



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RAQUEL MOREIRA DE BRITTO

EFEITO DA FRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS
DE *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe SOBRE A
FUNÇÃO CONTRÁTIL DO CORAÇÃO DE
MAMÍFEROS

ARACAJU
2011

RAQUEL MOREIRA DE BRITTO

EFEITO DA FRAÇÃO AQUOSA DAS FOLHAS
DE *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe SOBRE A
FUNÇÃO CONTRÁTIL DO CORAÇÃO DE
MAMÍFEROS

Dissertação apresentada ao Núcleo de
Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia

ARACAJU
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Britto, Raquel Moreira de
B862e Efeito da fração aquosa das folhas de *Costus spiralis*
(Jacq.) Roscoe sobre a função contrátil do coração de
mamíferos / Raquel Moreira de Britto. – Aracaju, 2011.
161 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –
Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-
Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em
Medicina.

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia

1. *Costus spiralis* - Zingiberaceae 2. Inotropismo 3.
Miocárdio 4. Pesquisa experimental em mamíferos 5. Plantas
medicinais I. Título.

CDU 582.548.27:633.88

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia

1º Examinador: Prof. Dr. Jader dos Santos Cruz

2º Examinador: Profa. Dra. Sandra Lauton Santos

PARECER

[illegible]

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biofísica do Coração (LBC) do Departamento de Fisiologia (DFS), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e contou com o suporte financeiro das Centrais Elétricas Brasileiras (ELETROBRAS, Processo No. 23113.009351/03-67), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sergipe (FAP/FUNTEC FNS/Processo N° 01/2003) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Processo N° 478581/2008-4).

“Entrega o teu caminho ao Senhor;
confia Nele e Ele o fará”.

Salmos 37:5

Para

Marta Britto, minha mãe

Percival Britto, meu pai

Ana Paula e Jéssica, minhas irmãs

Marylou, minha tia

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida;

Aos meus pais, minhas irmãs e a minha tia Marylou, pelo amor e pelo suporte afetivo e por não terem poupado esforços para permitir o meu crescimento;

Ao Professor Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia, pela orientação segura, por sua dedicação ímpar à Ciência e ao ensino, preocupando-se com o meu aprendizado, não apenas do ponto de vista acadêmico, mas também pessoal;

À Professora Dra. Carla Maria Lins Vasconcelos de Araújo, por sua amizade e afeição, sempre disponível para ajudar-me a discutir e interpretar os resultados experimentais;

À Professora Dra. Sandra Lauton, pelas correções do original e pelo apoio inestimável, ajudando-me a alcançar este momento, sempre disposta a auxiliar-me com sua atitude amável, meiga e atenciosa;

A André Luiz Santos, por sua maneira sempre gentil e amiga, sempre disposto a colaborar para a conclusão deste trabalho, não medindo esforços durante os experimentos e suas análises;

Ao Professor Dr. Jader dos Santos Cruz do LAMEx/Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG, por sua importante ajuda, disponibilizando o seu Laboratório para que fosse possível realizar experimentos com a técnica de ‘patch clamp’;

À Professora Silvia Guatimosim (UFMG) e à sua doutoranda Aline Alves Lara, por me terem facilitado o acesso à microscopia confocal, permitindo a obtenção de dados importantes para compreender o mecanismo de ação da fração aquosa estudada neste trabalho;

À Dra. Lucia Calumby Barreto de Macedo, do Instituto de Tecnologia e Pesquisa do Estado de Sergipe (ITPS) por me ter recebido com grande amabilidade e ter realizado a determinação dos teores de sódio e de potássio na fração aquosa estudada neste trabalho;

Ao Professor Dr. Charles dos Santos Estevam, por ter colaborado para o esclarecimento da composição fitoquímica da fração aquosa estudada nesta dissertação, dando-me acesso ao seu Laboratório e disponibilizando todos os

recursos necessários para a realização da tarefa e também por ter feito correções que aprimoraram o texto original;

Ao Professor Dr. Leonardo Rigoldi que, durante o Exame de Qualificação, apresentou sugestões e correções que tanto melhoraram a qualidade deste trabalho;

Aos funcionários da secretaria de apoio do NPGME/UFS e a todos os colegas do Mestrado, especialmente aos professores do Programa de Pós-Graduação, que tanto contribuíram para o meu crescimento;

A William de Bulhões Brandão meu colega do curso de graduação na Universidade Tiradentes (UNIT) e também no Laboratório de Biofísica do Coração (LBC/UFS), amigo próximo, solidário, sempre atento às minhas demandas e que sempre me distinguiu com o seu carinho fraternal;

A Antonio Nei Santana Gondim, Mestre em Ciências (LBC/UFS e LTF/UFPB), atualmente doutorando no LAMEx/ICB/UFMG, amigo desde os tempos universitários, por sua enorme disposição em colaborar para esclarecer a ação da fração aquosa de *C.spiralis* sobre as correntes de cálcio;

À Professora Dra. Evaleide Diniz de Oliveira e à Vanda Rodrigues de Oliveira, ambas integrantes do LBC/UFS, pela ajuda, atenção e carinho com que sempre me trataram e pela colaboração para que este trabalho fosse produzido;

À Adriana Karla de Lima, professora da UNIT, atualmente doutoranda no LBC/UFS, por sua amizade e por estar sempre disposta a ajudar-me, discutindo os resultados e aperfeiçoando os meus caminhos na investigação científica;

Aos bons amigos do LBC, Rejane Cardoso Souza, Sandra Valéria Santos de Cerqueira, Amilton Gustavo da Silva Passos, Anne Caroline Oliveira dos Santos, pelo excelente companherismo, pela disposição de colaborar e ajudar para o sucesso desta minha empreitada;

À Marcli Costa da Silveira Libório, pessoa radiante e alegre, secretária tão dedicada às tarefas do Departamento de Fisiologia/UFS, por ter dispensado tanta atenção e cuidado ao LBC, ajudando assim à concretização da minha tarefa;

A todos os funcionários do Biotério Central da UFS, em especial aos senhores Osvaldo Andrade dos Santos e Aluísio, que tão gentilmente atenderam às minhas solicitações;

À Dona Jane dos Santos, por sua simpatia, alegria e zelo, tratando a todos com carinho e atenção e cuidando da limpeza do LBC/UFS.

RESUMO

Justificativa: Preparados de *Costus spiralis* têm sido usados pela medicina popular (diurético, hipotensor, citotóxico, imunomodulador, antilitiásico, antidiarréico, anti-espasmódico, antiurólítico, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, antileishmânia, anti-inflamatório e antiedematogênico). Apesar da gama de ações a eles atribuídas, nada pôde ser encontrado na literatura científica com respeito ao possível efeito dos preparados dessa planta sobre o músculo cardíaco. **Objetivo:** Este trabalho visou determinar os efeitos inotrópicos obtidos das folhas de *C. spiralis*, que apresentava maior potência, bem como contribuir para o mecanismo de ação desse preparado no miocárdio de mamíferos. **Metodologia:** Os experimentos sobre contração foram realizados em átrio esquerdo de cobaia (*Cavia porcellus*), enquanto que as medidas de transiente de cálcio intracelular e de corrente de membrana foram feitas em cardiomiócitos de camundongo. A investigação fitoquímica do preparado mais ativo foi conduzida segundo Matos (1997). Os teores de sódio e de potássio presentes na fração mais potente, foram determinados por fotometria de chama. A força de contração atrial foi captada isometricamente e, depois amplificada, foi armazenada em computador. O transiente de cálcio intracelular foi avaliado com microscopia confocal de varredura a laser. As correntes de cálcio sarcolemas foram medidas em cardiomiócitos submetidos à técnica do “patch clamp” (“whole cell”). **Resultados:** A fração aquosa (FAq) foi a que apresentou maior rendimento (69,40%) e a que exerceu maior efeito inotrópico negativo ($CE_{50} = 305 \pm 41,00$ mg/L, Hill = $1,46 \pm 0,19$). Na sua constituição foram detectadas as seguintes classes de metabólitos secundários: taninos e saponinas, com reação fortemente positiva, e os polifenóis, com reação positiva (flavonóis, flavononóis, flavonas, xantonas, fenóis e flavonóides). Em 1 g/L de FAq foram encontrados 1,91 mM de potássio e 0,15 mM de sódio. A adição de FAq ao Tyrode não modificou significativamente a concentração desses íons. Os tempos de contração e de relaxamento, bem como o tempo de acoplamento eletromecânico não foram alterados pela FAq. Contudo, ela reduziu os Índices de Eficiência da contração e do relaxamento. A FAq aboliu completamente o fenômeno de Bowditch induzido por alta frequência de estimulação, indicando que ela reduz a entrada desse íon nas células. Com base nessa evidência, foram realizados protocolos para aprofundar o conhecimento sobre a participação das correntes de cálcio no mecanismo cardiodepressor da FAq. Esta fração produziu os seguintes resultados: 1) aboliu completamente o efeito inotrópico positivo do isoproterenol (10^{-1} a 10^3 pM); 2) deslocou para a direita a curva concentração-efeito para o $CaCl_2$ (0,5 a 7,0 mM), aumentando a CE_{50} de $1,12 \pm 0,07$ (Hill = 1,5) para $7,23 \pm 0,47$ mM (Hill = 7,4) ($n = 3$; $p < 0,05$); 3) aboliu completamente o efeito inotrópico positivo do (-) BAY K8644 (5 a 2000 nM); 4) reduziu em cerca de 20% o pico da fluorescência intracelular correspondente ao transiente de cálcio citoplasmático (controle: $n = 30$ células; teste: $n = 27$ células; 4 animais); 5) não modificou a velocidade de decaimento do sinal de fluorescência, o que significa que ela não interfere com o funcionamento da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; 6) reduziu em 23% a densidade de corrente de cálcio tipo-L que variou de $-6,29 \pm 0,34$ para $-4,9 \pm 0,2$ A/F ($n = 5$ animais, $p < 0,05$). **Conclusões:** 1) a FAq foi a fração com maior potência inotrópica; 2) os principais metabólitos secundários presentes na FAq foram taninos, saponinas e polifenóis; 3) a FAq reduz a força de contração do átrio; 4) o mecanismo da ação cardiodepressora da FAq

sobre a contratilidade miocárdica se deve à diminuição da disponibilização do cálcio durante a contração.

Palavras-chave: *Costus spiralis*, inotropismo, miocárdio, transiente intracelular de cálcio, corrente sarcolemal de cálcio, mamíferos

ABSTRACT

Biological effects: Teas and infusions from *C. spiralis* leaf have largely been used by folk medicine as diuretic, hypotensor, cytotoxic, immunomodulator, antilithiasic, antidiarrheic, antispasmodic, antiurolitic, antimicrobial, antifungic, antioxidant, antileishmania activity, antiinflammatory, and antiedematogenic activity. In spite of these biological effects attributed to the extracts of *C. spiralis*, nothing so far could be found in the scientific literature dealing with its effects on the mammalian myocardium. **Aims:** The present study aimed to describe the inotropic effects produced by extracts from the *C. spiralis* leaf on isolated guinea pig atrium, as well as to contribute for a better understanding about its mechanism of action in that tissue. In isolated mouse cardiomyocytes, the effect produced by those extracts on the intracellular calcium transient and on the sarcolemal L-type calcium current were also measured. **Methods:** Experiments performed to evaluate the contractile effects were carried out on isolated atrium from guinea pig (*Cavia porcellus*). Firstly, our purpose was to determine the most potent fraction obtained from the *C. spiralis* leaf. This was done by comparing the hydroalcoholic crude extract with the following ones: aqueous, chloroform, and ethyl acetate. A phytochemical analysis was performed on the fraction exhibiting the greater potency. This evaluation followed the procedures proposed by Matos (1997). The content of sodium and potassium in the most potent fraction was determined by flame photometry. In the contractile experiments, the atrial force was measured isometrically. Biological signals were captured, amplified, and then stored in computer to be processed off line. Intracellular calcium transients were studied by confocal microscopy with laser scanning by using the fluorescent dye FLUO 4AM. Calcium inward currents were measured in mouse cardiomyocytes by using patch clamp technique in the whole cell configuration. **Results:** Yield percentage of the aqueous fraction (AqF) was 69,40%. This fraction showed the most potent depressor effect on the myocardial contractility ($EC_{50} = 305 \pm 41,00$ mg/L, Hill constant = $1,46 \pm 0,19$). The following metabolites were found in the AqF: tannins, saponins, and polifenols (flavonol, flavononol, flavone, xanthone, phenol, and flavonoid). The potassium and sodium contents in 1 g/L of AqF were 1,91 and 0,15 mM, respectively. This was not enough to change the myocardial inotropism, even in the highest concentration of AqF used in the experiments. The contraction and the relaxation time, as well as the time related to the excitation-contraction coupling (stimulus-response) were not modified by adding AqF to the organ bath. However, AqF reduced the Efficiency Index for the contraction and relaxation phases. The Neyler & Merrillees protocol was employed to evaluate the AqF effect on the calcium inward current in myocardial cells. Our results showed that AqF is able to completely abolish the Bowditch phenomenon, suggesting that it could be acting by reducing the sarcolemal calcium current. Supported by those experimental evidences, experiments were proposed to better understand the relationship between AqF and calcium mechanisms in cardiac cells. The following results were obtained with 1,5 g/L AqF: 1) AqF completely abolished the positive inotropic effect induced by isoproterenol (10^{-1} to 10^3 pM); 2) AqF shifted rightwardly the concentration-effect curve for $CaCl_2$ (0.5 to 7.0 mM) and increased the EC_{50} from 1.12 ± 0.07 (Hill = 1.5) to 7.23 ± 0.47 mM (Hill = 7.4) ($n = 3$; $p < 0.05$); 3) AqF completely abolished the positive inotropic effect of (-) BAY K8644 (5 to 2000 nM); 4) AqF reduced the intracellular fluorescence from $4.66 \pm$

1.17 to 3.74 ± 1.0 a.u. ($n = 30$ cells, 4 mice, $p < 0.05$); 5) AqF did not modify the decay rate of the fluorescent signal (892 ± 37 to 930 ± 30 ms, $n = 30$ cells, 4 mice, $p > 0.05$), indicating that it does not interfere with the calcium removal from the sarcoplasm; 6) AqF reduced the calcium inward current through L-type calcium channels from 6.29 ± 0.34 to 4.9 ± 0.2 A/F (23% , $n = 5$ animals, $p < 0.05$).

Conclusions: This study brought us unto the following conclusions: 1) AqF is the most potent fraction obtained from *C. spirallis* leaves; 2) AqF contains the following secondary metabolites: tannins, saponins, and polyphenols; 3) AqF reduces the contraction force of the guinea pig left atrium; 4) AqF acts on the myocardium contractility by reducing the calcium entry in myocardial cells during contraction.

Key words: *Costus spiralis*, inotropism, myocardium, intracellular calcium transient, L-type calcium current, mammals

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto da <i>Costus spiralis</i> (Jacq.) Roscoe.....	31
Figura 2 – Micrografia eletrônica dos discos intercalares.....	58
Figura 3 - A organização ultra-estrutural do músculo cardíaco.....	59
Figura 4 – Componentes do sarcômero.....	60
Figura 5 - Mecanismos celulares da contração muscular.....	66
Figura 6 – Cálcio “spark” e o transiente de Ca^{+2} de célula ventricular cardíaca	67
Figura 7 – Representação esquemática da organização ultra-estrutural do miócito ventricular (A) e atrial (B).....	68
Figura 8 – Acoplamento excitação-contração do miócito atrial.....	69
Figura 9 – <i>Cavia porcellus</i>	78
Figura 10 – Camundongo C57BL6/J.....	78
Figura 11 - Esquema da montagem experimental para determinação da força de contração isométrica do átrio.....	80
Figura 12 - Fotômetro de chama DIGIMED DM-61.....	82
Figura 13 - Esquema indicando as variáveis medidas nas curvas de força de contração atrial.....	83
Figura 14 – Tempos referentes ao acoplamento eletromecânico.....	84
Figura 15 – Protocolo para estudar a participação de receptores muscarínicos no efeito inotrópico do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C.spiralis</i>	85
Figura 16 - Protocolo para estudar a participação de canais de potássio no efeito inotrópico do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C.spiralis</i>	86
Figura 17 – Experimento representativo mostrando a sequência de eventos usado para reproduzir o protocolo Nayler & Merrill.....	87
Figura 18 - Protocolo para estudar a participação de correntes de cálcio sensíveis ao isoproterenol, no efeito inotrópico do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C.spiralis</i>	88

Figura 19 - Protocolo para estudar a participação de correntes de cálcio, sensíveis ao cálcio extracelular, no efeito inotrópico do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C.spiralis</i> nas células do miocárdio.....	89
Figura 20 - Protocolo para estudar a participação de correntes de cálcio, ativadas pelo agonista (-) BAY K8644, no efeito inotrópico do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C.spiralis</i> nas células do miocárdio.....	90
Figura 21 - Cardiomiócitos isolados do coração de camundongo.....	91
Figura 22 - Microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta.....	93
Figura 23 - Protocolo de pulsos utilizado em ‘patch-clamp’ na configuração ‘whole-cell’ para o registro das correntes de cálcio tipo-L.....	95
Figura 24 - Registros experimentais representativos mostrando o efeito inotrópico negativo promovido pelo EBH e por suas frações.....	98
Figura 25 - Curvas concentração-efeito relativas ao efeito inotrópico negativo dos preparados das folhas de <i>Costus spiralis</i>	99
Figura 26 - Efeito da FAq sobre os tempos de contração da força atrial.....	101
Figura 27 - Efeito da FAq sobre os tempos de relaxamento da força atrial.....	102
Figura 28 - Efeito da FAq sobre o acoplamento eletromecânico do átrio de cobaia.....	102
Figura 29 - Efeito da FAq sobre o Índice de Eficiência da Contração.....	103
Figura 30 - Efeito da FAq sobre o Índice de Eficiência do Relaxamento.....	103
Figura 31 - Experimento representativo do bloqueio muscarínico sobre a ação inotrópica da FAq.....	104
Figura 32 - Efeito do bloqueio muscarínico sobre a ação inotrópica negativa produzida pela FAq.....	105
Figura 33 - Traçados representativos do bloqueio de correntes de potássio sobre a ação inotrópica da FAq.....	106
Figura 34 – Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre a ação inotrópica da FAq.....	106
Figura 35 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre o Fenômeno da Escada Positiva (fenômeno de Bowditch).....	108
Figura 36 – Efeito da FAq sobre o fenômeno de Bowditch.....	109
Figura 37 - Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica positiva do isoproterenol.....	110

Figura 38 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica positiva produzida pelo isoproterenol.....	111
Figura 39 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo CaCl_2	112
Figura 40 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo CaCl_2	113
Figura 41 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica do (-) BAY K8644	114
Figura 42 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo (-) BAY K8644	115
Figura 43 - Efeito da FAq sobre o valor do pico do transiente intracelular de Ca^{+2} , bem como do seu decaimento	117
Figura 44 – Decaimento da amplitude das primeiras forças atriais, obtidas após a pausa de estimulação (protocolo de Nayler & Merrillees).....	118
Figura 45 – Efeito da FAq (48 mg/L) sobre a densidade de corrente de cálcio tipo L medida em cardiomiócito de camundongo.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ação de flavonóides em doenças cardiovasculares.....	38
Tabela 2 - Solução de Tyrode modificada por Dorigo et al. (1990).....	74
Tabela 3 - Solução de Tyrode segundo Conde-Garcia (não publicada).....	74
Tabela 4 - Solução tamponada ‘Digest buffer’ (DB).....	75
Tabela 5 – Solução externa.....	76
Tabela 6 – Solução interna.....	76
Tabela 7 - Rendimento do processo de obtenção das frações do EBH.....	97
Tabela 8 - CE_{50} e constante de Hill de preparados obtidos das folhas <i>Costus spiralis</i>	99
Tabela 9 –Prospecção fitoquímica qualitativa da fração aquosa.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACO	Aconitina
AEM	Acoplamento eletromecânico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BK _{Ca}	Canal para potássio ativado por cálcio
bpm	Batimento por minuto
C-E	Curva concentração-efeito
CE ₅₀	Concentração do composto capaz de produzir cinquenta por cento do seu efeito máximo
CEPA	Comitê de ética em pesquisa com animais
CICR	Liberação de cálcio induzida pelo cálcio
CONCEA/MCT	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
cTn-C	Troponina cardíaca C
cTn-I	Troponina cardíaca I
cTn-T	Troponina cardíaca T
DB	“Digest buffer”
DCC	Doença cardíaca coronariana
DDL	Despolarização diastólica lenta
DHPD	Diidropiridinas
DHPR	Receptores das diidropiridinas
DMEM	Dulbelcco’s Modified Eagle’s Medium
EBH	Extrato bruto hidroalcoólico
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EGCG	Epigallocatequina galato
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ERON	Espécies reativas do oxigênio e/ou de nitrogênio
FAce	Fração acetato de etila
FAq	Fração aquosa
FClo	Fração clorofórmica
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazinaN’-2-ácido etanosulfônico

IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do efeito
I _{Ca}	Corrente de cálcio
I _{CaL}	Corrente de cálcio tipo L
IEc	Índices de Eficiência para a contração
IEr	Índices de Eficiência para o relaxamento
I _f	Corrente marcapasso “funny”
IK ₁ ou IK _{ir}	Corrente com retificação de entrada
IK _{dr} ou IK	Corrente de potássio com retificação tardia
IK _r	Corrente de potássio com ativação rápida
IK _s	Corrente de potássio com ativação lenta
IK _{to}	Corrente de potássio transiente de saída
IK _{ur}	Correntes de potássio de ativação ultra-rápidas
I _{Na}	Corrente de sódio
iNOS	Óxido nítrico sintase isoforma induzida
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
ISO	Isoproterenol
K _{ATP}	Canal para potássio sensível a ATP
K _{ir}	Canal para potássio com retificação para corrente de entrada
K _V	Canal para potássio dependente de voltagem
LDL	“light density lipids”
L-NA	N ^ω -nitro-L-arginina
LOX	lipoxigenase
Na ⁺ /H ⁺	Trocador sódio/hidrogênio
NCX	Trocador Na ⁺ /Ca ²⁺
njRS	Membrana não juncional do RS
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OX	xantina oxidase
PKA	proteína quinase A
PLB	fosfolamban
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	Retículo sarcoplasmático

RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático
St d-	Intervalo de tempo do estímulo à derivada máxima do relaxamento
St d+	Intervalo de tempo do estímulo à derivada máxima da contração
StPico	Intervalo de tempo entre a estimulação e o pico da contração
Tc	Tempo de contração
TEA	Tetraetilamônio
Tm	Tropomiosina
Tn	Troponina
Tr	Tempo de relaxamento
TT	Túbulos T
VOCs	“Voltage-operated channels”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1 Plantas Medicinais.....	28
2.2 <i>Costus spiralis</i> (Jacq.)Roscoe.....	30
2.2.1 Aspectos botânicos.....	30
2.2.2 Aspectos etnofarmacológicos.....	31
2.2.3 Efeitos biológicos.....	32
2.2.3.1 Atividade anti-urolítica.....	32
2.2.3.2 Atividade anti-microbiana, anti-fúngica e anti-oxidante.....	32
2.2.3.3 Atividade anti-leishmânia e citotóxica.....	33
2.2.3.4 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora.....	33
2.2.3.5 Outras atividades e perspectivas.....	34
2.3 Músculo liso vascular: efeito de constituintes do gênero <i>Costus</i>	35
2.3.1 Considerações gerais sobre o estresse oxidativo e doenças cardiovasculares	35
2.3.1.1 Efeito de flavonóides sobre doenças cardiovasculares.....	37
2.3.2 Considerações gerais sobre a vasoconstrição e a vasodilatação.....	39
2.3.2.1 Efeitos de flavonóides sobre a corrente de cálcio em células do músculo liso vascular.....	39
2.3.2.2 Efeitos de flavonóides sobre as correntes de potássio das células do músculo liso vascular.....	40
2.3.2.2.1 Efeito de flavonóides sobre os canais BK _{Ca}	41
2.3.2.2.2 Efeito de flavonóides sobre os K _{ATP} e outros canais.....	41
2.4 Músculo cardíaco: efeitos de flavonóides sobre correntes iônicas.....	42
2.4.1 Considerações gerais.....	42
2.4.2 Efeito sobre a corrente “funny”	43
2.4.3 Efeito sobre a corrente de sódio	43
2.4.4 Efeito sobre correntes de cálcio	44
2.4.5 Efeito sobre correntes de potássio.....	45

2.5 Aparelho cardiovascular: efeito de substâncias extraídas de plantas do gênero <i>Costus</i>	47
2.5.1 Efeito de catequinas.....	47
2.5.2 Efeito de xantonas.....	48
2.5.3 Efeito de taninos.....	49
2.5.4 Efeito de saponinas.....	51
2.5.5 Efeito de alcalóides.....	53
2.6 Breve revisão sobre a contratilidade cardíaca.....	55
2.6.1 Aspectos da fisiologia cardíaca.....	55
2.6.1.1 Considerações sobre o coração elétrico e mecânico	55
2.6.2 Organização das células miocárdicas.....	57
2.6.2.1 Estruturas contráteis.....	58
2.6.3 O acoplamento excitação-contração no coração	65
2.6.4 O relaxamento da célula miocárdica.....	69
3 OBJETIVOS	71
3.1 Geral.....	71
3.2 Específicos.....	71
4 MATERIAIS E MÉTODOS	72
4.1 Coleta, identificação e tratamento do material botânico.....	72
4.2 Obtenção de extratos e frações das folhas de <i>Costus spiralis</i>	72
4.2.1 Extrato bruto hidroalcoólico.....	72
4.2.2 Frações obtidas por partição líquido-líquido.....	72
4.3 Substâncias e sais.....	73
4.4 Água e soluções.....	73
4.4.1 Água.....	74
4.4.2 Soluções de Tyrode.....	74
4.4.3 Soluções para a dissociação enzimática do miocárdio.....	75
4.4.3.1 Solução tamponada	75
4.4.3.2 Solução I.....	75
4.4.3.3 Solução II.....	75
4.4.3.4 Solução III.....	75
4.4.3.5 Solução IV.....	76
4.4.3.6 Solução V.....	76

4.4.4 Soluções usadas no procedimento para medir as correntes de cálcio.....	76
4.4.4.1 Soluções externa e interna.....	76
4.5 Dissolução e conservação do EBH, frações e substâncias.....	76
4.6 Animais usados nos experimentos.....	77
4.6.1 Avaliação dos efeitos de preparados de <i>C. spiralis</i> sobre a contratilidade miocárdica.....	77
4.6.2 Avaliação dos efeitos de preparados de <i>C. spiralis</i> sobre a corrente de cálcio tipo-L e sobre os transientes intracelulares de cálcio.....	78
4.7 Isolamento e montagem experimental do átrio esquerdo de cobaia.....	79
4.8 Protocolos experimentais.....	80
4.8.1 Avaliação inotrópica do EBH e de suas frações.....	80
4.8.1.1 Determinação da CE ₅₀ e da constante de Hill.....	81
4.8.2 Avaliação fitoquímica qualitativa do preparado de maior potência inotrópica.....	82
4.8.3 Avaliação do conteúdo de sódio e potássio no preparado de maior potência inotrópica.....	82
4.8.4 Avaliação do efeito do preparado de maior potência inotrópica sobre os tempos de contração, relaxamento e acoplamento eletromecânico.....	83
4.8.5 Avaliação do efeito do preparado de maior potência sobre as correntes de potássio.....	84
4.8.5.1 Prospeção guiada pelo bloqueio muscarínico promovido pela atropina	84
4.8.5.2 Prospeção guiada pelo bloqueio inespecífico de canais para potássio promovido pelo tetraetilamônio.....	85
4.8.6 Avaliação do efeito do preparado de maior potência inotrópica sobre a entrada de cálcio nas células do miocárdio.....	86
4.8.6.1 Prospeção guiada pelo Fenômeno de Bowditch – Protocolo de Nayler & Merrillees.....	86
4.8.6.2 Prospeção guiada pela curva concentração-efeito para o isoproterenol.....	87
4.8.6.3 Prospeção guiada pela curva concentração-efeito para o CaCl ₂	88
4.8.6.4 Prospeção guiada pela curva concentração-efeito para o (-) BAY K 8644	89

4.8.7 Avaliação do efeito do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C. spiralis</i> , sobre o transiente citoplasmático de cálcio	90
4.8.7.1 Preparação de cardiomiócitos isolados.....	90
4.8.7.2 Medida do transiente intracelular de cálcio.....	92
4.8.8 Avaliação do efeito do preparado de maior potência, obtido das folhas de <i>C. spiralis</i> , sobre a remoção do cálcio citoplasmático livre.....	93
4.8.8.1 Prospecção guiada pela equação de Conde-Garcia.....	93
4.8.9 Avaliação do efeito do preparado de maior potência sobre as correntes de cálcio tipo-L.....	94
4.9 Tratamento estatístico dos dados.....	95
5 RESULTADOS.....	97
5.1 Rendimentos do EBH e de suas frações.....	97
5.2 Avaliação do efeito inotrópico do EBH e de suas frações.....	97
5.3 Prospecção química e fitoquímica da FAq.....	100
5.3.1 Determinação do sódio e do potássio	100
5.3.2 Triagem fitoquímica.....	100
5.4 Avaliação do efeito da FAq sobre os parâmetros contráteis do átrio.....	101
5.4.1 Tempos de contração e de relaxamento.....	101
5.4.2 Acoplamento eletromecânico	102
5.4.3 Índices de Eficiência da contração e do relaxamento	103
5.5 Estudo do mecanismo de ação da FAq sobre a contratilidade atrial.....	104
5.5.1 Avaliação da participação do potássio.....	104
5.5.1.1 Prospecção guiada pelo bloqueio muscarínico.....	104
5.5.1.2 Prospecção guiada pelo bloqueio de canais de potássio.....	105
5.5.2 Avaliação da participação do cálcio.....	107
5.5.2.1 Prospecção guiada pelo fenômeno de Bowditch	107
5.5.2.2 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o isoproterenol..	109
5.5.2.3 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o CaCl_2	111
5.5.2.4 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o (-) BAY K8644.....	113
5.6 Efeito da FAq sobre o pico do transiente de cálcio citoplasmático e sobre o decaimento da fluorescência relativa a este íon.....	115
5.6.1 Prospecção guiada pela fluorescência ao cálcio.....	115

5.6.2 Efeito da FAq sobre a remoção do cálcio citoplasmático livre	117
5.6.2.1 Prospecção guiada pela equação de Conde-Garcia.....	117
5.7 Prospecção guiada pelo ‘patch clamp’	119
6 DISCUSSÃO	120
7 CONCLUSÕES	128
REFERÊNCIAS	129
ANEXO A	160
ANEXO B	161

1 INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais é a mais antiga forma de cuidados à saúde, tendo recebido a contribuição de muitos cientistas, dentre esses: Hipócrates (460-377 A.C.), ChoChinkei (3000 A.C.), Galeno (123-199 D.C.) e Avicena (980-1037 D.C.). Paracelsus (1493-1541) foi o primeiro a conceituar a diferença entre remédio e veneno: “todas as substâncias são venenos, não há uma que não seja veneno. A posologia correta diferencia o veneno do remédio” (WAGNER; WISENAUER, 2006).

O potencial brasileiro na área de fitoterápicos inclui cerca de 120 mil espécies, a grande maioria na região amazônica. Destas, o saber popular selecionou cerca de duas mil que já pertencem à medicinal popular. Todavia, apenas 10% destas foram cientificamente investigadas do ponto de vista químico-farmacológico (DI STASI; LIMA, 2002). Observa-se, portanto, que há uma grande disparidade entre a diversidade da flora medicinal e os esforços de pesquisa para estabelecer critérios etnofarmacológicos adequados (FERREIRA, 1998).

A História é a principal testemunha da importância do estudo científico sobre plantas medicinais, pois muitos dos medicamentos usados na prática médica, provieram das plantas. Por exemplo, entre os fitofármacos, que têm ação sobre o sistema cardiovascular, destacam-se: glicosídeos cardiotônicos, como a estrofantina e a ouabaína (*Strophantus kombé* Oliv.), digoxina (*Digitalis purpurea* L.) e digitoxina (*Digitalis lanata* Ehrhart), antimalárico e anti-arrítmicos, como a quinidina (*Cinchona succirubra* Pavon), anticolinérgico, como a atropina (*Atropa belladonna* L.), anti-hipertensivo, como a reserpina (*Rauwolfia serpentina* Benth.), agonista adrenérgico, como a efedrina (*Ephedra vulgaris*) e a ergotamina extraída do fungo do esporão do centeio (*Claviceps purpurea*), bloqueadores de canais de Ca^{+2} , como a tetrandina (*Radix stephaniae tetrandrae*) e bloqueadores do canal liberador de Ca^{+2} existente no retículo sarcoplasmático, como a rianodina (*Ryania speciosa*) (VASCONCELOS, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conceitua planta medicinal como sendo aquela, de origem silvestre ou cultivada, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico (FERRO, 2006), ou então que sirvam como fonte primária de fármacos ou dos seus

precursores (ARIAS, 1999). A OMS preceitua ainda como fitoterápicos os “produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos ingredientes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais. Por material vegetal, entendem-se sucos, resinas, óleos fixos, óleos voláteis e qualquer outro de natureza semelhante. Os fitoterápicos podem conter excipientes, além dos ingredientes ativos. Se ao material vegetal estão associadas substâncias ativas, definidas do ponto de vista químico, sintéticas ou isoladas de planta, o produto final não é considerado um fitoterápico” (OMS, 1991).

A família Costaceae pertence à ordem Zingiberales, que consiste de oito famílias de monocotiledôneas: Zingiberaceae, Costaceae, Marantaceae, Cannaceae, Lowiaceae, Musaceae, Heliconiaceae e Strelitziaceae (NAKAI, 1941; CRONQUIST, 1981; DAHLGREN et al., 1985; KRESS, 1990; APG II, 2003). Ela é constituída pelos gêneros *Costus*, *Monocostus*, *Dimerocostus* e *Tapeinocheilas*, os quais são encontrados em áreas tropicais e subtropicais, tanto no Novo, quanto no Velho Mundo. Elas podem ser vistas em florestas pluviais e noutros ambientes úmidos. *Costus* é o maior dos gêneros, abrangendo de 125 a 175 espécies distribuídas pantropicalmente, sendo que a maioria delas ocorre na região neotropical (MAAS, 1972; STEVENSON & STEVENSON, 2004).

As plantas do gênero *Costus* geralmente têm ramos espirais com inflorescências terminais que produzem uma flor por dia, raramente duas, além de terem um período de floração estendido (SCHEMSKE, 1980, 1981, 1982; KAY & SCHEMSKE, 2003).

A *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe ocorre na parte tropical da América do Sul. Ela é encontrada nas florestas chuvosas ou em regiões de afloramento granítico (MAAS, 1972). Esta espécie tem sido usada na medicina popular brasileira para o tratamento de afecções urinárias, como cicatrizante, diurético e para o controle do diabetes, entre outros usos (ALBUQUERQUE, 1989; MARTINS et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004).

Apesar da variedade de ações imputadas aos extratos de *Costus spiralis*, a literatura científica não menciona se ela foi testada em tecido muscular cardíaco. Todavia, o LBC/UFS mostrou que o extrato bruto das folhas de *Costus spiralis* reduz a contratilidade do átrio de cobaia de forma dependente de concentração. Este achado

representou uma janela de oportunidade para suportar esta pesquisa. O nosso objetivo principal foi descrever, de modo sistemático, os efeitos contráteis produzidos pelo preparado das folhas que apresentasse maior potência inotrópica, em miocárdio atrial de cobaia. Neste trabalho, buscamos identificar pistas que possam contribuir para esclarecer o mecanismo de ação da substância cardioativa presente no preparado de *C. spiralis*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

A propriedade sedativa da valeriana já era conhecida pela medicina grega, mesmo antes da Era Cristã. Depois, ela foi empregada por Galeno e também referida por Dioscórides, em sua obra *De Materia Medica*. Mais recentemente, a atividade terapêutica dessa planta tem sido objeto de investigação e várias das suas propriedades biológicas foram cientificamente comprovadas (CIRCOSTA et al., 2007; BENT et al., 2006).

O emprego de plantas medicinais como instrumento de cura passou por diferentes paradigmas ao longo da história da Medicina (KUHN, 1985). Inicialmente, utilizadas de forma empírica, tinham suas qualidades transmitidas oralmente de geração a geração. Recentemente, as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para as pesquisas científicas. Deste esforço, a prática médica beneficiou-se com um novo e importante arsenal terapêutico composto por fitoterápicos e seus derivados (LEITE, 2009).

Apesar de se ter perdido muito do conhecimento sobre o poder curativo das plantas, uma sólida documentação sobre elas foi produzida por países da Europa Central e também pela China, Tibete, Índia (Ayurveda) e Japão (Kampo). Ainda hoje, todos os povos utilizam plantas ou seus derivados para tratar doenças (SALES, 2005; WAGNER; WISENAUER, 2006).

Estima-se que cerca de 25% dos medicamentos derivem de plantas. De um total de 252 drogas, contidas na lista médica da OMS, 11% têm, exclusivamente, origem vegetal (RATES, 2001). Mukherjee (2006) relata que cerca de 80% da população da África, Ásia e Índia dependem do uso de ervas medicinais para atender aos seus cuidados de saúde (OMS, 2008).

Entre os países latino-americanos, o Brasil, a Argentina e o México são os que mais devotam atenção ao potencial terapêutico das plantas medicinais. O uso dessas plantas com fins terapêuticos, está regulamentado no Brasil, desde 1967. Plantas medicinais são vendidas como medicamentos “over-the-counter”, isto é que têm venda livre não exigindo prescrição médica. Os requisitos legais para o registro

de fitoterápicos no Brasil estão estabelecidos pela Resolução da Diretoria Colegiada RDC/48/2004 da ANVISA (SAHOO, 2010).

O Brasil é considerado ser o detentor da maior biodiversidade do planeta. Nele estão cerca de 20% de todas as espécies vegetais do mundo e sua rica diversidade cultural e étnica permitiu um acúmulo considerável de conhecimentos que usualmente são passados de geração a geração (GALLO; JAGUS; PILOSOFF, 2006). Apesar disso, somente muito recentemente é que os laboratórios de pesquisa têm dedicado esforços para avaliar a flora medicinal com abordagem científica.

Para Ferreira (1998), apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe a insuficiência de estudos científicos acerca do assunto. Portanto, torna-se necessário estimular a realização desses estudos, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais, como sociais. Matos (2001) propôs que fossem avaliadas cientificamente as plantas popularmente conhecidas como terapêuticas. Esta abordagem foi depois recomendada na RDC/48/2004, da ANVISA, como sendo o caminho mais curto para a produção nacional de fitoterápicos.

As estimativas apontam que 82% da população brasileira utilizam produtos à base de ervas. O setor de fitoterápico conta com cerca de duzentas empresas, que movimentam em torno de US\$ 400 milhões, o que representa 6,7 % das vendas de medicamentos no Brasil e emprega mais de cem mil pessoas no país, sendo um mercado promissor e em franca expansão (ALVES et al., 2008).

A RDC No. 48/2004 da ANVISA conceitua fitoterápicos como medicamentos preparados exclusivamente com plantas medicinais ou com partes delas e que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção ou tratamento sintomático de doenças, mas também que tenham sido validadas por estudo etnofarmacológico, apresentem documentação técnico-científica ou que tenham sido submetidas a ensaios clínicos até a Fase 3.

2.2 *Costus spiralis* (Jacq.)Roscoe

2.2.1 Aspectos botânicos

Pertence à família Zingiberaceae que inclui 52 gêneros nos quais estão distribuídas 1.100 espécies. Destas, várias são ervas com rizomas aromáticos e células secretoras que contêm óleos etéricos de amplo uso. Os gêneros estão distribuídos em duas subfamílias, a saber (DI STASI; LIMA, 2002):

- ✓ Costoideae, na qual se encontram as espécies dos gêneros *Costus*, especialmente a *spiralis* (Cana-do-brejo), de amplo uso nas regiões de Mata Atlântica;
- ✓ Zingiberoideae, que incluem os gêneros *Zingiber*, *Alpinia* e *Hedychium*, *Curcuma*, *Renealmia* e *Riedelia*, com várias espécies medicinais (DI STASI; LIMA, 2002).

A família Zingiberaceae (Costaceae) é bem conhecida pelo seu valor medicinal. Está amplamente distribuída entre os trópicos, particularmente no Sudoeste da Ásia. Os seus membros constituem um importante recurso natural, oferecendo muitos produtos úteis para alimentos, especiarias, medicamentos, corantes, perfumes e estética (JANTAN et al., 2003). A Índia é uma das regiões mais ricas e diversificadas no emprego e manipulação das Zingiberaceae. A região Nordeste da Índia é a zona onde há maior concentração destas plantas, podendo ser encontrados 19 gêneros e 88 espécies (PRAKASH; MEHROTRA, 1995). A maioria dos membros pertencentes à Zingiberaceae cresce na Índia em estado selvagem (TUSHAR et al., 2010).

Costus spiralis (Jacq.) Roscoe, da família Zinziberaceae/Costaceae, popularmente chamada no Brasil como ‘cana-do-brejo’ (Fig. 1), é uma espécie nativa, encontrada em locais úmidos do Sul do México, na península de Yucatan, na Costa Rica, norte da Colômbia e no Brasil (SILVA., et al 1999). A denominação cana-do-brejo inclui duas espécies: a *Costus spiralis* Rosc. e a *Costus spicatus* Swartz, ambas com a mesma utilidade na medicina tradicional (GASPARRI, 2005).

