizada em forma de infusão, com exceção no caso de transpirações das extremidades, onde é preferível a tintura. A *S. officinalis* é a mais estudada dentro do gênero, e por suas propriedades antimicrobianas, é muito utilizada também na higiene bucal, em banhos vaginais (casos de leucorréia), e aplicações

em feridas infectadas e aftas (ALONSO, 2004; MAROCHI, 1997; OLIVEIRA & AKISSUE, 2000). Na indústria cosmética utiliza-se na forma de extrato alcoólico ou destilado, em desodorantes, tônicos e antiperspirantes (MAROCHI, 1997). Além disso, a sálvia também é muito utilizada na culinária como condimento (OLIVEIRA & AKISSUE, 2000).

#### 1.1.5. Composição química

A planta é rica em flavonóides e também contém numerosos triterpenos derivados do ursano, onde o ácido ursólico está em maior quantidade, e do oleanano, assim como diterpenos e ácidos fenólicos (SIMOES *et al.*, 2001). Seu óleo essencial (1-2,8%) contém:  $\alpha$  e  $\beta$ - tujonas: (cetonas monoterpênicas bicíclicas, sendo  $\alpha$  na maioria dos casos predominante) (35-60%);  $\alpha$  - terpineol; linalol livre e esterificado; óxido de cariofileno; cineol; d- terpinol;  $\alpha$  - pineno; mirceno; canfeno; limoneno; ocimeno; alo-ocimeno; p-canfeno; aromadendreno;  $\beta$  - cariofileno; humuleno;  $\alpha$  - maalieno;  $\alpha$  - corocaleno;  $\beta$ - copaeno; isovalerianto de metila; alcanfor; viridiflor; timol; acetato de bornilo; acetato de sabinol e acetato de linalol (ALONSO, 2004; SIMOES *et al.*, 2001). Seus princípios amargos são diterpenos fenólicos entre os quais se destacam o carnosol, o ácido carnosílico, rosmanol, manool, etc. Seus flavonóides (1- 3%) são luteolina e glucoronídeos associados, hispidulina, 5-metoxi-salvigenina, genkwanina, 6-metoxigenkwanina, apigenina, vicenina, etc. Apresenta outros compostos, como: ácidos fenólicos (caféico, clorogênico, elágico, ferúlico, gálico, labiático e rosmarínico), taninos hidrolisáveis e condensados, asparagina (raiz), oleorresina, ácidos fosfórico, oxálico, ursólico, oleanico e nítrico em forma de sais. As sementes contem proteínas e ácidos graxos

compostos por aproximadamente 14% de ácido oléico, 29% de ácido linoleico, 34% de ácido linolênico e 12% de ácidos saturados. O ácido rosmarínico é um éster de ácido cafeico e do 4-4-dihidroxifeniláctico, e provém da rota de biossíntese originada na L-fenilalanina e L-tirosina (ALONSO, 2004). Os polissacarídeos que a *S. officinalis* possui em maior concentração são arabinose, galactose, 3-*o*-metilgalactose, glucose, manose, xilose, fucose, ramnose, e ácidos úricos (GILLI *et al.*, 1994), aos quais foi atribuída uma atividade imunomoduladora *in vitro* (CAPEK *et al.*, 2003; CAPEK & HRIBALOVA, 2004).

A tujona (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>O) desempenha um papel no controle de qualidade do óleo essencial: uma alta concentração de tujona determina uma ótima qualidade de óleo (GUENTHER, 1974). A tujona possui atividades antihelmínticas, psicoativas, possível efeito abortivo, antídoto de ópio e outras ações depressoras do SNC, estimulante do coração e promove aumento na taxa de formação de DNA e RNA. O termo salviol é usado para a tujona extraída da *S. officinalis* (PULEO, 1978).

#### 1.1.6. Ações farmacológicas

Os extratos da *Salvia officinalis* obtidos por diferentes solventes, o óleo essencial bem como os constituintes isolados a partir destes são responsáveis por muitas ações farmacológicas em diferentes sistemas fisiológicos.

O óleo essencial da Sálvia (em especial os compostos acetato de bornila e o  $\alpha$ -pineno) demonstrou atividade antiespasmódica *in vivo*. A sua administração intravenosa em cobaias resultou em uma inibição na contração do esfíncter de Oddi (GIACHETTI *et al.*, 1988). São descritas outras atividades do óleo essencial, como atividade antibactericida sobre microorganismos isolados de infecções do trato

urinário (PEREIRA *et al.*, 2004), atividade colerética *in vivo* (ALONSO, 2004) e ainda atividade tóxica em culturas de hepatócitos, quando em doses maiores que 200 nl/mg (LIMA *et al.*, 2004), dentre outras.

O extrato aquoso da sálvia apresentou um efeito hepatoprotetor em ratos submetidos à azathioprina (AMIN & HAMZA, 2005). No extrato metanólico de *Salvia officinalis* foram encontrados 4 diterpenos, o ácido carnósico, o carnosol, o ácido royleanônico, e o 7- metoxirosmanol, e um triterpeno, o ácido oleanólico. O ácido carnósico e o carnosol apresentaram efeito inibidor da atividade da lipase pancreática, enzima com importante papel na digestão de lipídeos, sendo que o carnosol a inibiu em uma dose menor. A este constituinte também foi atribuída a propriedade aperitiva-eupéptica (LAMAISON *et al.*, 1991). Além disso, o ácido carnósico também inibiu a elevação de triglicérides (NINOMIYA *et al.*, 2004).

O Efeito hipoglicemiante de *S. officinalis* foi observado em experimentos com o extrato hidroalcoólico, no qual a hiperglicemia em ratos diabéticos foi significativamente reduzida (ALARCON-AGUIAR *et al.*, 2002). Um resultado semelhante também foi obtido com o tratamento de ratos diabéticos 3 horas após a administração do extrato metanólico desta planta (mas não com o seu óleo essencial), observou-se ainda que não houve interferência na liberação da insulina pelo pâncreas em ratos saudáveis. (EIDI *et al.*, 2005)

A atividade antimicrobiana dos taninos da *S. officinalis* parece ter beneficiado a diminuição do crescimento de placas dentárias, inibição da inflamação na gengiva e os efeitos positivos na prevenção de cáries (WILLERSHAUSEN *et al.*, 1991). HUBBERT e colaboradores (2006) demonstraram que o extrato fluido desta planta pode ser um eficaz auxiliar no tratamento de faringite aguda, tendo sua sintomática diminuída após 24 horas da primeira administração. Estes resultados

foram estatisticamente significantes em relação ao do placebo. A *Salvia officinalis* é incluída como um ingrediente ativo em preparações que utilizam várias plantas para o tratamento de bronquite crônica e aguda, devido à atividade anti-viral dos extratos aquoso e etanólico (MANOLOVA *et al.*, 1995). A atividade anti-viral dos compostos dímeros do ácido caféico, obtidos da *S. officinalis*, foi pesquisada sobre a atividade da enzima HIV-integrase (enzima que une o DNA complementar do vírus ao DNA cromossômico da célula hospedeira) e apresentou potente efeito inibitório em concentrações micromolares (BAILY *et al.*, 2005), e ainda apresentou atividade na forma de creme, principalmente ao ser combinada ao ruibarbo, contra vírus do herpes labial, em efeito comparável ao creme de Aciclovir (SALLER *et al.*, 2003).

O extrato clorofórmico das folhas de *Salvia officinalis* mostrou forte atividade anti-inflamatória tópica atribuída à presença do ácido ursólico e esta atividade é influenciada pelo lugar de cultivo da planta (BARICEVIC *et al.*, 2001).