É uma planta perene, rizomatosa, ereta, não ramificada, de 1 a 2m de altura, nativa em quase todo o Brasil, principalmente nas regiões da mata Atlântica e da Amazônia. Apresenta folhas alternas, membranáceas, dotadas de bainhas papiráceas, velutina, em ambas as faces, de 25 a 40 cm de comprimento por 6 a 10 cm de largura. Possui inflorescências em espigas terminais estrobiliformes, com grandes brácteas vistosas de cor vermelha, que protegem as flores de cor amarelada. Multiplica-se tanto por sementes, como por rizomas. É cultivada como ornamental,

tanto para jardins, como para a produção de flor de corte. Suas folhas, hastes e rizomas são empregadas na medicina tradicional, principalmente na região Amazônica (LORENZI; MATOS, 2002).



Figura 2 - Foto da *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (<http://www.henriettesherbal.com>)

2.2.2 Aspectos etnofarmacológicos

No Brasil, a *Costus spiralis* é usada na medicina popular como diurético, analgésico para a bexiga e uretra, bem como para ajudar no processo de eliminação de cálculo renal (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1965). Na Mata Atlântica, a infusão das folhas é usada contra hipertensão e o decocto de suas folhas, contra diarreia. A infusão obtida dos colmos é usada contra hepatite e cólicas intestinais (DI STASI; LIMA, 2002).

Boorhem (1999) relata que o decocto da *Costus spiralis* é empregado para aliviar irritações vaginais e a leucorreia. Nas regiões Norte e Centro-oeste, a *Costus spiralis* é utilizada no tratamento do reumatismo (TRESVENZOL et al., 2006). Segundo o conhecimento empírico, a cana-do-brejo também auxilia no tratamento do *diabetes mellitus* (SILVEIRA; RIEDER, 2009).

Corrêa (1984) refere que o suco das folhas dessa planta é útil contra arteriosclerose e como calmante, e que as folhas frescas são usadas topicamente na resolução de abscessos.

2.2.3 Efeitos biológicos

2.2.3.1 Atividade antiurolítica

Viel et al. (1999) testaram a atividade antiurolítica do extrato aquoso de *Costus spiralis*, implantando cristais de oxalato de cálcio e discos de zinco na bexiga urinária de ratos Wistar. Este procedimento induziu à formação de cálculos urinários, bem como a hipertrofia da musculatura lisa da bexiga. O tratamento com o extrato aquoso (0,25 – 0,5 g/kg/dia, 4 semanas, v.o.) reduziu o crescimento dos cálculos, porém não preveniu a hipertrofia do órgão. A contratilidade da bexiga provocada pelo agonista muscarínico betanecol, não foi diferente entre os grupos tratados com extrato ou com a atropina. Não houve, contudo, alteração do volume urinário dos ratos tratados, quando comparados com os animais do grupo controle. Os resultados indicaram que o extrato de *Costus spiralis* possui atividade antiurolítica, confirmando, assim, seu uso pela medicina popular.

2.2.3.2 Atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante

Habsah et al. (2000) estudaram a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos metanólico e diclorometânico de *Costus spiralis*. Para o estudo do efeito antimicrobiano, seis micro-organismos foram avaliados: *Bacillus subtilis* (gram positivo), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (gram positivo), *Escherichia coli* (gram negativo), *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativo), *Candida albicans* e *Aspergillus ochraceus*. O extrato metanólico inibiu o crescimento de quatro dos micro-organismos testados (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus ochraceus*), quando usado em concentrações maiores que 1 mg/disco. Para a *Escherichia coli* e *Candida albicans*, os extratos não tiveram ação. O extrato diclorometânico na concentração de 1 mg/disco inibiu o *Bacillus subtilis* e o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, enquanto que, para a *Pseudomonas*

aeruginosa e para *Aspergillus ochraceous*, a inibição ocorreu com concentrações maiores que 1 mg/disco. Os autores não realizaram controle positivo.

Com relação à atividade antifúngica, Braga et al. (2007) avaliaram o efeito do extrato metanólico das folhas de *Costus spiralis* em dois tipos de fungo, a *Candida albicans* e o *Cryptococcus neoformans*. Contra eles, o extrato da *Costus spiralis* não mostrou atividade.

A atividade antioxidante dos extratos obtidos com metanol ou diclorometano foi testada por Habsah et al. (2000). Foram avaliados o efeito antioxidante dos extratos obtidos das seguintes espécies de *Costus*: *discolor*, *megalobracteata*, *spiralis* e *villosissimus*. A *Costus spiralis* foi a que apresentou maior ação antioxidante para ambos os extratos.

Gasparri (2005) concluiu que a fração metanólica do extrato da cana-do-brejo produziu um efeito antioxidante contra as leveduras de *S. cerevisiae*, quando expostas ao peróxido de hidrogênio ou ao paraquat, sugerindo que esta fração concentra uma quantidade significativa de agentes antioxidantes.

2.2.3.3 Atividade antileishmânia e citotóxica

Braga et al. (2007) mostraram que o extrato metanólico das folhas de *Costus spiralis* possui atividade antileishmânia com um IC₅₀ de 250 µg/mL, tanto para a *Leishmania amazonensis*, como para a *Leishmania chagasi*. Na concentração de 250µg/mL, o extrato metanólico de *Costus spiralis* não apresentou sinais de toxicidade significativa para células de mamíferos.

2.2.3.4 Atividade anti-inflamatória e imunomoduladora

Das folhas da *Costus spiralis* foi isolado e descrito um novo diglicosídeo flavônico, o 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona 3-O-neohesperidosídeo. Já eram conhecidos a tamarixetina 3-O-neohesperidosídeo, canferídio 3-O-neohesperidosídeo, quercetina 3-O-neohesperidosídeo e o canferol 3-O-neohesperidosídeo. Estes glicosídeos flavônicos demonstraram atividade inibidora para a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados, bem como atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2000).

Dos rizomas da *Costus spiralis*, foram isoladas duas novas saponinas esteroidais (SILVA; PARENTE, 2004): a $(3\beta,25R)$ -26- $(\beta$ -D-glucopiranosiloxe)-22-hidroxfurose-5-3-yl O-D-apio- β -D-furanosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopiranoside e a $(3\beta,25R)$ -26- $(\beta$ -D-glucopiranosiloxe)-22-hidroxfurose-5-3-yl-O-D-apio- β -D-furanosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-lucopiranoside. Os autores avaliaram suas atividades farmacológicas. Na dose de 100mg/kg, as saponinas esteroidais mostraram ser capazes de inibir o aumento da permeabilidade vascular. Estes resultados sugerem que estas saponinas podem ser agentes terapêuticos para situações que envolvem desordem inflamatória, justificando, assim, o uso da *Costus spiralis* pela medicina tradicional brasileira.

Muitos polissacarídeos do tipo glicano encontrados em vegetais mostraram possuir atividade anti-inflamatória (CZARNECKI; GRZYBEK, 1995) e imunomoduladora (TOMODA et al., 1994). Os estudos sugerem que o mecanismo de ação desses polissacarídeos pode estar relacionado a fatores como a sua ação sobre o sistema retículo-endotelial, a estimulação da capacidade fagocitária dos leucócitos e a sua ação sobre os vasos, afetando-lhes a permeabilidade (WHISTLER et al., 1976).

Silva e Parente (2003) isolaram de talos fresco da cana-do-brejo, três polissacarídeos do tipo glicanos denominados Cs1, Cs2 e Cs3. Os estudos químicos e espectroscópicos indicaram que eles têm uma estrutura ramificada do tipo glicano. Mostraram ainda que a capacidade fagocitária dos leucócitos foi aumentada pela adição desses glicanos, sugerindo haver neles uma ação imunomoduladora. Em adição a isto, estes glicanos também inibiram o aumento da permeabilidade vascular produzido pelo ácido acético (WHITTLE, 1964).

2.2.3.5 Outras atividades e perspectivas

Uma pesquisa pré-clínica objetivando avaliar extratos da cana-do-brejo sob o ponto de vista farmacológico, confirmou ser a espécie possuidora de atividade analgésica, bem como possuir ação antiedematogênica e antiespasmódica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Na composição química do decocto da planta foi registrada a presença de inulina, ácido oxálico, taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens e

pectinas (ALBUQUERQUE, 1989; CORRÊA et al., 1998; VIEIRA; ALBUQUERQUE, 1998). Por outro lado, Braga et al. (2007) encontraram os seguintes constituintes na análise fitoquímica do extrato metanólico obtidos das folhas de *Costus spiralis*: flavonóides, esteróis e alcalóides.

Um levantamento bibliográfico do efeito biológico dos constituintes fitoquímicos da *Costus spiralis* sobre o músculo cardíaco, músculo liso e músculo esquelético foi realizado nos seguintes ‘sites’ de busca: SCIEDIRECT, PUBMED, MEDLINE, SCIELO. Esta avaliação mostrou que, dos constituintes fitoquímicos mencionados, não houve relato de ação sobre o funcionamento do músculo esquelético. Porém, alguns efeitos foram relatados nos músculos cardíaco e liso.

Os polifenóis foram os constituintes fitoquímicos que mais apresentaram efeitos biológicos. Dentre eles estão: flavonóides, catequinas, taninos e xantonas. As saponinas e os alcalóides também apresentaram efeitos biológicos sobre os músculos cardíaco e liso.

2.3 Músculo liso vascular: efeito de constituintes do gênero *Costus*

2.3.1 Considerações gerais sobre o estresse oxidativo e doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares continuam a ser a principal causa de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento, representando cerca de 20% da mortalidade (COADY et al., 2001). No Brasil estas doenças causam uma mortalidade geral de 158,91 óbitos/100.000 habitantes. O elo comum entre as doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, doença cardíaca coronariana (DCC), hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, é o estresse oxidativo. Este mecanismo é caracterizado por uma condição de desequilíbrio entre antioxidantes endógenos e espécies reativas do oxigênio e/ou de nitrogênio (ERON) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As ERONs podem ser geradas por ação enzimática, particularmente pela oxidase do NADPH, oxidase da xantina (OX) e lipoxigenase (LOX). A produção de ERONs pode ser ampliada pelo papel catalisador exercido pelo ferro ou cobre. A

modificação do colesterol LDL (“light density lipids”) produzida por estresse oxidativo leva à indução de processo inflamatório com aumento da aderência leucocitária e da perda de propriedades protetoras do endotélio vascular (Mladenka et al., 2010). Estes mecanismos são importantes na patogênese da aterosclerose (MLADENKA et al., 2010 cita: KUHN et al., 1994; OZAKI et al., 2002; ALP; CHANNON, 2004; MIYOSHI et al., 2006; CHENG; LI, 2007; OGURA et al., 2009; HUANG, 2009; NAPOLI; IGNARRO, 2009).

A disfunção endotelial e o aumento da agregação plaquetária são fatores pró-coagulantes e podem levar à trombose. Este quadro muitas vezes conduz ao infarto agudo do miocárdio (IAM). Na fase isquêmica do IAM, ocorre frequentemente agregação plaquetária, ativação de neutrófilos, aumento intracelular do ferro redutor livre e a transformação da xantina desidrogenase em espécie reativa de oxigênio (ERO), produzindo oxidase de xantina. Estes fatos desempenham importante papel no processo inflamatório do IAM (CHAMBERS et al., 1985; TERADA et al., 1997; BERRY; HARE, 2004). Quando o fluxo coronariano é restaurado (reperusão) a recuperação tissular se encontra comprometida devido à grande liberação de EROs e de metais transitórios livres (MLADENKA et al., 2010 cita: AMBROSIO et al., 1987; BOLLI et al., 1990; BOUCHER et al., 1992; CHEVION et al., 1993; BERENSHTEIN et al., 2002).

Consequências comuns do IAM são a insuficiência e as arritmias cardíacas (ZWEIER; TALUKDER, 2006). Nestes casos, as EROs podem estar envolvidas no surgimento de hipertrofia do músculo do coração. Foi visto que pacientes com insuficiência cardíaca têm a produção de ERO aumentada (DE BIASE et al., 2003). Os superóxidos podem desempenhar um papel importante na origem de arritmias do coração (GOLDBERG et al., 1983; BERNIER et al., 1986; MANNING et al., 1984). Pacientes com hipertensão arterial são propensos a desenvolver maior estresse oxidativo (PARAVICINI et al., 2008). O papel do estresse oxidativo nessa condição é, provavelmente, mais complexo e envolve tanto aspectos hemodinâmicos (vasoconstrição), quanto estruturais (remodelação vascular) (MA et al., 2008). No que diz respeito à contribuição hemodinâmica, estas podem ser devidas à inativação direta do óxido nítrico (NO), promovida pelos radicais superóxidos e pela estimulação da NADPH oxidase (ZALBA et al., 2005; PARAVICINI et al., 2008).

2.3.1.1 Efeito de flavonóides sobre doenças cardiovasculares

Os flavonóides exercem ação positiva sobre a saúde de camundongos ateroscleróticos. Além disso, eles contribuem para melhorar o espectro lipoprotéico de ratos diabéticos sem interferir nos níveis glicêmicos dos animais (CAYATTE et al., 2001; KRISHNA et al., 2005; XIAO et al., 2009). Miladěnka et al. (2010), revisando os trabalhos de Van Jaarsveld et al. (1996), De Celle et al. (2004), Ji et al. (2004), Ralay et al. (2004), Lapchak et al. (2007), Jackman et al. (2007), Ha et al. (2008) e Akhlaghi; Bandy (2009), relataram que os flavonóides podem prevenir o aparecimento de efeitos colaterais em pacientes com infarto cerebral ou miocárdico. Relataram ainda que, nos trabalhos de Karthick et al. (2006), Rajadurai; Prince (2007), Mladěnka et al. (2009), os flavonóides exerceram um efeito positivo em animais com IAM, porém a rotina lhes agravou o quadro clínico. Os flavonóides foram capazes de reduzir a pressão arterial dos animais hipertensos, porém nenhum efeito foi visto em animais normotensos, conforme relatam Negishi et al. (2004), Sanchez et al. (2006), Sarr et al. (2006), Jackman et al. (2007), estes revisados por Miladěnka et al. (2010).

Na sua revisão, Miladěnka et al. (2010), analisando os trabalhos de WANG et al. (1999), DUAN et al. (2000), VIANNA et al. (2006) realizados tanto em modelos animais, quanto no homem, mostraram que os flavonóides exerceram efeitos positivos nos pacientes com insuficiência cardíaca e também no controle das arritmias do coração. Relataram ainda que alguns flavonóides foram capazes de reduzir a cardiotoxicidade da doxorubicina em cardiomiócito de rato (KOZLUCA et al., 1996; VAN ACKER et al., 2001; PSOTOVA et al., 2004; BAST et al., 2007; KAISEROVA et al., 2007).

Miladěnka et al. (2010) resumizam os mecanismos de ação envolvidos com os efeitos positivos dos flavonóides (Tabela 1) na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, nas seguintes categorias:

- Diminuição do estresse oxidativo por:
 - Ação direta na remoção de radicais livres;
 - Quelação de radicais livres mediada pelo ferro ou cobre;

Inibição de enzimas produtoras de EROs, em particular da oxidase de xantina, oxidase do NADPH e das lipoxigenases

- Diminuição da expressão de moléculas que sinalizam a cascata inflamatória:
Inibição da expressão da sintase induzida do óxido nítrico (iNOS)
Inibição da expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2);
Inibição da ativação leucocitária (inibição da transcrição dependente de NF-
□ □ □
- Inibição da agregação plaquetária
- Ação direta vasodilatadora

Tabela 1 – Ação de flavonóides em doenças cardiovasculares

Doença cardiovascular	Ação potencialmente positiva
Aterosclerose e formas estáveis de CDC	Diminuição na oxidação do LDL (inibição da LOX) e atenuação do estresse oxidativo. Diminuição do processo inflamatório (inibição da adesão leucocitária, das mieloperoxidases e diminuição da expressão de iNOS e COX-2).
IAM	Diminuição da produção de EROs (quelamento e eliminação de EROs por metais, inibição da OX e oxidase do NADPH) e inibição da agregação plaquetária.
Insuficiência cardíaca	Diminuição do estresse oxidativo (eliminação de EROs), ação inotópica positiva e inibição de metaloproteinases.
Arritmias	Diminuição do estresse oxidativo (eliminação direta de EROs ou por quelamento feito por metais).
Hipertensão arterial	Ação vasodilatadora, inibição da oxidase do NADPH, recuperação do NO devido à inibição da produção de superóxido

2.3.2 Considerações gerais sobre a vasoconstrição e a vasodilatação

Scholz et al. (2010) descreveram que a pressão arterial sistêmica depende da resistência do sistema vascular ao fluxo de sangue que por ele passa. Afirmaram que o principal determinante da resistência vascular é decorrência da contratilidade das células vasculares do músculo liso, que se localizam nas paredes das artérias de resistência e das arteríolas. A atividade dessas células é controlada com precisão por estímulos vasodilatadores e vasoconstrictores, que são mediados por hormônios circulantes, por neurotransmissores e fatores locais derivados do endotélio.

A atividade contrátil das células do músculo liso vascular é controlada por canais iônicos que se localizam na membrana plasmática (JACKSON, 2000; BRAYDEN, 2002). O cálcio citoplasmático livre regula de forma precisa a contratilidade da musculatura vascular. Este íon transita pela membrana celular via canais iônicos especializados que são controlados pelo potencial de membrana. O influxo de cálcio, através dos canais para cálcio da membrana plasmática, inicia a cascata que leva à contração muscular, desencadeando a liberação do cálcio que se encontra estocado nas organelas intracelulares. Por outro lado, quando há ativação dos canais para potássio, a célula hiperpolariza devido ao aumento do efluxo deste íon. A modificação da voltagem da membrana leva à inativação dos canais para cálcio, o que contribui para a vasodilatação (BRAYDEN, 2002). As células do músculo liso vascular expressam diversos tipos de canais iônicos, entre eles, os canais para potássio, para cálcio, para cloreto e também os canais que são ativados pelo estiramento mecânico do músculo, ajudando, assim, a regular sua atividade contrátil (JACKSON, 2000).

2.3.2.1 Efeitos de flavonóides sobre a corrente de cálcio em células do músculo liso vascular

O cálcio que entra nas células do músculo liso vascular promove uma despolarização e inicia a contração desse músculo, levando à vasoconstrição. Assim, fármacos anti-hipertensivos têm sido produzidos baseados na ideia de inibir as correntes de entrada de cálcio. Vários flavonóides mostraram-se capazes de inibir essa corrente e foram reconhecidos como substâncias dotadas de

potencialidade terapêutica contra a hipertensão arterial. Wijetunge et al. (1992) relataram que a isoflavona e a genisteína, este um inibidor da quinase de tirosina, podem inibir, de forma dose-dependente, a corrente de cálcio nas células musculares dos vasos. Resultados semelhantes foram também obtidos por Figtree et al. (2000). Estes mostraram que a genisteína – que é um fitoestrógeno – bem como a fletina e a biochanina A, relaxam as artérias coronárias de coelhos por inibirem a corrente de cálcio da célula vascular, efeito que ocorre de forma independente do endotélio. Curiosamente, em pacientes voluntários que ingeriram proteína de soja, foram observados efeitos vasorrelaxantes com concentrações plasmáticas de flavonóides que estavam na mesma faixa usada nos estudos *in vitro* (FIGTREE, 2000).

Pan et al. (2008) relataram que o flavonóide escutelarina, extraído da *Scutellaria barbata* e da *Scutellaria lateriflora*, relaxa anéis de aorta de rato dotados ou não de endotélio. Os autores sugeriram que a inibição do influxo de cálcio pode estar envolvida no efeito vasorrelaxante observado. Inibição da corrente de cálcio vascular foi também relatada para o flavonóide calicosina, isolado da *Sarcococa saligna*, e também para o flavonóide de origem vegetal chamado de catequina (GHAYUR; GILANI, 2006; WU et al., 2006; GHAYUR et al., 2007).

Os efeitos produzidos pela epigallocatequina galato (EGCG) - principal flavonóide do chá verde - sobre preparações vasculares têm sido muito estudados. A EGCG produz efeito bifásico, promovendo uma vasoconstrição inicial, que se deve a um aumento do influxo de cálcio e, em seguida, um vasorrelaxamento, este devido à inibição dos canais para cálcio vasculares (HUANG et al., 1998; ALVAREZ et al., 2004; KIM et al., 2004). Fusi et al. (2003) mostraram que o flavonóide miricetina exerce efeitos similares a EGCG em canais para cálcio, resultando em uma redução da corrente de cálcio em células isoladas de artéria da calda do rato.

2.3.2.2 Efeitos de flavonóides sobre as correntes de potássio das células do músculo liso vascular

Quatro principais canais para potássio estão descritos nas células do músculo liso vascular. São eles: canal ativado por cálcio (BK_{Ca}), canal sensível a ATP (K_{ATP}), canal dependente de voltagem (K_V) e o canal com retificação para

corrente de entrada (“inward rectifier channel – K_{ir} ”) (KO et al., 2008). A ativação destes canais promove o aumento das correntes de potássio, levando as células do músculo liso vascular à hiperpolarização, o que induz à vasodilatação.

2.3.2.2.1 Efeito de flavonóides sobre os canais BK_{Ca}

Os canais BK_{Ca} têm sua condutância aumentada sempre que a concentração de cálcio intracelular se eleva (EICHHORN; DOBREV, 2007). Com isso, o efluxo de potássio aumenta, produzindo hiperpolarização e consequente vasodilatação. A ação de flavonóides sobre os BK_{Ca} tem sido muito estudada. XU et al.(2008) relataram que o canferol exerce parte da sua atividade vasodilatadora por ativação destes canais. Efeitos similares têm sido relatados para a isoflavona pueranina (SUN et al., 2007). A diocleína, um flavonóide da raiz da *Dioclea grandiflora*, causa hipotensão em ratos normotensos (CÔRTES et al., 2001). Usando preparações isoladas de artérias mesentéricas de ratos, CÔRTES et al. (2001) mostraram que o efeito vasorrelaxante da diocleína se deve, principalmente, à hiperpolarização devido a ativação de canais BK_{Ca} . Saponara et al. (2006), encontraram que o flavonóide naringenina, obtido de cítricos, também dilata anéis de aorta de rato privados de endotélio. O mecanismo envolve a ativação de canais do tipo BK_{Ca} . Efeitos similares foram obtidos com os flavonóides quercetina, pueranina, EGCG e proantocianidinas e também para o polifenol não flavonóide resveratrol (KUHLMANN et al., 2005; COGOLLUDO et al., 2007; GAO et al., 2007; NAGAOKA et al., 2007; DALBÓ et al., 2008; ROMANO; LOGRANO, 2009). A ativação de canais do tipo BK_{Ca} é uma chave importante para explicar o efeito vasorrelaxante de flavonóides, o que pode ser um mecanismo importante para explicar o efeito benéfico dessas substâncias nas doenças cardiovasculares (SCHOLZ et al., 2010).

2.3.2.2.2 Efeito de flavonóides sobre os K_{ATP} e outros canais

A ação de flavonóides sobre canais para potássio regulados pelo ATP (K_{ATP}) foi estudada por Ogata et al.(1997). Eles relataram que a genisteína inibe os K_{ATP} em músculo liso da veia porta de coelho. Propuseram ainda que a inibição da corrente desse canal pode ser devida a uma ação bloqueadora feita em conjunto com

a ativação da quinase de tirosina. Jin et al. (2007) mostraram que o chá verde, que é rico em flavonóides EGCG e em epicatequina, também reduz a atividade dos canais K_{ATP} . Em concentrações elevadas, o EGCG inibe diretamente estes canais, porém em baixa concentração a redução da corrente parece ser devida ao desacoplamento de fosfoinosítídeos e ATP, da proteína formadora do canal.

O papel exato da inibição do canal K_{ATP} na regulação do tônus vascular ainda não foi completamente entendido. Khan; Gilani (2006), analisando os efeitos do flavonóide crisoeriol, obtido do chá da *Aspalathus linearis*, mostraram que, em ratos anestesiados, havia uma vasodilatação promovida por ativação dos canais K_{ATP} .

Ko et al. (2009) relataram que a genisteína pode inibir os canais para potássio dependente de voltagem (K_V), independentemente da ativação da quinase de tirosina. Analizando os efeitos de procianidina, Kim et al.(2000) mostraram que o efeito vasodilatador pode ser devido a ativação desses canais. Iwasaki-Kurashige et al. (2006) relataram que concentrados de *Ribes nigrum* exercem um efeito vasodilatador por ativação de vários canais para potássio. Eles sugeriram ainda que duas delphinidinas, abundantes na *Ribes nigrum*, podem ser causadoras do efeito observado.

O flavonóide tilianina, isolado da *Agastache mexicana*, também promove um efeito anti-hipertensivo, relaxando anéis de aorta isolados. O mecanismo de ação deste relaxamento envolve a abertura de canais para potássio independentes de endotélio (HERNÁNDEZ-ABREU et al., 2009). Recentemente, Matsui et al.(2009) mostraram que a procianidina, obtida da maçã, relaxa anéis de aorta de rato, possivelmente por ativar canais para potássio diversos. A vasodilatação relatada para amentoflavona, colavirona, pinocembrina, luteolina e cardamonina, envolve uma ação sinérgica entre a ativação de correntes de potássio e a redução de corrente de cálcio (KANG et al., 2004; JIANG et al., 2005; ZHU et al., 2007; ADARAMOYE; MEDEIROS, 2009; FUSI et al., 2010).

2.4 Músculo cardíaco: efeitos de flavonóides sobre correntes iônicas

2.4.1 Considerações gerais

A atividade mecânica do coração é controlada com precisão por estímulos elétricos que se propagam ordenadamente através do tecido miocárdico. Células especializadas, localizadas no nódulo sinusal, formam o marcapasso primário do coração. Depois da despolarização dos átrios, a onda de excitação passa pelo nódulo átrio-ventricular e então se espalha seguindo o sistema His-Purkinje para, por fim, alcançar o miocárdio ventricular. A ativação dos miofilamentos promovida pelo cálcio intracelular livre acopla as atividades elétricas e mecânicas do músculo cardíaco, promovendo então a sístole. Com a abertura de canais para potássio, as células do coração repolarizam, o que mecanicamente leva à diástole (CONDE-GARCIA, 2002; SCHOLZ et al., 2010).

2.4.2 Efeito sobre a corrente “funny”

A corrente marcapasso “funny” (I_f) é uma corrente transportada por cátions não específicos e que se ativa pela hiperpolarização da membrana das células do tecido marcapasso (RODEN et al., 2002). A inibição da I_f reduz a taxa da despolarização diastólica lenta (DDL), que é característica dos potenciais de ação marcapasso (CONDE-GARCIA, 2002). Com isto, a variação do potencial de membrana que se observa nas células marcapasso se torna mais lenta, aumentando o tempo para que o limiar de estimulação seja alcançado e, consequentemente, reduzindo a frequência dos disparos da região marcapasso. Ma et al. (2002) encontraram que a isoflavona e a genisteína, esta um inibidor natural da quinase de tirosina, exercem um efeito cronotrópico negativo em células isoladas do nódulo sinoatrial de coelho. Altomare et al. (2006) demonstraram que a genisteína pode inibir a I_f , interagindo com sítio intracelular da proteína que forma o canal I_f .

2.4.3 Efeito sobre a corrente de sódio

A fase de despolarização do potencial de ação miocárdico é produzida graças à corrente de sódio (I_{Na}) que transita pelos canais rápidos para este íon. Este canal é operado pela voltagem da membrana celular (RODEN et al., 2002). O influxo prolongado de sódio, durante a fase do platô, é considerado ser um mecanismo pró-arritmogênico, pois favorece ao aparecimento de oscilações prematuras pós-

despolarização o que pode levar ao aparecimento de taquicardia ventricular. Nesse sentido, a inibição da I_{Na} permite que as atividades elétricas pró-fibrilatórias possam ser supressas (KNELLER et al., 2005). Usando a técnica do “patch-clamp”, Zhang et al. (2003) mostraram que, entre outras correntes iônicas, a isoflavona puerarina inibe diretamente I_{Na} de forma dose dependente. Os autores afirmaram que a inibição das correntes I_{Na} feita pela puerarina pode ter efeito antiaritmico, especialmente sobre as arritmias observadas durante a reperfusão miocárdica.

Wallace et al. (2006) encontraram que os flavonóides quercetina e catequinas, ambos constituintes das uvas vermelhas, bem como o polifenol não-flavonóide resveratrol, inibem os canais para sódio da célula miocárdica. Curiosamente, os autores mostraram que o resveratrol exerce parte deste efeito inibindo a I_{Na} tardia. Esta corrente parece ser um elemento-chave para o desenvolvimento das pós-despolarizações prematuras, que induzem o aparecimento de taquiarritmias ventriculares, bem como as temidas Torsade-de-Pointes (WALLACE et al., 2006).

2.4.4 Efeito sobre correntes de cálcio

A corrente de cálcio das células miocárdicas (I_{Ca}) podem ser sub-divididas em dois grupos principais: a) corrente de cálcio tipo-L e b) corrente de cálcio pelos canais tipo-T (RODEN et al., 2002). O influxo de cálcio via canais para cálcio tipo-L é um dos elementos responsáveis pela manutenção do platô dos potenciais de ação dos cardiomiócitos. Além do mais, esse influxo de cálcio provoca a liberação do cálcio estocado intracelularmente, promovendo, assim, o acoplamento eletromecânico. No entanto, um excesso na entrada de cálcio tem sido associado ao desenvolvimento de fenômenos prematuros e oscilantes conhecidos como pós-despolarização precoce, que são causa de graves arritmias (MARBAN et al., 1986; GREENSTEIN et al., 2000; KEATING; SANGUINETTI, 2001; MA et al., 2002; RODEN et al., 2002; ZHANG et al., 2003; KNELLER et al., 2005; ALTOMARE et al., 2006; WALLACE et al., 2006).

A inibição das correntes de cálcio tipo-L tem sido produzida por vários flavonóides. Chiang et al. (1996) relataram que a isoflavona genisteína inibe diretamente I_{Ca} em miócito ventricular de cobaia. Além do mais, Katsube et al.

(1998), encontraram que a genisteína reduz a probabilidade do estado aberto dos canais para cálcio, sem afetar, contudo, o tempo de abertura médio destes canais nem as variações da condutância da membrana. Resultados semelhantes foram também obtidos por outros grupos (BELEVYCH et al., 2002; JI et al., 2004). Os dados experimentais analisados em conjunto mostraram que existe um grande número de evidências de que a isoflavona e inibidores da quinase de tirosina, tal como a genisteína, podem exercer ação negativa e direta sobre os canais para cálcio das células do músculo cardíaco.

Quian et al. (1999) estudaram os efeitos da puerarina sobre a corrente de cálcio em cardiomiócitos isolados de cobaia. Estes autores encontraram que a isoflavona inibe I_{Ca} de forma dose-dependente, com uma potência semelhante para a inibição da I_{Na} pela puerarina.

Assim, semelhantemente à isoflavona genisteína, a puerarina também parece agir como um inibidor multicanal em cardiomiócitos. Analisando os efeitos de flavonóides derivados de extrato de planta, tem sido sugerido que o extrato da *Averrhoa carambola*, *Hyoscyamus Niger* e *Ginkgo biloba* inibem a corrente de cálcio nas células do coração (SATO; NISHIDA, 2004; VASCONCELOS et al., 2005; KHAN; GILANI, 2008;).

2.4.5 Efeito sobre correntes de potássio

A corrente de potássio sarcolemal nos cardiomiócitos pode ser sub-dividida em uma corrente transiente de saída (IK_{to}), uma corrente com retificação tardia (IK_{dr} ou IK) e uma corrente com retificação de entrada (IK_1 ou IK_{ir}) (GREENSTEIN et al., 2000; KEATING; SANGUINETTI, 2001; MA et al., 2002; RODEN et al., 2002; ZHANG et al., 2003; KNELLER et al., 2005; ALTOMARE et al., 2006). Principalmente expressadas nas camadas epicárdicas do miocárdio, a IK_{to} produz uma breve corrente de saída, logo após a fase 0 da despolarização, contribuindo para que o potencial de ação miocárdico tenha uma forma tipo “ponta e cúpula”. As IK_{ir} podem ser divididas em correntes de ativação ultra-rápidas (IK_{ur}), ativação rápida (IK_r) e ativação lenta (IK_s). Enquanto que a IK_{ur} está intimamente relacionada com a repolarização de células atriais humanas, a IK_r e a IK_s estão envolvidas com a fase de

repolarização de células ventriculares (GREENSTEIN et al., 2000; KEATING; SANGUINETTI, 2001; RODEN et al., 2002).

A reativação da corrente I_{K1} recupera o potencial de repouso da membrana no final da repolarização. Até o momento, somente poucos flavonóides têm mostrado ser capazes de inibir as correntes IK_{to} . A isoflavona puerarina (ZHANG et al., 2001) e a genisteína (GAO et al., 2004; OUYANG et al., 2006) inibem a IK_{to} . A flavona acacetina foi considerada ser uma droga promissora por sua capacidade seletiva de tratar arritmias atriais (LI et al., 2008). Li et al. (2008) mostraram que a acacetina prolonga o potencial de ação cardíaco porque inibe a IK_{to} e a IK_{ur} , sem produzir efeito sobre as correntes despolarizantes I_{Na} e I_{Ca} . A inibição da IK_{ur} pela isoliquiritigenina - extraída do alcaçuz - foi relatada por Noguchi et al. (2008).

A repolarização ventricular depende fortemente da ativação da corrente IK_r (KIEHN et al., 1999). Sua inibição é um efeito colateral comum em um grande número de drogas e tem sido associada com o desenvolvimento de arritmias ventriculares malignas (Torsade-de-Pointes). No entanto, a inibição desta corrente também está relacionada a propriedades antiarrítmicas de compostos bem conhecidos, tais como: a amiodarona, dronedarona e ajmalina (KIEHN et al., 1999; THOMAS et al., 2003; KIESECKER et al., 2004). Recentemente, foi realizado um amplo estudo envolvendo muitos flavonóides. Nele se observou que, entre outros, os flavonóides cítricos hesperetina e naringenina bloqueiam os canais para potássio HERG, que são a base molecular da I_{Kr} , em seres humanos (SCHOLZ et al., 2005; ZITRON et al., 2005; SCHOLZ et al., 2007). Resultados similares foram encontrados com o EGCG (KELEMEN et al., 2007). No entanto, deve ser ainda elucidado se esse efeito é pró ou anti-arritmogênico. A IK_1 é uma das principais correntes responsáveis pela repolarização celular e pela estabilização do potencial de repouso da membrana (GREENSTEIN et al., 2000; KEATING; SANGUINETTI, 2001; RODEN et al., 2002).

Analizando a corrente de potássio, em miócito ventricular de cobaia, Chiang et al. (2002) encontraram que o inibidor da quinase de tirosina - genisteína - bloqueia a IK_{dr} , levando à despolarização do potencial de membrana e ao aparecimento de automaticidade anormal. A inibição dos canais $K_{ir} 2.3$ foi identificada por Zhao et al. (2008) como sendo a base molecular para a redução da IK_1 que é promovida pela genisteína. Analizando os mecanismos causadores do aumento de duração do

potencial de ação cardíaco observado com extrato preparado de *Crataegus*, Müller et al. (1999) encontraram que IK_{ir} e IK_{dr} podem ser bloqueadas por este extrato. Scholz et al (2010) resumiram numa tabela a ação de diversos flavonóides sobre diferentes tipos de canais iônicos importantes na eletrofisiologia celular do miocárdio e do músculo liso vascular.

Bidase et al.(2000) mostraram que as isoflavonas tectoridina e 3-hidroxi-tectoridina, isoladas de ervas Ayurvédicas, podem se ligar e modular os receptores de rianodina, que são responsáveis pela liberação do cálcio estocado no retículo sarcoplasmático. Lorenz et al.(2008) encontraram que o EGCG, componente do chá verde, ativa os trocadores cardíacos para Na^+/H^+ e Na^+/Ca^{2+} , modulando a contratilidade miocárdica. A puerarina, que é um inibidor multicanal, tem sido mostrada ser capaz de inibir a permeabilidade da membrana mitocondrial e também de ativar o canal para potássio sensível ao ATP dessa organela (GAO et al., 2006).

2.5 Aparelho cardiovascular: efeito de substâncias extraídas de plantas do gênero *Costus*

2.5.1 Efeito de catequinas

Estudando a ação das catequinas sobre o músculo cardíaco e vascular, Velayutham et al. (2008) relataram que dados epidemiológicos e resultados de estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o consumo de chá verde pode ter efeitos benéficos para a saúde cardiovascular. Os polifenóis são os principais compostos do chá verde, sendo que as catequinas são o seu principal componente. Esta substância exerce efeito vaso-protetor que se dá por meio de diversos mecanismos, entre eles: antioxidantes, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-proliferativos, anti-trombogênicos e redutores dos lipídeos plasmáticos. Descrevem ainda o mecanismo de ação da catequina sobre a função vascular, citando: 1) atividade antioxidante, eliminando radicais livres, quelando íons de metais de transição ativos, inibindo os fatores de transcrição, inibindo enzimas pró-oxidantes e induzindo enzimas antioxidantes; 2) As catequinas do chá inibem enzimas-chave envolvidas na biossíntese de lipídeos e reduzem a absorção intestinal destas substâncias, melhorando assim o perfil lipídico do sangue; 3) As catequinas regulam

o tônus vascular, ativando o óxido nítrico endotelial; 4) As catequinas previnem a inflamação vascular, que desempenha um papel crítico na progressão das lesões ateroscleróticas. Esta atividade anti-inflamatória pode ser devida a supressão que ela promove da aderência de leucócitos ao endotélio, o que facilita a transmigração destas células. Este efeito anti-inflamatório se dá por meio da inibição da produção de citocinas que são mediadas pelo fator nuclear κ B (NF- κ B) nas células endoteliais e inflamatórias; 5) As catequinas inibem a proliferação de células do músculo liso vascular, interferindo com fatores de crescimento destas células que estão envolvidos no processo de aterogênese; 6) As catequinas suprimem a aderência de plaquetas, inibindo assim a trombogênese. Esses efeitos apontam para o fato de que as catequinas podem ser novas moléculas derivadas de plantas, úteis na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares.

Para testar a hipótese de que as catequinas podem atenuar a remodelação ventricular crônica depois de isquemia miocárdica, Suzuki et al. (2007) administraram oralmente estas substâncias a ratos submetidos à isquemia miocárdica. Embora tenha sido observado em animais isquêmicos uma produção de fibrose tissular e a exacerbação de fatores pró-inflamatórios, as catequinas promoveram, nestes animais, uma atenuação dessa reação por inibirem tanto o fator NF- κ B, quanto as metaloproteinases matriciais. Estes efeitos não foram acompanhados de reações adversas sistêmicas. Os autores concluíram que as catequinas podem prevenir o remodelamento do coração pós-isquemia porque podem suprimir a expressão de vários genes pró-inflamatórios.

2.5.2 Efeito de xantonas

Wang et al. (2001) realizaram um ‘screening’ sobre os efeitos hipotensores e vasorrelaxantes produzidos por derivados sintéticos das xantonas. Com isso, foram identificados vários compostos com propriedades biológicas. CHEN et al. (1993) sugeriram que um dos compostos, o composto 13, agia por bloqueio dos canais para cálcio e dos receptores adrenérgicos. Os resultados decorrentes do estudo de Wang et al. indicaram que este composto, usado em concentração elevada, é um inibidor relativamente seletivo de canais-receptores operados por Ca^{+2} . Os autores sugeriram ainda que o efeito inibidor sobre a resposta contrátil observado com elevado K^{+}

extracelular ou com a norepinefrina em aorta torácica de rato, se devia principalmente à inibição do influxo de Ca^{+2} , tanto através de canais dependente de voltagem, quanto pelos canais-receptores operados por Ca^{2+} . Chen et al. (1992) mostraram que o composto 9 podia inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Sua atividade hipotensora se deve, simultaneamente, ao bloqueio dos canais para cálcio, à inativação da ECA e a um antagonismo ao sistema parassimpático.

Marona et al.(2009) estudaram vários derivados sintéticos de xantonas, examinado suas atividades eletrocardiográficas, hipotensoras e anti-convulsivantes, bem como suas afinidades para os receptores adrenérgicos dos tipos α_1 e β_1 . Entre os compostos estudados, alguns apresentaram importante atividade anti-arrítmica e/ou hipotensora. Os compostos 4 e 7 apresentaram-se com maior potência contra arritmias induzidas pela adrenalina.

Wang et al. (2009) mostraram que xantonas isoladas de *Halenia elliptica* promoveram vasodilatação na artéria coronária de rato, quando ela foi pré-contraída pela 5-hidroxitriptamina (5-HT). Eles estudaram os seguintes derivados: 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxi-xantona (HM-1), 1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxi-xantona (HM-2), 1-hidroxi-2,3,4,5-tetrametoxi-xantona (HM-3), 1,7- dihidroxi-2,3,4,5-tetrametoxi-xantona (HM-4), 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxi-xantona (HM-5) e 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-xantona (HM-7). A remoção do endotélio diminuiu os efeitos vasorrelaxante da HM-1, HM-7, mas não da HM-2, HM-3, HM-4 ou HM-5.