Uma importante propriedade antioxidante é atribuída à *S. officinalis*. A infusão da planta promoveu aumento do potencial antioxidante do fígado de ratos, sugerindo a existência de compostos bioativos no chá (PEREIRA-WILSON *et al.*, 2005). Esta propriedade pode estar relacionada com a presença de componentes fenólicos, derivados do carnosol e flavonóides, sendo eles: ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico, ácido caféico, genkwanina, rosmanol, rosmadial e cirsimaritina (CUVELIER *et al.*, 1996). Os derivados do ácido rosmarínico (ácido salvianólico K e I, sagecoumarina e ácido sagerínico) demonstraram maior potencial antioxidante que os flavonóides (LU *et al.*, 2001A, 2001B). O ácido carnósico e o carnosol apresentam extrema instabilidade, dependendo de fatores como a temperatura, a luz, oxigênio e o solvente utilizado na extração (SCHWARZ *et al.*, 1992). Estes compostos demonstraram alta atividade como seqüestrador de radical

peroxil e hidroxil e o ácido carnósico também apresentou atividade como seqüestrador de peróxido de hidrogênio (TEPE *et al.*, 2006). O ácido carnósico é facilmente convertido enzimaticamente em ácido 1,2-*o*-metilcarnósico, onde o grupo metil elimina a atividade antioxidante da molécula, ou também pode levar à formação de carnosol, este com atividade antioxidante (LUIS, 1991; ARUOMA *et al.*, 1992). A atividade seqüestrante de espécies reativas de oxigênio pelo ácido carnósico leva à formação de diterpenos altamente oxidados, como o rosmanol e o isorosmanol (LUIS 1991; GONZALEZ *et al.*, 1992). O ácido salvianólico, extraído com água/acetona 70%, demonstrou ter um alto poder como seqüestrador de radicais superóxidos e DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila), superiores ao ácido caféico e rosmarínico (SCHWARZ *et al.*, 1992).

Um efeito antimutagênico foi atribuído às frações terpênicas da *S. officinalis* testadas em mamíferos, sugerindo uma possível utilidade no tratamento do câncer (VUJOSEVIC & BLAGOJEVIC, 2004). Quinonas diterpênicas isoladas das raízes desta planta demonstraram atividade citotóxica e danosa na replicação de DNA em células cancerígenas de cólon e hepatócitos *in vitro* (SLAMENOVA *et al.*, 2004).

Em testes que avaliaram a atividade antifertilidade pós coital, três extratos da *S. officinalis* obtidos com éter de petróleo, benzeno e água foram testados mas não demonstraram efeitos significantes (KHOLKUTE *et al.*, 1976).

Alguns componentes da *Salvia officinalis* parecem apresentar interferências na ação de anticonvulsivantes (ALONSO, 2004). Podem também potencializar os efeitos sedativos de benzodiazepínicos, por afinidade com seus receptores (KAVVADIAS *et al.*, 2003). O extrato desta planta ainda proporcionou melhora significativa de pacientes com doença de Alzheimer moderada, e parece reduzir a agitação nos portadores (AKHONDZADEH *et al.*, 2003).

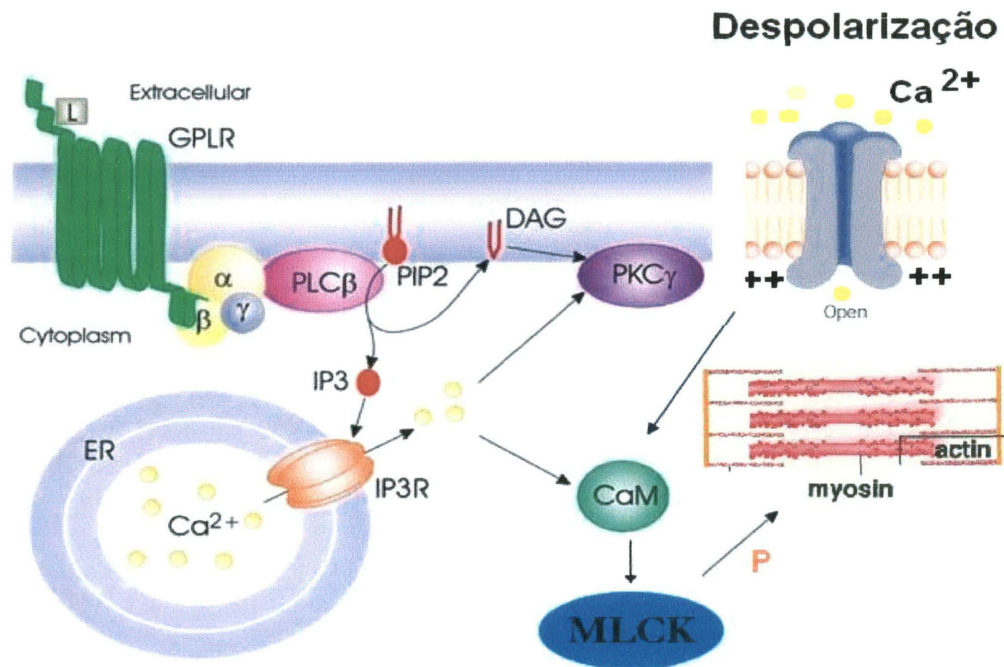
Estudos realizados com o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* demonstraram uma moderada, porém prolongada, diminuição na pressão sanguínea de gatos e ainda apresentou uma atividade inibitória de 60 a 80% sobre o fêto isolado de cobaias contraídos por histamina, acetilcolina, serotonina e cloreto de bário (TODOROV *et al.*, 1984). Inspirados por este estudo, investigamos a ocorrência de efeito inibitório do extrato hidroalcoólico da *Salvia officinalis* sobre a musculatura lisa vascular e não vascular.

## 1.2. MECANISMOS DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DOS MÚSCULOS LISOS

A contração de músculos, tanto para o músculo esquelético, quanto para o cardíaco ou o liso, possuem sua base molecular fundamental muito semelhante, isto é, com a interação entre filamentos de actina e miosina, iniciada por um aumento da concentração de cálcio intracelular e impulsionada pela energia vinda do ATP. Contudo, cada músculo apresenta características próprias neste mecanismo, responsáveis por sua diferente resposta a fármacos e outros mediadores químicos (RANG *et al.*, 2004). Nos músculos esquelético e cardíaco, a contração é desencadeada pela fixação do cálcio à troponina C (GANONG, 1998). Em células de músculo liso, o cálcio é o fundamental segundo mensageiro (Figura 5). O aumento das concentrações citoplasmáticas de cálcio, sua ligação à calmodulina, e a ativação da quinase de cadeia leve da miosina são os primeiros estímulos para a contração. Para ativar o mecanismo contrátil, é necessário um aumento global dos níveis de cálcio citoplasmático (SANDERS, 2001). O  $Ca^{2+}$  entra no compartimento citoplasmático, através da abertura de canais, durante períodos de despolarização da membrana, estimulação por agonistas ou distorção mecânica. A liberação de

estoques intracelulares é uma segunda maneira de aumentar as concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula. Após um evento excitatório, o relaxamento e a homeostase do cálcio são obtidos por sua recaptação para os estoques intracelulares e através da sua eliminação por abertura de canais para o espaço extracelular. Esta cadeia de eventos é realizada por pelo menos uma dúzia de transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  e canais iônicos especializados (SANDERS, 2001). O relaxamento do músculo liso ocorre quando há uma dissociação final do complexo cálcio-calmodulina, ou quando outro mecanismo atua (GANONG, 1998), como a desfosforilação da cadeia leve regulatória, promovida por uma fosfatase de cadeia leve da miosina (ANDERSSON & ARNER, 2004).

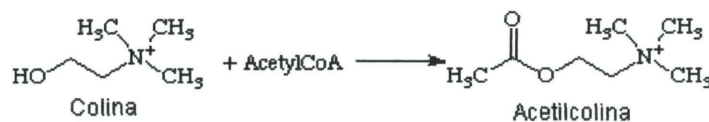
As propriedades do músculo liso variam de forma considerável em diferentes órgãos, e na maioria dos casos, o potencial de ação é gerado por canais de cálcio de tipo L, voltagem dependentes, sendo uma importante via de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . O influxo de cálcio também pode ocorrer através de canais regulados por ligantes, quando estes respondem a transmissores. As células musculares lisas também armazenam cálcio no retículo sarcoendoplasmático, de onde pode ser liberado através da ativação de receptores para mediadores específicos com o receptor para trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ), um segundo mensageiro produzido pela ativação de muitos receptores acoplados a proteína G. Conseqüentemente, pode haver liberação de cálcio e contração do músculo liso sem a necessidade de eventos elétricos e entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana, apenas pela ativação dos receptores acoplados à proteína G (ANDERSSON & ARNER, 2004; RANG *et al.*, 2004).



**Fig. 5:** Via de sinalização envolvida na contração muscular. Fonte: Google Imagens, acesso em abril/2006.

### 1.2.1. Efeitos da acetilcolina sobre o tônus da musculatura lisa

A acetilcolina foi um dos primeiros neurotransmissores a ser descoberto, (originalmente foi chamada de "vagusstoff" por ser liberada por estimulação do nervo vago ao alterar as contrações da musculatura cardíaca).



**Fig. 6:** Produção de acetilcolina. Fonte: <http://www.neurosci.pharm.utoledo.edu/MBC3320/acetylcholine.htm>. Acesso em junho/2006.

A acetilcolina é produzida por ação da enzima colina acetiltransferase, a qual utiliza como substratos a acetilcoenzima A e a colina (Figura 6). Após liberação, a

acetilcolina torna-se inativa após ser metabolizada em colina e acetato pela enzima acetilcolinesterase e outras esterases (ex. butirilcolinesterase).

As ações da acetilcolina são resultado da ativação dos receptores nicotínicos ou dos receptores muscarínicos. Os receptores muscarínicos sensíveis a acetilcolina são subdivididos em 5 subtipos ( $M_1 - M_5$ ) (BARNES, 1989). Tanto  $M_2$  como  $M_3$  estão presentes no músculo liso e  $M_2$  corresponde a aproximadamente 80% da população total de receptores. A ativação de receptores muscarínicos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  estimulam a transformação do fosfatidilinositol em diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), enquanto que a ativação dos receptores  $M_2$  e  $M_4$  diminuem a síntese de AMPc (BIRNBAUMER, 1990). Assim, os receptores  $M_1$  e  $M_3$  estão vinculados com a ativação de proteína  $G_{q/11}$  (síntese de  $IP_3$ ) e o  $M_2$  e  $M_4$  estão vinculados com a ativação da  $G_{i/10}$  (inibição da síntese de AMPc, ativação direta de canais de potássio e outras ações) (BONNER *et al.*, 1987; BUCKLEY 1990; DÖRJE *et al.*, 1990; HULME *et al.*, 1990). Dentre vários efeitos, os receptores muscarínicos são responsáveis por deflagrar mecanismos de contração ou relaxamento da musculatura lisa. Para promover a contração, a acetilcolina se liga aos receptores muscarínicos, induzindo a formação de diacilglicerol (DAG) e  $IP_3$  (trifosfato de inositol), que atua sobre receptores específicos no retículo sarcoendoplasmático, levando a liberação de  $Ca^{2+}$ . O aumento na concentração intracelular de cálcio tem efeito em cadeia sobre outros canais modulados ou ativados por cálcio, como, por exemplo, canais de potássio, cloreto e, algumas vezes, canais de cátions. Estes eventos podem ocasionar despolarização de membrana, que permite a entrada de uma quantidade maior de cálcio, através da abertura de canais de cálcio voltagem dependentes (VOCs). Além disso, o cálcio pode atuar sobre receptores de  $IP_3$  e da rianodina (RyRS) presentes no retículo sarcoendoplasmático, induzindo uma maior

liberação de cálcio, produzindo um evento conhecido como “liberação de cálcio induzida por cálcio” (CIRC) (ISHII *et al.*, 1986; CARDFOLI, 1987; CARSTEN & MILLER, 1987; VAN BREEMEN, 1989; IINO, 1989; GAFFIN, 1999). A elevação da concentração intracelular de cálcio resulta em maior ligação deste à calmodulina. O cálcio, ligado à calmodulina, ativa a miosina quinase de cadeia leve (MLCK), que contribui para a fosforilação das miosinas (miosinas-P), induzindo a contração da musculatura lisa (CARL *et al.*, 1996). A fosforilação permite que a ATPase da miosina possa ser ativada pela actina, possibilitando a interação entre os filamentos e a contração muscular (BOLTON, 1979; ABDEL-LATIF, 1986; ISHII *et al.*, 1986; CARDFOLI, 1987; CARSTEN & MILLER, 1987; VAN BREEMEN, 1989; SWEENEY *et al.*, 1994). Portanto, alterações no influxo de cálcio extracelular e/ou liberação intracelular deste íon influenciam no processo de contração e no tônus do músculo (VAN BREEMEN *et al.* 1987).

Segundo WRZOS *et al.* (2004), os mecanismos de regulação da contração colinérgica do músculo liso intestinal são complexos e ainda não foram completamente elucidados. Receptores muscarínicos específicos estão presentes em grandes quantidades no músculo liso do trato gastrointestinal (TGI). A acetilcolina é um neurotransmissor bem conhecido do trato gastrointestinal, e a ativação de receptores colinérgicos muscarínicos é importante no mecanismo de contração do intestino e cólon (TEZUKA *et al.*, 2004). Apresenta efeito oposto ao da noradrenalina e os simpatomiméticos sobre o potencial de membrana e sobre a atividade contrátil do músculo liso do TGI (GANONG, 1998).

De forma semelhante, nas vias aéreas a acetilcolina liberada pelos nervos parassimpáticos (ex: nervo vago) gera contração da musculatura lisa traqueal e dos brônquios por ação sobre receptores M<sub>3</sub>. Parece não haver inervação simpática do

músculo liso brônquico, portanto, os efeitos gerados ocorrem por ação das catecolaminas circulantes (ex. adrenalina), especialmente sobre os receptores  $\beta_2$  adrenérgicos (RANG *et al.*, 2004).

Os efeitos colinérgicos sobre o músculo liso vascular são opostos aos observados para os não-vasculares, devido a sua ação sobre as células endoteliais adjacentes, isto é, a acetilcolina causa vasodilatação de quase todos os leitos, mediada principalmente pela presença de receptores do subtipo  $M_3$ , localizados nas células endoteliais dos vasos sanguíneos. Quando estimulados, estes promovem a liberação de óxido nítrico pelas células endoteliais, e este se difunde para as células dos músculos lisos adjacentes. O óxido nítrico estimula a guanilato ciclase solúvel, com o conseqüente aumento da produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e ativação das proteínas quinases dependente do GMPc (PKG). O aumento dos níveis intracelulares de GMPc reduz o influxo de  $Ca^{2+}$  através da membrana plasmática, bem como a liberação de  $Ca^{2+}$  de seus depósitos intracelulares, aumentando o seqüestro do íon. A PKG, e ainda o GMPc e o NO podem diretamente ativar canais de potássio, induzindo hiperpolarização, o que impede a entrada de  $Ca^{2+}$  para o citoplasma, levando à vasodilatação (BATLOUNI, 2001; GOODMAN *et al.*, 2003). Existe também um mecanismo indireto de vasodilatação pela acetilcolina, através da inibição da liberação de noradrenalina pelas terminações adrenérgicas (GOODMAN *et al.*, 2003). Nos vasos, a noradrenalina e agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (ex. fenilefrina) provocam vasoconstrição por estimularem a fosfolipase C a produzir DAG,  $IP_3$  e conseqüente aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , o mesmo mecanismo intracelular ativado para a obtenção de contração induzida pela acetilcolina em outros tecidos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. GERAIS