2.5.3 Efeito de taninos

Os taninos são polifenóis naturais capazes de precipitar alcalóides hidrossolúveis e que possuem uma ação inibitória sobre a ECA. Liu et al. (2003) identificaram 18 polifenóis tanínicos a partir de ervas chinesas e examinaram o efeito *in vitro* desses taninos sobre a ECA, bem como os seus mecanismos de ação. Nesse trabalho, os autores analisaram o efeito dos taninos sobre a elevação da pressão sanguínea induzida por angiotensina I, em ratos espontaneamente hipertensivos. Nove taninos inibiram a ECA com $\text{IC}_{50} < 200 \mu\text{M}$ e foram identificados como pertencentes a três classes: cafeoilquinatos, flavan-3-ols e galotaninos. Dois dos flavan-3-ols, a saber, a epigalocatequina-3-O-galato e epigalocatequina-3-O-

metilgalato, e um dos galotaninos, o 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- β -D-glicose apresentaram ação inibitória não-específica da atividade das enzimas tripsina e quimiotripsina. A inibição da ECA pelo 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- β -D-glicose foi também reduzida pela adição de albumina sérica bovina, sugerindo um modo de ação não-específico. *In vivo*, a 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil- β -D-glicose e a epigalocatequina-3-*O*-metilgalato tiveram um forte efeito hipotensor, que foi dose-dependente e que reduziu de forma significativa a pressão arterial de ratos hipertensos. Os achados sugerem que alguns dos taninos isolados das ervas medicinais chinesas inibem a atividade da ECA de forma não-específica. A ação inibitória exercida por esses taninos pode explicar os efeitos hipotensores observados no uso de algumas ervas da Medicina tradicional chinesa.

Lee et al. (2010) estudaram os efeitos de taninos hidrolisáveis sobre as contrações do músculo papilar de rato, comparando-os com o efeito do propranolol tomado como controle positivo. Os valores das IC_{50} para o ácido digálico, ácido gálico, germina D, praecoxina A e 1-desgaloil rugosina F foram, respectivamente, 4.2×10^{-5} , 1.3×10^{-4} , 1.4×10^{-4} , 1.5×10^{-4} e 1.7×10^{-4} M. A incubação com taninos atenuou a resposta inotrópica negativa induzida pelo propranolol e potenciou as atividades α -adrenérgicas do bloqueador.

Xie et al. (2007) examinaram os efeitos vasorrelaxantes do extrato bruto e de taninos purificados obtidos da *Geum japonicum* Thunberg (Rosaceae). Os estudos foram conduzidos em aorta torácica isolada de rato, a fim de avaliar os efeitos hipotensores produzido por extratos e taninos, em ratos normotensos e hipertensos. Os autores mostraram que os extratos acetônico e butanólico usados numa concentração 30 μ g/mL, relaxaram os anéis de aorta pré-contraídos pela fenilefrina sem, contudo, afetar a tensão repouso da preparação biológica. A remoção do endotélio vascular, a inibição da óxido nítrico sintase (NOS), promovida pela N α -nitro-L-arginina (L-NA) ou a inibição da biossíntese do GMPc, feita com azul de metileno, todos aboliram o efeito vasorrelaxante do extrato da *Geum japonicum* Thunberg. A adição de L-arginina, que é substrato para biossíntese do óxido nítrico (NO), reverteu os efeitos inibitórios da L-NA. Efeito vasorrelaxante semelhante foi observado com os taninos penta-*O*-galoil- β -glicosídeo, casuarina e 5-desgaloilestaquirina. A injeção intravenosa do extrato butanólico, em ratos hipertensos e normotenso, resultou em uma redução da pressão arterial, efeito que foi

abolido pela injeção prévia de L-NA. Estes resultados sugerem que os taninos podem ser responsáveis pelos efeitos vasorrelaxante e hipotensores da *Geum japonicum*, e que tais efeitos são mediados pela produção endógena de NO com formação subsequente de GMPc. Estes dados indicam que os extratos de *Geum japonicum* podem vir a ter uso como novos agentes anti-hipertensivos.

Chiesi; Schwaller (1994) descreveram que o tanino é capaz de estimular a ATPase- Ca^{2+} -dependente do retículo sarcoplasmático (SERCA) e a atividade de bombeamento do cálcio citoplasmático livre para o retículo sarcoplasmático (RS), em miocárdio de cão. Entretanto, não houve estimulação sobre SR de músculo esquelético, pois essa preparação expressa pouco fosfolamban (PLB). As características da estimulação foram semelhantes às aquelas observadas após a fosforilação da proteína regulatória PLB feita pela quinase de proteína A (PKA). Como a capacidade de essa enzima fosforilar o PLB foi impedida pelo tanino, conclui-se que ele ao interagir com o PLB promove de forma semelhante à fosforilação, a liberação da SERCA para que ela possa bombear Ca^{2+} para o RS. A fosforilação da troponina I, que é outro substrato para a PKA, não sofre influência da inibição feita pelo tanino. Os resultados experimentais sugeriram que, em concentrações submicromolares, os taninos previnem a fosforilação do PLB, interagindo com uma porção hidrofílica e citosólica desta estrutura. Os autores concluíram que a ligação específica do tanino ao PLB impede a inibição exercida por ele sobre a SERCA do RS.

2.5.4 Efeito de saponinas

Saponinas esteróides têm atraído a atenção de muitos pesquisadores devido à sua diversidade estrutural e significativa atividade biológica. Saponinas esteroidais totais, extraídas do rizoma da *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright (DZW) constituem um tratamento eficaz para a doença cardiovascular. Hua li et al. (2010) isolaram muitos compostos da DZW e avaliaram sua atividade anti-trombótica, usando o modelo de trombose induzida por ligadura da veia cava inferior do rato e também avaliando a trombose pulmonar em modelo de camundongo. Os principais constituintes encontrados foram: parviflosida, protodeltonina, protodioscina, protogracilina, saponina zingiberensis, deltonina, dioscina e trilina. As saponinas

extraídas dos rizomas mostraram capacidade de inibir a agregação plaquetária, evitando assim a formação de trombo. Elas prologaram o tempo de tromboplastina ativado e também os tempos de trombina e de protrombina. Essas saponinas também aumentaram o tempo de sangramento e de coagulação de maneira dose-dependente.

Li et al (2010) estudaram os efeitos da saponina Asperosaponina VI (ASA VI), extraída da planta *Dipsacus asper* (Xuduan), em modelo animal de isquemia miocárdica. A isquemia foi produzida por ligadura da artéria coronária. O pré-tratamento dos animais com ASA VI protegeu o coração, diminuindo os níveis da creatinoquinase-MB, lactato desidrogenase, transaminase glutâmico-oxalacética e da troponina T séricas. Os níveis de catalase, peroxidase glutatiônica e de dismutase de superóxido foram aumentados no miocárdio, enquanto que os níveis de malonaldeído sofreram redução em ratos com isquemia miocárdica. A ASA VI também elevou as atividades das enzimas mitocondriais, entre elas as desidrogenases do ácido succínico, do isocitrato e do maleato, bem como a do α -cetoglutarato. Ainda elevou o nível intracelular de ATP, porém reduziu os de cálcio. O seu efeito cardíaco-protetor foi visto no eletrocardiograma e na histopatologia. Em estudos *in vitro*, a ASA VI mostrou ser citoprotetora contra a exposição ao peróxido de hidrogênio. Usada antes da exposição a este peróxido, a ASA VI aumentou a viabilidade celular e inibiu a formação de espécies reativas induzidas pela H_2O_2 . Também aumentou a atividade da desidrogenase do lactato no sobrenadante de cultura de células e da desmutase de superóxido, em cardiomiócitos, reduzindo os níveis de malonodialdeído. Concluíram os autores que a ASA VI pode ter um efeito cardioprotetor significativo contra danos causados pela isquemia miocárdica, sugerindo que o mecanismo de ação para isto seja a eliminação (“scavenging”) de produtos da lipoperoxidação decorrentes da ação de espécies reativa derivadas do oxigênio. Esta ação seria responsável por aumentar as enzimas de defesa à agressão oxidativa, prevenindo o dano mitocondrial.

Os efeitos da glicosídeo saponina no músculo ventricular de furão foram investigados por Noireaud et al. (1989). A saponina produziu um efeito inotrópico positivo em preparação isolada mantida em câmara para órgão. Quando a concentração de cálcio no banho foi reduzida para níveis equivalentes àqueles encontrados no meio intracelular, então a saponina foi capaz de promover a destruição do sarcolema das células cardíacas. Os efeitos foram também investigados

em fibras de Purkinje de coração de ovelhas. Na presença de concentrações de cálcio extracelular normal, usado para prevenir a agressão à membrana celular, a saponina aumentou a atividade do sódio, diminui a atividade do potássio, mas pouca alteração fez no pH intracelular. A diminuição da atividade de potássio foi comparada àquela decorrente do efeito da estrofantidina. As alterações nos níveis iônicos intracelulares foram acompanhadas pelo desenvolvimento de contratura. Os efeitos da saponina podem ser explicados por sua interação com o colesterol na membrana celular, resultando em um aumento na permeabilidade da membrana ao sódio. Os autores sugerem que este mecanismo pode ser pelo menos em parte responsável pelo aumento inespecífico da permeabilidade da membrana celular.

2.5.5 Efeito de alcalóides

Li et al (2010) estudaram o mecanismo da ação arritmogênica produzida por compostos extraídos de plantas do gênero *Aconitum*. Estes derivados são empregados desde muito tempo na China para o tratamento de doenças. No entanto, o uso inadequado dos produtos derivados dessa planta pode resultar em intoxicação grave. Aconitina (ACO), um alcalóide diterpenóide obtido de plantas do gênero *Aconitum*, contribui para os efeitos cardiotóxicos observados, sendo também conhecido que esta substância induz arritmias em modelos animais. Os autores investigaram os efeitos da aconitina sobre canais para potássio tipo Kv11.1 que são codificados pelo gene HERG (“ether-à-go-go related channel”) e sobre os Kv1.5. Os canais HERG e Kv1.5 foram expressos em ovócitos de *Xenopus laevis* e as correntes iônicas foram registradas usando a técnica de “voltage-clamp” com dois microeletrodos. Nos canais HERG, a ACO promoveu um bloqueio que evoluiu de maneira dependente de tempo e voltagem. Nos canais Kv1.5, a ACO produziu uma inibição que foi dependente da voltagem, do tempo e da frequência de estimulação. Estes fatos sugeriram que a ação da ACO sobre tais canais se deve a uma ligação preferencial desta substância com a proteína Kv.1.5, quando esta se encontra em seu estado aberto. Os autores concluem que a ACO bloqueia canais para potássio, preferencialmente os canais HERG e Kv1.5, quando estão no estado aberto. Sugerem que tais bloqueios podem contribuir para o mecanismo arritmogênico da ACO.

No átrio esquerdo isolado de cobaia, contraíndo-se isometricamente, a sanguinarina - uma benzofenantridina - um alcalóide da extraído da *Sanguinaria canadensis*, pertencente à família papaverácea, produziu um efeito inotrópico positivo e dependente de concentração. A contratilidade aumentou em 108% o que foi comparável ao efeito máximo produzido pela ouabaína. Na mesma faixa de concentração empregada para a ouabaína ($2,3 \times 10^{-6}$ - $6,5 \times 10^{-5}$ M), a sanguinarina produziu inibição da Na^+, K^+ -ATPase do miocárdio de cobaia. A completa inibição desta bomba ocorreu na concentração de 1×10^{-4} M (ERNST et al., 2002).

A ação hipotensiva da berbamina, um alcalóide isolado da *Berberis lycium*, foi investigada por Khan et al. (1969). Os estudos foram feitos em gatos anestesiados com nembutal e neles foram registradas as variações da pressão arterial e da força de contração cardíaca após a administração desse alcalóide. Preparações de músculo esquelético de rato, íleo isolado de cobaia e coração isolado e perfundido de coelho foram usadas para avaliar os efeitos locais da berbamina. Nas doses de 5 e 10 mg/kg, a berbamina produziu uma diminuição significativa da pressão arterial média e da amplitude da contração cardíaca. O efeito hipotensor foi antagonizado pelo dimetano-maleato. Estas doses não alteraram a resposta contrátil da membrana nictitante estimulada pré-ganglionarmente no tronco cervical do simpático. A resposta hipotensiva não foi modificada pela atropinização ou vagotomia bilateral. Em experimentos de circulação cruzada, a berbamina na dose de 10 mg/kg, injetada na carótida comum do gato receptor, produziu hipotensão apenas no gato doador. A berbamina reduziu a amplitude da contração do coração isolado de coelho. O perfusato coletado em preparações de músculo esquelético de rato, após administração de berbamina, contraiu o íleo isolado de cobaia. Este efeito foi antagonizado pelo dimetano-maleato. Com base nessas observações, os autores sugeriram que a berbamina produz seu efeito hipotensor por ação depressora direta no miocárdio e pela liberação de histamina tissular.

2.6 Breve revisão sobre a contratilidade cardíaca

2.6.1 Aspectos da fisiologia cardíaca

O coração é o responsável pela função do sistema cardiovascular de distribuir sangue aos tecidos, fornecendo-lhes nutrientes essenciais ao metabolismo celular e removendo-lhes os catabólitos. O músculo cardíaco funciona como uma bomba que, ao contrair-se, impulsiona o sangue através dos vasos sanguíneos (COSTANZO, 2004). Esse órgão é formado por duas bombas em série: uma delas impele o sangue através dos pulmões, permitindo as trocas de oxigênio e dióxido de carbono, e a outra, bombeia o sangue para os demais órgãos e tecidos do corpo. Cada uma é constituída por duas cavidades, sendo que o ventrículo assume a função mecânica principal. Os átrios, contudo, atuam como câmaras de compensação para estabilizar a pressão venosa pulmonar durante as variações do retorno venoso e da demanda ventricular. Para o exercício dessa função, vários mecanismos de controle, quer de natureza mecânica, quer elétrica, convergem para que o órgão atue pronta e harmonicamente (BERNE et al., 2004).

2.6.1.1 Considerações sobre o coração elétrico e mecânico

O coração é um órgão elétrico, mas também mecânico (CONDE GARCIA, 2002). No miocárdio, existem estruturas especializadas na gênese e condução da atividade elétrica. No átrio direito, situa-se o nódulo sinusal, que é um conjunto de células especializadas localizadas próximo à desembocadura da veia cava superior. Este nódulo é, no coração normal, o local onde se origina a atividade elétrica cardíaca espontânea. Por isso, é chamado de marcapasso cardíaco (CARVALHO, 1999).

As células marcapasso são encarregadas de promover a autoestimulação do órgão, a partir da geração espontânea e repetitiva de potenciais de ação que se propagam para comandar a atividade cardíaca. Tais células estão localizadas principalmente nos nódulos (sinusal e atrioventricular) e nas bordas do anel valvular, porém podem ser encontradas em qualquer ponto do tecido cardíaco (CONDE GARCIA, 2002).

Também no átrio direito, localiza-se o nódulo atrioventricular, outra estrutura muscular especializada, situada próximo ao seio coronariano, além de alguns feixes de condução intra-atriais. Outro tecido especializado em condução é o feixe de His. Este se inicia no nódulo átrio-ventricular e se estende para a

musculatura ventricular. Inicialmente é um tronco único que logo sofre divisão e termina sobre o endocárdio, formando uma extensa rede de fibras (fibras de Purkinje) responsáveis por levar a estimulação elétrica à musculatura ventricular (CARVALHO, 1999).

O miocárdio é um tecido muscular que, além de sua capacidade inotrópica, especializou-se também em conduzir ondas elétricas de modo rápido e sustentado, propagando o estímulo gerado pelas células marcapasso para todo o órgão. Este evento elétrico precede e dispara a atividade mecânica do coração. O principal gerador primário de impulsos elétricos é o nódulo sinusal. Em virtude da conexão direta das fibras sinusais com as atriais, os potenciais de ação daquela estrutura são facilmente propagados para a parede atrial (CONDE GARCIA, 2002).

No coração existem dois sincícios musculares distintos. Um deles corresponde ao músculo cardíaco que forma a parede dos átrios e o outro corresponde ao músculo cardíaco que forma a parede dos ventrículos (GUYTON; HALL, 2002). O sincício muscular cardíaco não é verdadeiro, pois, conceitualmente, sincício é o resultado da fusão de muitas células, formando uma só estrutura multinucleada (BERNE; LEVY, 2001). O músculo cardíaco, ao contrário, é formado por células individualizadas que estão, de fato, separadas umas das outras por membranas celulares chamadas de juncionais ou discos intercalares, tais como descritos por Rothschild (1950) como “barreiras elétricas transversas”. Entretanto, o músculo cardíaco funciona como se um sincício fora, porque, quando um estímulo é aplicado a qualquer parte desse músculo, o resultado é uma onda de excitação que se propaga por todo o tecido miocárdico (BERNE; LEVY, 2001; CONDE-GARCIA, 2002).

No tecido cardíaco, a velocidade de propagação dos impulsos elétricos é de 60 e 80 cm/s. O anel valvular, região onde se encontram ancoradas as válvulas do coração, é constituído por tecido elétrico não excitável. Deste modo, a única via normal para que o impulso elétrico despolarizante alcance os ventrículos está localizada no nódulo atrioventricular. No interior desta estrutura, a onda elétrica se propaga a uma velocidade relativamente baixa (1 a 10 cm/s). Daí por diante, ela segue através do feixe de His e dos seus ramos, alcançando as fibras de Purkinje. Estas últimas, apesar de musculares, tornaram-se especializadas em conduzir potenciais de ação com grande velocidade e presteza (2 a 4 m/s). Suas células

apresentam poucas miofibrilas e têm elevado grau de acoplamento entre si (WEIDMANN, 1966; CONDE-GARCIA, 2002).

O potencial de repouso se deve à ação de vários fatores conhecidos, entre eles o mais importante é a alta permeabilidade da membrana ao K^+ em relação as que se observam para os íons Na^+ e Ca^{+2} . As células, em repouso, possuem um potencial que se situa, normalmente, entre -80mV a -95mV, enquanto que nas fibras especializadas na condução do impulso, essa diferença de potencial se situa entre -90 mV e -100 mV (GUYTON, 2002; CONDE-GARCIA, 2002; BERNE; LEVY, 2001; AIRES, 1999; PAES DE CARVALHO, 1976).

2.6.2 Organização das células miocárdicas

As “barreiras elétricas transversas” descritas por Engelmann (1877) e por Rothschild (1950), que separam as células cardíacas, ficaram conhecidas também, como discos intercalares. Ao microscópio eletrônico essas estruturas se apresentam como mostrado na Fig. 2. Nela se podem ver regiões especializadas constituindo o que foi chamado de *fascia adherens*, desmossomos (*macula densa* ou *macula adherens*), *nexus* e regiões não-diferenciadas. As regiões da *fascia* e da *macula adherens* são eletrodensas e apresentam, com nitidez, um espaço extracelular entre as membranas apostas (McNUTT; FAWCETT, 1974; FAWCETT; McNUTT, 1969). Os *nexi*, no entanto, são segmentos curtos, também densos, mas neles não se distingue uma separação entre as membranas juncionais, dando a impressão de tratar-se de uma única membrana. Os *nexi*, também chamados de junções “gap”, são o sítio de baixa impedância entre as células dos tecidos excitáveis (CONDE-GARCIA, 2002).

A estrutura das junções “gap” é formada por conexons, que são arranjos protéicos hexagonais. A reunião de dois conexons, ligados de forma término-terminal, permite à formação de um canal de comunicação intercelular, conectando o citosol de células adjacentes. Esses canais atuam como via de baixa resistência elétrica, permitindo que correntes iônicas possam fluir entre células adjacentes (CONDE-GARCIA, 2002; BERNE et al, 2004).

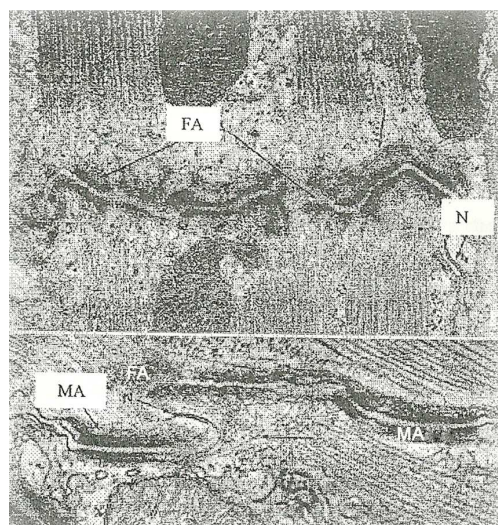


Figura 2 – Micrografia eletrônica dos discos intercalares mostrando regiões correspondentes a *fascia aderens* (FA), *macula aderens* (MA) e *nexus* (N) (McNutt, N.S. & Fawcett, D.W., in Langer & Brady, 1974, p.33).

2.6.2.1 Estruturas contráteis

O músculo cardíaco é estriado. Isso significa que ele possui um padrão morfológico bem diferenciado, onde as miofibrilas estão distribuídas ordenadamente (CONDE-GARCIA, 2002). A presença de estrias transversais no músculo cardíaco cria um padrão de bandas. O tecido miocárdico é formado por células alongadas e ramificadas que se unem por meio dos discos intercalares. Os componentes das células musculares recebem nomes especiais. A membrana plasmática é chamada de sarcolema; o citoplasma, de sarcoplasma; e o retículo endoplasmático liso, de retículo sarcoplasmático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A unidade contrátil básica do músculo é o sarcômero e este se encontra formando uma unidade que se repete ao longo de toda a célula muscular cardíaca (SILVERTHORN, 2003).

O sarcômero é demarcado na microscopia eletrônica por linhas escuras chamadas de linhas Z. O comprimento médio de um sarcômero é 2 μm . Em cada lado da linha Z existe uma linha clara, que contém filamentos finos, compostos primariamente da proteína actina chamada Banda I e é uma região isotrópica, que não desvia a luz polarizada, por isso nomeada de Banda I (Fig. 3). A área entre duas

bandas I, dentro do sarcômero, e que contém filamentos grossos compostos principalmente de miosina, é a Banda A. A faixa escura é anisotrópica, desviando a luz polarizada, daí sua aparência escura, quando vista ao microscópio de polarização.



Figura 3 - A organização ultra-estrutural do músculo cardíaco. Esta micrografia eletrônica em corte longitudinal mostra o complexo padrão de bandas produzido pela sobreposição dos dois conjuntos de filamentos. Sarcômero atrial de gato mostrando suas bandas A e I, e os discos ou linhas Z e M (43.000X, Reproduzido de LANGER, 1974, p. 11).

O filamento fino da actina se estende da linha Z para o centro do sarcômero, sobrepondo-se a uma porção dos filamentos grossos. A área escura, nos extremos da Banda A, representa a região de sobreposição entre os filamentos grossos e finos. Uma área clara presente no centro do sarcômero é chamada de Banda H. Esta representa a porção de Banda A que contém filamentos grossos de miosina, mas não os filamentos de actina. Uma linha escura, chamada de linha M, é evidente no centro do sarcômero e inclui proteínas que parecem ser críticas para a organização e alinhamento dos filamentos grossos no sarcômero (VASSALO, 1999; BERNE et al., 2004).

As principais proteínas contráteis estão representadas esquematicamente na Fig. 4 e são a actina (42 kD), a tropomiosina (68 kD), as troponinas (80 a 90 kD) e a miosina (480 kD). As três primeiras formam os filamentos finos e a última, os filamentos grossos (VOET et al., 2000).

A actina pode ser isolada sob duas formas: G (globular) ou F (filamentosa). A actina G é uma proteína que se polimeriza para formar a actina F, que tem estrutura filamentar e se apresenta em forma de dupla hélice. A tropomiosina é uma molécula longa com cerca de 40 nm de comprimento, contendo duas cadeia

polipeptídicas, que se dobram em forma de hélice. Ela se dispõe ao lado das cadeias de actina F. Na fibra não contraída, a tropomiosina (Tm) está posicionada de modo a bloquear os sítios de interação entre os filamentos de actina e as cabeças da miosina (CARVALHO et al., 1999).

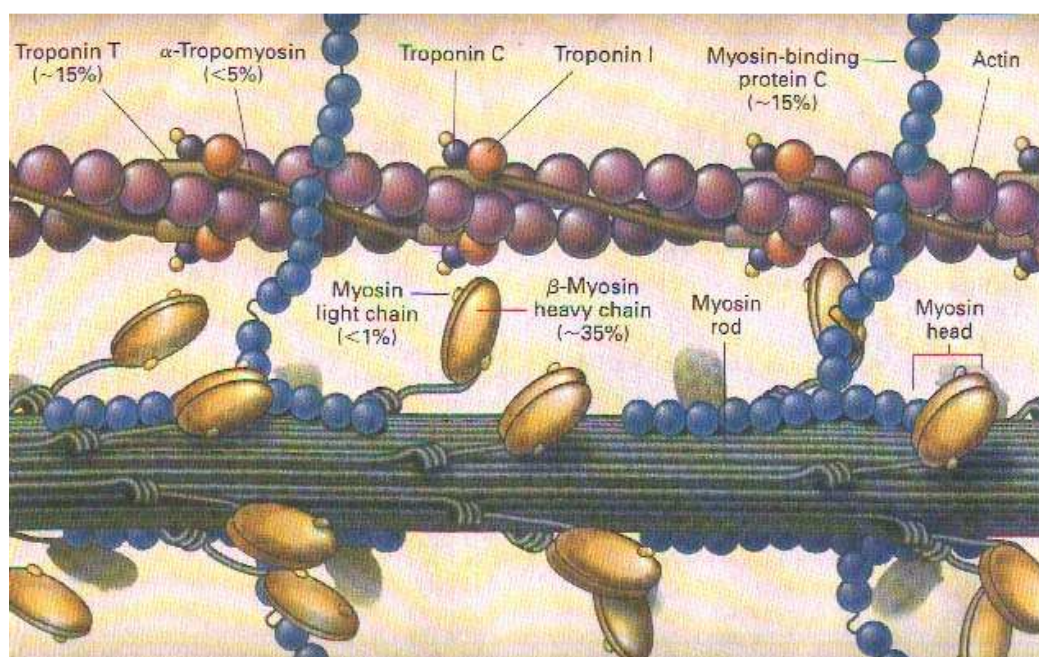


Figura 4 – Componentes do sarcômero. Os sarcômeros consistem de arranjos altamente organizados de dois tipos de filamentos – filamentos de actina e miosina (reproduzido de SEIDMAN;SEIDMAN, 1995).

A tropomiosina e o complexo das troponinas são essenciais para a regulação da ativação dos miofilamentos contráteis. As troponinas (Tn) são proteínas heterotriméricas produzidas por três genes distintos: 1) troponina cardíaca C (cTn-C), que é o sítio de ligação para o Ca^{+2} ; 2) troponina cardíaca I (cTn-I), que cobre o sítio que permite a interação da actina com a miosina e 3) troponina cardíaca T (cTn-T), que é uma proteína que se liga fortemente à tropomiosina (JUNQUEIRA;CARNEIRO, 1999; DE TOMBE, 2003).

Os filamentos grossos são formados pela associação de moléculas de miosina. Esta é uma proteína com peso molecular de 450 kDa, composta por duas cadeias entrelaçadas que terminam numa região globular. A hidrólise enzimática da miosina pela tripsina a divide em duas partes: uma leve, formada por sua cauda (meromiosina leve, PM=140 kDa) e outra mais pesada (meromiosina pesada,

PM=340 kDa), que contém a região globular. Com o prosseguimento da hidrólise, a meromiosina pesada é partida em duas subunidades, S1 e S2, com peso molecular de 120 e 60 kDa, respectivamente. A região S1 corresponde à região globular propriamente dita, possuindo atividade ATPásica. Essa subunidade é formada por um par de estruturas globulares, cada uma contendo uma cadeia polipeptídica pesada e duas cadeias polipeptídicas leves. A cadeia pesada constitui o corpo da enzima ATPase miosínica, posto que a sua remoção leva à perda da atividade de hidrólise do ATP. Também uma destas cadeias leves é fosforilável, o que pode alterar a velocidade de hidrólise do ATP. A associação das moléculas de miosina forma o filamento grosso, estando as cabeças sempre voltadas para a linha Z. Projetam-se para fora do tronco do filamento, assemelhando-se a cabeça de uma fecha e correspondem às projeções dos filamentos grossos em direção aos filamentos finos (VASSALLO; STEEMON, 1999).

As regiões da “cabeça” das moléculas de miosinas, projetadas lateralmente a partir do filamento, são chamadas de pontes cruzadas e contêm o sítio de ligação da actina com o ATP (BERNE et al., 2000). Associada aos filamentos de miosina encontra-se a titina, uma grande proteína (2500 kDa) que parece estar envolvida com a manutenção do padrão das estriações do músculo (LINKE; FERNANDEZ, 2002; GRANZIER; LABEIT, 2002).

A relação entre as propriedades biomecânicas do sarcômero e o comportamento mecânico do coração é complexa. Ela é determinada não só pela orientação e densidade dos constituintes das fibras musculares (parâmetros espaciais), mas também pelo ritmo de ativação e relaxamento das fibras cardíacas (parâmetros temporais) (DE TOMBE, 2003).

A geração de força muscular é função do número de pontes cruzadas que podem interagir com os filamentos delgados. Um estado de alta energia livre ocorre depois da hidrólise do ATP e da ligação dos seus subprodutos com a miosina, a fim de formar o complexo miosina-ADP-Pi que apresenta elevada afinidade pelo sítio de interação com a actina. Se nessa situação tal sítio estiver liberado, ocorrerá uma ligação rápida da cabeça da miosina com a actina, formando, inicialmente, um ângulo de 90 graus. Quando o ADP e Pi se desligam do complexo inicial, a energia livre da miosina alcança seu nível mais baixo, o que produz uma mudança conformacional na sua ligação com o filamento fino, fazendo com que o ângulo de

interação seja reduzido para 45 graus. Essas mudanças produzem uma força no filamento delgado e movimentação em direção ao centro do sarcômero. A fosforilação da troponina I e a ligação de uma molécula de ATP à cabeça de miosina fazem com que a afinidade da miosina pela actina seja reduzida e, por isso, permite que as pontes cruzadas se desconectem dos filamentos delgados. Isto leva a um novo ciclo de geração de força ou então cria as condições para que se instale o processo de relaxamento (BERNE et al., 2004).

As células miocárdicas apresentam um complexo sistema de tubulações transversas - os túbulos T (TT) - que são invaginações do sarcolema à altura de cada disco Z. Os TT fazem com que o meio intersticial fique mais próximo dos filamentos. Ao longo das células miocárdicas, existe uma extensa rede de tubos denominados de retículo sarcoplasmático (RS). Ela recobre completamente cada sarcômero e sua fisiologia está intimamente relacionada com os eventos que se passam nos TT. Devido à disposição morfológica dos TT, os seus canais para cálcio ficam próximos dos canais liberadores de Ca^{+2} existentes na membrana das cisternas dos RS. Estes canais, por serem bloqueados pela rianodina, são chamados de receptores de rianodina (RyR) (OGAWA, 1994).

Por alguns anos, pensou-se que o sistema de TTs fosse uma simples invaginação da superfície da membrana de miócitos ventriculares cardíacos, que permitia a propagação do potencial de ação para o interior das células. Entretanto, publicações recentes mostraram que algumas das proteínas envolvidas no processo acoplamento excitação-contração estão localizadas predominantemente nos TTs, sugerindo que eles têm função especializada e importante no manejo do cálcio e no processo acoplamento excitação-contração (BRETTE; ORCHARD, 2007).

Tanto no sarcolema, quanto nos túbulos TT, existem canais iônicos, proteínas receptoras, trocadores iônicos e outras estruturas especializadas. Canais para Na^{+} , canais para K^{+} e bombas de $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ são mais abundantes no sarcolema do que nos túbulos TT do músculo esquelético. Por outro lado, a densidade de canais para cálcio operados por voltagem (como os canais da diidropiridina – DHPRs, também chamados de canais do tipo-L para cálcio) é quatro vezes maior nos túbulos TT do que no sarcolema (ALMERS et al., 1981). A distribuição de canais para cálcio ao longo da membrana plasmática, não é uniforme. Bers (2002) ao estudar a membrana de células miocárdicas de coelho, observou que nela existia uma alta

concentração de receptores das DHPRs nos túbulos TT, quando comparada à concentração existente no sarcolema.

O conjunto formado pelo TT com as cisternas dos RS que se dispõem à sua volta, é conhecido como tríade. Ao conjunto formado pelo TT com uma das cisternas do RS, denomina-se de díade. As díades são consideradas unidades funcionais para o processo excitação-contração do músculo cardíaco (SUN et al., 1995).

A junção diádica é representada pela membrana sarcolemal do TT, pela fenda diádica e pela cisterna do RS. Nesta estrutura, estão os “couplons” formados por 10 a 25 receptores de diidropiridinas (DHPR) situados no sarcolema e que estão posicionados em frente a 100 RyR, estes localizados na membrana do RS (GATHERCOLE et al., 2000). Esta proporção cria uma margem de segurança para garantir que cada “couplon” desenvolva a liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares, quando for solicitado pela despolarização da membrana celular (FRANZINI-ARMSTRONG et al., 1999).

As células atriais não possuem TT e o RS exhibe dois tipos de membrana: a juncional, localizada na periferia da célula, próxima à superfície da membrana e a não-juncional, localizada mais internamente em relação ao centro da célula. Os RyRs estão ancorados em ambos os tipos de membrana e participam, efetivamente, no processo de acoplamento excitação-contração (BLATTER et al., 2003; TANAKA et al., 2003).

O retículo sarcoplasmático (RS) é uma organela fundamental no processo de acoplamento excitação-contração de todas as células musculares, embora seja mais abundante em células musculares esqueléticas do que em cardiomiócitos. Isto demonstra que ele exerce maior contribuição para ativar a contração na célula muscular estriada esquelética. O RS armazena Ca^{2+} que é captado do mioplasma por meio de uma poderosa bomba de Ca^{2+} e, durante o processo da contração muscular, libera Ca^{2+} estocado para esse meio. O local da liberação de íons Ca^{2+} é a cisterna terminal do RS. Nesta região, encontram-se proteínas que estão ancoradas na membrana e que são comumente conhecida como receptores da rianodina (RyR), devido a sua alta afinidade para se ligar a este alcalóide de origem vegetal. A rianodina bloqueia esses canais (SAITO et al., 1988; WAGENKNECHT et al., 1989).

A unidade funcional da membrana relacionada à contração chama-se “couplon”. Este está localizado nas díades e é formado por 10 a 25 canais do tipo-L para cálcio presentes na membrana dos túbulos T (DHPRs) e 100 canais liberadores de Ca^{2+} (RyR) localizados na membrana das cisternas do RS (BERS, 2002). Já Wibo et al. (1991) sugerem uma estequiometria na qual um RyR se acopla com dois DHPRs, em células musculares esqueléticas, e quatro RyR se acoplam com dez DHPRs, em miócitos ventriculares de mamíferos.

A membrana do RS possui uma potente bomba de Ca^{2+} que é responsável pela remoção dos íons Ca^{2+} do mioplasma para dentro do retículo. No interior do RS, pode se encontrar uma proteína que apresenta alta capacidade e baixa afinidade para se ligar aos íons Ca^{2+} . Ela é conhecida como calsequestrina e uma das suas funções é minimizar a energia necessária para o bombeamento dos íons cálcio para o interior do RS (BERS, 1985; BERS, 2001). A localização das proteínas de membrana do RS foi estudada por Scriven et al. (2000).

As mitocôndrias respondem à elevação do Ca^{+2} intracelular e contribuem para a regulação espacial e temporal dos níveis citoplasmáticos deste íon, sobretudo durante os picos dos transientes de cálcio intracelular livre. Por conseguinte, a mitocôndria está também envolvida na recaptção e na liberação do cálcio intracelular, contribuindo assim para a recarga de Ca^{+2} existente no RS. A homeostase mitocondrial de Ca^{+2} é complexa e regulada por numerosos canais para Ca^{+2} , bombas e trocadores. Notavelmente, o papel da mitocôndria na homeostase do Ca^{+2} é influenciado fundamentalmente pela organização estrutural desta organela (GRALER; FRIEDEN; MELIL, 2007).

Além de gerar energia para a contração muscular, as mitocôndrias possuem um papel direto, ainda que pequeno, no acoplamento-excitação da célula miocárdica. A mitocôndria possui um sistema uniporte de íons Ca^{2+} que serve para capturar o íon para o interior da organela, contribuindo, assim, para reduzir sua concentração citoplasmática e, por isso, para o relaxamento da célula muscular cardíaca. Esta contribuição, contudo, é de 1 a 3% do total de íons Ca^{2+} que são recaptados durante o relaxamento muscular (BERS, 2002).

2.6.3 O acoplamento excitação-contração no coração

Acoplamento excitação-contração é o processo que ocorre desde a despolarização da membrana excitável até a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS) e a contração da célula muscular (BRANDÃO, 2007). Para isso, há a necessidade de que haja um influxo de íons cálcio proveniente do meio extracelular (HOBAN; LEVI, 1999). O cálcio penetra nas células através de dois tipos de canais chamados de canais tipo L e tipo T para cálcio, ambos operados por voltagem (VOCs – “voltage-operated channels”) (PAOLI et al., 2002).

A Fig. 5 mostra esquematicamente o acoplamento excitação-contração no músculo estriado cardíaco. O Ca^{2+} é essencial para atividade elétrica cardíaca juntamente com outros íons. Ele é o ativador direto dos miofilamentos, induzindo a contração e permitindo que o sangue seja propelido para as grandes artérias. Durante o potencial de ação cardíaco, o Ca^{2+} proveniente do meio extracelular alcança o meio intracelular principalmente através dos canais do tipo-L para cálcio, contribuindo para a formação do platô do potencial de ação. Além disso, existe uma contribuição de menor significância do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que, agindo no sentido reverso, ajuda a elevar os níveis intracelulares de cálcio (BRANDÃO, 2007).

O aumento do Ca^{2+} intracelular estimula a abertura de canais liberadores de Ca^{2+} (canais-receptores da rianodina) existentes na membrana do RS, um processo denominado de liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR, “calcium-induced calcium release”) (FABIATO, 1983). A entrada de Ca^{2+} na célula muscular, juntamente com o Ca^{2+} que é liberado do RS, eleva a concentração intracelular deste íon e, como consequência, proporciona sua ligação com a troponina C, iniciando o processo de geração de força contrátil. É notável o fato de que é necessário que apenas uma pequena fração dos canais cálcio tipo-L do sarcolema e dos receptores de rianodina existentes na membrana do RS sejam ativados para que a contração muscular possa ocorrer (BERS, 2002). O Ca^{2+} é um agente inotrópico positivo. Assim, uma diminuição da concentração extracelular deste íon reduz a força de contração miocárdica o que reduz o débito cardíaco (BERS, 2006).

Três diferentes genes (ryr1, ryr2 e ryr3) expressam diferentes isoformas de RyR, estando presente no coração a isoforma do tipo 2 (RyR2) (OGAWA, 1994). O RyR1 é o principal canal liberador de cálcio do RS no músculo estriado (SAMSÓ,

1998), seguido do canal para cálcio ativado pelo IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) (OGAWA, 1994).

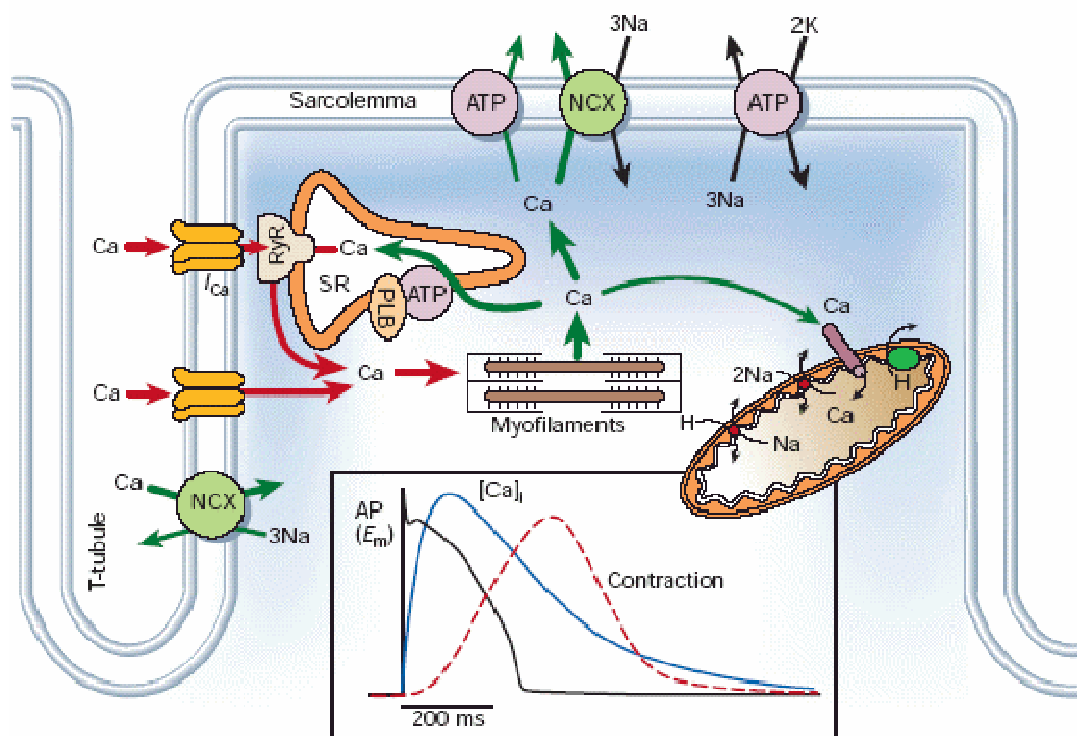


Figura 5 - Mecanismos celulares da contração muscular mostrando o fenômeno da liberação de Ca^{2+} induzido por Ca^{2+} (CICR). No inserto, estão curvas relativas ao potencial de ação (AP), a variação da $[Ca^{2+}]_i$ durante a contração, bem como a força de contração muscular (contraction); NCX: trocador sódio/cálcio; PLB: fosfolamban; Cyt: citocromos; RyR: receptores de rianodina (Reproduzido de BERS, 2006).

Uma característica importante do mecanismo de CICR é a sua capacidade para amplificar a informação recebida, pois uma pequena entrada de cálcio na célula leva a uma grande elevação do Ca^{+2} citosólico. A elevação do Ca^{+2} no citoplasma contribui para que, num mecanismo de “feedback” positivo, ocorra uma maior ativação dos RyRs, elevando, assim, rapidamente a concentração de cálcio intracelular livre (NIGGLI, 1999).

A liberação de Ca^{+2} do RS no músculo cardíaco que pode ser detectada por técnicas de fluorescência, é chamada de sparks de cálcio (NIGGLI, 1999; GUATIMOSIM et al., 2002; BERS, 2002). O cálcio “spark” (Fig. 6) foi inicialmente observado com auxílio da microscopia confocal dotada de varredura a laser e com o uso de indicadores fluorescentes sensíveis ao Ca^{+2} . Com esta técnica, foi possível

mapear alguns eventos fundamentais do processo de liberação do cálcio estocado do RS (NIGGLI, 1999). O “spark” de Ca^{+2} é caracterizado por uma duração muito curta (20 a 50 ms) e apresenta uma distribuição espacial limitada (1,5 a 2 μm). Durante este evento, a concentração local de Ca^{+2} aumenta muito rapidamente e, em cerca de 10 ms, alcança uma concentração de pico de 200 nM. O cálcio “spark” desaparece mais lentamente, pois em 20 ms, o sinal óptico decai para 50% do seu valor máximo (GUATIMOSIM et al., 2002).

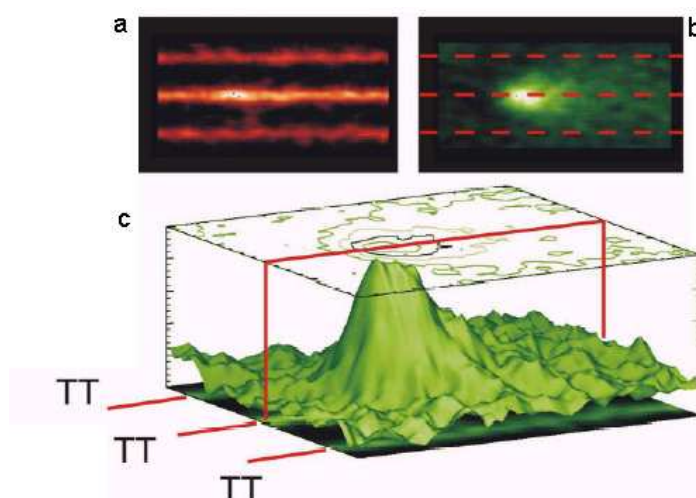


Figura 6 – Cálcio “spark”. As imagens foram obtidas por microscopia confocal de varredura. Os painéis **a** e **b** mostram a relação espacial entre túbulos T (TT) revelados com sulfrodamina B e cálcio “spark” revelado com fluo-3. O painel **c** mostra a superfície de “plot” do Ca^{+2} “spark” na relação com o TT (Reproduzido de GUATIMOSIM et al., 2002).

O processo de acoplamento excitação-contração apresenta-se de forma diferente nas células atriais e ventriculares. As células ventriculares evocam o processo de CICR no retículo sarcoplasmático através da entrada de Ca^{+2} por canais para Ca^{+2} do tipo L localizados nas invaginações do sarcolema. Tais estruturas, garantem uma proximidade entre os canais para Ca^{+2} do tipo-L e os canais de liberação de Ca^{+2} do RS (RyR), permitindo haver uma liberação mais uniforme de cálcio (Fig. 7) (BLATTER et al., 2003).

Nos miócitos atriais, o mecanismo de acoplamento excitação-contração e a regulação da concentração intracelular de Ca^{+2} parecem ser eventos mais complexos. Estudos ultra-estruturais de Mcnut; Fawcett (1969) *apud* Blatter et al., (2003),

Tanaka et al. (2003), têm mostrado a ausência de túbulos TT nas células atriais. Além disto, dois tipos de membrana do retículo sarcoplasmático foram identificados: um deles situado periféricamente, isto é, voltado para o sarcolema (membrana juncional – jRS) e que está em íntima associação com a membrana plasmática e outro localizado mais para o centro da célula, este chamado de membrana não juncional do RS (njRS). Os RyRs estão ancorados nos dois tipos de membrana do retículo sarcoplasmático e, provavelmente, participam do acoplamento excitação-contracção. Devido ao padrão ultra-estrutural do retículo sarcoplasmático atrial, a elevação da concentração intracelular do Ca^{+2} durante o acoplamento não é uniforme, mas aumenta progressivamente a partir da região submembranar, em direção ao centro do miócito (Fig. 8) (GONDIM, 2005). Com o auxílio da microscopia confocal, foi possível registrar um transiente de Ca^{+2} intracelular em forma de U, indicado que primeiramente há um aumento de Ca^{+2} na periferia da célula antes de que ele se propague para o citosol.

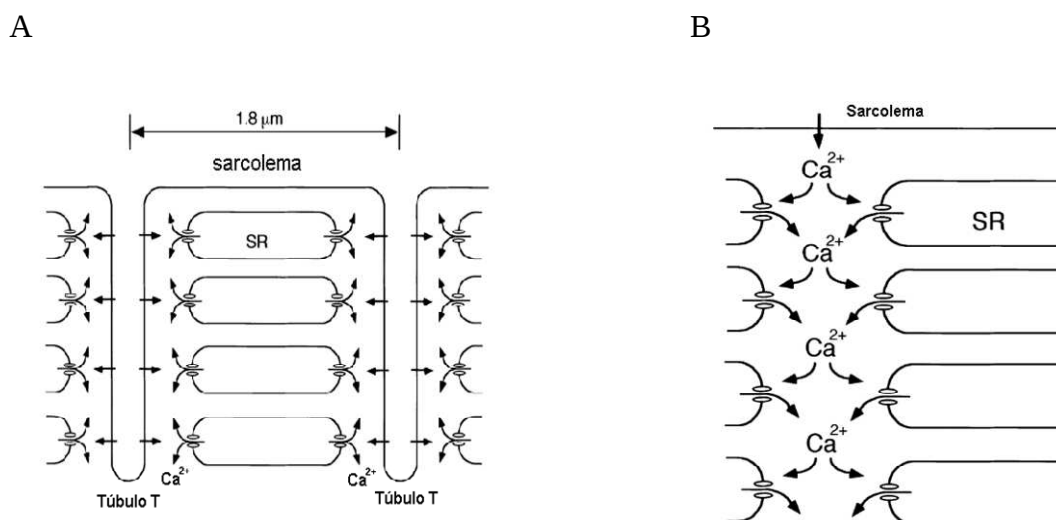


Figura 7 – Representação esquemática da organização ultra-estrutural do miócito ventricular (A) e atrial (B). No miócito ventricular, o influxo de Ca^{+2} sarcolemal dispara a liberação de Ca^{+2} a partir de canais de Ca^{+2} na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) resultando em um aumento simultâneo do Ca^{+2} no citoplasma. No miócito atrial (B), o influxo de Ca^{+2} sarcolemal dispara a liberação de Ca^{+2} do RS subsarcolemal e uma onda de liberação de Ca^{+2} induzida por Ca^{+2} propaga-se para o interior da célula (Reproduzido de TANAKA et al., 2003).

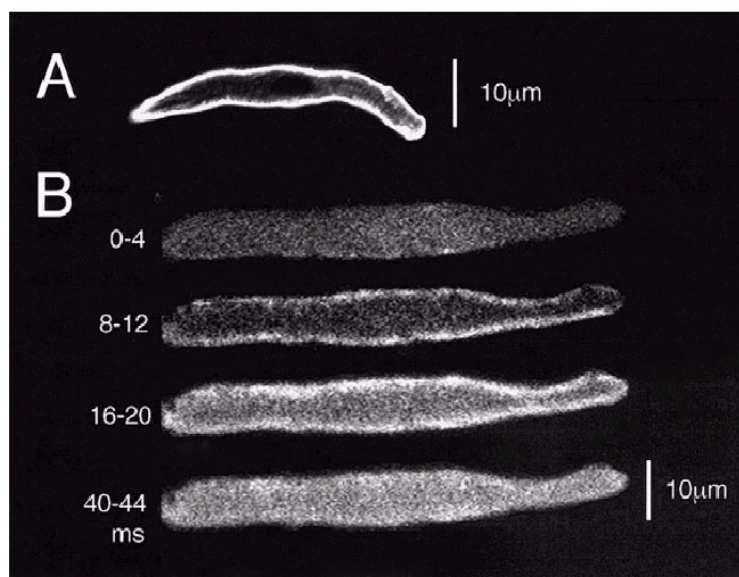


Figura 8 – Acoplamento excitação-contração do miócito atrial. Em **A**, pode-se observar fluorescência (sonda di-2-ANEPEQ) apenas na região subsarcolemal confirmando a ausência de túbulos T no interior da célula. Em **B**, pode se observar que o Ca^{+2} começa a aumentar na periferia da célula e depois se espalha para o seu interior (Reproduzido de TANAKA et al., 2003).

2.6.4 O relaxamento da célula miocárdica

O relaxamento muscular é o processo pelo qual os músculos retornam, após uma contração, à sua condição inicial. Do ponto de vista fisiológico, o relaxamento rápido e completo é um pré-requisito para a adaptação cardíaca a mudanças nas condições de carga, estimulação inotrópica ou alteração na frequência (CHEMLA et al., 2000).

Para que o relaxamento da fibra muscular ocorra, é necessário que a concentração intracelular de cálcio diminua para os valores de repouso. O processo de relaxamento é iniciado pela dissociação do cálcio dos miofilamentos e pela diminuição de sua concentração no citosol. São cinco os principais mecanismos de remoção do cálcio do citosol: 1) ativação da SERCA na membrana do RS, o que promove a recaptação do cálcio para o lúmen do retículo; 2) ativação da Ca^{2+} -ATPase do sarcolema, o que permite a transferência do íon para o meio extracelular;

3) o NCX presente na membrana celular, que, utilizando a energia proveniente do gradiente eletroquímico do íon sódio, a cada ciclo de transporte move 3 íons sódio para o meio intracelular e 1 íon cálcio no sentido inverso. Tal mecanismo pode operar também em sentido reverso. Este sistema contribui, assim, tanto para a elevação, quanto para a diminuição da concentração do Ca^{2+} livre intracelular, modulando a intensidade da contração ou a velocidade do relaxamento; 4) inativação dos canais para Ca^{2+} do tipo L, que ocorre com a repolarização celular, impedindo o influxo deste íon para o sarcoplasma; 5) sistema uniporte mitocondrial que remove o cálcio do sarcoplasma, sequestrando-o no interior das mitocôndrias, porém a contribuição deste sistema para o relaxamento é, no entanto, pequena (BRANDÃO, 2007; MAACK; O'ROURKE, 2007) (Fig. 5).

A SERCA está presente na membrana do RS, sendo responsável pela remoção da maior fração do cálcio citoplasmático para o lúmen do retículo (BERS, 2002). Sua ativação é regulada pelo PLB, o qual, em estado desfosforilado, inibe a SERCA. Assim, a fosforilação do PLB acelera a captação de cálcio pelo RS (ORCHARD; BRETTE, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Descrever os efeitos produzidos pelo extrato de maior potência obtido das folhas de *Costus spiralis* sobre a contratilidade do átrio esquerdo de cobaia, bem como elucidar o seu mecanismo de ação neste tecido e também avaliar, em cardiomiócitos de camundongo, o seu efeito sobre o transiente intracelular de cálcio e sobre a corrente sarcolemal de cálcio do tipo-L.

3.2 Específicos

- Obter o extrato bruto hidroalcoólico e as frações de *Costus spiralis*;
- Obter curvas concentração-efeito dos extratos obtidos das folhas de *Costus spiralis* para determinar qual deles apresenta efeito inotrópico mais potente sobre o átrio esquerdo de cobaia;
- Caracterizar, do ponto de vista fitoquímico, a composição do extrato de maior potência de *Costus spiralis*;
- Avaliar o efeito do extrato de maior potência de *Costus spiralis* sobre os parâmetros contráteis do átrio esquerdo de cobaia;
- Investigar o possível envolvimento de receptores muscarínicos no mecanismo de ação do extrato de maior potência de *Costus spiralis*;
- Avaliar no miocárdio atrial de cobaia a participação de canais de K^+ no efeito inotrópico do extrato de maior potência de *Costus spiralis*;
- Avaliar no tecido atrial de cobaia, a participação de canais de cálcio no efeito inotrópico do extrato de maior potência de *Costus spiralis*;
- Investigar se o extrato de maior potência interfere na homeostase do cálcio intracelular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta, identificação e tratamento do material botânico

Neste trabalho, foram utilizadas folhas de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe coletadas na Farmácia Viva (Parque da Sementeira, 10°56'42.14''S, 37°03'09.17''O, Aracaju/SE), durante o inverno (julho/2007). A identificação do material botânico foi feita pela Dra Maria Olivia de Oliveira Cano, do Herbário IPA “Dárdano de Andrade Lima”, em Recife/PE, onde se encontra depositada uma exsicata, que recebeu o número 70.285 (ANEXO A). Logo após o processo de coleta, as folhas foram separadas, lavadas rapidamente com água destilada e então desidratadas em estufa com circulação de ar quente, a uma temperatura de $48 \pm 2^\circ\text{C}$, durante oito dias. O processo de secagem lenta visou a preservação dos metabólitos secundários contidos nas folhas. Depois de secas, foram trituradas e o pó resultante foi então conservado em “freezer” a -21°C (FRICON – VCV -1C PVR, Brasil).

4.2 Obtenção de extratos e frações das folhas de *Costus spiralis*

4.2.1 Extrato bruto hidroalcoólico

O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) foi obtido colocando sachês, contendo folhas secas trituradas, imersos em solução de água:etanol (6:4, v/v) e macerado com extração contínua durante 15 dias à temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$). Em seguida, a solução extrativa foi filtrada. Inicialmente, em algodão e depois, em papel de filtro. Os solventes foram evaporados, usando-se equipamento rotativo (TE- 210, TECNAL, Brasil) e o resíduo foi levado à estufa seca ($50 \pm 2^\circ\text{C}$) para completar a evaporação. Uma vez obtido, o EBH seco, este foi conservado em “freezer” a -21°C .

4.2.2 Frações obtidas por partição líquido-líquido

Para obtenção das frações do EBH este foi submetido a um fracionamento pela técnica de partição com solventes orgânicos usados de acordo com a polaridade crescente (partição líquido-líquido) (SIMÕES et al., 2000). Foram empregados os

seguintes solventes: clorofórmio, acetato de etila e água, tendo sido obtidas as respectivas frações. Em seguida, cada fração foi concentrada em evaporador rotativo (TE-210, TECNAL, Brasil) e levada à estufa ($50 \pm 2^\circ\text{C}$) para a completa secagem. Uma vez secos, os respectivos rendimentos foram calculados e as frações foram estocadas a -21°C .

4.3 Substâncias e sais

- ✓ Clorofórmio P.A, acetato de etila P.A, etanol P.A e álcool etílico (VETEC Química Fina, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ✓ Cloreto de potássio (KCl), glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o cloreto de cálcio (CaCl_2), adquiridos da MERCK S.A (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), cloreto de magnésio (MgCl_2) e fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), adquiridos da VETEC Química Fina (Brasil) e cloreto de sódio (NaCl), adquirido da QUIMIS (São Paulo, SP, Brasil);
- ✓ Cloreto de tetraetilamônio (TEA), sulfato de atropina, reserpina (metil-reserpato 3,4,5, trimetoxibenzóico ácido éster), (-) BAY K8644 (1,4-diidro-2-6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-piridina ácido carboxílico metil éster), bitartarato de isoproterenol, EGTA (etileno glicol bis- β -aminometilester-N,N,N',N'-ácido tetraacético), HEPES (N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico]), cloreto de cézio (CsCl), cloreto de bário (BaCl_2), hidróxido de cézio (CsOH), collagenase tipo II, protease tipo XIV, ácido láctico, ácido pirúvico, DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium" com 25 mM de HEPES, L-glutamina, 4500 mg de glicose, sem bicarbonato de sódio, Catalogo SIGMA No. D1152), dextrose, EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), albumina bovina e DMSO (dimetilsulfóxido), foram obtidos da SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, EUA), enquanto que a heparina foi adquirida da ROCHE (Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ✓ Fluo-4 AM foi adquirido da MOLECULAR PROBES (Eugene, OR, USA).

4.4 Água e soluções

4.4.1 Água

Água ultrapura foi obtida com o sistema Milli-Q[®] Academic A10 (Quantum EX Ultrapure Organex, Q-Gard 1, Millipore S.A.S., Molsheim, França)

4.4.2 Soluções de Tyrode

Tabela 2- Solução de Tyrode modificada por Dorigo et al. (1990) (TyD)

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	120,00
KCl	2,70
MgCl ₂	0,90
NaHCO ₃	11,90
CaCl ₂	1,37
Glicose	5,50
NaH ₂ PO ₄	0,40

Tabela 3- Solução de Tyrode segundo Conde-Garcia (não publicada)

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	120,00
KCl	2,70
MgCl ₂	0,90
NaHCO ₃	11,90
CaCl ₂	0,5
Glicose	5,50
NaH ₂ PO ₄	0,40

4.4.3 Soluções para a dissociação enzimática do miocárdio

4.4.3.1 Solução tamponada

Tabela 4- Solução tamponada ‘Digest buffer’ (DB)

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	130,00
KCl	5,40
Ácido pirúvico	3,00
HEPES	25,00
MgCl ₂	0,50
Dextrose	22,00
NaH ₂ PO ₄	0,33
O pH 7,4 foi ajustado com NaOH (1 M)	

A partir da solução especificada na Tabela 4, foram feitas as soluções de I a IV abaixo mencionadas.]

4.4.3.2 Solução I

Adicionou-se para cada 12,5 mL de solução DB, 10 mg de collagenase tipo II, 1 mg de protease XIV e 0,63 µL de cloreto de cálcio a 1M.

4.4.3.3 Solução II

Adicionou-se para cada 6,25 mL de solução DB, 0,63 µL de cloreto de cálcio 1M, 62,5 mg de albumina e 5 mg de collagenase tipo II.

4.4.3.4 Solução III

Adicionou-se para cada 6,25 mL de solução DB, 1,6 µL de cloreto de cálcio 1M e 125 mg de albumina.

4.4.3.5 Solução IV

Adicionou-se para cada 6,25 mL de solução DB, 3,12 µL de cloreto de cálcio 1M e 125 mg de albumina.

4.4.3.6 Solução V

Para preparar esta solução, foram usados 0,87 g de “Dulbelcco’s modified Eagle’s medium” (DMEM), 550 µL de NaCl (4 M), 10 µL de insulina (100 UI/mL), dissolvidos em água Milli-Q (q.s.p. 50 mL). O pH foi ajustado para 7,4.

4.4.4 Soluções usadas no procedimento para medir as correntes de cálcio

4.4.4.1 Soluções externa e interna

Tabela 5 – Solução externa

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	140,00
KCl	5,40
NaH ₂ PO ₄	0,33
MgCl ₂	0,50
CaCl ₂	1,80
HEPES	4,00
Glicose	11,00

O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH

Tabela 6 – Solução interna

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	5,00
CsCl	120,00
TEACl	20,00
EGTA	5,00
HEPES	10,00

O pH foi ajustado para 7,2 com CsOH

4.5 Dissolução e conservação do EBH, frações e substâncias

O EBH e suas frações, obtidas de *Costus spiralis*, foram dissolvidas em solução TyD ou então na solução Tyrode modificada por Conde-Garcia, a depender do protocolo experimental a ser realizado. Até o momento da utilização, o EBH e as frações permaneceram a -21 °C. As soluções-estoque de (-) BAY K8644 (0,5

mg/mL), isoproterenol (1 mg/ml) e reserpina (2 mg/mL) foram dissolvidas em água ultra-pura. Os estoques foram conservados a -21°C e em frasco Eppendorf de cor âmbar. No momento dos experimentos, essas substâncias foram diluídas em solução-estoque de Tyrode modificado por Conde-Garcia (baixa concentração de cálcio). As demais substâncias utilizadas nos experimentos foram dissolvidas apenas em água ultra-pura a fim de produzir soluções-estoque, a partir das quais foram feitas diluições no Tyrode com a composição proposta por Dorigo et al. (1990).

4.6 Animais usados nos experimentos

4.6.1 Avaliação dos efeitos de preparados de *C. spiralis* sobre a contratilidade miocárdica

Foram usadas cobaias adultas (*Cavia porcellus*, Fig. 9) de ambos os sexos, pesando entre 300 e 500 g, provenientes do Biotério da UFS. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nutricobaia, Agribands do Brasil Ltda, Brasil) e estiveram submetidos a ciclos claros/escuros de 12 horas. Durante a execução dos experimentos, foram obedecidas as normas de manipulação dos animais propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA/MCT). Os procedimentos metodológicos realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da UFS, sob o número 038/2008 (ANEXO B).

Os animais foram sacrificados no dia do experimento, exceto aqueles em que o protocolo de experimentação exigia reserpinização. Quando isso foi necessário, os animais receberam por via intraperitoneal 5 mg/kg de reserpina, 24 h antes do experimento. Os animais sacrificados foram entregues ao biotério para destinação adequada.



Figura 9 – *Cavia porcellus*

4.6.2 Avaliação dos efeitos de preparados de *C. spiralis* sobre a corrente de cálcio tipo-L e sobre o transiente intracelular de cálcio

Nestes experimentos foram usados camundongos machos da linhagem C57BL6/J (Fig. 10), pesando cerca de 30 g e provenientes do Biotério da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes animais receberam heparina sódica (100 UI/animal, via i.p.) cerca de 15 a 20 minutos antes de serem sacrificados.



Figura 10 – Camundongo C57BL6/J

4.7 Isolamento e montagem experimental do átrio esquerdo de cobaia

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral. Em seguida, a caixa torácica foi aberta e o coração rapidamente removido. O átrio esquerdo foi separado do coração e colocado em placa de Petri, contendo leito de parafina. Ali, suas extremidades foram fixadas a suportes de aço inoxidável e depois foi transferido para o interior de uma cuba para órgão isolado (5 mL, $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, 2 Hz), contendo solução de Tyrode aerada com carbogênio (95% de oxigênio e 5% de gás carbônico). Um fino fio de aço inoxidável, preso a uma das extremidades da preparação, foi acoplado a um transdutor isométrico de força (FTA10 HP/SUNBORN, EUA), a fim de permitir a captação da força de contração do átrio. A solução do banho pôde ser trocada rapidamente por aspiração realizada com a ajuda de um sistema a vácuo. A temperatura do banho foi mantida constante ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), fazendo-se circular água termo-estabilizada (HAAKE FJ, Alemanha e refrigerador IBBL, modelo FN2000, Brasil) através de uma jaqueta disposta em torno da cuba. A temperatura da solução de Tyrode contida na cuba foi monitorada continuamente por meio de um termistor YSI 401 acoplado a um SIRECUST 322 (SIEMENS, Alemanha). Os átrios foram então estirados para uma tensão de repouso de 9,8 mN (1gf) e submetidos a uma estimulação de campo de 2 Hz (DIGITIMER D4030, 3072, Inglaterra). Este método de estimular a preparação se baseia no fato de que os eletrodos pelos quais os pulso elétricos de estimulação são aplicados são posto ao longo de toda a preparação biológica, porém sem manter qualquer contato direto com ela. Com isso, garante-se que a preparação será toda estimulada simultânea e uniformemente e também que os subprodutos da decomposição da água em virtude da eletrólise, não irão danificar o tecido. Foram, assim, aplicados pulsos elétricos de 400 V e duração de 0,5 ms, usando-se um par de eletrodos de Ag/AgCl. O período para estabilização do tecido nas condições experimentais usadas foi de 30 minutos.

A força de contração atrial, captada isometricamente, foi amplificada (HP 8805B, EUA), o sinal digitalizado (conversor A/D, DI 205, DI 400, Windaq Pro Acquisition, DATAQ Instruments, EUA) e então gravado em computador. A frequência de amostragem foi de 512 amostras/s/canal (Fig.11). Os sinais biológicos foram processados “off line” pelos softwares PRAEPARATOR e CONEXON, ambos de autoria do Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia e depositado no INPI do

Ministério da Indústria e Comércio sob o No. 00051104, em 26 de abril de 2003 - 26 de maio de 2008 - e também registrado no Cartório do 10º Ofício de Títulos, Documentos e Pessoas Jurídicas, Aracaju/SE.

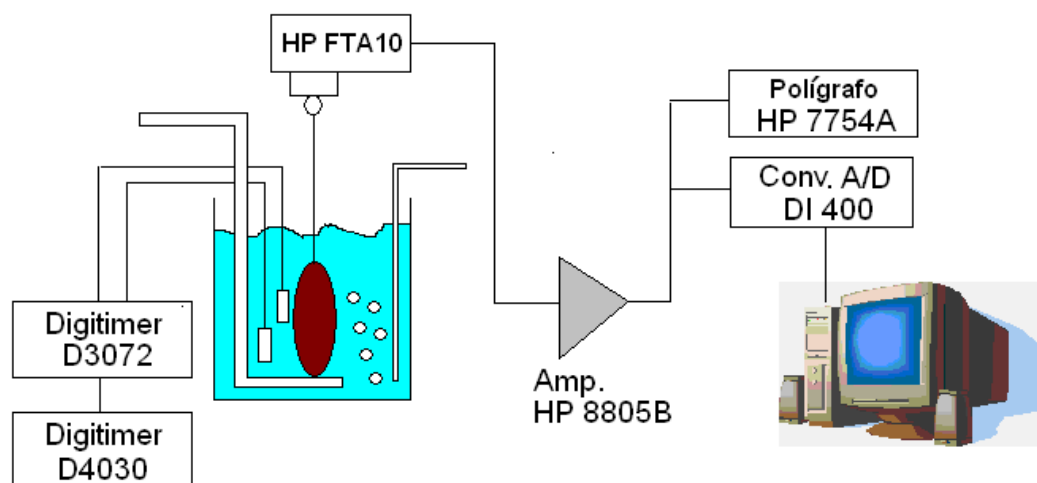


Figura 11 - Esquema da montagem experimental para determinação da força de contração isométrica do átrio esquerdo de cobaia. O átrio foi montado em cuba para órgão isolado (5 mL, Tyrode, 95 % de O₂ + 5 % de CO₂, 29,0 ± 0,1°C, tensão de repouso: 1 gf). A força foi medida com um transdutor isométrico (HP FTA10) acoplado a um amplificador (HP 8805B). Os sinais foram enviados a um polígrafo (HP 7754 A) e, depois de digitalizados por um conversor analógico–digital (A/D, DI 400), foram armazenados em computador. O átrio foi estimulado eletricamente (2 Hz, 400V e 0,5 ms; Digitimer D3072 e D4030).

4.8 Protocolos experimentais

4.8.1 Avaliação inotrópica do EBH e de suas frações

Com a finalidade de determinar o preparado das folhas de *C. spiralis* que apresentava maior potência inotrópica, o átrio esquerdo isolado foi mantido em cuba para órgão e testado com concentrações crescentes de extrato bruto hidroalcoólico (EBH), bem como das seguintes frações: clorofórmica (FClo), acetato de etila (FAce) e aquosa (FAq). Cada um destes preparados foi adicionado cumulativamente ao banho, a fim de avaliar os seus efeitos sobre a contratilidade atrial. A potência inotrópica foi avaliada por meio de curva concentração-efeito, o que permitiu que fossem determinadas as CE₅₀ (concentração do preparado capaz de produzir 50 % do

seu efeito máximo) de cada preparado. Os dados experimentais foram ajustados pela equação de Hill-Langmuir (CASTELLAN, 1967, p. 548; MOORE, 1968, p. 358; MAHLER; CORDES, 1971, p. 307; VOLKENSHTEIN, 1983, p. 228; RANG et al., 2004). Durante esse ajustamento, foi possível determinar também a constante de Hill, o que permitiu que fosse identificado o tipo de cooperatividade existente entre a substância cardioativa presente no extrato ou fração e o seu alvo biológico (VOET et al., 2000).

4.8.1.1 Determinação da CE_{50} e da constante de Hill

A CE_{50} bem como a constante de Hill foram obtidas com a ajuda da equação de Hill-Langmuir usada para o ajustamento dos pontos experimentais obtidos com o protocolo para curvas do tipo concentração-efeito. A CE_{50} é definida como sendo a concentração de substância necessária para produzir 50% do efeito máximo induzido por essa substância. A constante de Hill está associada à inclinação da curva sigmoidal gerada pela equação de Hill-Langmuir e indica o grau de cooperatividade entre a substância cardioativa e o seu sítio de ação.

A equação de Hill-Langmuir é a seguinte:

$$E = \frac{\left(\frac{[C]}{CE_{50}}\right)^n}{1 + \left(\frac{[C]}{CE_{50}}\right)^n}$$

onde:

E : efeito inotrópico

[C] : concentração no banho da substância testada

CE_{50} : variável relacionada à potência da substância testada

n: constante de Hill

4.8.2 Avaliação fitoquímica qualitativa do preparado de maior potência inotrópica

A investigação dos principais grupos de metabólitos secundários (flavonóides, alcalóides, taninos, saponinas e esteróides), presentes no preparado que apresentou maior potência inotrópica, foi realizada de acordo com os testes de prospecção fitoquímica qualitativa propostos por Matos (1997).

4.8.3 Avaliação do conteúdo de sódio e potássio no preparado de maior potência inotrópica

Os níveis de potássio e sódio presentes no preparado de maior potência inotrópica obtido das folhas de *Costus spiralis* foram determinados pelo Instituto de Tecnologia e Pesquisa de Sergipe, usando a fotometria de chama (Digimed DM-61, São Paulo, SP, Brasil, Fig. 12).



Figura12 - Fotômetro de chama DIGIMED DM-61

4.8.4 Avaliação do efeito do preparado de maior potência inotrópica sobre os tempos de contração, relaxamento e acoplamento eletromecânico

Os tempos de contração (T_c) e de relaxamento (T_r) foram medidos em três níveis diferentes da amplitude da curva de força do átrio esquerdo de cobaia (20, 50 e 80 %). Para isso, 50 contrações foram selecionadas quando a força atrial já estava estabilizada em cada concentração do extrato ou frações de maior potência e os tempos médios foram obtidos com ajuda de um processamento automático realizado pelo software CONEXON. Os tempos foram determinados no controle e também após a adição ao banho do preparado de maior potência, este usado nas seguintes concentrações: 10, 100, 300, 800, 1500 mg/L (Fig. 13).

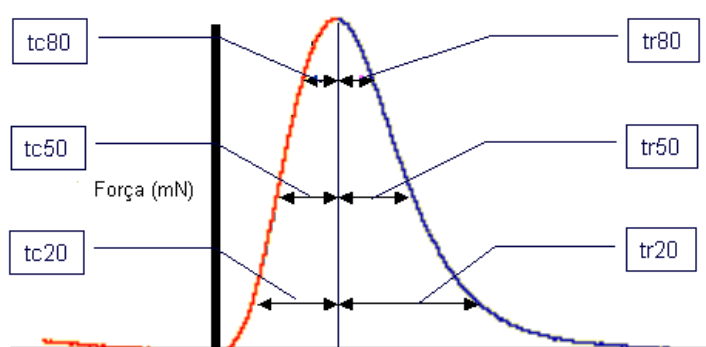


Figura 13 - Esquema indicando as variáveis medidas nas curvas de força de contração atrial. Amplitude da força (Força, mN); tempo de contração a 80% (tc80, ms); tempo de contração a 50% (tc50, ms); tempo de contração a 20% (tc20, ms); tempo de relaxamento a 80% (tr80, ms), tempo de relaxamento a 50% (tr50, ms) e tempo de relaxamento a 20% (tr20, ms).

O intervalo de acoplamento eletromecânico (AEM) foi medido do início da estimulação até o pico da contração (StPico) (Fig.14). Foram também determinados os Índices de Eficiência para a contração e para o relaxamento (IEc e IEr). Estes índices foram obtidos em gf/s, dividindo-se a amplitude da força atrial pelos tempos de contração ou de relaxamento em cada um dos três níveis da força (80, 50 e 20%).

Os parâmetros inotrópicos foram determinados tanto no controle, quanto ao se submeter o átrio ao preparado de *C. spiralis* que apresentou maior potência.

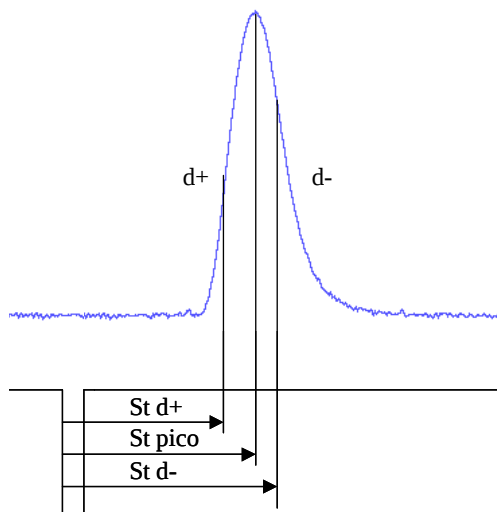


Figura 14 – Tempos referentes ao acoplamento eletromecânico, mostrando os intervalos de tempo do estímulo à derivada máxima da contração (St d+), do estímulo ao pico (St pico) e do estímulo à derivada máxima do relaxamento (St d-). A curva superior refere-se à força de contração atrial e a inferior mostra o momento da estimulação (pulso retangular negativo)

4.8.5 Avaliação do efeito do preparado de maior potência sobre as correntes de potássio

4.8.5.1 Prospecção guiada pelo bloqueio muscarínico promovido pela atropina

Com a intenção de investigar, em átrio esquerdo de cobaia, o possível envolvimento dos receptores muscarínicos no efeito inotrópico do extrato ou fração de maior potência de *C. spiralis*, a preparação biológica, mantida em cuba para órgão isolado, foi estimulada eletricamente com pulsos de 2 Hz, 400 V e 0,5 ms. Em solução TyD (Tabela 2), uma vez estabilizada a preparação, a resposta contrátil induzida pelo preparado mais potente foi testada antes e depois do bloqueio muscarínico feito pela atropina (1,5 μ M; tempo de incubação: 20 minutos). O extrato ou fração mais potente da *C. spiralis* foi adicionado cumulativamente ao banho, de

modo a que fossem obtidas as seguintes concentrações finais: 10, 100, 300, 800, 1000 e 1500 mg/L. A Fig. 15 esquematiza a sequência de eventos deste protocolo.

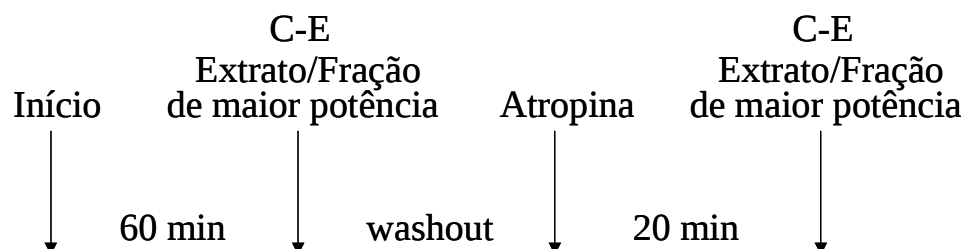


Figura 15 – Protocolo para estudar a participação de receptores muscarínicos no efeito inotrópico do preparado de maior potência obtido das folhas de *C. spiralis*, em átrio de cobaia. Inicialmente, foi permitido ao átrio estabilizar com as condições experimentais por cerca de 60 min. Em seguida, o preparado de maior potência inotrópica, obtidos das folhas de *C. spiralis*, foi adicionado cumulativamente ao banho para produzir as seguintes concentrações extracelulares: 10, 100, 300, 800, 1000 e 1500 mg/L. Em cada concentração, a amplitude da força de contração foi determinada e, com os dados obtidos, foi construída uma curva concentração-efeito (C-E) para a qual a CE_{50} foi determinada. O procedimento foi repetido no átrio pré-incubado com 1,5 mM de atropina – bloqueador inespecífico de receptores muscarínicos. Nesta condição, uma nova CE_{50} foi determinada para comparação ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms e 2 Hz).

4.8.5.2 Prospecção guiada pelo bloqueio inespecífico de canais para potássio promovido pelo tetraetilamônio

Para avaliar, em átrio esquerdo de cobaia, a possível participação de canais de potássio no efeito inotrópico promovido pelo extrato ou fração de maior potência de *Costus spiralis* utilizou-se como ferramenta farmacológica o tetraetilamônio (TEA), que é um bloqueador inespecífico desses canais (FREEMAN et al.,1992). Neste protocolo, foram obtidas curvas concentração-efeito do preparado de maior potência antes e após a incubação do átrio com tetraetilamônio. A Fig. 16 esquematiza a sequência de eventos usados nesses experimentos. Inicialmente, foi permitida à preparação estabilizar-se com a situação experimental imposta, por cerca de 60 min. Depois, foi adicionado ao banho de forma cumulativa, o preparado (fração ou

extrato) mais potente, de modo a que fossem obtidas as seguintes concentrações: 10, 100, 300, 800, 1000 e 1500 mg/L. As amplitudes das forças em cada concentração foram determinadas e com elas foi construída uma curva do tipo concentração-efeito o que permitiu fosse conhecido o valor da CE_{50} . Isto foi repetido após a incubação do átrio com TEA (20 mM, 20 min). Os eventos experimentais estão esquematizados na Fig. 20.

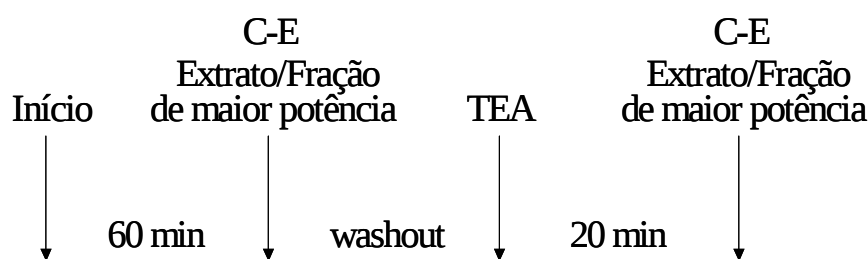


Figura 16 - Protocolo para estudar a participação de canais de potássio no efeito inotrópico do preparado de maior potência obtido das folhas de *C. spiralis*, em átrio de cobaia. Inicialmente, foi permitido ao átrio estabilizar com as condições experimentais por cerca de 60 min. Em seguida, o preparado foi adicionado cumulativamente ao banho para produzir as seguintes concentrações extracelulares: 10, 100, 300, 800, 1000 e 1500 mg/L. Em cada concentração, a amplitude da força de contração foi determinada e, com os dados obtidos, foi construída uma curva concentração-efeito (C-E) para a qual a CE_{50} foi determinada. O procedimento foi repetido no átrio pré-incubado com 20 mM de TEA – bloqueador inespecífico de canais sarcolemas para potássio. Nesta condição, uma nova CE_{50} foi determinada para comparação ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms e 2 Hz).

4.8.6 Avaliação do efeito do preparado de maior potência inotrópica sobre a entrada de cálcio nas células do miocárdio

4.8.6.1 Prospecção guiada pelo fenômeno de Bowditch – Protocolo de Nayler & Merrillees

Para testar se o preparado de maior potência inotrópica de *Costus spiralis* podia interferir com a entrada de cálcio nas células do tecido miocárdico, foram realizados experimentos usando-se o protocolo de Nayler; Merrillees (1971). Para isso, as cobaias foram reserpinizadas (5 mg/kg, via i.p.) 24 horas antes do experimento, a fim de promover a depleção de catecolaminas dos terminais nervosos

adrenérgicos do miocárdio. Esse procedimento visou minimizar o aparecimento de arritmias atriais, geralmente extrassístolia produzida por focos ectópicos.

O protocolo de Nayler; Merrillees (1971) está baseado no aumento da força de contração observado após a elevação da frequência de estimulação (fenômeno de Bowditch, 1871, apud SEED; WALKER, 1987).

A Fig. 17 mostra um exemplo representativo do método usado nos experimentos referente ao protocolo de Nayler; Merrillees (1971). Durante a investigação, o átrio esquerdo foi estimulado com uma frequência-controle de 0,2 Hz. Uma vez em equilíbrio inotrópico, a frequência foi elevada para alcançar uma dada frequência-teste (FT). Nela, a preparação permaneceu estimulada por 150 s. Depois disso, a estimulação foi interrompida por 40 s e, então, reiniciada com a mesma frequência-controle (0,2 Hz). Em diferentes ciclos experimentais foram testadas as seguintes FTs: 0,33 / 0,50 / 0,66 / 1,00 / 1,33 / 1,66; 2,00 / 2,50 / 3,33 Hz.

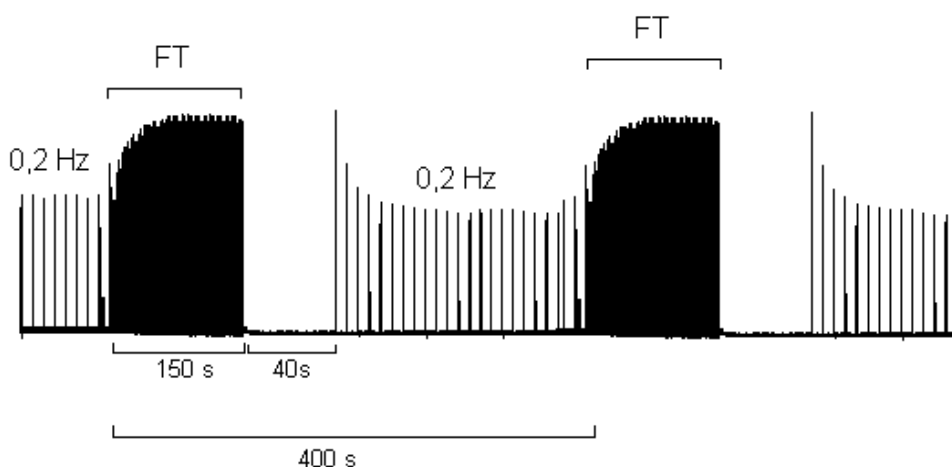


Figura 17 – Experimento representativo mostrando a sequência de eventos usados para reproduzir o protocolo Nayler; Merrillees (1971), a fim de avaliar a captação de cálcio pelo miocárdio. (Frequência-controle: 0,2 Hz; FT: 1,66 Hz; $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms).