Identificar uma possível ação do extrato hidroalcoólico da *Salvia officinalis* (EHS) sobre o tônus da musculatura lisa vascular e não vascular de ratos.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- Definir as concentrações do EHS capazes de promover efeitos sobre a musculatura lisa;
- Investigar a existência de efeito do EHS sobre a contratilidade induzida pela acetilcolina em músculo liso de traquéia isolada de rato;
- Identificar a ocorrência de efeito relaxante do EHS sobre as contrações induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato;
- Investigar se o EHS promove algum efeito sobre as contrações cumulativas induzidas pela acetilcolina em jejuno isolado de rato e caracterizar este efeito;
- Havendo efeito, estabelecer o período necessário para a reversão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE *Salvia officinalis* (EHS)

O extrato hidroalcoólico foi gentilmente cedido para este estudo pelo professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Os procedimentos de preparo dos extratos foram como segue: 2,0 kg de planta seca e moída foram percolados com etanol/15% água. Dez litros do percolado foram concentrados em rotavapor na temperatura de até 45 °C, rendendo 154,8 g de percolado hidroalcoólico seco. Após a percolação, o mesmo material (planta) foi extraído por maceração durante oito dias com etanol/15% água. A maceração consiste em deixar a matriz (planta seca e moída) em contato com o solvente extrator (“deixar de molho”) por um determinado período. Após a maceração, o solvente foi retirado e concentrado em rotavapor à temperatura de até 45 °C rendendo 320 g de extrato hidroalcoólico seco.

#### 3.2. DROGAS E REAGENTES

Para o cumprimento dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ), dihidrogenofosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), D-Glucose, e D-Glucose, , fenilefrina e acetilcolina (todos Merck; Alemanha); Todos os sais foram dissolvidos em água

destilada e as diluições das drogas (obtidas a partir das soluções estoques) foram preparadas com líquido nutritivo de Tyrode (para jejuno) e Krebs-Henseleit (para aorta e traquéia). O EHS foi dissolvido em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (50 µl de DMSO + 950 µl de líquido nutritivo), obtendo 1 ml de solução final, de forma que, ao ser adicionado na cuba, a quantidade deste correspondia até 0,5%, a qual não interferiu significativamente na resposta normal dos tecidos, de acordo com os controles obtidos nos experimentos. As drogas foram aplicadas de modo que o volume total de cada droga não excedesse 0,1 ml no banho.

### 3.3. MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus* variedade Wistar) machos, adultos e pesando entre 200 a 250g, provenientes da colônia do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, tratados com água e ração balanceada padrão (Nuvital<sup>®</sup>, Curitiba/PR) "ad libitum".

### 3.4. PROCEDIMENTO PARA PREPARAÇÃO DOS TECIDOS

#### 3.4.1. Isolamento de traquéia de rato

Os ratos foram mortos por concussão cerebral e imediatamente após a traquéia foi cuidadosamente retirada e colocada em um recipiente (placa de Petri), contendo solução nutritiva aquecida previamente, no qual o tecido conectivo foi extraído, e foi seccionada em anéis medindo aproximadamente 4 mm de

comprimento. Estes anéis foram acondicionados, por meio de hastes, em cubas de vidro (com volume máximo de 3 ml) contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit, sob temperatura constante de 37°C e aerada com solução carbogênica, 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Uma das extremidades da haste foi conectada a um transdutor de força acoplado a um sistema computadorizado, que permite o registro de contrações isométricas. Logo a seguir, os anéis de traquéia foram submetidos a uma tensão de 1 g durante 60 minutos, tempo reservado para estabilizar a preparação, antes do início dos protocolos experimentais. O tempo de 60 minutos também foi respeitado nos intervalos entre as curvas, sendo que neste período o líquido nutritivo foi renovado a cada 15 minutos. O líquido nutritivo Krebs-Henseleit apresenta a seguinte composição (concentrações em mM): NaCl (133), KCl (5,0), CaCl<sub>2</sub> (2,5), MgSO<sub>4</sub> (1,3) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2), NaHCO<sub>3</sub> (20) e Glicose (10). Foi adicionado ácido acético (10%) ao líquido nutritivo para ajustar o pH em 7,4.

Os registros das respostas foram obtidos por meio de um sistema composto por transdutores isométricos (modelos TRI 210 da Letica Scientific Instruments e F 1202 da CB Sciences, EUA), acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, MacLab ADI Instruments, EUA), conectados a um computador Macintosh contendo um software específico de integração (Chart v3.6.8, PowerLab/MacLab, ADI Instruments, EUA).

#### 3.4.2. Isolamento de aorta torácica de rato

Os ratos foram mortos por deslocamento cervical, e a aorta torácica foi retirada. O tecido conectivo foi removido e a camada muscular seccionada em anéis com 4 mm de comprimento. Estes anéis foram mantidos em cubas de vidro (3 ml),

contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit, a 37°C, aerada com solução carbogênica e sob 1 g de tensão. A haste de suspensão do anel de aorta foi conectada a um transdutor de força que permitiu o registro de contrações isométricas em programa de computador. Um período de 60 minutos de estabilização foi permitido para a estabilização e também nos intervalos entre as curvas, sendo o líquido nutritivo renovado a cada 15 minutos.

#### 3.4.3. Isolamento de jejuno de rato

Para estudar os efeitos do EHS em musculatura lisa não vascular, os animais foram mortos por deslocamento cervical com barra metálica, sua cavidade abdominal foi aberta e uma porção do intestino, correspondente ao jejuno, foi retirada e imersa em líquido nutritivo de Tyrode (NaCl 136,9; KCl 2,68; MgCl<sub>2</sub> 0,53; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33; CaCl<sub>2</sub> 1,8; Glicose 5,6; mM), aquecido a 37° C e constantemente aerado. A luz do órgão foi lavada com solução de Tyrode, para retirar resíduos alimentares.

O jejuno foi dividido em porções de aproximadamente 1,5 cm e as extremidades foram amarradas. Os órgãos foram suspensos em hastes de vidro em banho de perfusão através de uma das extremidades, enquanto que a outra foi conectada à alavanca de inscrição frontal para registro das contrações isotônicas (ampliado em 6 vezes) em cilindro de papel esfumado de um quimógrafo (CARLINI, 1973). As preparações permaneceram em estabilização por 30 minutos, trocando-se o líquido de Tyrode a cada 10 minutos.

### 3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### 3.5.1. Caracterização dos efeitos do EHS sobre traquéia isolada de rato

Após o período de estabilização (60 minutos), os anéis foram submetidos inicialmente a contrações com acetilcolina (1  $\mu$ M). A bradicinina (10  $\mu$ M) foi adicionada para confirmar a integridade epitelial da traquéia através do relaxamento. Após 60 minutos, uma nova contração com acetilcolina foi obtida e, na fase sustentada desta contração o EHS (3, 5, 10, 30, 50, 100, 150, 300, 500, 1000, 1500 e 3000  $\mu$ g/ml) foi administrado cumulativamente e o seu efeito foi observado. Após uma hora deste procedimento, uma nova curva acetilcolina/bradicinina foi obtida com o objetivo de avaliar se o extrato era capaz de comprometer a integridade das preparações. Para avaliar se o veículo, DMSO 0,5%, era capaz de alterar o tônus do tecido, o mesmo foi adicionado à preparação, previamente contraída com acetilcolina, nos volumes correspondentes às diferentes concentrações do EHS.

### 3.5.2. Caracterização dos efeitos do EHS sobre aorta isolada de rato

Após o período de estabilização (60 minutos), a presença ou ausência de endotélio foi confirmada através da administração de acetilcolina (1  $\mu$ M) nos anéis de aorta contraídos previamente por fenilefrina (1  $\mu$ M). Foram considerados anéis com endotélio funcional aqueles cujo relaxamento mínimo produzido pela acetilcolina correspondeu a 80% da contração. Uma segunda resposta à fenilefrina foi obtida e, durante a fase tônica da contração resultante, foi adicionado EHS nas concentrações de 3, 5, 10, 30, 50, 100, 150, 300, 500 e 1000  $\mu$ g/ml. Ao término deste procedimento, induziu-se uma nova contração por fenilefrina (1  $\mu$ M), seguida

da adição da acetilcolina (1  $\mu$ M), com o objetivo de avaliar se o extrato era capaz de comprometer a integridade das preparações. Para avaliar se o veículo, DMSO 0,5%, era capaz de alterar o tônus do tecido, o mesmo foi adicionado à preparação nos volumes correspondentes às diferentes concentrações do EHS.