4.8.6.2 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o isoproterenol

O efeito do preparado de maior potência inotrópica, obtido das folhas de *C. spiralis* sobre as correntes sarcolemas de cálcio foi testado em experimentos realizados em átrio de cobaia nos quais foram determinadas curvas concentra-

efeito para concentrações crescentes de isoproterenol. Este agonista adrenérgico foi adicionado ao banho de forma cumulativa, antes e após a incubação da preparação com o extrato ou fração obtida de *C. spiralis*. Os animais foram reserpinizados 24 horas antes do experimento. O isoproterenol foi adicionado ao banho para alcançar as seguintes concentrações: 0,1; 1; 3; 6; 10; 30; 100; 300 e 1000 pM). As amplitudes da força atrial foram determinadas para cada concentração e, com elas, foram construídas curvas do tipo concentração-efeito o que permitiu que fossem calculadas as CE_{50} antes e após a ação do preparado de *C. spiralis*. A Fig. 18 esquematiza a sequência dos eventos experimentais.

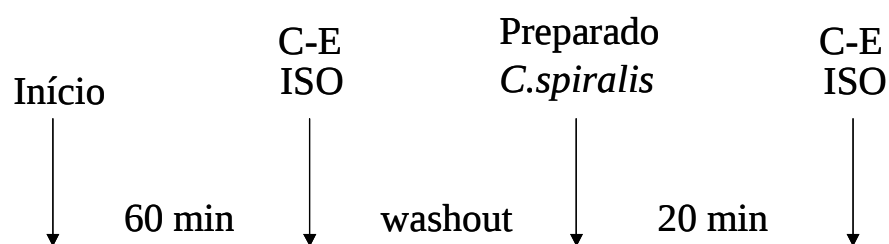


Figura 18 - Protocolo experimental para estudar a participação de correntes de cálcio sensíveis ao isoproterenol no efeito inotrópico do preparado de maior potência obtido das folhas de *C. spiralis*, em átrio de cobaia. Inicialmente, foi permitido ao átrio estabilizar com as condições experimentais por cerca de 60 min. Em seguida, foi adicionado isoproterenol (ISO) cumulativamente ao banho para produzir as seguintes concentrações extracelulares: 0,1; 1; 6; 10; 30; 100; 300 e 1000 pM. Em cada concentração, a amplitude da força de contração foi determinada e, com os dados obtidos, foi construída uma curva concentração-efeito (C-E) para a qual a CE_{50} foi determinada. O procedimento foi repetido no átrio pré-incubado com o preparado de maior potência inotrópica, obtido das folhas de *C. spiralis*. Nesta condição, uma nova CE_{50} foi determinada para comparação ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms e 2 Hz).

4.8.6.3 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o CaCl_2

O efeito do preparado mais potente de *Costus spiralis* sobre a resposta inotrópica produzida por concentrações crescentes de CaCl_2 foi estudado adicionando-se diretamente o sal ao banho de forma cumulativa de tal forma que alcançasse os níveis extracelulares desejados (0,5 / 0,7 / 1,0 / 1,2 / 1,5 / 2,0 / 2,5 / 3,0 / 4,0 / 5,0 / 6,0 e 7,0 mM). A Fig. 19 mostra, esquematicamente, a sequência dos eventos empregados nesse estudo. A solução de Tyrode usada foi a de baixo cálcio, cuja composição está descrita na Tabela 2. Os experimentos foram realizados a $29,0$

$\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ e os átrios, previamente estirados para uma tensão de repouso 4,58 mN (0,5 gf), foram estimulados eletricamente com pulsos gerados com frequência constante. A força atrial foi determinada isometricamente tal como se descreveu antes. A concentração inicial de cálcio foi de 0,5 mM (TyCG). Todos os animais foram reserpinizados, por via intra-peritoneal, 24 horas antes do experimento.

A força atrial foi medida em situação-controle e também após a incubação da preparação com o preparado de *Costus spiralis* que apresentou maior potência inotrópica. Para cada concentração, a amplitude da força atrial foi determinada, permitindo, assim, que curvas dose-resposta no controle e no teste fossem obtidas e também que fossem determinadas as respectivas CE_{50} , permitindo, assim, uma comparação.

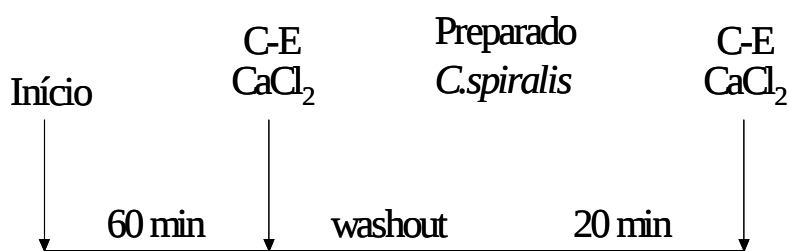


Figura 19 - Protocolo experimental para estudar a participação de correntes de cálcio sensíveis ao cálcio extracelular no efeito inotrópico do preparado de maior potência obtido das folhas de *C.spiralis*, em átrio de cobaia. Inicialmente, foi permitido ao átrio estabilizar com as condições experimentais por cerca de 60 min. Em seguida, foi adicionado CaCl_2 cumulativamente ao banho para produzir concentrações extracelulares entre 0,5 e 7,0 mM. Em cada concentração, a amplitude da força de contração foi determinada e, com os dados obtidos, foi construída uma curva concentração-efeito (C-E) para a qual a CE_{50} foi determinada. O procedimento foi repetido no átrio repetido pré-incubado com o preparado de maior potência inotrópica, obtidos das folhas de *C. spiralis*, nesta condição, uma nova CE_{50} foi determinada para comparação ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms e 2 Hz).

4.8.6.4 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o (-) BAY K8644

Para estudar se o preparado de maior potência, obtido das folhas de *Costus spiralis*, produzia efeito inotrópico por meio do bloqueio de canais de cálcio tipo-L, foram usadas concentrações crescentes de (-) BAY K8644, que é um agonista deste canal e, então, curvas concentração-efeito foram determinadas antes e após a adição

do preparado de *C. spiralis* no banho. O (-)BAY K8644 foi adicionado ao banho de forma cumulativa para alcançar as seguintes concentrações 5, 50, 100, 300, 500, 800 e 1000 nM. Os experimentos foram feitos a $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Todos os animais foram reserpinizados por via intraperitoneal, 24 horas antes do experimento. A Fig. 20 esquematiza a sequência de eventos desses experimentos.

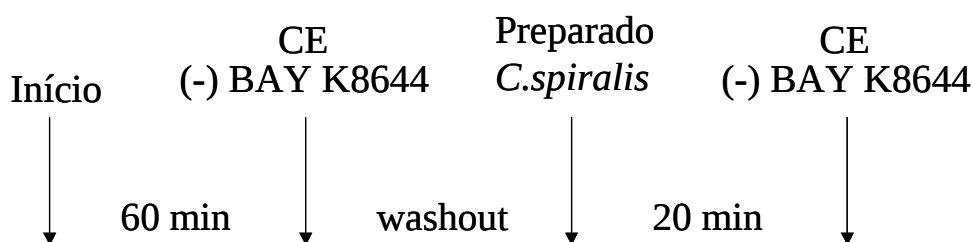


Figura 20 - Protocolo experimental para estudar a participação de correntes de cálcio ativadas pelo agonista (-) BAY K8644 no efeito inotrópico do preparado de maior potência obtido das folhas de *C.spiralis*, em átrio de cobaia. Inicialmente, foi permitido ao átrio estabilizar com as condições experimentais por cerca de 60 min. Em seguida, foi adicionado (-) BAY K8644 cumulativamente ao banho para produzir as seguintes concentrações extracelulares: 5, 50, 100, 300, 500, 800 e 1000 nM. Em cada concentração, a amplitude da força de contração foi determinada e, com os dados obtidos, foi construída uma curva concentração-efeito (C-E) para a qual a CE_{50} foi determinada. O procedimento foi repetido no átrio pré-incubado com o preparado de maior potência inotrópica, obtido das folhas de *C. spiralis*. Nesta condição, uma nova CE_{50} foi determinada para comparação ($29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 400 V; 0,5 ms e 2 Hz).

4.8.7 Avaliação do efeito do preparado de maior potência, obtido das folhas de *Costus spiralis*, sobre o transiente citoplasmático de cálcio

4.8.7.1 Preparação de cardiomiócitos isolados

Para estudar o efeito do preparado das folhas de *C. spiralis* sobre o comportamento do cálcio intracelular, foram usados camundongos da linhagem C57BL6/J sacrificados em guilhotina. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução DB gelada. A dissociação enzimática dos cardiomiócitos (Fig. 21) foi feita segundo o protocolo proposto por Mitra; Morad (1985). Basicamente, esse procedimento constitui-se das seguintes etapas:

1. Perfusão do coração, através das artérias coronárias, por 5 a 10 minutos com solução DB mantida à temperatura ambiente, a fim de remover o sangue contido nos vasos coronários;
2. Perfusão do coração (6 a 8 min) com Solução I, a fim de iniciar o processo de digestão enzimática do miocárdio (37°C);
3. Fragmentação do miocárdio ventricular em placa de Petri;
4. Agitação mecânica do tecido fragmentado em Solução I contida em tubo Falcon (50 mL) e usando pipeta de transferência, a fim de promover a separação dos cardiomiócitos;
5. Filtração em rede de nylon para a remoção de “debris”;
6. Centrifugação (10 s, 1000 rpm) da suspensão de células;
7. Remoção do sobrenadante e ressuspensão do ‘pellet’ de células isoladas, na Solução II, contida em tubo Falcon (10 mL), onde permaneceram por cerca de 2 minutos, a fim de interromper a ação enzimática;
8. Centrifugação por 10 s (1000 rpm) e remoção do sobrenadante com posterior ressuspensão do ‘pellet’ de células na Solução III, onde foram mantidas por 2 minutos;
9. Centrifugação (10 s) e remoção do sobrenadante com posterior ressuspensão do ‘pellet’ de células na Solução IV, onde foram mantidas por 2 minutos;
10. Centrifugação (10 s) e remoção do sobrenadante com posterior ressuspensão do ‘pellet’ de células na solução DMEM modificada onde permaneceram até serem usadas no experimento.



Figura 21- Cardiomiócitos isolados do coração de camundongo (Reproduzido de LAUTON-SANTOS, 2007).

4.8.7.2 Medida do transiente intracelular de cálcio

A avaliação do efeito do preparado de maior potência, obtido das folhas de *C. spiralis*, sobre os transientes intracelulares de Ca^{2+} foi feita no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) usando-se microscópio confocal (Zeiss LSM 510 Meta, Zeiss GmbH, Jena, Alemanha) (Fig. 22). Os cardiomiócitos previamente isolados foram carregados com 10 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-4 AM sensível ao Ca^{+2} (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 30 minutos e à temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$). Após este procedimento, as células foram lavadas, para remover o excesso da sonda fluorescente, e colocadas novamente em solução DMEM. A sonda FLUO-4/AM, quando adequadamente excitada e complexada a íons cálcio, emite um sinal de fluorescência que pode ser medido em 515 nm. A intensidade desta fluorescência está relacionada com as variações do cálcio sarcoplasmático livre. As variações do Ca^{2+} intracelular livre (transiente intracelular de cálcio) foram produzidas pela estimulação elétrica dos cardiomiócitos aplicada por meio de um par de eletrodos de platina (1Hz, 5 ms, 30 V, GRASS Technologies SD9, EUA).. Esta sonda foi então excitada com laser de argônio (488 nm), tendo a análise sido executada ao longo de uma linha (512 *pixels*) posicionada aleatoriamente ao longo do eixo longitudinal da célula, tomando-se o cuidado para não cruzar a região dos núcleos. As varreduras foram repetidas a cada 1,54 ms e sempre sobre o mesmo trajeto e se iniciaram após a aplicação de oito pulsos elétricos de estimulação o que visou estabilizar a preparação biológica. Os sinais de fluorescência emitidos pela célula foram usados para a criação de imagens bidimensionais onde a variável tempo foi colocada no eixo X. As imagens foram processadas pelo software IDL 5.2 (Research Systems, Inc., Boulder, CO, EUA). Os níveis de Ca^{2+} foram expressos como F/F_0 , onde F_0 representa a fluorescência basal da sonda Fluo 4AM (GÓMEZ *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2007; LAUTON - SANTOS *et al.*, 2007).



Figura 22- Microscópio confocal Zeiss LSM 510 Meta

4.8.8 Avaliação do efeito do preparado de maior potência, obtido das folhas de *Costus spiralis*, sobre a remoção do cálcio citoplasmático livre

4.8.8.1 Prospecção guiada pela equação de Conde-Garcia

A velocidade de remoção do cálcio citoplasmático livre foi estudada, em átrio de cobaia, aplicando-se a equação de Conde-Garcia às força atriais obtidas após a pausa da estimulação descrita no protocolo experimental de Nayler; Merrillees (1971).

Para determinar a velocidade de recuperação das forças pós-pausa, as amplitudes das contrações, obtidas nesta fase, foram ajustadas pela equação desenvolvida pelo Prof. Dr. Eduardo Antonio Conde-Garcia, a saber:

$$F(i) = \frac{100 - F_{\min}}{K^i} + F_{\min} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

$F(i)$: Amplitude da força pós-pausa de ordem i

$F_{\min}$: Amplitude mínima das forças pós-pausa

K : Constante de decaimento das forças no pós-pausa

i : número de ordem da contração das forças no pós-pausa

A Eq. 1 permitiu que a taxa de variação da amplitude da força de contração atrial no período pós-pausa pudesse ser conhecida. Para isto, esta equação foi logaritmada, resultando na seguinte expressão:

$$\log (Y_{(i)} - F_{\min}) = \log (100 - F_{\min}) - i \log(K)$$

que é, em última instância, uma equação de reta do tipo $Y = B - Ax$.

Nesta equação,

$$Y = \log (F(i) - F_{\min})$$

$$B = \log (100 - F_{\min})$$

$$A = \log K \text{ e } X = i$$

Com isso, o coeficiente angular $A = \log K$ referente à reta de decaimento pôde ser conhecido e, assim, avaliado na presença ou na ausência do preparado de maior potência.

4.8.9 Avaliação do efeito do preparado de maior potência sobre as correntes de cálcio tipo-L

O estudo foi feito em cardiomiócitos de camundongo, seguindo-se os procedimentos da técnica de ‘patch clamp’ na configuração ‘whole-cell’ (MATSUDA & CRUZ, 1993; CRUZ *et al.*, 1999). Para isto foi empregado um amplificador EPC-10 (HEKA Instruments, Alemanha) controlado pelo software PULSE (HEKA Instruments).

Os miócitos cardíacos foram colocados em solução externa (Tabela 5) contida em câmara de fundo transparente que foi fixada à platina de um microscópio invertido (Axiovert 20, Zeiss, Alemanha). Para o registro das I_{CaL} foram utilizadas pipetas de vidro comum preparadas com ‘puller’ de dois estágios (PP830, Narishige, Japão), com resistência entre 0,7 e 1,5 MΩ, preenchidas com solução interna (Tabela 6).

Para analisar o efeito do extrato ou da fração de maior potencia inotrópica, sobre as correntes de cálcio tipo-L, foi executado um protocolo experimental visando medir o curso temporal das correntes macroscópicas relacionadas com a entrada de cálcio nas células. Foi usado o seguinte protocolo de pulsos: inicialmente a voltagem da membrana foi mantida em -80 mV (‘holding’) e, a partir dela, foi aplicado um pré-pulso de -40 mV por 50 ms, a fim de inativar os canais rápidos para sódio. Em

seguida, foi aplicado um pulso-teste de 200 ms, despolarizando a membrana para 0 mV, para, em seguida, retornar-se ao potencial ‘holding’ original (Fig. 23).

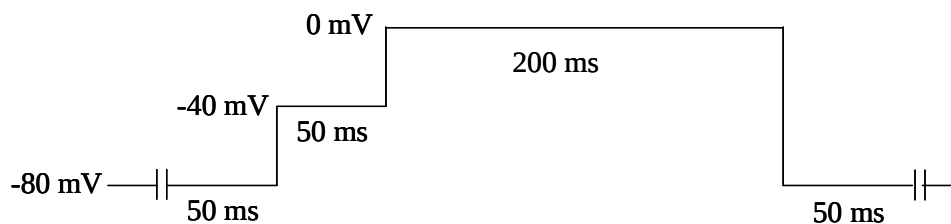


Figura 23 - Protocolo de pulsos utilizado em ‘patch-clamp’ na configuração ‘whole-cell’ para o registro das correntes de cálcio tipo-L, em cardiomiócitos de camundongo.

As correntes obtidas foram submetidas a um filtro de Bessel do tipo passa-baixa, com frequência de corte de 2,9 kHz e foram digitalizados a 10 kHz. Os miócitos que apresentaram resistência em série maior que 6 M Ω foram descartados. Naqueles válidos, a resistência em série foi compensada em 40%. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$).

As correntes foram registradas e analisadas usando-se o software Pulse-Pulsetfit (HEKA Instruments, Alemanha). Os gráficos finais foram obtidos com o *software* SigmaPlot 8.0 (Jandel Scientific, EUA).

4.9 Tratamento estatístico dos dados

Para a sistematização e observação, os resultados foram tabulados e confeccionados gráficos pertinentes, usando-se os softwares EXCEL (Microsoft Office 2003, EUA) e GRAPHPAD PRISMA v. 3.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). O software estatístico MINITAB v.14 (Minitab Inc., EUA) foi usado para análise. Para a decisão entre diferenças de médias foi empregado o teste ANOVA ‘one-way’, seguido do teste de Tukey, tendo sido adotado um nível de significância de $p < 0,05$ para rejeitar a hipótese de nulidade. Onde coube, foi aplicado o teste t de Student na sua modalidade pareada.

A decisão sobre a diferença entre curvas obtidas num dado teste experimental foi realizada por meio do método dos Fatores de Diferenciação (f1) e de Similaridade (f2), proposto por Moore; Flanner (1996). Adotou-se como curvas diferentes aquelas

cujo teste resultou nas desigualdades $f_1 > 15$ e $f_2 < 50$ e para aceitar a semelhança entre elas os intervalos $0 \leq f_1 \leq 15$ e $50 \leq f_2 \leq 100$. Neste trabalho, os dados quantitativos estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

5 RESULTADOS

5.1 Rendimentos do EBH e de suas frações

Depois de secas e trituradas, as folhas de *C. spiralis* pesaram 222 g tendo sido obtido 23,37g de EBH. Desse total, 7,65g foram destinados a um novo processo de separação, empregando-se a técnica de partição líquido-líquido. Os rendimentos finais das frações obtidas foram calculados e estão mostrados percentualmente na Tabela 7.

Tabela 7 - Rendimento do processo de obtenção das frações do EBH

Frações	Rendimento (%)
Aquosa	69,40
Acetato	6,14
Clorofórmio	1,70

5.2 Avaliação do efeito inotrópico do EBH e de suas frações

O processo de partição líquido-líquido feito a partir do EBH, permitiu que fossem obtidas frações extraídas com solventes de polaridades crescentes. Foram obtidas as seguintes frações na ordem crescente de polaridade: clorofórmica (FClo), acetato de etila (FAcet) e aquosa (FAq).

A Fig. 24 mostra que o EBH e suas frações promoveram um efeito inotrópico negativo sobre o miocárdio atrial da cobaia. Este efeito foi dependente de concentração e desapareceu parcialmente com a retirada do extrato ou da fração da solução contida na cuba para órgão isolado ('washout').

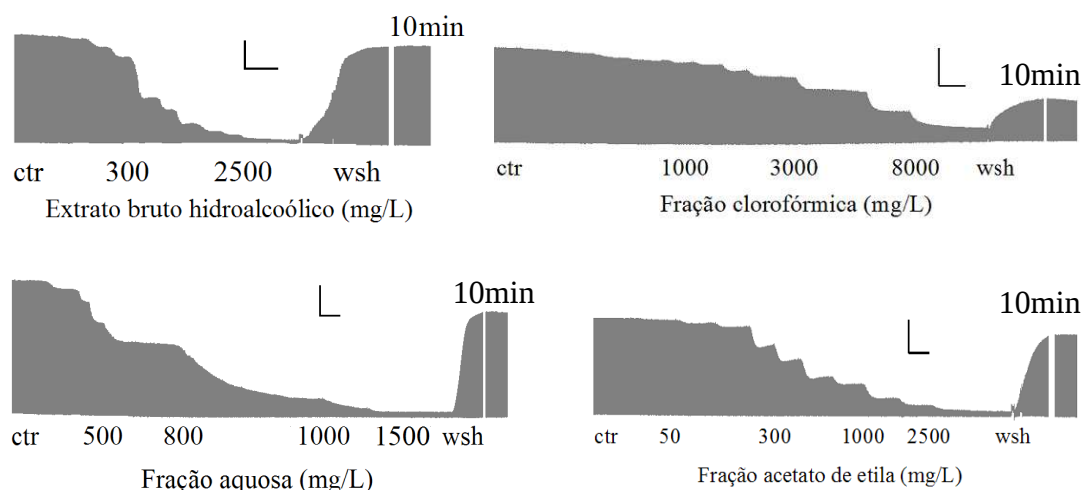


Figura 24 - Registros experimentais representativos mostrando o efeito inotrópico negativo promovido pelo EBH e por suas frações (clorofórmica, acetato de etila e aquosa), obtidas das folhas de *Costus spiralis*. O final de cada traçado corresponde a 10 min após o ‘washout’ (wsh) (ctr: controle; $27,0 \pm 0,1$ °C; estimulação: 2 Hz; 400 V; 0,5 ms; Barras de calibração: 5 mN, 1 min).

Com a finalidade de determinar que preparado das folhas possuía maior efeito depressor sobre o inotropismo miocárdico, curvas concentração–efeito foram obtidas com cada um deles e suas respectivas CE_{50} foram calculadas. A Fig. 25 mostra estas curvas ajustadas aos pontos experimentais pela equação de Hill-Langmuir. Com elas, foi possível determinar o valor da CE_{50} para o efeito inotrópico de cada extrato ou fração testada. A FAq foi a mais potente, deprimindo a força atrial com uma CE_{50} de $305 \pm 41,00$ mg/L e uma constante de Hill de $1,460 \pm 0,196$, indicando que a reação de ligação do metabólito cardioativo com o sítio receptor se faz de forma positivamente cooperativa (VOET et al., 2000). Na Tabela 8, podem ser vistas as CE_{50} , bem como as constantes de Hill das frações e do EBH avaliado.

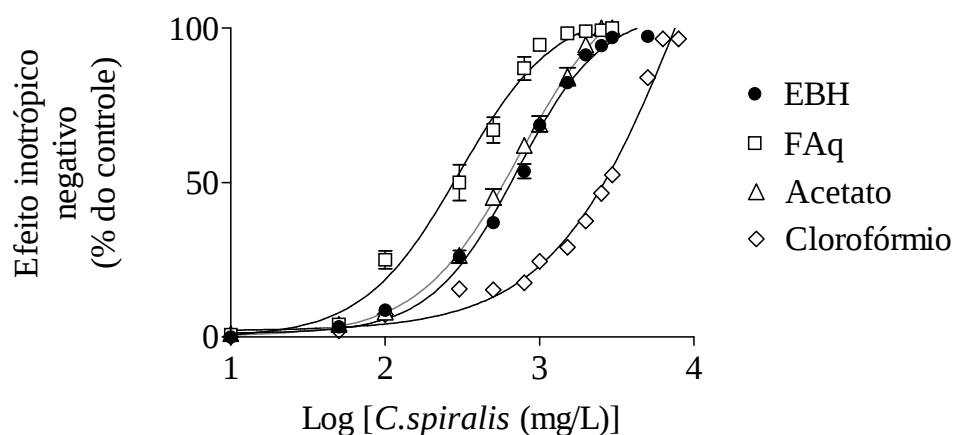


Figura 25 - Curvas concentração-efeito relativas ao efeito inotrópico negativo dos preparados das folhas de *Costus spiralis*. EBH: extrato bruto hidroalcoólico (●, n = 3), FAq: fração aquosa (□, n = 3), Acetato: fração acetato de etila (△, n = 3) e Clorofórmio: fração clorofórmica (◇, n = 3) Os pontos experimentais foram ajustados por curvas geradas com a equação de Hill-Langmuir ($27,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; estimulação: 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

Tabela 8 - CE_{50} e constante de Hill de preparados obtidos das folhas *Costus spiralis*

Preparado	$\text{CE}_{50} \pm \text{DP}$ (mg/L)	Constante de Hill $\pm \text{DP}$
EBH	$712 \pm 41,00$	$1,590 \pm 0,079$
FAq	$305 \pm 41,00$	$1,460 \pm 0,196$
FAcet	$788 \pm 121,00$	$1,360 \pm 0,399$
FClo	$8948 \pm 1346,00$	$1,017 \pm 0,055$

Uma vez determinado que a FAq foi o preparado das folhas de *C. spiralis* com maior potência inotrópica, então todos os experimentos subsequentes foram realizados com a mesma.

5.3 Prospecção química e fitoquímica da FAq

5.3.1 Determinação do sódio e do potássio

Os resultados obtidos com a ajuda da fotometria de chama revelaram que, na concentração de 1 g/L de FAq, havia 1,91 mM de potássio e 0,1525 mM de sódio. Estes resultados, somados com as concentrações de potássio e sódio existentes na solução de Tyrode, segundo Dorigo et al. (1990), elevou o potássio da solução para 4,61 mM e o sódio para 120,1525 mM.

5.3.2 Triagem fitoquímica

A prospecção fitoquímica da FAq revelou os principais metabólitos secundários. Estes se encontram listados na Tabela 9. Apesar de investigada, não foi possível comprovar a presença de alcalóides, auronas, chalconas, antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidas e triterpenóides.

Tabela 9 –Prospecção fitoquímica qualitativa da fração aquosa

COMPOSTO	MÉTODO	RESULTADO
Fenóis	FeCl ₃ ou Reativo de Folin Ciocalteu	Positivo
Taninos	FeCl ₃	Positivo
Flavonas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Positivo
Xantonas	Mg ²⁺ /HCl/Mudança de cor	Positivo
Auronas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Chalconas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Flavonóides	HCl/NaOH/Mudança de cor	Positivo
Antocianinas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Antocianidinas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Catequinas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Leucoantocianidinas	HCl/NaOH/Mudança de cor	Negativo
Flavonóis	Mg ²⁺ /HCl/Mudança de cor	Positivo

Tabela 9 - continuação

Flavanonóis	Mg ²⁺ /HCl/Mudança de cor	Positivo
Flavanonas	Mg ²⁺ /HCl/Mudança de cor	Positivo
Triterpenóide e Esteróides	Lieberman-Burchard	Negativo
Saponinas	Resíduo clorofórmico/H ₂ O/Espuma	Positivo
Alcalóides	Bouchardat	Negativo
	Mayer	Negativo
	Dragendorff	Negativo
	Ác. sílico-túngstico	Negativo

5.4 Avaliação do efeito da FAq sobre parâmetros contráteis do átrio

5.4.1 Tempos de contração e de relaxamento

A análise de curvas de força atrial, obtidas em 4 átrios, mostrou que a FAq, usada em concentração de até 1500 mg/L, não alterou de forma significativa os tempos de contração (Tc) nem os de relaxamento (Tr), quando medidos nos níveis de 80, 50 e 20% da amplitude da curva de força atrial (Fig. 26 e Fig. 27).

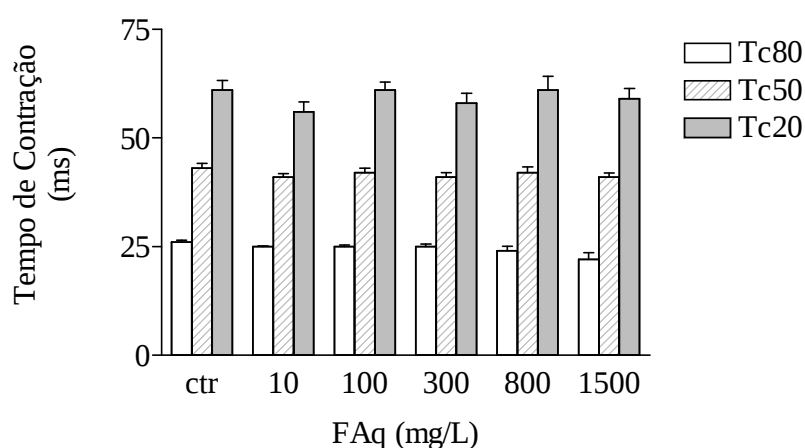


Figura 26- Efeito da FAq sobre os tempos de contração da força atrial. A FAq não alterou estes tempos, comparando com o controle (ctr) (n = 4; 29 ± 0,1°C; 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

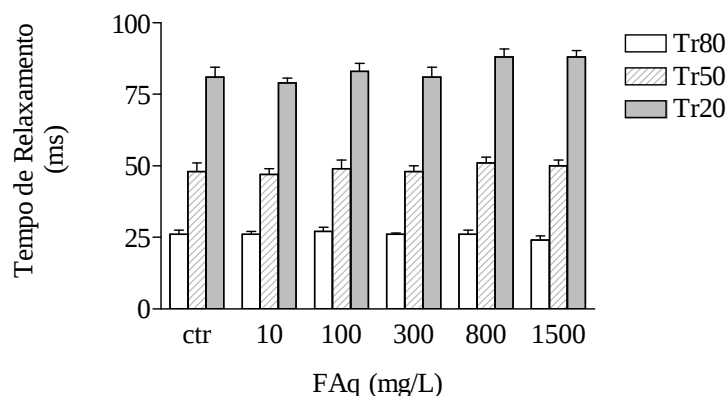


Figura 27- Efeito da FAq sobre os tempos de relaxamento da força atrial. A FAq não alterou estes tempos, comparando com o controle (ctr) ($n = 4$; $29 \pm 0,1^\circ\text{C}$; 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.4.2 Acoplamento eletromecânico

Outro parâmetro avaliado foi o acoplamento eletromecânico (AEM) considerado como sendo o intervalo de tempo existente entre a estimulação elétrica e o pico máximo da força de contração atrial. Como pode ser visto na Fig. 28, a FAq não alterou de forma significativa este intervalo.

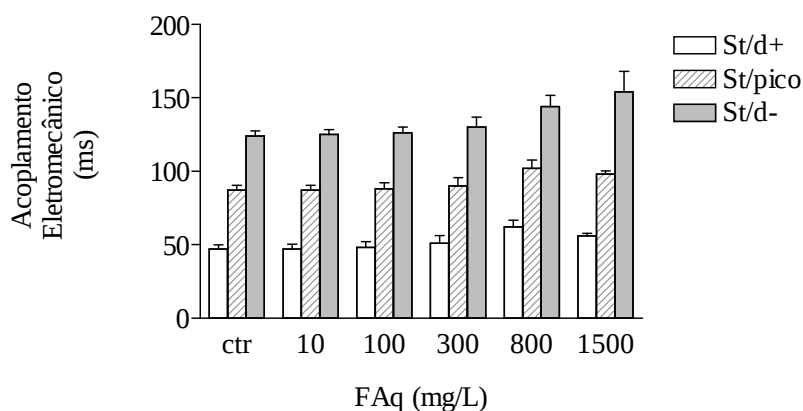


Figura 28 - Efeito da FAq sobre o acoplamento eletromecânico do átrio de cobaia determinado entre o estímulo e a derivada máxima da contração (St/d+), entre o estímulo e o pico da força (St/pico) e entre o estímulo e a derivada máxima do relaxamento (St/d-). A adição da fração ao banho não alterou de forma significativa os tempos de acoplamento quando comparado com os respectivos controles (ctr) ($n = 3$; $29 \pm 0,1^\circ\text{C}$; 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.4.3 Índices de Eficiência da contração e do relaxamento

O efeito da FAq sobre o IEC e o IER do átrio esquerdo de cobaia foram avaliados nas situações controle e teste. Estes parâmetros foram medidos nos níveis de 80, 50 e 20% da amplitude de cada força. As Figs. 29 e 30 mostram que houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do IEC, quando a concentração de FAq no banho foi maior do que 300 mg/L, e do IER, quando a concentração de FAq foi maior que 100 mg/L.

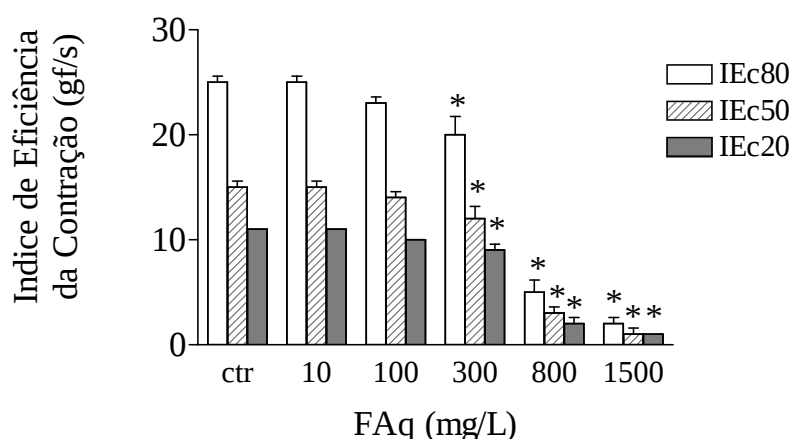


Figura 29- Efeito da FAq sobre o Índice de Eficiência da Contração medido a 80 (IEc80), 50 (IEc50) e a 20% (IEc20) da amplitude da curva de força do átrio esquerdo de cobaia ($n = 3$; $*p < 0,05$; $29 \pm 0,1$ °C; 2 Hz; 400 V; 0,5 ms; ctr: controle).

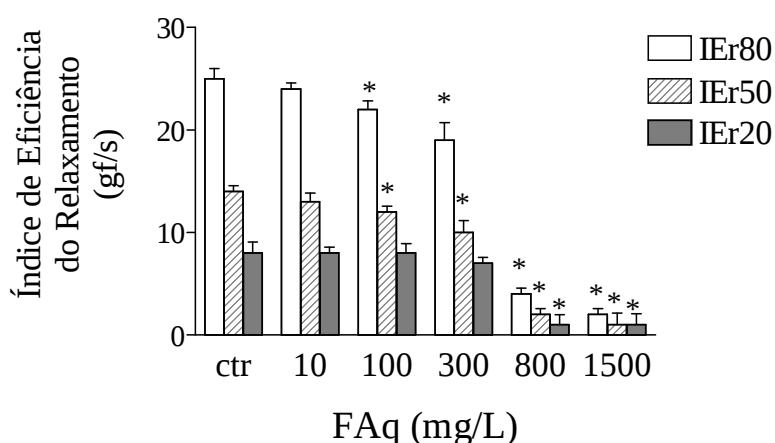


Figura 30 - Efeito da FAq sobre o Índice de Eficiência do Relaxamento medido a 80 (IEr80), 50 (IEr50) e 20% (IEr20) da amplitude da curva de força atrial ($n = 3$; $*p < 0,05$; $29 \pm 0,1$ °C; 2 Hz; 400 V; 0,5 ms; ctr: controle).

5.5 Estudo do mecanismo de ação da FAq sobre a contratilidade atrial

5.5.1 Avaliação da participação dos canais de potássio

5.5.1.1 Prospeção guiada pelo bloqueio muscarínico

A fuga de potássio da célula para o meio extracelular, promovida pela abertura de canais para este íon, é condição importante para a repolarização das células miocárdicas, evento que se traduz mecanicamente pela fase de relaxamento muscular. Como a FAq determina um efeito inotrópico negativo, nós estudamos a possibilidade das correntes sarcolemas de potássio estarem contribuindo para a gênese deste efeito. Isto foi realizado pelos protocolos experimentais abaixo mencionados.

A Fig. 31 mostra traçados obtidos num experimento representativo referente ao efeito inotrópico negativo da FAq. Os registros foram captados antes (Painel A) e depois (Painel B) do bloqueio de receptores muscarínicos pelo sulfato de atropina (1,5 μ M).

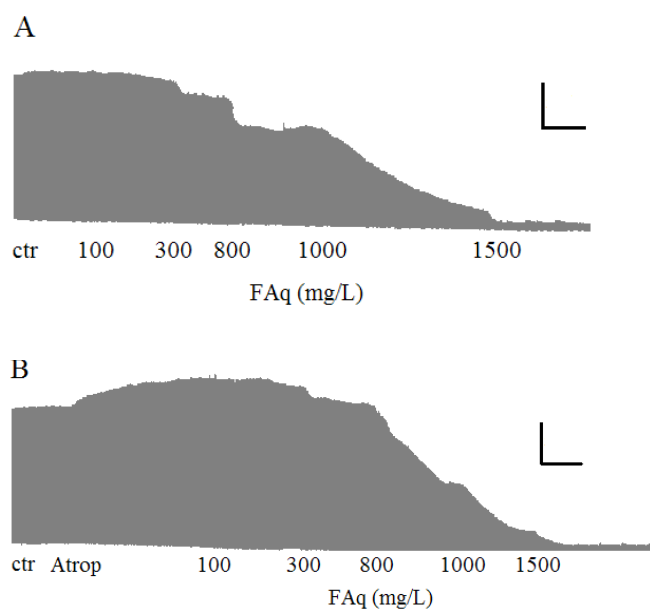


Figura 31 – Registros experimentais representativos do efeito do bloqueio muscarínico sobre a ação inotrópica da FAq, em átrio esquerdo de cobaia. Os traçados foram obtidos em situação controle (A) e após incubação do átrio com 1,5 μ M de atropina (B, Atrop) (ctr: controle; $29,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 2Hz; 400V; 0,5 ms; Barras de calibração: 5 mN, 5 min).

A Fig. 32 resume os resultados obtidos em quatro átrios nos quais se testou a ação do bloqueio muscarínico sobre o efeito inotrópico negativo da FAq. Nela se pode ver que a adição de sulfato de atropina ao banho ($1,5 \mu\text{M}$) não deslocou a curva concentração-efeito relativa ao inotropismo negativo da FAq. A pequena variação da CE_{50} que passou de $568,30 \pm 48,06$ ^[1] ($\text{Hill} = 2,56 \pm 0,22$) no controle, para $600,70 \pm 24,46$ ² mg/L ($\text{Hill} = 2,51 \pm 0,15$) após o bloqueio, não foi, contudo, estatisticamente significativa.

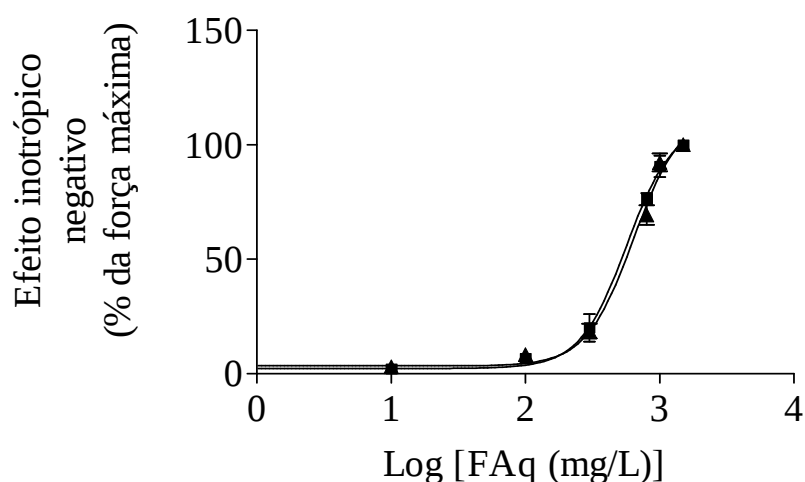


Figura 32 - Efeito do bloqueio muscarínico sobre a ação inotrópica negativa produzida pela FAq, em átrio esquerdo de cobaia. As curvas foram obtidas em situação controle (■) e após incubação da preparação com de $1,5 \mu\text{M}$ de atropina (▲). Os pontos experimentais foram ajustados pela equação de Hill-Langmuir ($n = 4$; $p > 0,05$; $29,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.5.1.2 Prospecção guiada pelo bloqueio de canais para potássio

A Fig. 33 mostra um experimento representativo referente ao efeito inotrópico negativo da FAq antes (painel A) e após (painel B) o bloqueio inespecífico de correntes de potássio feito pelo TEA (20 mM).

¹ Log 568,30 (mg/L) = 2,75

² Log 600,00 (mg/L) = 2,77

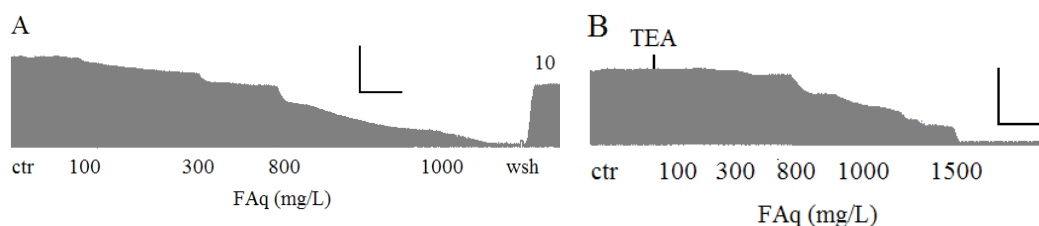


Figura 33 - Traçados representativos do bloqueio de correntes de potássio sobre a ação inotrópica da FAq, em átrio esquerdo de cobaia. Os registros foram obtidos em situação controle (A) e após incubação do átrio com 20 mM de tetraetilamônio (B, TEA) (ctr: controle; $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 2Hz; 400V; 0,5 ms; Barras de calibração: 5 mN, 5 min).