### 3.5.3. Caracterização dos efeitos do EHS sobre jejuno isolado

Após o período de estabilização, foram induzidas curvas cumulativas controles com a acetilcolina nas concentrações entre  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$ M. As preparações de jejuno foram lavadas a cada 10 minutos e, depois de 30 minutos, EHS foi incubado nas concentrações de 10, 30, 60 ou 100  $\mu$ g/ml em diferentes preparações. Em outra preparação, o DMSO foi incubado para efetuar o controle do veículo. Após 5 minutos da adição do extrato, foi induzida uma nova curva concentração-efeito para a acetilcolina. Para verificar a possibilidade de o extrato provocar lesões nos tecidos, nova curva cumulativa com acetilcolina foi repetida após 90 minutos.

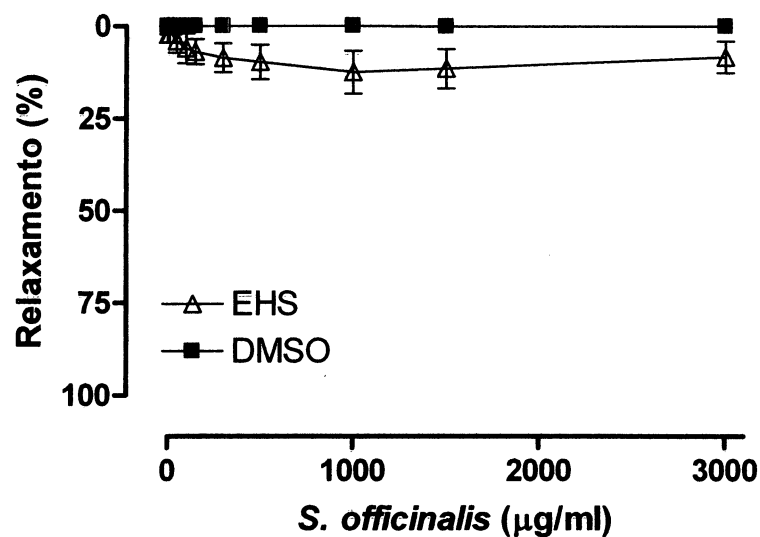
### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de médias. Os resultados significativos foram determinados através de análises de variância (ANOVA) e conferidos pelo teste t de Bonferroni. Os valores P com menos de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Gráficos e análises estatísticas foram executadas usando GraphPad Prism versão 3,00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. EFEITO DO EHS SOBRE TRAQUÉIA ISOLADA DE RATOS

O EHS não promoveu relaxamento significativo em anéis de traquéia previamente contraídas com acetilcolina 10  $\mu$ M (Figura 7). O DMSO utilizado como veículo não promoveu nenhuma alteração no tônus do tecido.

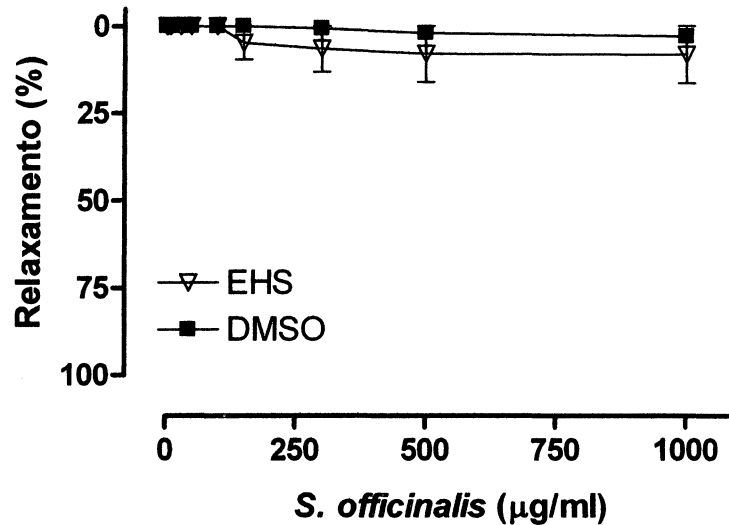


**Fig. 7:** Curva concentração-resposta (3 – 3000  $\mu$ g/ml) induzida pelo extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (EHS) em traquéia isolada de rato, e o controle com DMSO 5% (veículo) utilizado nos mesmos volumes das concentrações do EHS administrado. Os pontos correspondem às médias  $\pm$  erro padrão das médias de 5 experimentos.

### 4.2. EFEITO DO EHS SOBRE AORTA ISOLADA DE RATOS

Em anéis de aorta providos de endotélio vascular e previamente contraídos com fenilefrina 1  $\mu$ M, o EHS não promoveu relaxamento significativo (Figura 8). O

DMSO 5%, utilizado como veículo, não alterou o tônus do tecido pré contraído por fenilefrina.



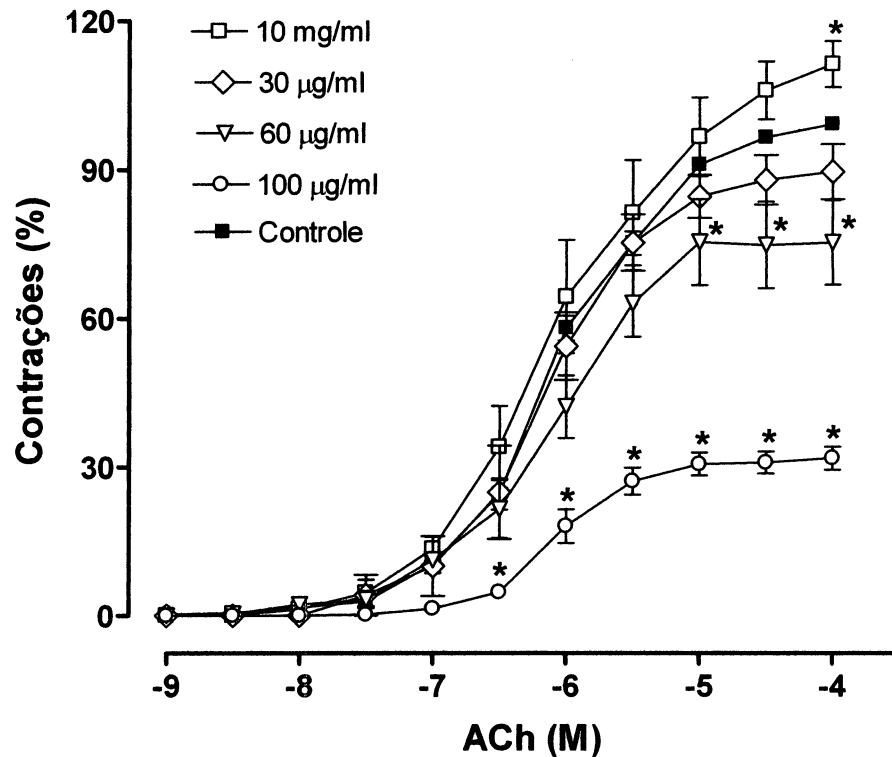
**Fig. 8:** Curva concentração-resposta induzida pelo extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (3 – 1000 µg/ml) em anéis de aorta de rato, e o controle com DMSO 5% (veículo) utilizado nos mesmos volumes das concentrações do EHS administrado. Os pontos representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 5 experimentos.

#### 4.3. EFEITO INIBITÓRIO DO EHS SOBRE AS CONTRAÇÕES CUMULATIVAS INDUZIDAS PELA ACETILCOLINA EM JEJUNO ISOLADO DE RATO

Em jejuno, o EHS induziu um aumento da resposta máxima na concentração de 10 µg/ml. Nas demais concentrações, houve uma redução na resposta máxima sem deslocamento da curva concentração-efeito, quando comparada ao controle. As inibições mais significativas foram observadas nas concentrações de 60 e 100 µg/ml (Figura 9).

Em comparação à curva controle, a concentração de 10 µg/ml do EHS aumentou em torno de 12,2% a resposta máxima ( $E_{MAX}$ ) induzida pela acetilcolina na

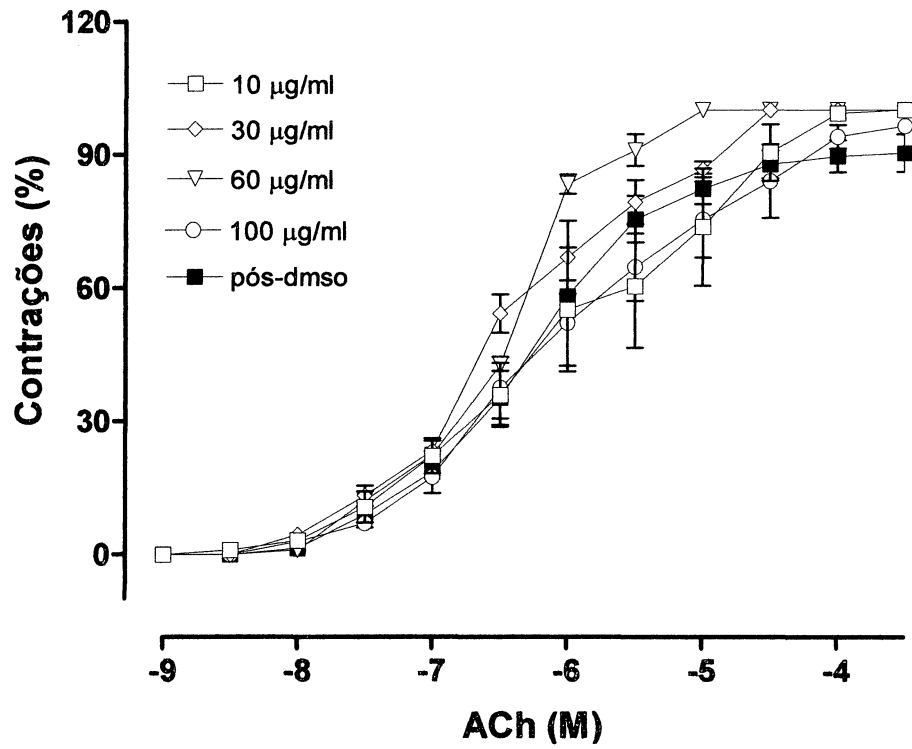
concentração  $10^{-4}$ . Nas demais curvas na presença do EHS 30, 60 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , houve redução de forma concentração dependente das respostas máximas, cujas porcentagens correspondem respectivamente a 8,7% (não significante estatisticamente), 23% e 66,9%.



**Fig. 9:** Efeito do EHS sobre as curvas concentração-resposta induzidas pela acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$ M). Os pontos representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 4 a 6 experimentos. \* Indica  $p < 0,05$ , ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

#### 4.3.1. Reversão do efeito contrátil induzido pela acetilcolina após exposição ao EHS em jejuno isolado de rato

Houve total reversão 90 minutos após a exposição ao EHS nas diferentes concentrações. A reversão observada não apresentou diferença estatística significativa entre as respostas máximas de todas as curvas (Figura 10).



**Fig. 10:** Curva de reversão das contrações induzidas por acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) 90 minutos após remoção do EHS nas diferentes concentrações (10, 30, 60 e 100  $\mu\text{g/ml}$ ), em relação ao controle com solução de DMSO 5% utilizado no mesmo volume da maior concentração do EHS administrado. Os pontos representam as médias  $\pm$  erro padrão das médias de 4 a 6 experimentos.

## 5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigamos os possíveis efeitos do extrato hidroalcoólico da *Salvia officinalis* (EHS) sobre a musculatura lisa vascular (aorta) e não vascular (traquéia e jejuno) isoladas de ratos. Os resultados indicam que, aparentemente, o EHS nas concentrações utilizadas (3 a 3000 µg/ml) não parece interferir com os mecanismos de contração e relaxamento do tecido muscular liso de traquéia e aorta de ratos (ver figuras 7 e 8, respectivamente). Entretanto, em jejuno contraído com concentrações cumulativas de acetilcolina ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M) as concentrações 30, 60 e 100 µg/ml do EHS apresentaram um perfil de antagonismo não competitivo clássico, pois não houve deslocamento da curva, mas a resposta máxima foi reduzida em relação ao controle (ver figura 9) (EGLÉN *et al.*, 1996; GOODMAN *et al.*, 2003; RANG *et al.*, 2004). Este resultado, dentre outras hipóteses, pode sugerir uma interferência na via de sinalização deflagrada pela ativação dos receptores colinérgicos. Esta interferência pode decorrer de uma ação inibitória direta sobre canais de cálcio da membrana celular ou dos estoques intracelulares, ativação de canais de potássio, ou ainda modificação da atividade de enzimas (por exemplo, proteínas quinases), dentre várias outras vias possíveis (DAR & CHANNA, 1999; RYU *et al.*, 2004). As inibições mais significativas foram observadas em concentrações de 60 e 100 µg/ml, o que indicaram uma ação dependente de concentração (ATTAGUILE *et al.*, 2004; RYU *et al.*, 2004).

Na concentração de 10 µg/ml, houve um discreto aumento da resposta máxima, o qual aponta uma possível potencialização da ação da acetilcolina sobre o músculo. O mecanismo pelo qual este processo ocorre não foi investigado neste

estudo, mas supõe-se que pode ocorrer por diferentes vias: (a) degradação ou diminuição da atividade da acetilcolinesterase, provocando o aumento de acetilcolina livre, que pode se ligar aos receptores. KENNEDY e colaboradores (2006) relataram as propriedades inibitórias de *S. officinalis* sobre a colinesterase, o que aumentava a performance cognitiva e melhorava o humor em pacientes jovens e saudáveis; (b) existência de compostos que nesta concentração possam promover ativação de receptores colinérgicos ou de outros receptores (ex: histaminérgicos) que induzem sinergicamente a contração do músculo liso. A ativação de receptores colinérgicos foi relatada anteriormente por EIDI e colaboradores (2006), os quais demonstraram que o extrato etanólico de *S. officinalis* potencializou a retenção da memória em uma ação atribuída a uma interação com o sistema colinérgico muscarínico e nicotínico, envolvidos no processo da memória; (c) facilitação da entrada do cálcio extracelular ou liberação de cálcio intracelular, potencializando a contração muscular lisa e ativando a cadeia iniciada pela interação com a calmodulina, estimulação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) e subsequente interação dos filamentos de actina e miosina gerando a contração ou aumentando a sua intensidade (EGLEN & WHITING, 1996; EGLEN *et al.*, 1996; GOODMAN, 2003; RANG *et al.*, 2004). Teoricamente, esta seria uma hipótese possível, embora existam trabalhos na literatura com extratos de *Salvia miltiorrhiza* Bunge que reduziram a liberação de cálcio intracelular em cardiomiócitos (CAO *et al.*, 2003) e em hepatócitos (WANG *et al.*, 2005).

Portanto, na concentração de 10 µg/ml, o EHS não é suficiente para inibir a contração induzida pela acetilcolina, efeito este que só é observado nas concentrações superiores a 30 µg/ml. Desta forma, propõe-se que esta ação

potencializadora do EHS esteja vinculada à interação das substâncias que constituem o extrato e à sua concentração.