A Fig. 34 mostra que não houve deslocamento significativo da curva concentração-efeito inotrópico negativo da FAq, antes e após o bloqueio inespecífico das correntes de potássio feito pelo TEA. A CE_{50} da FAq passou de $446,72 \pm 45,08$ ^[3] na situação controle, para $636,33 \pm 121,22$ ^[4] mg/L, após o bloqueio ($n = 4$, $p > 0,05$). As constantes de Hill foram $2,54 \pm 0,56$ e $2,37 \pm 0,41$, respectivamente.

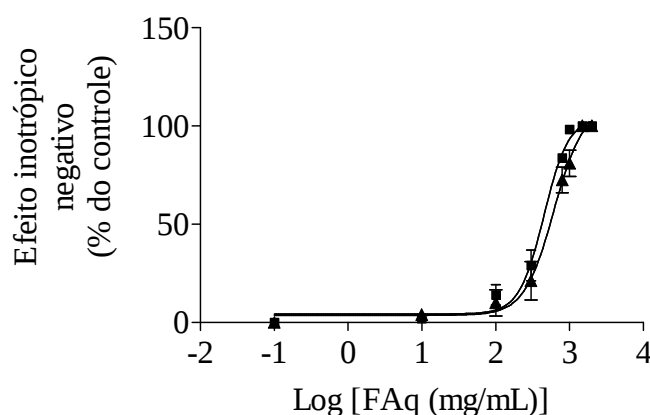


Figura 34 – Efeito do bloqueio de correntes de potássio sobre a ação inotrópica da FAq, em átrio esquerdo de cobaia. As curvas foram obtidas em situação controle (■) e após a incubação da preparação com o 20 mM de TEA (▲). Os pontos experimentais foram ajustados pela equação de Hill-Langmuir ($n = 4$; $p > 0,05$; $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 2 Hz; 400 V; 0,5 ms).

³ Log 446,72 (mg/L) = 2,65

⁴ Log 636,33 (mg/L) = 2,80

5.5.2 Avaliação da participação do cálcio

5.5.2.1 Prospecção guiada pelo fenômeno de Bowditch

A Fig. 35 mostra um experimento representativo em que foi utilizado o protocolo de Nayler & Merrillees (1971) para induzir o aparecimento do fenômeno de Bowditch. Em átrio esquerdo, mantido em cuba para órgão isolado e estimulado elétrica e ritmicamente a 0,2^[5] Hz (estimulação-controle), a frequência de estimulação foi subitamente aumentada para 2,0^[6] Hz (estimulação-teste), a fim de promover uma maior entrada de cálcio nas células do miocárdio. Com isso, a força de contração do átrio tornou-se maior, criando, assim, um incremento de força acima da força controle e que aqui será denominado de ‘overshoot’ de força.

No painel A da Fig. 35 (situação controle), o fenômeno de Bowditch aumentou a amplitude da força em 177% do valor controle. Quando o mesmo teste foi realizado na preparação biológica incubada com 1500 mg/L de FAq, não se pôde observar qualquer ‘overshoot’ de força. Na realidade, sob tal circunstância, a elevação da frequência de estimulação-teste, ao invés de aumentar a força atrial, promoveu uma redução de 27% na amplitude da força em relação à amplitude no controle (Fig. 35B). Este efeito, no entanto, desapareceu parcialmente durante o ‘washout’ (Fig 35C).

⁵ 0,2 Hz = 12 bpm

⁶ 2,0 Hz = 120 bpm

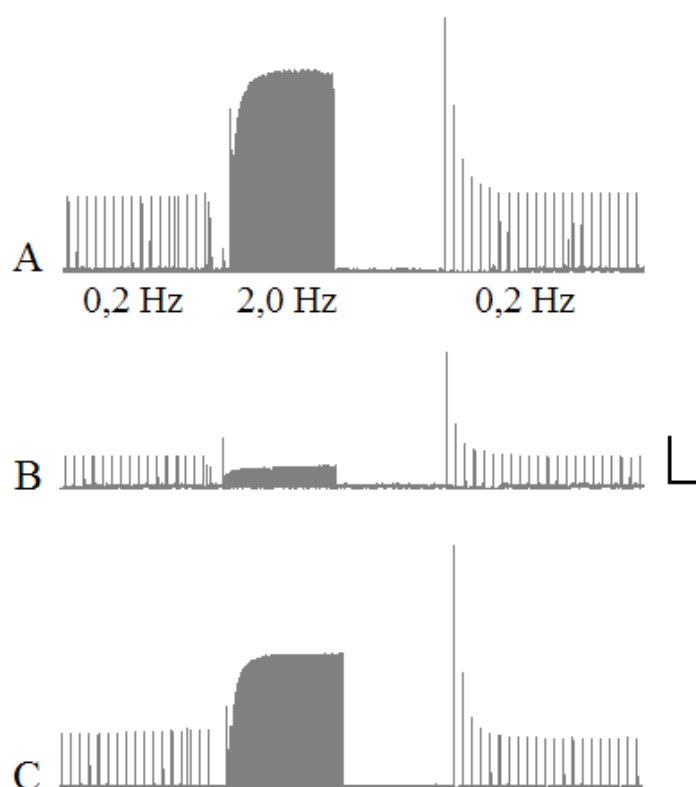


Figura 35 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre o Fenômeno da Escada Positiva (fenômeno de Bowditch) induzido pelo aumento da frequência da estimulação-teste de 0,2 para 2,0 Hz, em átrio esquerdo de cobaia. A: registro-controle obtido na ausência da FAq; B: registro-teste obtido na presença de 1500 mg/L da FAq; C: registro obtido 10 min após a remoção da FAq do banho (‘washout’) ($n = 4$ átrios; $27 \pm 0,1^\circ\text{C}$; estimulação: 400 V; 0,5 ms; 0,2 Hz no controle e 2,0 Hz na fase de teste; Calibração: 5 mN, 40 s).

A Fig. 36 resume os resultados obtidos com o protocolo de Nayler e Merrillees (1971) usado para avaliar o efeito da FAq sobre a entrada de cálcio nas células do miocárdio atrial da cobaia. Trata-se de um gráfico em que se mostra a variação do ‘overshoot’ de força em função da frequência de estimulação nas situações controle, teste (FAq 1500 mg/L), bem como após 30 min de ‘washout’. Nesta figura, pode se observar que, quando a frequência de estimulação-teste foi aumentada gradativamente de $20^{[7]}$ para $120^{[8]}$ bpm, a força no ‘overshoot’ aumentou de forma progressiva (escada positiva ou fenômeno de Bowditch) até alcançar $120 \pm$

⁷ Log 20 (bpm) = 1,30

⁸ Log 120 (bpm) = 2,08

16% acima da amplitude da força registrada durante a baixa frequência (0,2 Hz). Na presença de FAq, contudo, esse aumento da frequência de estimulação ao invés de elevar a amplitude da força atrial, promoveu uma redução estatisticamente significativa. A inversão do fenômeno de Bowditch foi originalmente descrita por Woodworth (1902), tendo, por isso, recebido o nome deste pesquisador. O fenômeno de Woodworth induzido pela incubação do átrio com FAq desapareceu parcialmente durante o ‘washout’.

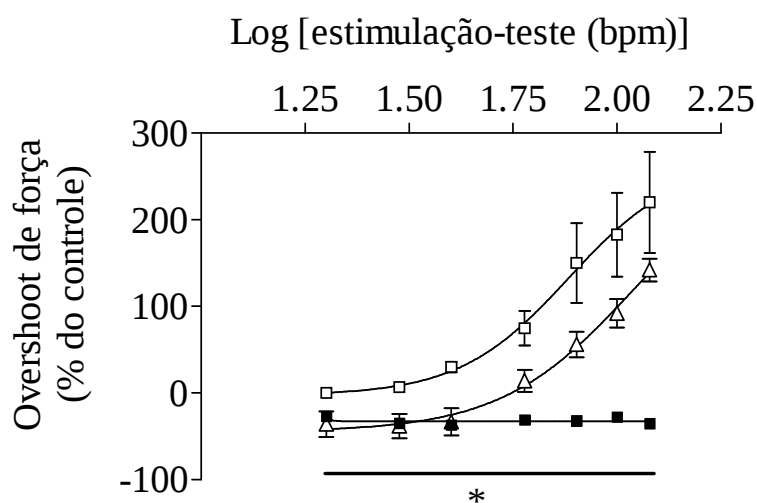


Figura 36 – Efeito da FAq sobre o fenômeno de Bowditch obtido em situação controle (quadrados vazios) e após incubação da preparação com 1500 mg/L de FAq (quadrados cheios). O efeito depressor da FAq foi parcialmente abolido 30 min após iniciado o ‘washout’ (triângulos vazios) (n = 4; 27 ± 0,2°C, *p < 0,05 para comparações com o controle).

5.5.2.2 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o isoproterenol

Com a finalidade de confirmar a ação negativa da FAq sobre a corrente sarcolemal de Ca^{+2} foram realizados experimentos para construir curvas concentração-efeito para o isoproterenol, um potente agonista β -adrenérgico. Foram realizadas medidas antes e depois da incubação do átrio esquerdo de cobaia com 1500 mg/L de FAq, por cerca de 20 min. A Fig. 37 mostra um registro representativo. Nela se pode ver o efeito inotrópico positivo do isoproterenol adicionado ao banho. No painel A, está mostrado o registro em situação controle,

enquanto que, no painel B vê-se o efeito da FAq abolindo o inotropismo positivo produzido pelo isoproterenol.

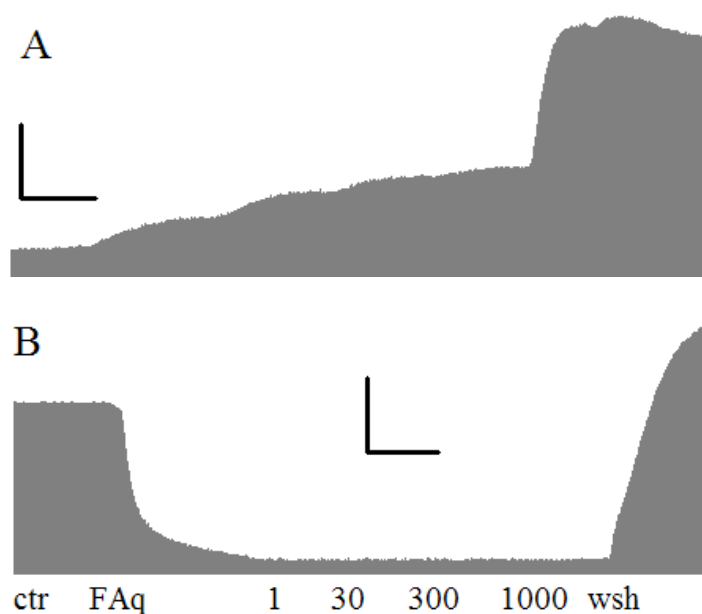


Figura 37 - Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica positiva do isoproterenol, em átrio esquerdo de cobaia. Os traçados foram obtidos em situação controle (A) e após incubação do átrio com 1500 mg/L de FAq (B) (ctr: controle; wsh: washout; $29,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; Estimulação: 2Hz; 400V; 0,5 ms; Barras de calibração: 5 mN, 5 min).

A Fig. 38 mostra que a FAq aboliu o efeito inotrópico positivo do isoproterenol em átrio de cobaia, tal como exemplificado na Fig. 37. A CE_{50} média do efeito inotrópico positivo do isoproterenol, em situação controle, foi de $11,19^{[9]} \pm 1,20$ pM com constante de Hill igual a 1,2. A pré-incubação das preparações com 1500 mg/L de FAq aboliu completamente o efeito inotrópico do isoproterenol.

⁹ $\text{Log } 11,19 \text{ (pM)} = 1,04$

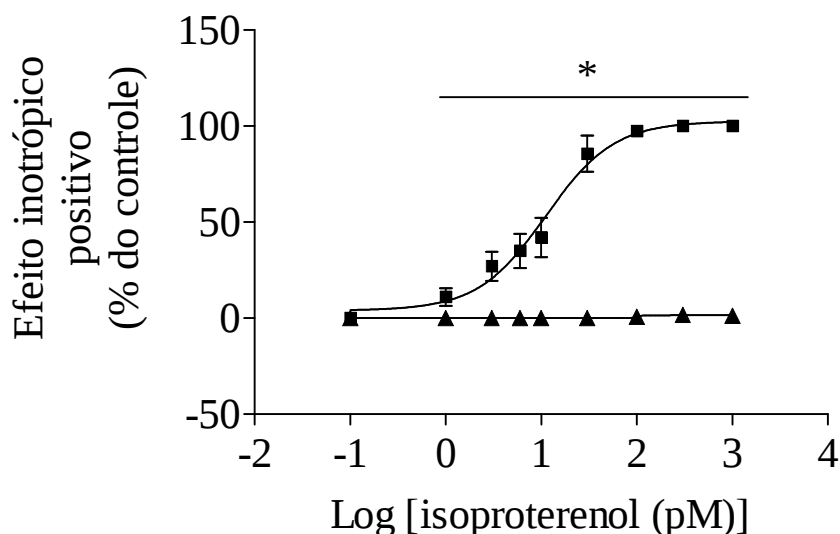


Figura 38 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica positiva produzida pelo isoproterenol, em átrio esquerdo de cobaia. As curvas foram obtidas em situação controle (■) e após incubação da preparação com 1500 mg/L de FAq (▲) (n = 3; *p < 0,05; 29,0 ± 0,1°C; Estimulação: 2Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.5.2.3 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o CaCl₂

Os resultados obtidos com o protocolo de Nayler; Merrillees (1971) mostrados anteriormente (Fig. 36) sugerem que a FAq altera as correntes sarcolemas de cálcio. Para elucidar o mecanismo celular envolvido, foram realizados experimentos em átrio esquerdo de cobaia, medindo-se a amplitude da força de contração com a preparação submetida a diferentes concentrações de cálcio extracelular (0,5 a 7,0 mM). A elevação do cálcio externo promove um aumento nas correntes de entrada desse íon nas células miocárdicas, o que aumenta a força de contração desse tecido. Assim, se a FAq bloquear os canais de cálcio, tal aumento de força não seria visto.

A Fig. 39 mostra um exemplo representativo desses experimentos. Note-se nela que a elevação progressiva do cálcio no banho (Fig. 39A) produziu concomitantemente aumento da força de contração atrial, porém, quando a avaliação foi feita em átrio pré-incubado com 1500 mg/L de FAq (Fig. 39B), o efeito do aumento do cálcio extracelular, nas mesmas concentrações aplicadas antes da adição da FAq, foi abolido. Somente com concentrações maiores que 8,0 mM o efeito inotrópico positivo do CaCl₂ reapareceu.

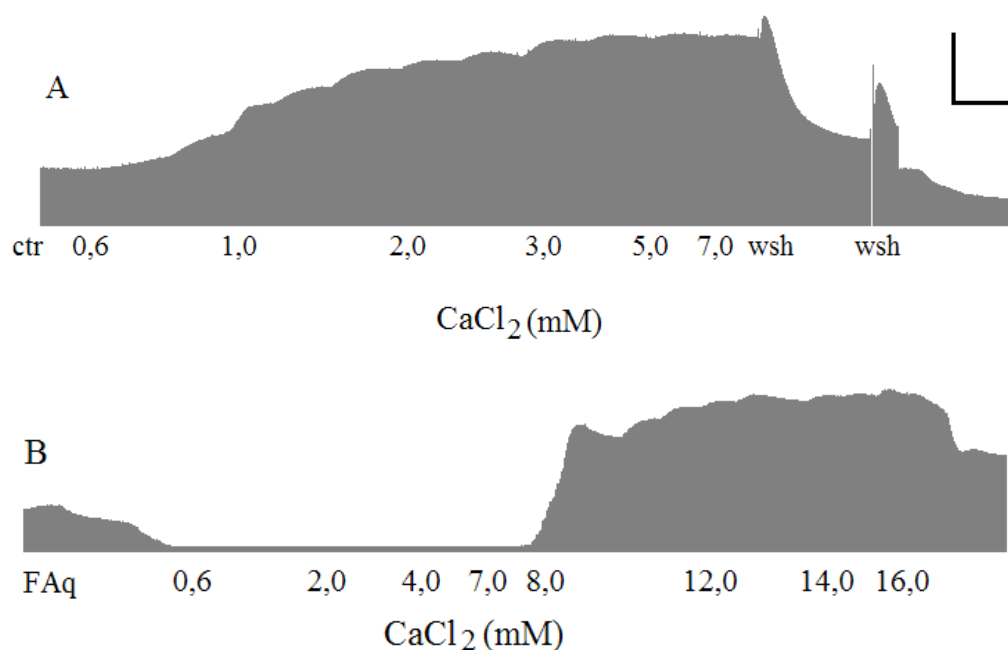


Figura 39 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo CaCl_2 , em átrio esquerdo de cobaia. Os traçados foram obtidos em situação controle (A) e após incubação do átrio com 1500 mg/L de FAq (B) (ctr: controle; wsh: washout; $29,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 2Hz; 400V; 0,5 ms; Barras de calibração: 10 mN, 5 min).

Na Fig. 40 estão plotados os resultados obtidos com a variação do cálcio extracelular. Nela se pode ver que a FAq (1500 mg/L) deslocou para a direita a curva concentração-efeito do CaCl_2 , aumentando a CE_{50} de $1,12^{[10]} \pm 0,07$ (Hill = 1,5) para $7,23^{[11]} \pm 0,47$ mM (Hill = 7,4) ($n = 3$; $p < 0,05$).

¹⁰ $\text{Log } 1,12 \text{ (mM)} = 0,04$

¹¹ $\text{Log } 7,23 \text{ (mM)} = 0,85$

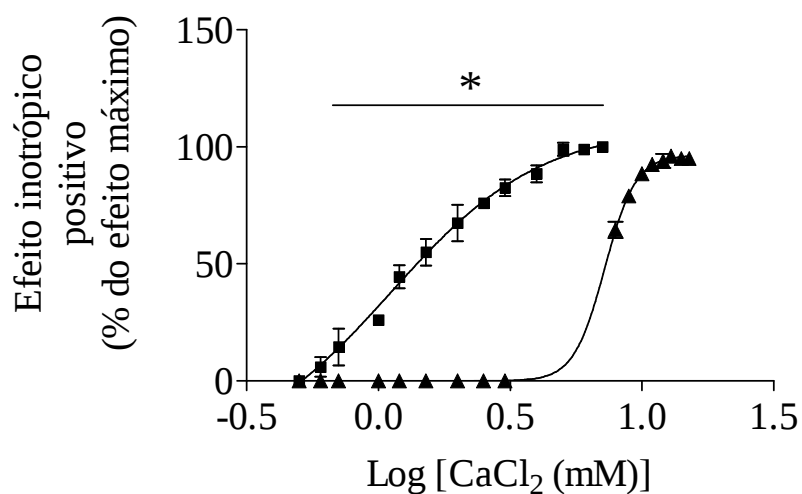


Figura 40 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo CaCl₂, em átrio esquerdo de cobaia. As curvas foram obtidas em situação controle (■) e após incubação da preparação com 1500 mg/L de FAq (▲) (n = 3; *p < 0,05; 29,0 ± 0,1°C; Estimulação: 2Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.5.2.4 Prospecção guiada pela curva concentração-efeito para o (-) BAY K8644

Para confirmar a ação depressora da FAq sobre a corrente de cálcio sarcolemal o efeito da FAq sobre o inotropismo positivo promovido pelo (-) BAY K8644 foi avaliado. Este composto é um agonista para os canais de Ca⁺² do tipo-L. A Fig. 41A mostra um registro experimental da força de contração atrial avaliada em diferentes concentrações de (-) BAY K 8644 adicionado ao banho. Pode-se observar na Fig. 41B, que a FAq (1500 mg/L) aboliu completamente a força atrial mesmo sob a ação do (-) BAY K 8644.

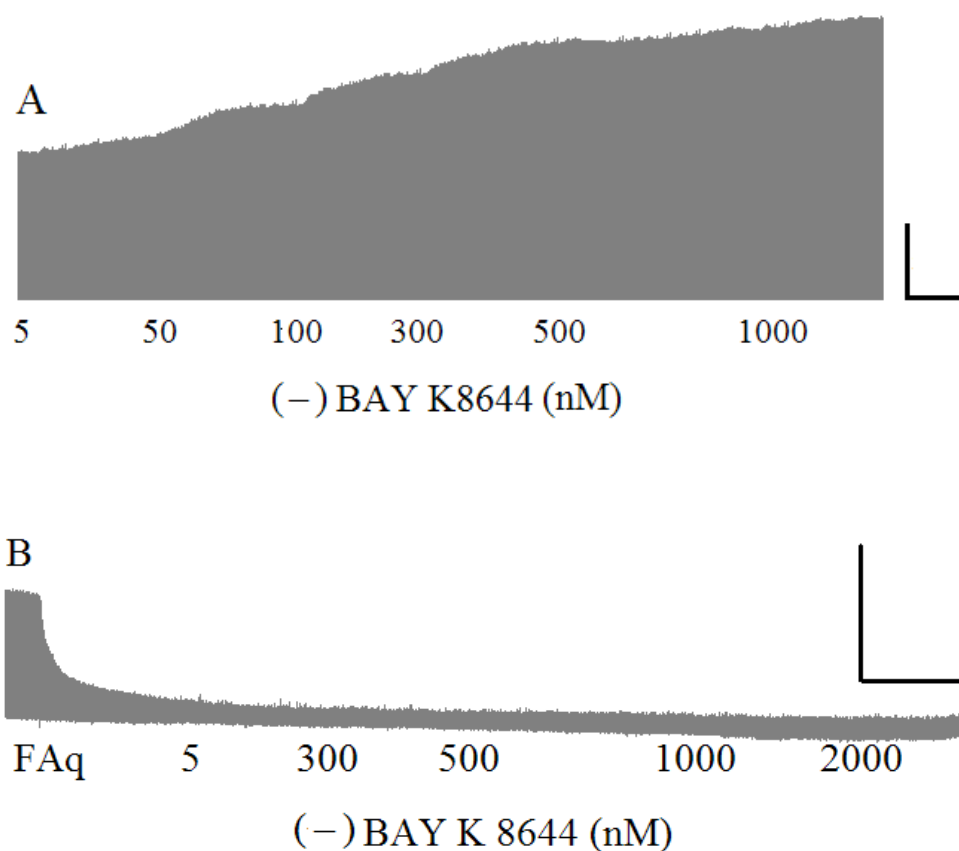


Figura 41 – Traçados representativos do efeito da FAq sobre a ação inotrópica do (-) BAY K8644, em átrio esquerdo de cobaia. Os traçados foram obtidos em situação controle (A) e após incubação do átrio com 1500 mg/L de FAq (B) ($29,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 2Hz; 400V; 0,5 ms; Barras de calibração: em A: 5 mN, 10 min; em B: , 2,5 mN, 10 min).

A Fig. 42 mostra que o efeito da FAq visto no experimento representativo da Fig. 41, também se repetiu em três átrios testados. A CE_{50} média do efeito inotrópico positivo do (-) BAY K8644, em situação controle, foi de $77,19^{[12]} \pm 1,07$ nM com constante de Hill igual a 1,3. A pré-incubação das preparações com 1500 mg/L de FAq aboliu completamente o efeito inotrópico do (-) BAY K8644 na faixa de concentrações empregadas.

¹² $\text{Log } 77,19 \text{ (nM)} = 1,88$

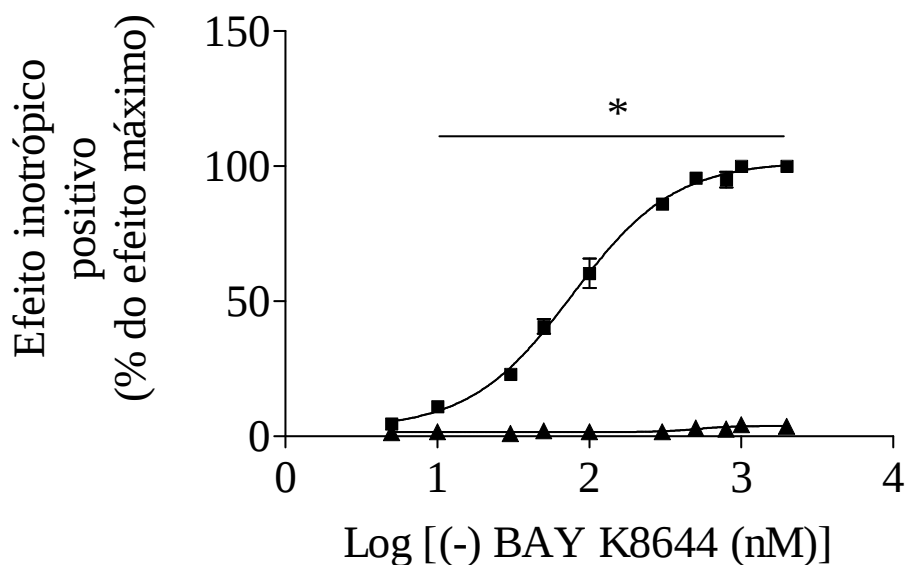


Figura 42 - Efeito da FAq sobre a ação inotrópica produzida pelo (-) BAY K8644, em átrio esquerdo de cobaia. As curvas foram obtidas em situação controle (■) e após incubação da preparação com 1500 mg/L de FAq (▲) (n = 3; *p < 0,05; 29,0 ± 0,1°C; Estimulação: 2Hz; 400 V; 0,5 ms).

5.6 Efeito da FAq sobre o pico do transiente de cálcio citoplasmático e sobre o decaimento da fluorescência relativa a este íon

5.6.1 Prospecção guiada pela fluorescência ao cálcio

A Fig. 43, Painel A, mostra, em representação a cores, as variações da concentração de cálcio livre no citoplasma de um cardiomiócito incubado com a sonda fluorescente FLUO 4AM e submetido à estimulação elétrica de campo. Neste Painel, estão os resultados obtidos com três estímulos aplicados antes de a célula ser incubada com 48 mg/L de FAq e também com três estímulos aplicados ao cardiomiócito após este ter sido submetido à ação da FAq. A cor vermelha foi usada para representar uma elevada concentração de cálcio livre no citoplasma, enquanto que a azul serviu para sinalizar a ocorrência de uma baixa concentração deste íon no citoplasma. Denomina-se por F_0 , a fluorescência basal da célula, isto é., aquela que ocorre quando ela está em repouso e temporalmente afastada do último estímulo

elétrico a ela aplicado. Com a aplicação de estímulos elétricos a liberação do cálcio no meio intracelular promove a ligação do mesmo com a sonda, que ao ser estimulada pelo laser emite fluorescência. Esta manifestação foi sempre analisada ao longo de uma linha disposta longitudinalmente no cardiomiócito. Com a aplicação do estímulo e com a consequente elevação da concentração de cálcio no citoplasma, o transiente intracelular de cálcio pode ser analisado. A princípio, ele é muito intenso (pico do transiente) para, em seguida, decair por ação dos sistemas de remoção de cálcio. A redução do nível de cálcio livre vai progressivamente sendo colorida como azul. As variações do nível de cálcio livre no citoplasma foram então convertidas nas curvas mostradas no Painel B da Fig. 43. Deste modo, foi possível inferir-se sobre a quantidade máxima do cálcio, medindo-se, de forma relativa, a amplitude do pico do transiente intracelular de cálcio. Em seguida, os traçados permitiram que a eficiência dos sistemas responsáveis pela remoção do cálcio livre para o retículo sarcoplasmático, mitocôndrias ou para outros compartimentos, pudesse ser avaliada.

Os resultados das medidas de fluorescência estão exibidos no Painel C e D da Fig. 43. Nela, o painel C representa a intensidade relativa (F/F_0) da fluorescência gerada pelo transiente de cálcio citoplasmático e no painel D a eficiência do mecanismo de remoção deste cálcio. A quantificação desta eficiência foi feita pela determinação do tempo necessário para que o decaimento da fluorescência decrescesse até 90% (T90) do seu valor de pico.

A Fig. 43, Painel C, mostra que a FAq reduziu a amplitude do pico da fluorescência de $4,66 \pm 1,17$ para $3,74 \pm 1,00$ u.a. ($p < 0,05$), o que representa 19,76%, porém não modificou a eficiência dos sistemas de remoção do cálcio citoplasmático, o que nos permite supor que a FAq não promove alteração na atividade da SERCA, da bomba de cálcio sarcolemal, nem dos trocadores de cálcio que operam na membrana celular.

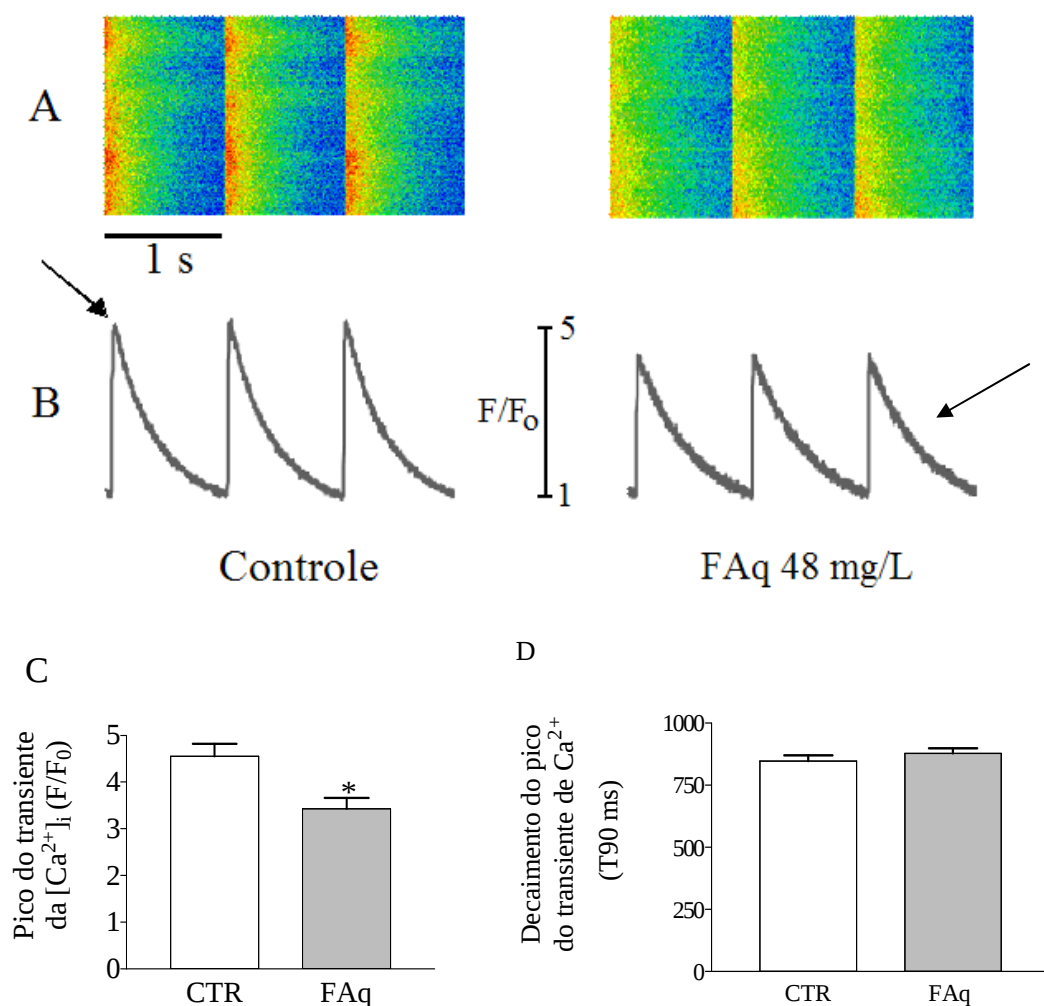


Figura 43 - Efeito da FAq sobre o valor do pico do transiente intracelular de Ca^{+2} , bem como do seu decaimento em cardiomiócito de camundongo. Painel A: fluorescência (confocal “line-scan”) colorida por computador, representando a emissão de cardiomiócito incubado com FLUO 4AM, em situação controle e após a adição de 48 mg/L de FAq (vermelho: alta concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma; azul: baixa concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma; Painel B: curvas representando os transientes da concentração de cálcio citoplasmático, em cardiomiócito estimulado. Setas indicam o pico do transiente e a fase de decaimento deste pico. Painel C: Efeito da FAq sobre o pico do transiente de Ca^{2+} e também sobre o seu decaimento (ctr: controle, n = 42 células; FAq: n = 35 células; n = 4 animais; *p < 0,05; Estimulação 30 V, 1 Hz).

5.6.2 Efeito da FAq sobre a remoção do cálcio citoplasmático livre

5.6.2.1 Prospecção guiada pela equação de Conde-Garcia

A Fig. 44 mostra os resultados obtidos em quatro átrios ensaiados para a determinação da velocidade de decaimento das primeiras contrações obtidas após a pausa de estimulação proposta no protocolo de Nayler e Merrillees (ver metodologia). Esta verificação foi realizada para avaliar a velocidade de remoção do cálcio livre no meio intracelular. Os resultados, obtidos em situação controle ou na presença da FAq (1500 mg/L), mostraram que esta fração não modificou a forma com que decaíram as forças atriais referentes às primeiras contrações (painel superior). A logaritimação dessas curvas mostrou que, em ambas as situações, os coeficientes angulares das retas obtidas no controle e no teste, foram idênticos (painel inferior), confirmando os achados com os estudos do decaimento da fluorescência nos quais se empregou a técnica de fluorescência.

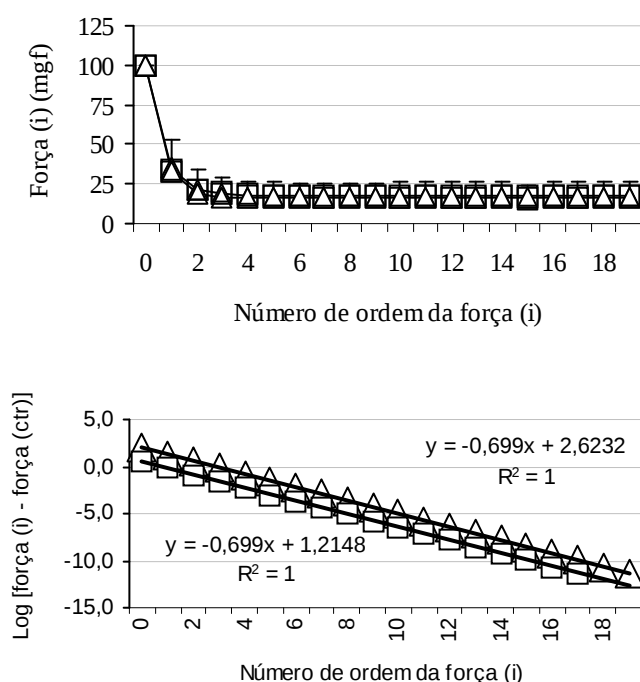


Figura 44 – Decaimento da amplitude das primeiras forças atriais, obtidas após a pausa de estimulação (protocolo de Nayler & Merrillees). As medidas foram feitas em situação controle (triângulos) e no teste com FAq (quadrados). Os pontos experimentais foram ajustados pela equação de Conde-Garcia ($n = 4$; $p > 0,05$; $29,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; Estimulação: 400V; 0,5ms; 0,2 Hz).

5.7 Efeito da FAq sobre as correntes de cálcio do tipo L

5.7 Prospecção guiada pelo ‘patch clamp’

A Fig. 45 mostra o efeito da FAq (48 mg/L) sobre a entrada de cálcio nas células miocárdicas. O painel A ilustra traçados representativos desta corrente, obtidos em cardiomiócito de camundongo e registrados com pulso-teste de 0 mV. Nele estão apresentados três registros obtidos em situação controle (1), teste (2) e também após o washout (3). No Painele B está mostrado um gráfico em que o curso temporal da densidade dessa corrente foi plotado. Pode-se ver que a FAq reduziu em cerca de 23%, tendo a densidade de corrente variado de $-6,64 \pm 0,02$ A/F (1) para $-5,07 \pm 0,04$ A/F (2). Este efeito foi revertido parcialmente com o washout, tendo a densidade de corrente aumentado para $-5,74 \pm 0,14$ A/F (3). O Painele C resume o efeito da FAq (48 mg/L) em células isoladas de diferentes camundongos. Neste painel, pode se ver que a FAq reduziu a densidade de corrente de cálcio de $-6,29 \pm 0,34$ para $-4,9 \pm 0,2$ A/F ($n = 5$ animais, $p < 0,05$).

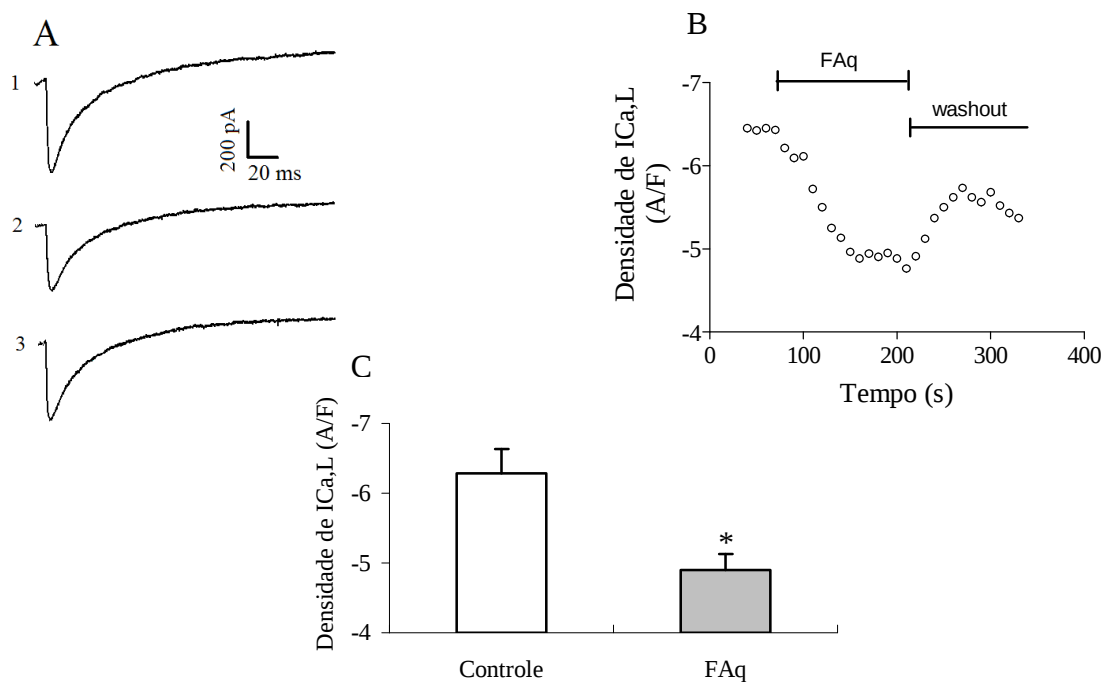


Figura 45 – Efeito da FAq (48 mg/L) sobre a densidade de corrente de cálcio tipo L medida em cardiomiócito de camundongo. Painele A: traçados da corrente de cálcio em situação controle (1), teste (2) e washout (3); Painele B: curso temporal da densidade de corrente de cálcio referente ao estudo no painel A; Painele C: densidade de corrente de cálcio tipo L obtida em potencial de 0 mV ($n = 5$ células, 5 animais; * $p < 0,05$; Estimulação: 30 V, 2 ms, 1 Hz).

6 DISCUSSÃO

Importância do estudo. Preparados de *Costus spiralis* têm sido usados pela medicina popular como diurético e antilitiásico (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1965), fato que justifica o esforço empregado no presente trabalho. Na Mata Atlântica, o infuso das folhas é usado no controle da hipertensão arterial e o decocto tem sido empregado contra síndromes diarréicas. Infusões obtidas dos colmos são usadas nos casos de hepatites e cólicas intestinais (STASI; LIMA, 2002). Um levantamento bibliográfico sobre a *Costus spiralis*, feito nos bancos de dados PUBMED, BIREME e SCIENTEDIRECT, recuperou 28 referências relativas aos efeitos biológicos e ao uso popular de preparados de *Costus spiralis*. Apesar dos relatos informarem sobre efeitos antiurolítico, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, antileishmânia, citotóxico; anti-inflamatório, imunomodulador; antiedematogênico e antiespasmódico, nada pôde ser encontrado com respeito a um possível efeito sobre o músculo cardíaco. Esta lacuna serviu de reforço para justificar o pioneirismo deste estudo.

Determinação da fração mais potente obtida das folhas de *Costus spiralis*. Neste trabalho, foram avaliados o efeito inotrópico do EBH e de três frações dele obtidas. Os resultados mostraram que todos os preparados testados reduziram, de forma dependente de concentração, a força de contração do átrio de mamífero. Entre as frações clorofórmica, acetato de etila e aquosa, esta última foi a mais potente. Este achado indica que a substância cardioativa de *C. spiralis*, é de alta polaridade.

Características do efeito inotrópico da FAq. A FAq e as demais frações, deprimem a contratilidade do miocárdio (Figs. 24 e 25). Infelizmente, não há relato na literatura sobre a ação inotrópica ou lusitrópica de preparados de *C. spiralis*. Porém, Di Stasi; Lima (2002) relataram que a infusão das folhas dessa planta tem sido empregada para controlar hipertensão arterial. De certa forma, os nossos resultados podem em parte explicar este efeito, pois a ação depressora sobre o músculo cardíaco pode também ocorrer na musculatura vascular. O efeito inotrópico negativo da FAq desapareceu após a fração ter sido removida do banho (Figs. 24 e 25), sugerindo que a(s) substância(s) ativa(s) nela contida(s) não se liga(m) fortemente ao sítio sobre o qual atua(m), nem modifica(m), de forma irreversível, qualquer etapa da bioquímica celular.

Determinação do conteúdo de sódio e potássio na FAq. Para estudar o mecanismo de ação do efeito depressor da FAq sobre a contratilidade do miocárdio atrial, iniciamos por determinar a quantidade de potássio e sódio existente nesta fração. Os resultados mostraram que, nos testes em que se empregou a maior concentração de FAq (1,5 g/L), as concentrações de potássio e de sódio da solução de Tyrode à qual ela foi adicionada aumentaram de 2,70 para 5,56 mM e de 120,00 para 120,23 mM, respectivamente. Estas variações, por si mesmas, são pequenas para explicar a ação depressora da FAq sobre a contratilidade. Vasconcelos et al. (2005) mostraram que a elevação do potássio extracelular para até oito mM não modificava a força de contração do miocárdio.

Prospecção fitoquímica e efeitos inotrópicos de constituintes. Uma vez que as variações iônicas da solução-teste meio externo não foram suficientes para explicar os resultados inotópicos da FAq, fomos buscar resposta na composição fitoquímica desta fração. Albuquerque (1989), Corrêa et al. (1998), Vieira; Albuquerque (1998) encontraram por decocção da planta inteira, as seguintes classes de substâncias: taninos, sistosterol, saponinas, sapogeninas, mucilagens, pectinas, inulina e ácido oxálico, enquanto que Braga et al. (2006) descreveu a presença de flavonóides, esteróis, e alcalóides, no extrato metanólico das folhas. Na nossa prospecção fitoquímica encontramos na FAq as seguintes classes de metabólitos secundários: polifenóis (flavonóides, xantonas, flavonas, , flavonóis, flavanonóis, flavanonas), saponinas e taninos, tal como mostrado na Tabela 7. Houve apenas concordância parcial entre os metabólitos encontrados, podendo ter sido causa da diferença os diferentes métodos de extração empregados.

Efeito da FAq sobre parâmetros da contração. A avaliação do efeito da FAq sobre os parâmetros contráteis do miocárdio atrial da cobaia mostrou que ela não altera os Tempo de Contração (Tc), nem de Relaxamento (Tr) (Figs. 26 e 27). Também não modificou o Tempo de Acoplamento Eletromecânico (AEM) (Fig. 28). Contudo, em relação aos Índices de Eficiência da Contração (IEc) e do Relaxamento (IEr) (Figs. 29 e 30), a FAq promoveu uma diminuição destas variáveis. Este achado sugere que a FAq altera a cinética dos eventos intracelulares que levam ao processo de contração e de relaxamento muscular. O fato de o IEc somente ter diminuído com FAq maior que 300 mg/L, enquanto que o IEr ter sido reduzido com a FAq de 100 mg/L sugere que o mecanismo celular ligado ao relaxamento é ligeiramente mais

sensível à FAq do que aquele que produz a contração. Ainda mais foi visto na Fig. 30 que mesmo a FAq em concentração de 100 ou de 300 mg/L não modificou o IER20, sugerindo que os últimos eventos do processo que leva ao relaxamento (remoção do Ca^{2+} pela SERCA, defosforilação do fosfolaban e redução da afinidade da TnC ao Ca^{2+}) são menos sensíveis do que as primeiras (fosforilação do fosfolamban e da TnI pela PKA e diminuição da afinidade TnI – Ca^{2+}).

Estudo sobre o mecanismo de ação da FAq.

Prospecção sobre o envolvimento do potássio

FAq versus receptores muscarínicos e canais de potássio. É sabido que a acetilcolina reduz a força de contração atrial. Assim, a FAq poderia agir de forma semelhante à ação deste agonista muscarínico. Para testar esta hipótese, foram realizados experimentos bloqueando receptores muscarínicos com atropina (Figs. 31 e 32), bem como os canais de potássio com o TEA (Figs. 33 e 34). Os resultados mostraram que, nem o bloqueio dos receptores, nem o bloqueio de canais de potássio, modificaram a resposta inotrópica do átrio à FAq. Isto indica, que o mecanismo de ação inotrópica da FAq não envolve os mecanismos de gerenciamento do potássio.

Prospecção sobre o envolvimento do cálcio

Efeito da FAq sobre o fenômeno de Bowditch. A Fig. 36 mostra que FAq aboliu o ‘overshoot’ de força visto na fase em que a frequência de estimulação do átrio foi aumentada de 0,2 para 2 Hz (Fenômeno de Bowditch). Nela se vê que, com a FAq (1500 mg/L), houve o surgimento do clássico fenômeno descrito por Woodworth, que se caracteriza por uma redução da amplitude da força em relação ao seu valor em situação controle. Nayler e Merrillees (1971), estudando os efeitos do tiopental sódico sobre o miocárdio, encontraram um efeito semelhante ao que neste trabalho foi obtido para a FAq. Estes pesquisadores, usando cálcio radioativo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$), concluíram que a abolição do “overshoot” de força produzida pelo tiobarbitúrico estava relacionada a uma diminuição da entrada de Ca^{2+} nas células. Esta conclusão também foi alcançada por Grossaman e Furchgott (1964). Embora a

duração de cada potencial de ação esteja diminuída com a redução dos intervalos entre os batimentos cardíacos, o efeito que predomina sobre o influxo de Ca^{+2} é o do número elevado de platôs por unidade de tempo. Por isso, a concentração intracelular de Ca^{+2} tende a aumentar (BERNE; LEVY, 2001; LEE, 1987). Isto nos permitiu sugerir que a redução do “overshoot” de força está associada à inibição de correntes de entrada de cálcio, o que explica o efeito inotrópico depressor da FAq.

A redução de força produzida pela FAq no miocárdio atrial da cobaia não foi, contudo, um efeito permanente, pois ele pôde ser revertido durante o “washout” (Fig. 35C). Isto sugere que os componentes ativos presente na FAq devem se ligar com baixa afinidade ao sítio biológico desta fração. Os resultados com o protocolo de Bowditch indicam que a FAq age por redução da entrada de cálcio nas células do miocárdio. Por isso, fomos investigar com outros protocolos esta hipótese (isoproterenol, CaCl_2 e (-) BAY K8644).

Efeito da FAq sobre a curva inotrópica do isoproterenol. A Fig. 38 mostra que a adição de FAq ao banho aboliu completamente a curva concentração-efeito para o isoproterenol. Como o isoproterenol é um agonista de receptores β -adrenérgicos que, quando estimulados, abrem canais de cálcio, via AMPc, então o antagonismo exercido pela FAq sugere que o local de ação desta fração seja ou os receptores β -adrenérgicos, ou a via de produção do AMPc pela adenilato ciclase, ou a ação do AMPc sobre os canais de cálcio. Mesmo adicionando-se ao banho concentrações elevadas de isoproterenol, o efeito inotrópico positivo deste agonista, não foi restaurado. Este fato sugere que, entre as moléculas cardioativas da FAq e as do isoproterenol, não existe um mecanismo de competitividade em relação ao alvo biológico.

Efeito da FAq sobre a curva inotrópica do CaCl_2 . A Fig. 40 mostra que a adição de FAq ao banho deslocou para a direita a curva concentração-efeito para o CaCl_2 , indicando que a FAq antagonizou o efeito inotrópico positivo do CaCl_2 . Além disso, ocorreu um aumento da constante de Hill, o que sugere que foram necessárias mais moléculas de CaCl_2 interagindo com o alvo biológico para produzir o mesmo efeito visto na situação controle. Este fato indica que a FAq reduz a eficácia do complexo agonista-receptor o que, em termos de corrente de entrada de cálcio nas células, significa que ela reduz tais correntes. Como elevadas concentrações de CaCl_2 , foram capazes de restaurar o efeito inotrópico positivo deste sal, efeito que

havia sido abolido pela FAq, pode se pensar que exista um mecanismo competitivo entre o CaCl_2 e as moléculas cardioativas da FAq, em relação a um alvo biológico.

Efeito da FAq sobre a curva inotrópica do (-) BAY K8644. A Fig. 42 mostra que a adição de FAq ao banho aboliu completamente a curva concentração-efeito para o (-) BAY K8644, cuja CE_{50} era no controle igual a $77,19 \pm 1,07$ nM (Hill = 1,3). Como o (-) BAY K8644 é um agonista de canais de cálcio tipo L, então o antagonismo exercido pela FAq sugere que o local de ação desta fração sejam estes canais. Mesmo adicionando-se ao banho concentrações elevadas de (-) BAY K8644, o efeito inotrópico positivo deste agonista, não foi restaurado. Este fato sugere que, entre as moléculas cardioativas da FAq e as do (-) BAY K8644, não existe um mecanismo de competitividade em relação a um alvo biológico comum. O (-)BAY K8644 aumenta a condutância do canal de cálcio tipo L por interagir com a sub-unidade α_1 do Ca_v que é a sub-unidade formadora do poro hidrofílico e que fornece o sítio de ligação extracelular para quase todos os agonistas e antagonistas de cálcio, a exemplo dos derivados de dihidropiridinas tal como o BAY K8644 (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Avaliação do efeito da FAq sobre o transiente e o decaimento do transiente intracelular de cálcio. Os resultados experimentais até aqui descritos apontam na direção de que o mecanismo de ação da FAq deve envolver eventos relacionados ao cálcio intracelular. Para testar mais detalhadamente esta hipótese, nós avaliamos o seu efeito sobre o transiente intracelular de cálcio. O experimento foi feito com microscopia confocal de varredura a laser, usando como sonda fluorescente o FLUO 4AM. Os resultados estão mostrados na Fig. 43. Nela se pode ver que a FAq reduziu em aproximadamente 20% o pico de fluorescência o que corresponde a reduzir a concentração do cálcio intracelular livre. Este efeito pode ser explicado por sua ação sobre a corrente de cálcio tipo L ou por uma diminuição na liberação do cálcio proveniente do RS. Para testar se a FAq poderia exercer alguma ação sobre o bombeamento de cálcio para o RS, nós investigamos a velocidade de remoção do cálcio citoplasmático livre, após uma contração.

Avaliação do efeito da FAq sobre a remoção do cálcio citoplasmático livre. A Fig. 44 mostra a evolução das amplitudes das primeiras contrações obtidas após a pausa e o retorno à frequência de estimulação controle, tal como vistas no protocolo experimental proposto por Nayler & Merrill (1971). A redução

progressiva da amplitude destas contrações foi interpretada como sendo decorrente da redução da concentração de cálcio livre no citoplasma, disponível para a contração. Os resultados mostraram que a velocidade com que essas contrações diminuíram batimento-a-batimento foi a mesma no controle e sob a ação da FAq (Fig. 44). Este achado sugere que a FAq não modifica a dinâmica dos sistemas que operam para remover o cálcio livre no citoplasma. Esta conclusão foi reforçada pelos resultados obtidos com a logaritmação da equação de Conde-Garcia, pois os coeficientes angulares - parâmetro que reflete a velocidade de variação da força - apresentaram-se com o mesmo valor no controle e após a incubação com a FAq. A conclusão de que FAq não interfere com a remoção do cálcio citoplasmático foi reforçada também pelos resultados obtidos com o decaimento da fluorescência do transiente intracelular de cálcio (Fig. 43, Painel C), pois não houve diferença no tempo (T90) do decaimento da fluorescência relativa ao cálcio.

Avaliação do efeito da FAq sobre as correntes de cálcio do tipo L. A Fig. 45 mostra que, sob a ação da FAq (48 mg/L), a densidade de $I_{Ca,L}$ diminuiu cerca de 23%. Esta medida confirma o que foi obtido com os protocolos experimentais empregados para avaliar o papel do cálcio no mecanismo de ação da FAq. O fato de as correntes de cálcio terem sido reduzidas pela ação da FAq indica que esta fração age na contratilidade do miocárdio por antagonizar as correntes de entrada transportadas pelo cálcio.

Que substâncias presentes da FAq podem agir impedindo a entrada de cálcio nas células?

Flavonóides versus miocárdio. Entre as classes de substâncias presentes na FAq, chamou-nos a atenção a presença de flavonóides, pois a literatura científica tem mostrado que substâncias pertencentes a esta categoria podem interferir com as correntes sarcolemas de cálcio e potássio. Chiang et al. (1996) relataram que a genisteína – uma isoflavona - inibe a I_{Ca} em miócito ventricular de cobaia. Este efeito parece estar associado à redução da probabilidade de estado aberto dos canais de cálcio induzida pela genisteína, sem contudo, afetar o tempo de abertura médio destes canais, nem as variações de condutância da membrana celular como proposto por Katsube et al. (1998). Achados semelhantes foram também obtidos por outros grupos (BELEVYCH et al., 2002; JI et al., 2004). Estes resultados, no entanto, conflitam com o que foi relatado por Li et al. (2008) e Wu et al. (2008) que

descreveram uma ação inotrópica positiva sobre o miocárdio de cobaia. Contudo, o fato de a genisteína relaxar a musculatura vascular (FIGTREE et al., 2000) e de reduzir a frequência espontânea do nódulo sinusal do coelho (MA et al., 2002) reforça os achados dos grupos que descreveram sua ação depressora sobre o cronotropismo e o inotropismo do coração.

A biocanina A e a floretina relaxam as artérias coronárias do coelho (FIGTREE et al., 2000), porém não encontramos qualquer referência sobre suas ação no miocárdio. A escutelarina (PAN et al., 2008), calicosina (WU et al., 2006) e miricetina (ANGELONE et al., 2010), apesar de serem vasorelaxantes, não se conhecem suas ações no tecido muscular cardíaco. Semelhantemente à calicosina, a catequina também inibe a corrente de cálcio (GHAYUR; GILANI, 2006; WU et al., 2006; GHAYUR et al., 2007), porém nada se relata quanto a sua ação sobre o miocárdio. Alguns tipos de catequinas atuam dessensibilizando a cTnC para sua ligação ao cálcio. Com isto é de se esperar que ela reduza a força de contração, porém não há qualquer relato de seu efeito sobre a contratilidade do coração (TADANO et al., 2010). A quercetina, apesar de ter efeito cronotrópico negativo, abolir as oscilações de cálcio e prevenir o remodelamento cardíaco, em situações de estresse, nada foi relatado sobre sua ação na contratilidade miocárdica (WANG et al., 1999).

A rutina, por sua vez, tem uma ação vasopressora que está associada a um aumento da entrada de cálcio nas células (SAPONARA et al., 2008; FUSI et al., 2003; SAPONARA et al., 2002). Porém, Zhou et al (2006) relataram que ela também pode relaxar os vasos, propriedade que, no miocárdio, poderia ajudar a entender o efeito depressor da FAq sobre a contratilidade. A controvérsia levantada por Zhou et al. (2006), no entanto, não permite que esta substância seja descartada como participante do efeito depressor da FAq, desde que, entre os flavonóides da *C. spiralis*, a rutina esteja presente. Apesar dos nossos esforços de busca, não foi encontrado qualquer trabalho que relacionasse a rutina com a atividade contrátil do miocárdio. Estudos adicionais deverão ser realizados para caracterizar os flavonóides presentes na FAq.

Nas folhas de *C. spiralis* um novo diglicosídeo flavônico, o 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona 3-O-neohesperidosídeo foi isolado (ANTUNES et al., 2000). Outros quatro flavonóides, o canferol 3-O-neohesperidosídeo (DAUGUET et al.,

1993), canferídio 3-*O*-neohesperidosídeo, quercetina 3-*O*-neohesperidosídeo e a tamarixetina 3-*O*-neohesperidosídeo, já eram conhecidos existirem nesta planta (Da SILVA et al., 2000). Contudo, não pudemos encontrar qualquer relato na literatura científica que tratasse dos efeitos desses compostos sobre a contratilidade miocárdica.

Saponinas versus miocárdio. Dos rizomas de *C. spiralis*, foram isoladas duas novas saponinas: (3 β ,25*R*)-26-(β -D-glucopiranosiloxe)-22- hidroxifurose-5-3-yl *O*-D-apio- β -D-furanosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-glucopiranoside e a (3 β , 25*R*)-26-(β -D-glucopiranosiloxe)-22-hidroxifurose-5-3-yl-*O*-D-apio- β -D-furanosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-lucopiranoside (PARENTE; SILVA, 2004). Silva e Parente (2003) isolaram de talos fresco de *C. spiralis*, três polissacarídeos do tipo glicanos que foram denominados Cs1, Cs2 e Cs3. Infelizmente, nenhum estudo de seus efeitos inotrópicos sobre o miocárdio pôde ser encontrado.

As saponinas têm sido largamente utilizada em experimentação com o tecido muscular cardíaco. Geralmente elas são empregadas com a finalidade de promover a destruição do sarcolema, permitindo a obtenção das chamadas ‘skinned cells’, que são células em que o sarcolema é destruído, porém permanecem funcionantes o RS e as miofibrilas. Tendo em vista que as saponinas destroem o sarcolema, então seria esperado que ela aumentasse a I_{Ca} , o que levaria a uma aumento da força de contração deste tecido (NOIREAUD et al., 1989). Por esta razão, as saponinas não parecem ser importantes para explicar o mecanismo de ação da FAq. Contudo, de forma controversa, Chen et al. (1994) relataram que a saponina pode inibir a contratilidade do músculo papilar da cobaia, fato que nos impede de excluir o papel dessas substâncias no efeito inotrópico da FAq.

Taninos versus miocárdio. Os taninos podem bloquear a enzima conversora da angiotensina (ECA) (LIU et al., 2003). Este bloqueio aumenta a força de contração do miocárdio conforme mostraram Wang et al. (2005). Por esta razão, não podemos crer que esta classe de substâncias possa exercer um papel importante na explicação do efeito depressor da FAq sobre a contratilidade do miocárdio. No entanto, Calixto et al. (1986) relataram que o ácido tanínico pode exercer um efeito bifásico em átrio. Em baixa concentração, ele atua como agente inotrópico positivo, mas em alta, produz um efeito inotrópico negativo.

Xantonas versus miocárdio. Wang et al. (2001) mostraram que xantonas podem produzir um efeito hipotensor e vasorrelaxante e que, algumas delas, atuavam por meio de um bloqueio dos canais de cálcio e também de receptores adrenérgicos (CHEN et al., 1993). Chen et al. (1992) mostraram que uma xantona a qual denominou de ‘composto 9’ pode inibir a atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Marona et al.(2009) mostraram que alguns derivados sintéticos de xantonas apresentavam atividade hipotensoras e anti-arrítmica. Wang et al. (2009) mostraram que xantonas isoladas de *Halenia elliptica* dilatavam a artéria coronária de rato, tendo estudado os seguintes compostos: 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxi-xantona (HM-1), 1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxi-xantona (HM-2), 1-hidroxi-2,3,4,5-tetrametoxi-xantona (HM-3), 1,7- dihidroxi-2,3,4,5-tetrametoxi-xantona (HM-4), 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxi-xantona (HM-5) e 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxi-xantona (HM-7). Todavia, não encontramos qualquer relato sobre a ação de xantonas na contratilidade do miocárdio.

7 CONCLUSÕES

A fração aquosa do extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Costus spiralis*:

- ✓ apresenta maior potência inotrópica sobre o miocárdio atrial da cobaia quando comparada ao EBH e com as frações acetato de etila e clorofórmica;
- ✓ apresenta maior rendimento entre as frações acetato de etila e clorofórmio;
- ✓ contém as seguintes classes de constituintes químicos: taninos, saponinas e polifenóis (flavonóis, flavononóis, flavonas, xantonas, fenóis e flavonóides);
- ✓ não altera os tempos de contração, relaxamento ou de acoplamento eletromecânico, porém reduz os Índices de Eficiência da contração e do relaxamento;
- ✓ não envolve, no seu mecanismo de ação, a participação de receptores muscarínicos;
- ✓ não envolve, no seu mecanismo de ação, a participação de canais para potássio;
- ✓ abole o 'overshoot' de força que é característico do fenômeno de Bowditch, indicando que ela antagoniza a entrada de cálcio nas células atriais;
- ✓ abole o efeito inotrópico positivo produzido pelo isoproterenol;
- ✓ desloca para a direita a curva concentração-efeito para o cloreto de cálcio;
- ✓ abole o efeito inotrópico positivo produzido pelo agonista de canais de cálcio, o (-) BAY K8644;
- ✓ reduz a fluorescência intracelular correspondente ao transiente de cálcio citoplasmático livre;
- ✓ não modifica a velocidade da remoção do cálcio citoplasmático livre, após uma contração;
- ✓ reduz a entrada de cálcio nas células atriais, que ocorre através dos canais de cálcio do tipo L.

REFERÊNCIAS

ADARAMOYE, O. A.; MEDEIROS, I. A. **Endothelium-independent vasodilation induced by kolaviron, a biflavonoid complex from *Garcinia kola* seeds, in rat superior mesenteric arteries.** J. Smooth Muscle Res., v. 45, p. 39–53, 2009.

AIRES, M.M. **Fisiologia.** Editora Guanabara Koogan, 2º ed Rio de Janeiro, RJ, p.795, 1999.

AKHLAGHI, M.; BANDY, B. **Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

ALEXANDER, S.P.H; MATHIE, A.; PETERS, J.A. **Guide to receptors and channels (GRAC).** 2nd Edition, Revision. Br. J. Pharmacol. v.150, (Suppl. 1), p. S1-S168, 2007.

ALMERS, W.; FINK, R.; PALADE, P. **Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of calcium current under maintained depolarization.** J. Physiol., v. 312, p. 177–207. 1981.

ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas medicinais de uso popular. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior (ABEAS).** Ministério da Agricultura – Secretaria Geral. In: GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular)- Universidade Luterana do Brasil, Canoas, p. 17, 2005.

ALVES, N. D. D. C.; SANTOS, T. C. D.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H.C.; LIRA, L. M.; DORNELAS, C. B.; CABRAL, L. M. **Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro.** Ciência e Saúde Coletiva, v.13, n., p. 745-753, 2008.

ALP, N. J.; CHANNON, K. M. **Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

ALVAREZ-CASTRO, E.; CAMPOS-TOIMIL, M.; ORALLO, F. **(-)-Epigallocatechin-3-gallate induces contraction of the rat aorta by a calcium influx-dependent mechanism.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 369, p. 496–506, 2004.

ALTOMARE C.; TOGNATI, A.; BESCOND, J.; FERRONI, A.; BARUSCOTTI, M. **Direct inhibition of the pacemaker (I_f) current in rabbit sinoatrial node cells by genistein.** Br. J. Pharmacol., v. 147, p. 36–44, 2006.

AMBROSIO, G.; ZWEIER, J.L.; JACOBUS, W.E.; WEISFELDT, M.L.; FLAHERTY, J.T. **Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

ANTUNES, A. S.; SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. **Flavonol glycosides from leaves of *costus spiralis*.** Fitoterapia, v. 71, p. 507–510, 2000.

ANGELONE, T.; PASQUA, T.; DI MAJO, D.; QUINTIERI, A. M., FILICE, E.; AMODIO, N.; TOTA, B.; GIAMMANCO, M.; CERRA, M. C. **Distinct signalling mechanisms are involved in the dissimilar myocardial and coronary effects elicited by quercetin and myricetin, two red wine flavonols,** Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., Jan 20. [Epub ahead of print] 2010

APG II (Angiosperm Phylogeny Group). **An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II.** Bot. J. Linnean Soc., v. 141, p. 399–436, 2003.

ARIAS, T.D. **Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso. Washington: organización panamericana de la salud / organización mundial de la salud.** In: RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. Rev. Bras. Farmacognosia, v.11, n. 2, p. 57–69, 2001.

BAST, A.; KAISEROVA, H.; DEN HARTOG, G. J.; HAENEN, G. R.; VAN DER VIJGH, W. J. **Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: flavonoids.** Cell Biol. Toxicol., v. 23, p. 39–47, 2007.

BELEVYCH, A. E.; WARRIER, S.; HARVEY, R. D. **Genistein inhibits cardiac L-type Ca^{2+} channel activity by a tyrosine kinase-independent mechanism.** Mol. Pharmacol., v. 62, p. 554–565, 2002.

BENT, S.; PADULA, A.; MOORE, D.; PATTERSON, M.; MEHLING, W. **Valerian for sleep: a systematic review and meta analysis**, Am. J. Med., v. 119 (12), p.1005-1012, 2006.

BERENSHTEIN, E.; VAISMAN, B.; GOLDBERG-LANGERMAN, C.; KITROSSKY, N.; KONIJN, A. M.; CHEVION, M. **Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart**. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

BERNIER, M.; HEARSE, D. J.; MANNING, A. S. **Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart**. Circ. Res., v. 58, p. 331–340, 1986.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Physiology**. 4^o Edition, Mosby Year Book, St. Louis, EUA, p. 1071, 2001.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERS, D. M. **Altered cardiac myocyte Ca⁺² regulation in heart**. Physiology, v. 21, p. 380 -387, 2006.

BERS, D. M. **Cardiac excitation-contraction coupling**. Nature, v. 415, p. 198-204, 2002.

BERS, D.M. **Excitation–contraction coupling and cardiac contraction force**. Kluwer: Academic Publishers. p. 02 - 03, 2001.

BERS, D. M.; PHILIPSON, K. D.; LANGER, G. A. **Cardiac contractility and sarcolemmal calcium binding in several cardiac muscle preparations**. Am. J. Physiol. v. 240, p. 576 - 583, 1985.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. **Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications**. J. Physiol., v. 555, p. 589–606, 2004.

BIDASEE, K. R.; MAXWELL, A.; REYNOLDS, W. F.; PATEL, V.; BESCH, H. R. J. **Tectoridins modulate skeletal and cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium-release channels.** J. Pharmacol. Exp. Ther., v.293, p. 1074–1083, 2000.

BLATTER, L. A.; KOCKSKÄMPER, J.; SHEEHAN, K. A.; ZIMA, A. V.; HÜSER, J.; LIPISIUS, S. L. **Local calcium gradients during excitation-contraction coupling and alternans in atrial myocytes.** J. Physiol., v. 546, p.19-31, 2003.

BOWDITCH, H.P. **Über die Eigenthumlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen.** Ber. Verhandl. Saechs Akad. Wiss. Leipzig, v.23, p. 652-689, 1871.

BOLLI, R.; PATEL, B. S.; JEROUDI, M. O.; LI, X. Y.; TRIANA, J. F.; LAI, E. K.; MCCAY, P. B. **Iron-mediated radical reactions upon reperfusion contribute to myocardial "stunning."** Am. J. Physiol., 259:H1901–H1911; 1990.

BOUCHER, F.; PUCHEU, S.; COUDRAY, C.; FAVIER, A.; DE LEIRIS, J. **Evidence of cytosolic iron release during post-ischemic reperfusion of isolated rat hearts. Influence on spin-trapping experiments with DMPO.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

BOORHEM, R. L. **Reader's Digest – Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais.** Reader's Digest Brasil Ltda., Rio de Janeiro, 1999. 416 p.

BRAGA, F. G.; MARIA, L. M. B.; RODRIGO, L. F. A.; MAGNUM, O. M.; FRANCIS, O. M.; ELITA, S.; ELAINE S. C. **Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil.** J. Ethnopharmacol., v. 111, p. 396–402, 2007.

BRANDÃO, W. B. **Tese - avaliação dos efeitos do extrato acético de *mentha x villosa hudson* (lamiaceae) sobre os eventos contráteis do músculo cardíaco de mamíferos.** UFPB, João pessoal, 2007.

BRAYDEN, J. E. **Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle.** Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., v.29, p.312–316, 2002.

BRETTE, F.; ORCHARD, C. **Resurgence of cardiac T-tubules research.** Physiology, v. 22, p. 167-173, 2007.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review**. Int. J. Food Microbiol., v. 94, p.223-253, 2004.

CARVALHO, A. C. C.; BARCELLOS, L. C.; SANTOS, P. E. B.; MASUDA, M. O. **Eletrofisiologia do Coração**. In. Fisiologia, Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, 1999.

CALIXTO, J. B.; NICOLAU, M.; RAE, G. A. **Pharmacological actions of tannic acid. I. Effects on isolated smooth and cardiac muscles and on blood pressure**. Planta Med., v.1, p. 32-5, 1986.

CASTELLAN, G. W. **Physical Chemistry**. Addison-Wesley Publishing, p. 548, 1967.

CAYATTE, A. J.; RUPIN, A.; OLIVER-KRASINSKI, J.; MAITLAND, K.; SANSILVESTRI-MOREL, P.; BOUSSARD, M. F.; WIERZBICKI, M.; VERBEUREN, T. J.; COHEN, R. A. **S17834, a new inhibitor of cell adhesion and atherosclerosis that targets nadph oxidase**. Arterioscler. Thromb. Vasc. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

CHAMBERS, D. E.; PARKS, D. A.; PATTERSON, G.; ROY, R.; MCCORD, J. M.; YOSHIDA, S.; PARMLEY, L. F.; DOWNEY, J. M. **Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia**. J. Mol. Cell. Cardiol., v. 17, p.145–152, 1985.

CHEMLA. D.; COIRAULT, C.; HEBERT, J-L.; LACARPENTIER, Y. **Mechanisms of relaxation of the human heart**. NIPS, v. 15, p. 78-83, 2000.

CHEN, C. H.; LIN, J. Y.; LIN, C. N.; HSU, S. Y. j. nat. prod in: WANG. L. W.; JOU, J.K.; CHEN,I. J.; TENG, C. MANDLIN, C.N. **Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives**. Bioorg. Med. Chem., v.10, issue 3, p. 567-572, 2001.

CHEN, I. J.; LIOU, S. J.; LIOU, S. S.; LIN, C. N. gen. pharmac In: WANG. L. W.; JOU, J.K.; CHEN,I. J.; TENG, C. MANDLIN, C.N. **Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives**. Bioorg. Med. Chem., v.10, issue 3, p. 567-572, 2001.

CHEN, X.; YANG, S. J.; CHEN, L.; MA, X. L.; CHEN, Y. P.; WANG, L. L.; SUN, C. W. **The effects of Panax quinquefolium saponin (PQS) and its monomer ginsenoside on heart.** Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, v. 640, p. 617-20. 1994.

CHENG, Z.; LI, Y. **What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: an update.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

CHEVION, M.; JIANG, Y.; HAR-EL, R.; BERENSHTEIN, E.; URETZKY, G.; KITROSSKY, N. **Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury.** In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

CHIANG C, LUK H, CHEN L, WANG T, DING PY. **Genistein inhibits the inward rectifying potassium current in guinea pig ventricular myocytes.** J. Biomed. Sci., v. 9, p. 321–326, 2002.

CHIANG CE, CHEN SA, CHANG MS, LIN CI, LUK HN. **Genistein directly inhibits L-type calcium currents but potentiates cAMP-dependent chloride currents in cardiomyocytes.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 223, p. 598–603, 1996.

CHIESI, M.; SHWALLER, R. **Reversal of Phospholamban-induced inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} -ATPase By tannin,** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 202, n°3, p. 1668-1673, 1994.

CIRCOSTA, C.; DE PASQUALE, R.; SAMPERI, S.; PINO, A.; OCCHIUTO, F. **Biological and analytical characterization of two extracts form Valeriana officinalis.** J. Ethnopharmacol., v. 112, p. 361-367, 2007.

COADY, S. A.; SORLIE, P. D.; COOPER, L. S.; FOLSOM, A. R.; ROSAMOND, W. D.; CONWILL, D. E. **Validation of death certificate diagnosis for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study.** J. Clin. Epidemiol., v. 54, p. 40-50, 2001.

COGOLLUDO, A.; FRAZZIANO, G.; BRIONES, A. M.; et al. **The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production of H_2O_2 . Role in vasodilatation.** Cardiovasc. Res., v. 73, p. 424–431, 2007.

CONDE - GARCIA, E.A. **Biofísica**. 1a ed., São Paulo, Editora Sarvier. 2002. 388p

CORRÊA, A. D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas Medicinais – do cultivo à terapêutica** – 2ª Edição. Editora Vozes. Petrópolis, p. 247, 1998.

CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultiváveis**. Imprensa Nacional do Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro. p. 4324, 1984.

CÔRTEZ, S. F.; REZENDE, B. A.; CORRIU, C. et al. **Pharmacological evidence for the activation of potassium channels as the mechanism involved in the hypotensive and vasorelaxant effect of dioclein in rat small resistance arteries**. Br. J. Pharmacol., v.133, p. 849–858, 2001.

COSTANZO, L.S., **Fisiologia**. 2a. ed., Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004.

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

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. Velloso S. A., Belo Horizonte, p. 863, 1965.

CRUZ, J. S.; SANTANA, L. F.; FREDERICK, C. A.; ISOM, L. L.; MALHOTRA, J. D.; MATTEI, L. N.; KASS, R. S.; XIA, J.; AN, R.-H. & LEDERER, W. J. **Whether "Slip-Mode Conductance" occurs**. Science 284: www.sciencemag.org, p. 711a6-711a13, 1999.

CZARNECKI, R.; GRZYBEK, J. **Antiinflammatory and vasoprotective activities of polysaccharides from fruit bodies of higher fungi P.I.** Phytother. Res., v. 9, p. 123-127, 1995.

DAHLGREN, R.M.T., CLIFFORD, H.T. & YEO, P.F. **The families of the monocotyledons**. Springer-Verlag, Berlin, 1985.

DALBÓ, S.; MOREIRA, E.G.; BRANDÃO, F. C.; et al. **Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries**. J. Pharmacol. Sci., v. 106, p. 234–241, 2008.

DAUGUET, J. C.; Bert, M.; Dolley, J.; Bekaert, A.; Lewin, G. **Methoxykaempferol 3-neohesperidoside and other flavonoids from bee pollen of *Crataegus monogyna***. *Phytochemistry*, v. 33, p.1503–1505, 1993.

DE BIASE, L.; PIGNATELLI, P.; LENTI, L.; TOCCI, G.; PICCIONI, F.; RIONDINO, S.; PULCINELLI, F. M.; RUBATTU, S.; VOLPE, M.; VIOLI, F. **Enhanced TNF alpha and oxidative stress in patients with heart failure: effect of TNF alpha on platelet O_2^- production**. *Thromb. Haemost.* v. 90, p. 317–325, 2003.

DE CELLE, T.; HEERINGA, P.; STRZELECKA, A. E.; BAST, A.; SMITS, J. F.; JANSSEN, B. **J.Sustained protective effects of 7-monohydroxyethylrutin in an in vivo model of cardiac ischemia-reperfusion**. *Eur. J. Pharmacol.* In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

DE TOMBE, P. P. **Cardiac myofilaments: mechanics and regulation**. *J. Biomech.*, v. 36, n. 5, p. 721-730, 2003.

DI STASI, L. C.; LIMA, H. C.A. **Plantas medicinais na amazônia e na mata atlântica, 2ª Edição, revista e ampliada**, Editora UNESP, p. 52, 2002

DORIGO, P.; GAION, R. M.; BERGAMIN, M.; GIACOMETTI, A.; VALENTINI, E.; MARAGNO, I. **Comparison between the cardiac effects induced by muzolimine and furosemide in guinea-pig atria**. *Cardiovasc. Drugs*, v. 4, p. 1477 – 1486, 1990.

DUAN, S.; LI, Y. F.; LUO, X. L. **Effect of puerarin on heart function and serum oxidized-LDL in the patients with chronic cardiac failure**. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

EICHHORN B, DOBREV D. **Vascular large conductance calcium-activated potassium channels: Functional role and therapeutic potential**. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 376, p. 145–155, 2007.

ENGELMANN, T. W. V. **Ergleichend Untersuchungen zur Lehre von der Nervenelectricitat**. *Pfluegers Arch. Ges. Physiol.*, v. 15, p. 116-148, 1877.

ERNST, S.; ROBERT, J. A.; KIRK, R. R.; **Sanguinarine: A positive inotropic alkaloid which inhibits cardiac Na^+, K^+ -ATPase.** Eur. J. Pharmacol., v. 60, Issue 4, p. 373-377, 2002.

FABIATO, A. **Calcium-induced calcium release from the cardiac sarcoplasmic reticulum.** Am. J. Physiol., v. 245, p. 1-14, 1983.

FAWCETT, D.W.; MCNUTT, N.S. **The ultrastructure of the cat myocardium. I. Ventricular papillary muscle.** J. Cell. Biol., v. 42(1), p. 1-45, 1969

FERREIRA, S. H. (Org.). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Rio de Janeiro: Acad. Bras. Ciên., p. 131, 1998.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos,** São Paulo, ed. Atheneu, p. 11, 2006.

Idem, Ibidem, p. 115-117

Idem, Ibidem, p. 120-121

FIGTREE, G. A.; GRIFFITHS, H.; LU, Y. Q.; WEBB, C. M.; MACLEOD, K.; COLLINS, P. **Plant-derived estrogens relax coronary arteries in vitro by a calcium antagonistic mechanism.** J. Am. Coll. Cardiol., v. 35, p. 1977–1985, 2000.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F.; ARMES, V. **Shape, size and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles.** Biophys. J., v. 77, p. 1528-1569, 1999.

FREEMAN, L. C.; KWOK, W. M.; ANUMONWO, J. M. B. e KASS, R. S. **Potassium channels in the heart: physiological function and neurohormonal regulation. In: Potassium channel modulators.** Pharm. Chem. J., Blackwell Scientific Publications, 1992.

FUSI, F.; CAVALLI, M.; MULHOLLAND, D.; et al. **Cardamonin is a bifunctional vasodilator that inhibits $\text{Ca(v)}1.2$ current and stimulates $\text{K(Ca)}1.1$ current in rat tail artery myocytes.** J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 332, p. 531–540, 2010.

FUSI, F.; SAPONARA, S.; FROSINI, M.; GORELLI, B.; SGARAGLI, G. **L-type Ca^{2+} channels activation and contraction elicited by myricetin on vascular smooth muscles.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 368, p. 470–478, 2003.

FUSI F, SAPONARA S, PESSINA F, GORELLI B, SGARAGLI G. **Effects of quercetin and rutin on vascular preparations: A comparison between mechanical and electrophysiological phenomena.** Eur. J. Nutr., v. 42, p. 10–17, 2003.

GALLO, L. I.; JAGUS, R. J.; PILOSOFF, A. M. R **Modelling *Saccharomyces cerevisiae* Inactivation by Natamycin in Liquid Cheese Whey.** Braz. J. Food Technol., v.9 , n.4, p. 311-316, 2006.

GAO, Q.; PAN, H.; QIU, S.; et al. **Atractyloside and 5-hydroxydecanoate block the protective effect of puerarin in isolated rat heart.** Life Sci., v. 79, p. 217–224, 2006.

GAO, Q.; YANG, B.; YE Z.; WANG, J.; BRUCE, I. C.; XIA, Q. **Opening the calcium-activated potassium channel participates in the cardioprotective effect of puerarin.** Eur. J. Pharmacol., v. 574, p. 179–184, 2007.

GAO, Z.; LAU, C.; WONG, T.; LI, G. **Protein tyrosine kinase-dependent modulation of voltage-dependent potassium channels by genistein in rat cardiac ventricular myocytes.** Cell. Signal., v. 16, p. 333–341, 2004.

GATHERCOLE, D.V.; COLLING, D. J.; SKEPPER, J. N.; TAKAGISHI, Y.; LEVI, A. J.; SEVERS, N. J. **Immunogold-labeled L-type calcium channels are clustered in the surface plasma membrane overlying junctional sarcoplasmic reticulum in guinea-pig myocytes-implications for excitation-contraction coupling in cardiac muscle.** J. Mol. Cell. Cardiol., v. 32, p. 1981-1994, 2000.

GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H. **Studies on cardio-suppressant, vasodilator and tracheal relaxant effects of *Sarcococca saligna*.** Arch. Pharm. Res., v. 29, p. 990–997, 2006.

GHAYUR, M. N.; KHAN, H.; GILANI, A. H. **Antispasmodic, bronchodilator and vasodilator activities of (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid.** Arch. Pharm. Res., v. 30, p. 970–975, 2007.

GOLDBERG, S.; GREENSPON, A. J.; URBAN, P. L.; MUZA, B.; BERGER, B.; WALINSKY, P.; MAROKO, P. R. **Reperfusion arrhythmia: a marker of restoration of antegrade flow during intracoronary thrombolysis for acute myocardial infarction.** Am. Heart J., v.105, p. 26–32, 1983.

GÓMEZ, A. M.; GUATIMOSIM, S.; DILLY, K. W.; VASSORT, G.; LEDERER, W. J. **Heart failure after myocardial infarction: altered excitation-contraction coupling.** Circulation, v.7; 104 (6), p. 688-93, 2001.

GONDIM, A. N. S. Tese- **Avaliação dos efeitos da fração aquosa do extrato acético de *psidium guajava* L. (myrtaceae) sobre os eventos contráteis e elétricos do coração de cobaia.** UFPB, centro de ciências da saúde, 2005.

GRALER, W. F.; FRIEDEN, M.; MELLI, R. **Mitochondria and Ca^{+2} signaling: old guest, new functions.** Pflugers Arch., v.455, p. 375-396, 2007.

GASPARRI, S. Tese- **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica /antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *costus spicatus*.** Canoas – RS, p. 79, 2005.

GRANZIER, H. e LABEIT, S. **Cardiac titin an adjustable multi-funcional spring,** J. Physiol. London, v.541, n.2, p. 335-342, 2002.

GREENSTEIN, J. L.; WU, R.; PO, S.; TOMASELLI, G. F.; WINSLOW, R. L. **Role of the calcium-independent transient outward current $I(\text{to}1)$ in shaping action potential morphology and duration.** Circ. Res., v. 87, p. 1026–1033, 2000.