Com o resultado da reversibilidade (Figura 10) observou-se que a capacidade contrátil do jejuno é restabelecida após 90 minutos da remoção do EHS da cuba. Isso demonstra que o tecido não é lesionado pelos componentes do extrato. Entretanto, quando o período é reduzido para 30 ou 60 minutos, o efeito do EHS não é revertido, sugerindo uma ação duradoura do extrato no tecido. Este efeito pode ser justificado por meio de uma forte interação entre os componentes do extrato e sua(s) molécula(s) alvo(s), a qual necessita de tempo prolongado e sucessivas trocas de líquido para reverter. Outra hipótese, menos provável, pode ser a necessidade de síntese de moléculas (ex. proteínas ou mediadores) necessárias em alguma fase do mecanismo contrátil da célula.

## 6. CONCLUSÕES

- O EHS não alterou o tônus de traquéia previamente contraída com acetilcolina, nem de aorta isolada de rato contraída com fenilefrina;
- Em jejuno, o EHS causou inibição das contrações máximas induzidas por acetilcolina, dependente da concentração e característico de um antagonismo não competitivo;
- Este efeito foi revertido 90 minutos após a remoção do EHS da preparação de jejuno.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALARCON-AGUILAR, F. J.; ROMAN-RAMOS, R.; FLORES-SAENZ, J. L.; AGUIRRE-GARCIA, F. 2002. *Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice*. Phytother Res. 16(4): 383-6.

ALONSO, J. 2004. *Tratado de Fitofarmacos y Nutracéuticos*. Rosário, Argentina: Corpus Libros: 954-959.

AKHONDZADEH, S.; NOROOZIAN, M.; MOHAMMADI, M.; OHADINIA, S.; JAMSHIDI, A. H.; KHANI, M. 2003. *Salvia officinalis extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial*. J Clin Pharm Ther. 28(1): 53-9.

AMIN A. & HAMZA, A. A. 2005. *Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine-induced toxicity in rats*. Life Sci. 77(3): 266-78.

ANDERSSON, K. & ARNER, A., 2004. *Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology*. Physiological Reviews, 84: 935-986.

- ANDREAZZA, R. C. S. 2000. *Análise botânica, química e microbiológica de Salvia aliciae E. P. Santos, S. lachnostachys Benth., S. microphylla Kunth, S. officinalis L. (Lamiaceae)*. Curitiba. Dissertação de mestrado em Botânica. Setor de Ciências Biológicas. 125 p.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL B.; AESCHBACH R.; LÖLIGER J. 1992. *Antioxidant and prooxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid*. Xenobiotica 22: 257-268.
- ATTAGUILE, G.; PERTICONE, G.; MANIA, G.; SAVOCA, F.; PENNISI, G.; SALOMONE, S. 2004. *Cistus incanus and Cistus monspeliensis inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle*. Journal of Ethnopharmacology 92: 245–250.
- BAILLY, F.; QUEFFELEC, C.; MBEMBA, G.; MOUSCADET, J. F.; COTELLE, P. 2005. *Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from Salvia officinalis*. Bioorg Med Chem Lett. 15(22): 5053-6.
- BARICEVIC, D.; SOSA S.; DELLA LOGGIA R.; TUBARO A.; SIMMONOVSKA B.; KRASNA A.; ZUPANCIC A. 2001. *Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. Leaves: the relevance of ursolic acid*. Journal of Ethnopharmacology 75: 125-132.
- BARNES, P. J., 1989. *Muscarinic receptor subtypes: implications for lung disease*. Thorax, 44: 161-167.

- BATLOUNI, M. 2001. *Endotélio e hipertensão arterial*. Revista Brasileira de Hipertensão, 8: 328-38.
- BIRNBAUMER, L. G., 1990. *G proteins in signal transduction*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 675-705.
- BOLTON, T. B. 1979. *Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle*. Physiol. Ver. 59: 606-718.
- BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. 1987. *Identification of a family of muscarinic acetilcolina receptor genes*. Science 237: 527-532.
- BRUNETON, J. 1991. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Espanha: Editorial Acribia.
- BUCKLEY, N. J. 1990. *Molecular pharmacology of cloned muscarinic receptor*. In: Transmembrane Signalling for Drug Development. Ed: S.R. Nahorski, New York: Willey.
- CALIXTO, J. B. Julho/Set. 2003. *Biodiversidade como fonte de medicamentos*. Cienc. Cult., 55, no.3: 37-39.
- CAO, C. M.; XIA, Q.; ZHANG, X.; XU, W. H.; JIANG, H. D.; CHEN, J. Z. 2003. *Salvia miltiorrhiza attenuates the changes in contraction and intracellular calcium*

*induced by anoxia and reoxygenation in rat cardiomyocytes. Life Sci. 72(22): 2451-63.*

CAPEK, P.; HRIBALOVA, V.; SVANDOVA E.; EBRINGEROVA A.; SASINKOVA V.; MASAROVA J. **2003.** *Characterization of immunomodulatory polysaccharides from Salvia officinalis L. Int J Biol Macromol. 33(1-3): 113-9.*

CAPEK, P. & HRIBALOVA, V. **2004.** *Water-soluble polysaccharides from Salvia officinalis L. possessing immunomodulatory activity. Phytochemistry 65(13): 1983-92.*

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

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

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

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

COLE, M. D. **1992.** *The significance of the terpenoids in the Labiatae. In: HARVEY, R. M. & REYNOLDS, T. Advances in Labiatae Science. Kew, England: R. J. Reynolds Tobacco Company: 315-325.*

- CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET C. 1996. *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts os sage and rosemary.* Journal of the American Oil Chemists' Society, 13: 645-652.
- DAR, A. & CHANNA, S. 1999. *Calcium antagonistic activity of Bacopa monniera on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig.* Journal of Ethnopharmacology 66: 167-174.
- DÖRJE, F.; FRIEBE, T.; TACKE, R.; MUTSCHILER, E.; LAMBRECHT, G. 1990. *Novel pharmacological profile of muscarinico receptors medianting contraction of the guinea-pig uterus.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 342: 284-289.
- EGLIN, R. M.; HEGDE, S. S.; WATSON N. 1996. *Muscarinic receptor subtipos and smooth muscle function.* Pharmacol Rev 48: 531-565.
- EGLIN, R. M. & WHITING, R. L. 1996. *Selective muscarinic receptor agonists and antagonists.* Pharmacol Toxicol 78: 59-78.
- EIDI, M.; EIDI, A.; ZAMANIZADEH, H. 2005. *Effect of Salvia officinalis L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats.* J. Ethnopharmacol. 100(3): 310-3.

EIDI, M.; EIDI A.; BAHAR, M. 2006. *Effects of Salvia officinalis L. (sage) leaves on memory retention and its interaction with the cholinergic system in rats.* Nutrition 22(3): 321-6.

ESSENTIAL AURA AROMATHERAPY. *Sage Essential Oil.* Disponível em <http://www.essentialaura.com/index.html>. Acesso em 10 de junho de 2006.

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

GANONG, W. F., 1998. *Fisiologia Médica.* Rio de Janeiro: Editora PHB, 578pp.

GIACHETTI D.; TADDEI E.; TADDEI I. 1988. *Pharmacological activity of essential oils on Oddi's sphincter.* Planta Med. 54(5): 389-92.

GILLI, R.; KACURAKOVA M.; MATHLOUTHI M.; NAVARINI L.; PAOLETTI S. 1994. *FT-IR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solutions.* Carbohydr. Res. 263: 315-326.

GOODMAN, L. S.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. 2003. *GOODMAN & GILMAN – As Bases Farmacológicas da Terapêutica.* Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill, 1647pp.

GONZALEZ A. G., ANDRES L. S.; AGUIAR Z. E.; LUIS J. G. 1992. *Diterpenes from Salvia mellifera and their biogenetic significance.* Phytochemistry 31, 1297-1305.

- GUENTHER, E., 1974. *The essential oils*. 1 ed. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, v. 3.
- HUBBERT, M.; SIEVERS, H.; LEHNFELD, R.; KEHRL, W. 2006. *Efficacy and tolerability of a spray with *Salvia officinalis* in the treatment of acute pharyngitis - a randomised, double-blind, placebo-controlled study with adaptive design and interim analysis*. Eur J Med Res. 11(1): 20-6.
- HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J.; BUCLEY, N. J. 1990. *Muscarinic receptor subtypes*. Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol. 30: 633-673.
- KAVVADIAS, D.; MONSCHEIN, V.; SAND, P.; RIEDERER, P.; SCHREIER, P. 2003. *Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor*. Planta Med. 69(2): 113-7.
- KENNEDY, D. O.; PACE, S.; HASKELL, C.; OKELLO, E. J.; MILNE, A.; SCHOLEY, A. B. 2006. *Effects of cholinesterase inhibiting sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery*. Neuropsychopharmacology 31(4): 845-52.
- KHOLKUTE, S. D.; MUDGAL, V.; DESHPANDE, P. J. 1976. *Screening of indigenous medicinal plants for antifertility potentiality*. Planta Med., Stuttgart, 29:151-155.

INFOAGRO. *Cultivo de la sálvia*. Disponível em [www.infoagro.com/aromaticas/salviaref2.asp](http://www.infoagro.com/aromaticas/salviaref2.asp). Acesso em 18 de julho de 2006.

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

ISHII, K.; KANO, T.; ANDO, J. 1986. *Calcium channel, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and mechanical reactivity of estrogen and progesterone treated rats uterus*. Jpn J. Pharmacol. 41:47-54.

LAWRENCE B. M. 1992. *Chemical components of Labiatae oils and their exploitation*. In: HARVEY, R. M. & REYNOLDS, T. Advances in Labiate Science. USA: R. J. Reynolds Tobacco Company.

LIMA, C. F.; CARVALHO, F.; FERNANDES, E.; BASTOS, M.L., SANTOS-GOMES, P. C.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. 2004. *Evaluation of toxic/protective effects of the essencial oil of Salvia officinalis on freshly isolated rat hepatocytes*. Toxicology in vitro 18: 457-465.

LIMA, C. F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; FERNANDES-FERREIRA, M.; PEREIRA-WILSON, C. 2005. *The drinking of a Salvia officinalis infusion improves liver antioxidant status in mice and rats*. J. Ethnopharmacol. 97(2): 383-9.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. 2002. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.

LU, Y. & FOO, L.Y. **2001A**. *Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from Salvia officinalis*. Tetrahedron Letters 42: 8223-8225.

LU, Y. & FOO, L.Y. **2001B**. *Antioxidant activities of polyphenols from sage (Salvia officinalis)*. Food Chemistry 75: 197-202.

LUIS J. G. **1991**. *Chemistry, biogenesis and chemotaxonomy of the diterpenoids of Salvia*. In: Harborne J.B., Tomas-Barberan F.A. Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids. Clarendon Press, Oxford: 63-82.

MANOLOVA, N.; SERKEDJIEVA, J.; IVANOVA, V. **1995**. *Anti-influenza activity of the plant preparation "Broncho Pam"*. Fitoterapia LVI: 223-226.

MAROCHI, E. *Verificação da atividade antimicrobiana da Sálvia officinalis L.* **1997**.  
Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Produtos Naturais) do Departamento de Farmácia da UFPR, Curitiba.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE – United States Department of Agriculture (Serviço de Conservação de Recursos Naturais – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). *Arquivo de plantas introduzidas*. Disponível em <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=SAOF2>. Acesso em 10 de junho de 2006.

NINOMIYA, K.; MATSUDA H.; SHIMODA H.; NISHIDA N.; KASAJIMA N.; YOSHINO T.; MORIKAWA T.; YOSHIKAWA M. 2004. *Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14: 1943-1946.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O.; UENO, M. 2004. *Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection*. Rev Saude Publica. 38(2): 326-8.

PULEO, M. A., 1978. *Mythobotany, pharmacology and chemistry of thujone-containing plants and derivatives*. Econ. Bot., New York, 32: 65-74.

OLIVEIRA, F. & AKISSUE, G. 2000. *Fundamentos de Farmacobotânica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 178 p.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. 1991. *Farmacognosia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K., 2004. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 904pp.

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

- RYU, S. D.; PARK C. S.; BAEK, H. M.; BAEK, S. H.; HWANG, S. Y.; CHUNG, W. G. 2004. *Anti-diarrheal and spasmolytic activities and acute toxicity study of Soonkijangquebo, a herbal anti-diarrheal formula*. São Paulo: Premier. Journal of Ethnopharmacology 91: 75-80.
- SALLER, R.; BUECHI, S.; MEYRAT, R.; SCHMIDHAUSER, C. 2001. *Combined herbal preparation for topical treatment of Herpes labialis*. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd. 8(6): 373-82.
- SANDERS, K. M., 2001. *Signal transduction in smooth muscle invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles*. Journal of Applied Physiology, 91: 1438-1449.
- SANTOS, R. A. D. 1926. *Farmacopéia Brasileira I*; 1. ed.; Companhia Editora Nacional: São Paulo, pp 1017.
- SCHWARZ, K.; TERNES W. 1992. *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis, II: Isolation os carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes*. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forscgung, 195: 99-103.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK P. R. 2001. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3ª Edição. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC.

- SLAMENOVA, D.; MASTEROVA, I.; LABAJ, J.; HORVATHOVA, E.; KUBALA, P.; JAKUBIKOVA, J.; WSOLOVA, L. 2004. *Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of Salvia officinalis L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro.* Basic Clin Pharmacol Toxicol. 94(6): 282-90.
- SWEENEY, H. L.; YANG, Z.; ZHI, G.; STULL, J. T.; TRYBUS, K. M. 1994. *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.
- TEPE, B.; SOKMEN M.; AKPULAT H. A.; SOKMEN A. 2006. *Screening of the antioxidant potential of six Salvia species from Turkey.* Food Chemistry 95: 200-204.
- TEZUKA, A.; ISHIHATA, A.; AITAB, T.; KATANO, Y. 2004. *Aging-related alterations in the contractile responses to acetylcholine, muscarinic cholinergic receptors and cholinesterase activities in jejunum and colon of the male Fischer 344 rats.* Experimental Gerontology, 39: 91-100.
- TODOROV S.; PHILIANOS S.; PETKOV V.; HARVALA C.; ZAMFIROVA R.; OLIMPIOU H. 1984. *Experimental pharmacological study of three species from genus Salvia.* Acta Physiol Pharmacol Bulg. 10(2): 13-20.
- VAN BREEMEN, C.; CAUVIN, C.; YAMAMOTO, H.; ZSCHAUER, A. 1987. *Vascular muscle calcium channels.* J. Cardiovasc. Pharmacol. 10: S10-S15.

VAN BREEMEN, C. 1989. *Celular mechanisms regutaing (calcium) smooth muscle.* Annu. Rev. Physiol 51: 315-329.

VUJOSEVIC, M. & BLAGOJEVIC J. 2004. *Antimutagenic effects of extracts from sage (Salvia officinalis) in mammalian system in vivo.* Acta Vet Hung. 52(4): 439-43.

WANG, J. M.; YAO, X. X.; LI, X. T.; YANG, S. L.; SU, Z. 2005. *Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae on Ca<sup>2+</sup> in hepatic stellate cells.* Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 36(2): 221-4.

WILLERSHAUSEN, B.; GRUBER I.; HAMM G. 1991. *The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the gingiva.* J. Clin. Dent. 2: 75-78.

WRZOS, H. F.; TANDON, T.; OUYANG, A. 2004. *Mechanisms mediating cholinergic antral circular smooth muscle contraction in rats.* World Journal of Gastroenterology, 10: 3292-3298.