GROSSMAN, A.; FURCHGOTT, R. F. **The effects of frequency of stimulation and calcium concentration on Ca^{45} exchange and contractility in the isolated guinea pig auricle.** J. Pharmacol., 143, 120, 1964.

GUATIMOSIM, S.; DILLY, K.; SANTANA, L.F.; JAFRI, M.S.; SOBIE, E.A.; LEDERER, W.J. **Local Ca^{2+} signaling and EC coupling in heart: Ca^{2+} sparks and the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transient.** J. Mol. Cell. Cardiol., v. 34, p. 941-950, 2002.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 10ª ed. Rio de Janeiro, Ed Guanabara Koogan, 2002.

HA, S. K.; LEE, P.; PARK, J. A.; OH, H. R.; LEE, S. Y.; PARK, J. H.; LEE, E. H.; RYU, J. H.; LEE, K. R.; KIM, S. Y. **Apigenin inhibits the production of NO and PGE₂ in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model.** *Neurochem. Int.*, 2008, In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**, 3^a ed. Oxford University Press, New York; 1999.

HABSAH, M. M.; AMRAN, M. M.; MACKEEN, N. H.; LAJIS, H.; KIKUZAKI, N.; NAKATANI, A. A.; RAHMAN; GHAFAR, A. M.; ALI. **Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and Antioxidant activities.** *J. Ethnopharmacol.*, v. 72, p. 403–410, 2000.

HERNÁNDEZ-ABREU, O.; CASTILLO-ESPAÑA, P.; LEÓN-RIVERA, I.; et al. **Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening.** *Biochem. Pharmacol.*, v.78, p. 54–61, 2009.

HOBAL, I. A.; LEVI, A. J. **Coming full circle: membrane potential, sarcolemmal calcium influx and excitation coupling in heart muscle.** *Cardiovasc. Res.*, v. 44, p. 477–487, 1999.

HUA LI.; WEN, HUANG.; YANQING, WEN.; GUOHUA, GONG.; QINGBING, ZHAO.; GANG, YU. **Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright.** *Fitoterapia*, v. 81(8), p. 1147–56. 2010.

HUANG, P. L. **eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Trends Endocrinol. Metab.*, 2009. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

HUANG, Y.; ZHANG, A.; LAU, C. W.; CHEN, Z. Y. **Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery.** *Life Sci.*, v. 63, p. 275–283, 1998.

IWASAKI-KURASHIGE, K.; LOYAGA-RENDON, R. Y.; MATSUMOTO, H.; TOKUNAGA, T.; AZUMA, H. **Possible mediators involved in decreasing peripheral vascular resistance with blackcurrant concentrate (BC) in hind-limb perfusion model of the rat.** *Vascul. Pharmacol.*, v. 44, p. 215–223, 2006.

JACKMAN, K. A.; WOODMAN, O. L.; SOBEY, C. G. **Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights.** *Curr. Med. Chem.*, 2007. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

JACKSON, W. F. **Ion channels and vascular tone.** *Hypertension*, v. 35, p. 173–178, 2000.

JANTAN, I. B.; YASSIN, M. S. M., CHIN, C. B.; CHEN, L. L.; SIM, N. L. **Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species.** *Pharmac. Biol.*, v. 41, p. 392–397, 2003.

JI, E.; YIN, J.; MA, H.; HE, R. **Effect of genistein on L-type calcium current in guinea pig ventricular myocytes.** *Sheng Li Xue Bao*, v. 56, p. 466–470, 2004.

JI, E. S.; YUE, H.; WU, Y. M.; HE, R. R. **Effects of phytoestrogen genistein on myocardial ischemia/reperfusion injury and apoptosis in rabbits.** *Acta Pharmacol.* In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

JIANG, H.; XIA, Q.; WANG, X.; SONG, J.; BRUCE, I. C. **Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels.** *Pharmacazie*, v. 60, p. 444–447, 2005.

JIN, J.; PARK, S.; BAE, J.; et al. **Uncoupling by (–)-epigallocatechin-3-gallate of ATP-sensitive potassium channels from phosphatidylinositol polyphosphates and ATP.** *Pharmacol. Res.*, v. 56, p. 237–247, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 8^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAISEROVA, H.; SIMUNEK, T.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A.; KVASNICKOVA, E. **Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase.** Biochim. Biophys. Acta, v.1772, p. 1065–1074; 2007.

KANG, D. G.; YIN, M. H.; OH, H.; LEE, D. H.; LEE, H. S. **Vasorelaxation by amentoflavone isolated from *Selaginella tamariscina*.** Planta Med., v. 70, p. 718–722, 2004.

KARTHICK, M.; STANELY, M.; PRINCE, P. **Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats.** J. Pharm. Pharmacol., 2006. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

KATSUBE, Y.; YOKOSHIKI, H.; NGUYEN L.; YAMAMOTO, M.; SPERELAKIS, N. **Inhibition of Ca^{2+} current in neonatal and adult rat ventricular myocytes by the tyrosine kinase inhibitor, genistein.** Eur. J. Pharmacol., v. 345, p. 309–314, 1998.

KAY, K. M. & SCHEMSKE, D. W. **Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of Neotropical *Costus* (Costaceae).** Biotropica, v. 35, p. 198–207, 2003.

KEATING, M. T.; SANGUINETTI, M. C. **Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias.** Cell, v. 104, p. 569–580, 2001.

KELEMEN, K.; KIESECKER, C.; ZITRON, E, et al. **Green tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits cardiac hERG potassium channels.** Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 364, p. 429–435, 2007.

KHAN, A.; GILANI, A. H. **Selective bronchodilatory effect of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) and its flavonoid, chrysoeriol.** Eur. J. Nutr., v. 45, p. 463–469, 2006.

KHAN, A.; GILANI, A. H. **Cardiovascular inhibitory effects of *Hyoscyamus niger*.** Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., v. 30, p. 295–300, 2008.

KHAN, I.; A, QAYUM.; Z. QURESHI. **Study of the hypotensive action of berbamine, an alkaloid isolated from berberis lyceum.** Life Sci., v.8, Issue 17, Part 1, p. 993–1001, 1969.

KIEHN, J.; LACERDA, A. E.; BROWN, A. M. **Pathways of HERG inactivation.** Am. J. Physiol., v. 277, p. H199–H210, 1999.

KIEHN, J.; THOMAS, D.; KARLE, C. A.; SCHO, L. S. W.; KUBLER, W. **Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 359, p. 212–219, 1999.

KIESECKER, C.; ZITRON, E.; LUCK, S.; et al. **Class Ia anti-arrhythmic drug ajmaline blocks HERG potassium channels: Mode of action.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 370, p. 423–435, 2004.

KIM, H. J.; YUM, K. S.; SUNG, J.; et al. **Epigallocatechin-3-gallate increases intracellular $[Ca^{2+}]$ in U87 cells mainly by influx of extracellular Ca^{2+} and partly by release of intracellular stores.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 369, p. 260–267, 2004.

KIM, S. H.; KANG, K. W.; KIM, K. W.; KIM, N. D. **Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta.** Life Sci., v. 67, p. 121–131, 2000.

KNELLER J, KALIFA J, ZOU R, et al. **Mechanisms of atrial fibrillation termination by pure sodium channel blockade in an ionically-realistic mathematical model.** Circ. Res., v. 96, p. e35–e47, 2005.

KRESS, W. J. **The phylogeny and classification of the Zingiberales.** Ann. Missouri Bot. Garden, v. 77, p. 698–721, 1990.

KRISHNA, K. M.; ANNAPURNA, A.; GOPAL, G. S.; CHALAM, C. R.; MADAN, K.; KUMAR, V. K.; PRAKASH, G. J. **Partial reversal by rutin and quercetin of impaired cardiac function in streptozotocin-induced diabetic rats.** Can. J. Physiol. Pharmacol., v. 83, p. 343–355, 2005.

KO, E. A.; HAN, J.; JUNG, I. D.; PARK, W. S. **Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells.** J. Smooth Muscle Res, v. 44, p. 65–81, 2008.

KO, E. A.; PARK, W. S.; SON, Y. K, et al. **The effect of tyrosine kinase inhibitor genistein On voltage-dependent k^+ channels in rabbit coronary arterial smooth muscle Cells.** Vascul. Pharmacol., v. 50, p. 51–56, 2009.

KOZLUCA, O.; OLCAY, E.; SURUCU, S.; GURAN, Z.; KULAKSIZ, T.; USKENT, N. **Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin.** Cancer Lett., v. 99, p. 1–6, 1996.

KUHLMANN, C. R.; SCHAEFER, C. A.; KOSOK, C.; et al. **Quercetin-induced induction of the NO/cGMP pathway depends on Ca^{2+} -activated K^+ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca^{2+} -entry into cultured human endothelial cells.** Planta Med., v. 71, p. 520–524, 2005.

KUHN, H.; BELKNER, J.; SUZUKI, H.; YAMAMOTO, S. **Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities.** J. Lipid Res, In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

KUHN, T. S. **As estruturas das revoluções científicas.** São Paulo: Perspectiva, p. 257, 1985.

LANGER, G.A.; BRADY, A. J. **The mammalian myocardium.** New York: Wiley Biomedical-Health, p. 310, 1974.

LAUTON-SANTOS, S. **Participação dos receptores B1 para cininas no controle da função cardíaca em camundongos.** Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 33-35, 2007.

LAPCHAK, P. A.; MAHER, P.; SCHUBERT, D.; ZIVIN, J. A. **Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes.** Neuroscience, 2007. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

LEE, HOBEOM.; JI, YUN LEE.; MOO, HYUN SUH.; SANG-SOO, SIM.; MIN-WON, LEE.; CHANG, JONG KIM. **Hydrolysable tannins depress cardiac papillary muscle contraction and propranolol-induced negative inotropism.** Fitoterapia, v.81, p. 820–825, 2010.

LEITE, J. P. V, **FITOTERAPIA : Bases Científicas e Tecnológicas.** Ed. Atheneu, São Paulo, p. 4-5, 2009.

LI, CHUNMEI.; ZHIFENG, LIU.; JINGWEI, TIAN.; GUISHENG, LI.; WANGLIN, J.; GUANBO, Z.; FANGFANG, CHEN.; PEIYAN, LIN.; ZUGUANG, YE. **Protective roles of Asperosaponin VI, a triterpene saponin isolated from**

Dipsacus asper Wall on acute myocardial infarction in rats. Eur. J. Pharmacol., v. 627; p. 235–241, 2010.

LI, G.; WANG, H.; QIN, G.; et al. **Acacetin, a natural flavone, selectively inhibits human atrial repolarization potassium currents and prevents atrial fibrillation in dogs.** Circulation, v. 117, p. 2449–2457, 2008.

LI, H.; ZHANG, Y.; TIAN, Z.; QIU, X.; GU, J.; WU, J. **Genistein stimulates myocardial contractility in guinea pigs by different subcellular mechanisms.** Eur. J. Pharmacol., v. 597(1-3), p. 70-74, 2008.

LI, YIFU.; DANNA, TU.; HUA, XIAO.; YIMEI, DU.; ANRUO, ZOU.; YUHUA, L.; SHAOHONG, DONG. **Aconitine blocks HERG and Kv1.5 potassium channels.** J. Ethnopharmacol., v.131, p. 187–195, 2010.

LINKE, W. A.; FERNANDEZ, J. M. **Cardiac titin: molecular basis of elasticity and cellular contribution to elastic and viscous stiffness components in myocardium.** J. Mus. Res. Cell. Motil, v.23 (5-6), p. 483-497, 2002.

LIU, JU-CHI.; FENG-LIN, H. S. U.; JEN-CHEN, TSAI.; PAUL, CHAN.; JENNY, YA-HSIN LIU.; G. NEIL, THOMAS.; BRIAN, TOMLINSON.; MING-YU, LO.; JUNG-YAW, LIN. **Antihypertensive effects of tannins isolated from traditional Chinese herbs as non-specific inhibitors of angiotensin converting enzyme.** Life Sci., v.73, p. 1543–1555, 2003.

LORENZ, M.; HELLIGE, N.; RIEDER, P.; et al. **Positive inotropic effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) involve activation of Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers.** Eur. J. Heart Fail., v. 10, p. 439–445, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE ABREU. **Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 512, 2002.

MA, A.; QI, S.; CHEN, H. **Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection.** Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem., v. 6, p. 20–43, 2008.

MA, T.; FAN, Z.; HE, R. **Electrophysiological effects of phytoestrogen genistein on pacemaker cells in sinoatrial nodes of rabbits.** Acta Pharmacol. Sin., v. 23, p. 367–370, 2002.

MAACK, C.; O'ROURKE, B. **Excitation-contraction coupling and mitochondrial energetics**. Basic Res. Cardiol., v. 102, n. 5, p. 369-392, 2007.

MAAS, P. J. M. **Costoidae (Zingiberaceae). Flora Neotrópica**, Monograph nº 8. Hafner, New York. 1972.

MAHLER, H. R.; CORDES, E. H. **Biological Chemistry**. New York: Harper & Row Publishers, p. 307, 1971.

MANNING, A. S.; COLTART, D. J.; HEARSE, D. J. **Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol**. Circ. Res., v. 55, p. 545-548, 1984.

MARBAN, E.; ROBINSON, SW.; WIER, WG. **Mechanisms of arrhythmogenic delayed and early afterdepolarizations in ferret ventricular muscle**. J. Clin. Invest. v. 78, p. 1185-1192, 1986.

MARONA, H.; NATALIA, S.; ANNA, R.; BARBARA, F.; MAŁGORZATA, D.; AGATA, S.; MAREK, C.; EDWARD, S. **Preliminary evaluation of pharmacological properties of some xanthone derivatives**. Bioorg. Med. Chem., v. 17, p. 1345-1352, 2009.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Editora UFV, Viçosa, 2003.

MATOS, F. J. A. **Contextualização histórica da fitoterapia no Brasil**. In: Fórum para a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos, Brasília. Conferência proferida. Ministério da Saúde, 2001. In: Proposta de validação farmacognóstica de drogas vegetais, plantas medicinais e fitoterápicos. Infarma, Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia, v. 3, p. 9-14, 1994.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 48, de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 mar., 2004c, Seção 1.

MATOS, F. J. ABREU. **Introdução à fitoquímica**. 2ª ed., Fortaleza, Editora UFC. p. 45-54, 1997.

MATSUDA, H.; CRUZ, J. S. **Voltage-dependent block by internal Ca^{2+} ions of inwardly rectifying K^+ channels in guinea-pig ventricular cells.** J. Physiol., v.470, p. 295-311, 1993.

MATSUI, T.; KOREMATSU, S.; BYUN E; NISHIZUKA, T.; OHSHIMA, S.; KANDA, T. **Apple procyanidins induced vascular relaxation in isolated rat aorta through NO/cGMP pathway in combination with hyperpolarization by multiple K^+ channel activations.** Biosci. Biotechnol. Biochem., v. 73, p. 2246–2251, 2009.

McNUTT, N.S.; FAWCETT, D.W. **Myocardial ultrastructure.** In: The mammalian myocardium. Ed. by Glenn A. Langer & Allan J. Brady. John Wiley & Sons, N.Y., 1974.

Mc NUTT, N.S.; FAWCETT, D.W. **The ultrastructure of the cat myocardium. II. Atrial muscle.** J. Cell Biol., v. 42, p. 46-67, 1969.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R. H. P. **Plantas medicinais e seus usos pelos sitiantes da Reserva do Rio das Pedras, Mangaratiba. RJ, Brasil.** Acta Bot. Bras., v.18, p.391-399, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos /** Brasília: 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

MITRA, R.; MORAD, M. **A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates.** Am. J. Physiol., v. 249, p. 1056–1060, 1985.

MIYOSHI, T.; LI, Y.; SHIH, D. M.; WANG, X.; LAUBACH, V. E.; MATSUMOTO, A. H.; HELM, G. A.; LUSIS, A. J.; SHI, W. **Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.** Life Sci., 79: 525–531; 2006.

MLADĚNKA, P.; LIBUŠE, Z.; TOMÁŠ, F.; RADOMÍR, H. **Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity.** Free Radic. Biol. Med., v. 49, p. 963–975, 2010.

MOORE, J. W; FLANNER, H. H. **Mathematical comparison of dissolution profiles.** Pharm. Technol. Chester, v. 20, p. 64-74, 1996.

MOORE, W. J. **Físico-Química**, Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico e Ed. da Universidade de São Paulo, p. 358, 1968.

MUKHERJEE, P. K, WAHILE, A. J. **Ethnopharmacology**. In: Sahoo Niharika, Padmavati Manchikanti, Satyahari Dey. Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia, 2010.

MULLER, A.; LINKE, W.; KLAUS, W. **Crataegus extract blocks potassium currents in guinea pig ventricular cardiac myocytes**. Planta Med, v. 65, p. 335–339, 1999.

NAGAOKA, T.; HEIN, T. W.; YOSHIDA, A.; KUO, L. **Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: Role of nitric oxide and potassium channels**. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., v. 48, p. 4232–4239, 2007.

NAKAI, T. **Notulae ad Plantas Asiae Orientalis**. J. Jap. Bot., v.17, p. 1-15. 1941.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L. J. **Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases**. Arch. Pharm. Res., v. 32, p. 1103–1108, 2009.

NAYLER, W. G.; MERRILLEES, N. C. R. **Cellular exchange of calcium**. In: Harris P and Opie LH, Calcium and the heart, London and New York: Academic Press, 1971.

NEGISHI, H.; XU, J. W.; IKEDA, K.; NJELEKELA, M.; NARA, Y.; YAMORI, Y. **Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats**. J. Nutr., v. 134, p. 38–42, 2004.

NIGGLI, E. **Ca²⁺ sparks in cardiac muscle: is there life without them?** News Physiol. Sci., v. 14 (4), p. 129-134, 1999.

NOGUCHI, C.; YANG, J.; SAKAMOTO, K.; et al. **Inhibitory effects of isoliquiritigenin and licorice extract on voltage-dependent K(+) currents in H9c2 cells**. J. Pharmacol Sci., v. 108, p. 439–445, 2008.

NOIREAUD, J. C. M.; BRIGHT; D. ELLIS. **Effects of saponin on contractile force and intracellular ion activities of cardiac tissues**. J. Mol. Cell. Cardiol., v. 21 (3), p. 291-298, 1989.

OGATA, R.; KITAMURA, K.; ITO, Y.; NAKANO, H. **Inhibitory effects of genistein on ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit portal vein smooth muscle.** Br. J. Pharmacol., v. 122, p. 1395–1404, 1997.

OGAWA, Y. **Role of ryanodine receptors.** Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., v. 29 (4), p. 229-274, 1994.

OGURA, S.; KAKINO, A.; SATO, Y.; FUJITA, Y.; IWAMOTO, S.; OTSUI, K.; YOSHIMOTO, R.; SAWAMURA, T. **Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction.** Circ. J., v. 73, p. 1993–1999, 2009.

OLIVEIRA, F. A. R.; GUATIMOSIM, S.; CASTRO, C. H.; GALAN, D. T.; LAUTON-SANTOS, S.; RIBEIRO, A. M.; ALMEIDA, A. P.; CRUZ, J. S. **Abolition of reperfusion-induced arrhythmias in hearts from thiamine deficient rats.** Amer. J. Physiol.. Heart and Circulatory Physiology, v. 293, p. H-394-H-401, 2007.

ORCHARD, C.; BRETTE, F. **T-tubules and sarcoplasmic reticulum function in cardiac ventricular myocytes.** Cardiovasc. Res., v. 77, p. 237-244, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE /ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas para la evaluación de medicamentos herbários.** Ginebra, 1991.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Traditional medicine.** In: SAHOO, N.; PADMAVATI, M.; SATYAHARI, D. Herbal drugs: Standards and regulation. Fitoterapia, 2010.

OUYANG, S; LI, S.; HUANG, B.; **Effect of genistein on voltage-gated potassium channels in guinea pig proximal colon smooth muscle cells.** World J. Gastroenterol., v. 12, p. 420–425, 2006.

OZAKI, M.; KAWASHIMA, S.; YAMASHITA, T.; HIRASE, T.; NAMIKI, M.; INOUE, N.; HIRATA, K.; YASUI, H.; SAKURAI, H.; YOSHIDA, Y.; MASADA, M.; YOKOYAMA, M. **Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice.** J. Clin. Invest., v. 110, p. 331–340, 2002.

PAES DE CARVALHO, A. **Fisiologia Cardiovascular.** Departamento de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Fundo Editorial BYK-PROCIENX, Rio de Janeiro, RJ, p. 375, 1976.

PAN, Z.; FENG, T.; SHAN, L.; et al. **Scutellarin-induced endothelium-independent relaxation in rat aorta**. *Phytother. Res.*, v. 22, p. 1428–1433, 2008.

PAOLI, P.; CERBAI, E.; KOIDL, B.; KIRCHENGAST, M.; SARTIANI, L.; MUGELLI, A. **Selectivity of different calcium antagonists on T- and L-type calcium currents in guinea-pig ventricular myocytes**. *Pharmacol. Res.*, v. 46, p. 491–497, 2002.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. **NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities**. *Diab. Care*, v. 31 (Suppl. 2), p. S170–S180, 2008.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. **Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases e NOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats**. *J. Hypertens.*, v. 24, p. 75–84, 2006.

PRAKASH, V.; MEHROTRA, B. N. **Zingiberaceae of north-east India: diversity and taxonomic status**. *Proceedings of the 2nd Symposium on the Family Zingiberaceae*, p. 262–273, 1995.

PSOTOVA, J.; CHLOPČIKOVA, S.; MIKETOVA, P.; HRBAC, J.; SIMANEK, V. **Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin**. *Phytother. Res.*, v. 18, p. 516–521, 2004.

QUIAN, Y.; LI, Z.; HUANG, L.; HAN, X.; SUN, J.; ZHOU, H.; LIU, Z. **Blocking effect of puerarin on calcium channel in isolated guinea pig ventricular myocytes**. *Chin. Med. J.*, v. 112, p. 787–789, 1999.

RAJADURAI, M.; PRINCE, P. S. **Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an in vivo and in vitro study**. *Toxicology*. In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

RALAY, R. H.; DIEBOLT, M.; ANDRIANTSITOHAINA, R. **Wine polyphenols induce hypotension, and decrease cardiac reactivity and infarct size in rats: involvement of nitric oxide**. *Br. J. Pharmacol.* In: Mladěnka, P.; Libuše Z.; Tomáš F.; Radomír H. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 49, p. 963–975, 2010.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5.ed., Ed. Guanabara Koogan, 2004.

RATES, S. M. K. **Plants as source of drugs**. *Toxicon*, v. 39, p. 603, 2001.

RODEN, D. M.; BALSER, J. R.; GEORGE, A. L. J.; ANDERSON, M. E. **Cardiac ion channels**. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 64, p. 431–475, 2002.

ROMANO, M. R.; LOGRANO, M. D. **Epigallocatechin-3-gallate relaxes the isolated bovine ophthalmic artery: Involvement of phosphoinositide 3-kinase-Akt-nitric oxide/cGMP signalling pathway**. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 608, p. 48–53, 2009.

ROTSCHUH, K.; EUBER. **Elektrische Entladungsvorgänge an der verletzten Skelettmuskelfaser und ihre Beziehungen zum Vorgang der Degeneration, der Regeneration und des Absterbens**. *Pflugers Arch. ges. Physiol.* In: CONDE - GARCIA, E.A. *Biofísica*. 1a ed., São Paulo, Editora Sarvier. 2002. 388p

ROTHSCHUH, K.; EUEBER. **Den aufbau des Herzmuskel aus elektrophysiologischen elementen**. *Ver. Dtsh. ges. Kreislaufforsch.*, v.16, p.226-231, 1950.

SAHOO, N.; PADMAVATI, M.; SATYAHARI, D. **Herbal drugs: Standards and regulation**. *Fitoterapia*, 2010.

SAITO, A.; INUI, M.; RADERMACHER, M.; FRANK, J.; FLEISCHER, S. **Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum**. *J. Cell. Biol.*, v. 107, p. 211 – 219. 1988.

SALES, P. M. **Fitoterapia: Prevalência de uso e suas interações potenciais com medicamentos anti reti-retrovirais em pacientes do programa de AIDS do hospital universitário de Brasília**. 155p (Dissertação) – Ciências da Saúde, Universidade de Brasilia, Brasilia, 2005.

SAMSÓ, M. **Contributions of electron microscopy and single-particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure**. *J. Struct. Biol.*, v. 121, p. 172-180, 1998.

SANCHEZ, M.; GALISTEO, M.; VERA, R.; VILLAR, I. C.; ZARZUELO, A.; TAMARGO, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J. **Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats.** J. Hypertens., v. 24, p. 75–84, 2006.

SAPONARA, S.; TESTAI, L.; IOZZI, D.; et al. **(+/-)-Naringenin as large conductance Ca^{+2} -activated K^{+} (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells.** Br. J. Pharmacol., v. 149, p. 1013–1021, 2006.

SAPONARA, S.; SGARAGLI, G.; FUSI, F. **Quercetin antagonism of Bay K 8644 effects on rat tail artery L-type Ca^{2+} channels.** Eur. J. Pharmacol., v. 598, p. 75–80, 2008.

SAPONARA, S.; SGARAGLI, G.; FUSI, F. **Quercetin as a novel activator of L-type Ca^{2+} channels in rat tail artery smooth muscle cells.** Br. J. Pharmacol., v.135, p. 1819–1827, 2002.

SARR, M.; CHATAIGNEAU, M.; MARTINS, S.; SCHOTT, C.; EL BEDOUI, J.; OAK, M. H.; MULLER, B.; CHATAIGNEAU, T.; SCHINI-KERTH, V. B. **Red wine polyphenols prevent angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in rats: role of NADPH oxidase.** Cardiovasc. Res., v.71, p. 794–802, 2006.

SATOH, H.; NISHIDA, S. **Electropharmacological actions of Ginkgo biloba extract on vascular smooth and heart muscles.** Clin. Chim. Acta, v. 342, p.13–22, 2004.

SCHEMSKE, D.W. **The evolutionary significance of extrafloral nectar production by *Costus woodsonii* (Zingiberaceae): An experimental analysis of ant protection.** J. Ecol., v. 68, p. 959-967, 1980.

SCHEMSKE, D.W. **Floral convergence and pollinator sharing in two bee-pollinated tropical herbs.** Ecology, v. 62, p. 946-954, 1981.

SCHEMSKE, D.W. **Ecological correlates of a Neotropical mutualism: ant assemblages at *Costus* extrafloral nectaries.** Ecology, v.63, p. 932-941, 1982.

SCHOLZ, E. P. E.; HUGO, A.; KATUS; CHRISTOPH, A.; KARLE. **Cardiovascular Ion Channels as a Molecular Target of Flavonoids.** Cardiovasc. Ther., v. 28, p. e46–e52, 2010.

SCHOLZ, E. P.; ZITRON, E.; KIESECKER, C. et al. **Inhibition of cardiac HERG channels by grapefruit flavonoid naringenin: Implications for the influence of dietary compounds on cardiac repolarisation.** Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., v. 371, p. 516–525, 2005.

SCHOLZ, E. P.; ZITRON, E.; KIESECKER, C. et al. **Orange flavonoid hesperetin modulates cardiac hERG potassium channel via binding to amino acid F656.** Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., v. 17, p. 666–675, 2007.

SCRIVEN, D. R.; DAN, P.; MOORE, E. D. **Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes.** Biophys. J., v. 79, p. 2682 – 2691. 2000.

SEED, W. A.; WALKER, J. M. Relation between beat interval and force of the heartbeat and its clinical **complications.** Cardiovasc. Res., v. 22, p. 303-314, 1987.

SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G. **Gene mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy.** In: Haber E, ed. Molecular cardiovascular medicine. New York: Scientific American, p. 193-209, 1995.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. **Flavonol glycosides from *Costus spicatus*.** Phytochemistry, v. 53, p. 87-92, 2000.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J.P. **A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*.** Phytochemistry, v. 51, p. 931-1935, 1999.

SILVA, P.; PARENTE P. **New Steroidal Saponins from Rhizomes of *Costus spiralis*.** Z. Naturforsch., v. 59c, p. 81-85, 2004.

SILVA, B. P.; PARENTE, J. P. **Bioactive polysaccharides from *Costus spicatus*.** Carbohydr. Polymers, v. 51, p. 239-242, 2003.

SILVEIRA, T. T. S.; RIEDER, A. 2a. Jornada Científica da UNIMAT. Anais. **Bioatividade do extrato foliar de cana-do-brejo (*Costus spiralis* (JACQ.) ROSCOE) em *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797), 2009.**

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada.** 2. ed. Austin-EUA: University of Texas. Ed. Manole, 2003.

SIMÕES, C. M. O, SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1. ed. Rio Grande do Sul/ Florianópolis: Editora da UFSC e Editora da UFRGS, p.641, 2000.

STEVENSON, D. W. M.; STEVENSON, J. W. **Costaceae (Costus Family)**. In Flowering Plants of The Neotropics. (N. Smith, S.A. Mori, A. Henderson, D.W.M. Stevenson & S.V. Heald, eds.). Princeton University Press, Princeton, p.429-431. 2004.

SUN, X.; DING, J.; LI, H.; et al. **Activation of large-conductance calcium-activated potassium channels by puerarin: The underlying mechanism of puerarin-mediated vasodilation**. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 323, p. 391–397, 2007.

SUN, X. H.; PROTAS, I. F.; TAKAHASHI, M.; TAKESHIMA, H.; FERGUSON, D. G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Molecular architecture of membranes involved in excitation contraction coupling of cardiac muscle**. J. Cell. Biol., v. 129, p. 659-671, 1995.

SUZUKI, JUN-ICHI.; MASAHITO, O.; YASUHIRO, MAEJIMA.; KAZUYA, I.; HIROYUKI, T.; YUKO, M.; SAGESAKA, M. I. **Tea catechins attenuate chronic ventricular remodeling after myocardial ischemia in rats**. J. Mol. Cel. Cardiol., v. 42, p. 432–440, 2007.

TADANO, N. D.; YUMOTO, F.; MORIMOTO, S.; OHTA, M.; XIE, M. F.; NAGATA, K.; ZHAN, D. Y.; LU, Q. W.; MIWA, Y.; TAKAHASHI-YANAGA, F.; TANOKURA, M.; OHTSUKI, I.; SASAGURI, T. **Biological actions of green tea catechins on cardiac troponin C**. Br. J. Pharmacol., v. 161(5), p. 1034-43, 2010.

TANAKA, H.; KAWANISHI, T.; SHIGENOBU, K. **Optical bioimaging: from living tissue to a single molecule: atrio-ventricular difference in myocardial excitation-contraction coupling – sequential versus simultaneous activation of SR Ca²⁺ release units**. J. Pharmacol. Sci., v. 93, p. 248-252, 2003.

TERADA, L. S.; PIERMATTEI, D.; SHIBAO, G. N.; MCMANAMAN, J. L.; WRIGHT, R. M. **Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels**. Arch. Biochem. Biophys., v. 348, p. 163–168, 1997.

THOMAS, D.; KATHOFER, S.; ZHANG, W.; et al. **Acute effects of dronedarone on both components of the cardiac delayed rectifier K^+ current, HERG and KvLQT1/min K potassium channels.** Br. J. Pharmacol., v. 40, p. 996–1002, 2003.

TOMODA, M.; OHARA, N.; SHIMIZU, N.; GONDA, R. **Characterization of a novel glucan, which exhibits reticulo endothelial system-potentiating and anti-complementary activities, from the rhizomes of *Cnidium officinale*.** Chem. Biochem., v. 32, p. 235-275, 1994.

TRESVENZOL, L. M.; PAULA, J. R.; RICARDO, A. F.; FERREIRA, H. D.; ZATTA, D.T. **Estudo sobre o comercio informal de plantas medicinais em Goiania e cidades vizinhas.** Rev. Eletrônica de Farmácia, v. 3 (2), p. 22-28, 2006.

TUSHARA, S. B.; GAJEN, C. S.; LATHA, R. **Ethnomedical uses of Zingiberaceous plants of Northeast India.** J. Ethnopharmacol., v. 132(1), p. 286-96, 2010

VAN ACKER, F. A.; HULSHOF, J. W.; HAENEN, G. R.; MENGE, W. M.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. **New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity.** Free Radic. Biol. Med., v. 31, p. 31–37, 2001.

VAN JAARSVELD, H.; KUYL, J. M.; SCHULENBURG, D. H.; WIID, N. M. **Effect of flavonoids on the outcome of myocardial mitochondrial ischemia/reperfusion injury.** Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., v. 91, p. 65–75, 1996.

VASSALO, D. V.; STEEMON, I. V. **Contratilidade cardíaca.** In: AIRES, M. M. Fisiologia. 2. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Editora Guanabara Koogan, p. 368 – 391, 1999.

VASCONCELOS, C. M. L.; ARAÚJO, M. S.; SILVA, B. A.; CONDE-GARCIA, E. **A. Negative inotropic and chronotropic effects on the guinea pig atrium of extracts obtained from *Averrhoa carambola* L. leaves.** Braz. J. Med. Biol. Res., v. 38, p. 1113–1122, 2005.

VELAYUTHAM, PON.; ANANDH, BABU.; DONGMIN, LIU. **Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update.** Curr. Med. Chem., v. 15(18): p. 1840–1850, 2008.

VIANNA, H. R.; CORTES, S. F.; FERREIRA, A. J.; CAPETTINI, L. S.; SCHMITT, M.; ALMEIDA, A. P.; MASSENSINI, A. R.; LEMOS, V. S. **Antiarrhythmogenic and antioxidant effect of the flavonoid dioclein in a model of cardiac ischemia/reperfusion.** *Planta Med.*, v.72, p. 300–303, 2006.

VIEIRA, L. S.; ALBUQUERQUE, J. M. **Fitoterapia Tropical – Manual de Plantas Medicinais.** FCAP - Serviço e Documentação e Informação. Belém, 1998.

VIEL, T. A. et al. **Evaluation of the antiurolithiatic activity of the extract of *Costus spiralis* Roscoe in rats.** *J. Ethnopharmacol.*, v. 66, p.193-198, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica.** Ed. Artmed, p. 931; 2000.

VOLKENSHTEIN, M. V. **Biophysics.** Moscow, Russian: Mir Publishers, p. 228, 1983.

WAGENKNECHT, T.; GRASSUCCI, R.; FRANK, J.; SAITO, A.; INUI, S. **Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum.** *Nature*, v. 338, p. 67 – 170, 1989.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. **Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas.** 2. São Paulo: Pharmabooks, 2006

WALLACE, CHR.; BACZKÓ, I.; JONES, L.; FERCHO, M.; LIGHT, PE. **Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols.** *Br. J. Pharmacol.*, v. 149, p. 657–665, 2006.

WANG, L. C.; MA, H.; HE, JG.; LIAO, X. X.; CHEN, W. F.; LENG, XY.; MA, L, MAI W.Y.; TAO, J.; ZENG, W. T.; LIU, J.; DONG, YG.; TANG, AL.; FENG, C. **Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor on the calcium transients and calcium handling proteins in ventricular myocytes from rats with heart failure.** *Chin. Med. J. (Engl.)*, v. 118(9), p. 731-7, 2005.

WANG. L. W.; JOU, J.K.; CHEN,I. J.; TENG, C. MANDLIN, C.N. **Antihypertensive and vasorelaxing activities of synthetic xanthone derivatives.** *Bioorg. Med. Chem.*, v.10 (3), p. 567-572, 2001.

WANG YAN, JIAN-GONG SHI, MU-ZOUWANG, CHUN-TAO CHE, JOHN H.K.YEUNG. **Vasodilatory actions of xanthenes isolated from a Tibetan herb, *Halenia elliptica***, *Phytomedicine*, v. 16, p. 1144–1150, 2009.

WANG, Y.; WANG, HY.; YUAN, ZK.; ZHAO, XN.; WANG, JX.; ZHANG, ZX. Quercetin decreased heart rate and cardiomyocyte Ca^{2+} oscillation frequency in rats and prevented cardiac hypertrophy in mice. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, v. 20(5) p. 426-30, 1999.

WEIDMANN, S. **Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart**. *J. Physiol.*, v. 210, p.1041, 1966.

WHISTLER, R. L.; BUSHWAY, A. A.; SINGH, P. P.; NAKAHARA, W.; TOKUZEN, R. **Noncytotoxic, antitumor polysaccharides**. *Advances in Carbohydrate. Chem. Biochem.*, v.32, p. 235-275, 1976.

WHITTLE, B. A. **The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics**. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, v. 22 (2), p. 246-253, 1964.

WIBO, M.; BRAVO, G.; GODFRAIND, T. **Postnatal maturation of excitation-contraction coupling in rat ventricle in relation to the subcellular localization and surface density of 1,4-dihydropyridine and ryanodine receptors**. *Circ. Res.*, v. 68, p. 662 – 673, 1991.

WIJETUNGE, S.; AALKJAER, C.; SCHACHTER, M.; HUGHES, A. D. **Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 189, p. 1620–1623, 1992.

WOODWORTH, R.S. **Maximal contraction, “staircase” contraction, refractory period, and compensatory pause of the heart**. *Am. J. Physiol.*, v. 8, p. 213-249, 1902.

WU, JX.; LI, HF.; LIU, CB.; TIAN, ZF. **Effects of genistein on contractility of isolated right ventricular muscles in guinea pig**. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, v. 24(4), p. 406-9, 2008.

WU, XL.; WANG, YY.; CHENG, J.; ZHAO, YY. **Calcium channel blocking activity of calycosin, a major active component of *Astragali Radix*, on rat aorta**. *Acta Pharmacol. Sin.*, v. 27, p. 1007–1012, 2006.

XIAO, H. B.; JUN, F.; LU, X. Y.; CHEN, X. J.; CHAO, T.; SUN, Z. L. **Protective effects of kaempferol against endothelial damage by an improvement in nitric oxide production and a decrease in asymmetric dimethylarginine level.** Eur. J. Pharmacol., v. 616, p. 213–222, 2009.

XIE, YI-WU.; HONG-XI, XU.; HUI, DONG.; RONALD, R.; FISCUS; PAUL P. H. **But, Role of nitric oxide in the vasorelaxant and hypotensive effects of extracts and purified tannins from *Geum japonicum*,** J. Ethnopharmacol., v. 109, p. 128–133, 2007.

XU, YC.; LEUNG, G. P. H.; WONG, P. Y. D.; VANHOUTTE, P. M.; MAN, R. Y. K. **Kaempferol stimulates large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (BKCa) channels in human umbilical vein endothelial cells via a cAMP/PKA-dependent pathway.** Br. J. Pharmacol., v. 154, p. 1247–1253, 2008.

ZALBA, G.; SAN JOSE, G.; MORENO, M. U.; FORTUNO, A.; DIEZ, J. **NADPH oxidase-mediated oxidative stress: genetic studies of the p22 (phox) gene in hypertension.** Antioxid. Redox Signal., v. 7, p. 1327–1336, 2005.

ZHANG, G.; HAO, X.; DAI, D.; FU, Y.; ZHOU, P.; WU, C. **Puerarin blocks Na^{+} current in rat ventricular myocytes.** Acta Pharmacol. Sin., v. 24, p. 1212–1216, 2003.

ZHANG, G. Q.; HAO, X. M.; ZHOU, P. A.; WU, C. H.; DAI, D. Z. **Puerarin blocks transient outward K^{+} current and delayed rectifier K^{+} current in mice hippocampal CA1 neurons.** Acta Pharmacol. Sin., v. 22, p. 253–256, 2001.

ZHAO, Z.; LIU, B.; ZHANG, G.; et al. **Molecular basis for genistein-induced inhibition of Kir2.3 currents.** Pflugers Arch., v. 456, p. 413–423, 2008

ZHOU, X. M.; YAO, H.; XIA, M. L.; CAO, C. M.; JIANG, H. D.; XIA, Q. **Comparison of vasodilatation effect between quercetin and rutin in the isolated rat thoracic aorta.** Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban., v. 35(1), p. 29–33, 2006.

ZHU, X.; FANG, L.; LI, Y.; DU, G. **Endothelium-dependent and –independent relaxation induced by pinocembrin in rat aortic rings.** Vascul. Pharmacol., v. 46, p. 160–165, 2007.

ZITRON, E.; SCHOLZ, E.; OWEN, R.W.; et al. **QTc prolongation by grapefruit juice and its potential pharmacological basis: HERG channel blockade by flavonoids.** *Circulation*, v. 111, p. 835–838, 2005.

ZWEIER, J. L.; TALUKDER, M. A. **The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury.** *Cardiovasc. Res.*, v.70, p. 181–190, 2006.

ANEXO A



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que, a amostra de planta encaminhada pela senhora Adriana Karla de Lima em 30/07/2006 para o Herbário IPA Dárdano de Andrade Lima, foi identificada como *Costus cf. spiralis* (Jacq.) Roscoe, pertencente à família Zingiberaceae, e, encontra-se tombada neste acervo sob o número 70.285.

Atenciosamente


MARIA OLÍVIA DE OLIVEIRA CANO
Pesquisadora

29/06/09

Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA
Vinculada à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária
Av. Gal. San Martin, 1371 - Bongi - 50761-000 - Recife - PE - C.P. 1022
CNPJ 10.912.293/0001-37 - PABX: (81) 3184-7200 - Fax: (81) 3184-7211
Home Page: www.ipa.br / E-mail: ipa@ipa.br

IPA - 73 anos semeando conhecimento

ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo de efeitos inotrópicos de extratos e frações obtidas das folhas de *Costus spiralis* (jacq.) Roscoe (cana-do-brejo) sobre o coração de cobaia (*Cavia pocellus*)", sob coordenação do Prof. Dr. Eduardo Antônio Conde Garcia, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 24/08/2008.

São Cristóvão, 25 de agosto de 2008

Prof.ª Dr.ª Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 2105 6661/6606