

MARIEM EL SAYAH

ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
Drymis winteri E DE ALGUNS DE SEUS CONSTITUINTES EM DIVERSOS
MÚSCULOS LISOS "IN VITRO".

Dissertação apresentada ao Curso de Pós -
graduação em Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis, dezembro de 1996.

**"ANÁLISE FARMACOLÓGICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA
DRYMIS WINTERI E DE ALGUNS DE SEUS CONSTITUINTES EM
DIVERSOS MUSCULOS LISOS *IN VITRO*"**

POR

MARIEM EL SAYAH

**Dissertação julgada e aprovada em sua forma
final, pelo Orientador e membros da Banca
Examinadora, composta pelos Professores
Doutores:**

Banca Examinadora:



João Batista Calixto

(FMC/UFSC-Orientador)



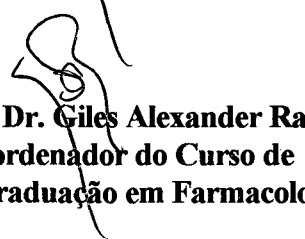
Roberto Soares de Moura

(UERJ/RJ-Membro Titular)



Giles Alexander Rae

(FMC/UFSC-Membro Titular)


Prof. Dr. Giles Alexander Rae
Coordenador do Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, dezembro de 1996.

Se um único homem atingir a mais elevada qualidade de amor,
isto será suficiente para neutralizar o ódio de milhões.

Gandhi

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha família, e em especial à minha mãe pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, pelo exemplo, incentivo e empenho durante todo o curso e no presente trabalho.
- A todos os professores do Departamento de Farmacologia da UFSC.
- Aos Professores Rosendo A. Yunes do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, e ao Professor Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Univale, que nos forneceram os extratos vegetais e os produtos isolados para os ensaios farmacológicos.
- A todos os funcionários do Departamento
- A todos os amigos que se fizeram especiais.
- A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram da realização deste trabalho.
- E à espiritualidade amiga.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Animais	15
3.2. Classificação botânica.....	15
3.3. Análise química.....	15
3.3.1. Preparação do extrato A (extrato hidroalcoólico)	16
3.3.2. Preparação do extrato B (extrato metanólico).....	16
3.4. Isolamento e Montagem das preparações.....	17
3.4.1. Traquéia de cobaia	17
3.4.2. Procedimento experimental	18
3.4.3. Traquéia de cobaia ativamente sensibilizada à ovalbumina	19
3.4.4. Bexiga de cobaia	20
3.4.5. Procedimento experimental	21
3.4.6. Íleo de cobaia	21
3.4.7. Procedimento experimental	22
3.4.8. Útero de rata.....	23
3.4.9. Procedimento experimental	23

3.5. Veia porta de rato	24
3.5.1. Procedimento experimental	24
3.6. Drogas e reagentes	25
3.7. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	28
4.1. Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo isolado de cobaia.....	28
4.2. Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no útero isolado de cobaia	30
4.3. Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na bexiga isolada de cobaia	33
4.4. Efeito do extrato hidroalcoólico da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia e veia porta de rato...	35
4.5. Efeito das frações semipurificadas obtidas da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia	44
4.5.1. Fração aquosa.....	44
4.5.2. Fração acetato de etila.....	47
4.5.3. Fração clorofórmica	50
4.6. Efeito da astilbina isolada da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia	53

4.7. Efeito do taxifolin isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia	56
4.8. Efeito do composto 3 isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.....	59
4.9. Efeito do composto 5 isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia.....	62
5.0. Efeito da composto 9 isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia.....	65
5.1. Efeito do composto 1- β -[p-metoxi-coumaroiloxi] poligodial isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.....	68
5.2. Efeito do composto poligodial isolado da <i>Drymis winteri</i> sobre as contrações induzidas por agonistas em diversos músculos lisos “in vitro”	71
5.2.1. Íleo isolado de cobaia	71
5.2.2. Traquéia isolada de cobaia.....	71
5.2.3. Veia porta isolada de rato	78
6. DISCUSSÃO.....	80
7. RESUMOS E CONCLUSÕES	105
8. ABSTRACT.....	111
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Vista de um dos ramos laterais, com flores, da *Drymis winteri*.....12
- FIGURA 2** - Compostos isolados da *Drymis winteri* descritos na literatura.....13
- FIGURA 3** - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela acetilcolina, histamina e bradicinina no íleo isolado de cobaia 29
- FIGURA 4** - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela acetilcolina, bradicinina e prostaglandina $F_{2\alpha}$ no útero isolado de rata 31
- FIGURA 5** - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela endotelina - 1, angiotensina II, ocitocina e ao cloreto de cálcio no útero isolado de rata 32
- FIGURA 6** - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pelo carbacol, histamina, bradicinina e substância P na bexiga isolada de cobaia 34
- FIGURA 7** - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela bradicinina, prostaglandina E_2 , U 46619 e composto 48/80 na traquéia isolada de cobaia..... 38

FIGURA 8 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela substância P, neurocinina A, substância P - metil ester na traquéia isolada de cobaia 39

FIGURA 9 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela acetilcolina e histamina na traquéia isolada de cobaia 40

FIGURA 10 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados 41

FIGURA 11 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pelo senktide na veia porta isolada de rato 42

FIGURA 12 - Efeito da fração aquosa isolada da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela bradicinina e substância P na traquéia isolada de cobaia 45

FIGURA 13 - Efeito da fração aquosa isolada da *Drymis winteri* sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados 46

FIGURA 14 - Efeito da fração acetato de etila isolada da *Drymis winteri* sobre a contração induzida pela histamina, acetilcolina e bradicinina na traquéia isolada de cobaia 48

FIGURA 15 - Efeito da fração acetato de etila isolada da *Drymis winteri* sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados 49

FIGURA 16 - Efeito da fração clorofórmica isolada da <i>Drymis winteri</i> sobre a contração induzida pela histamina, bradicinina e substância P na traquéia isolada de cobaia.....	51
FIGURA 17 - Efeito da fração clorofórmica isolada da <i>Drymis winteri</i> sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados	52
FIGURA 18 - Efeito da astilbina sobre a contração induzida pela acetilcolina e bradicinina na traquéia isolada de cobaia.....	54
FIGURA 19 - Efeito da astilbina sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados	55
FIGURA 20 - Efeito do taxifolin sobre a contração induzida pela acetilcolina e histamina no íleo isolado de cobaia.....	57
FIGURA 21 - Efeito do taxifolin sobre a resposta a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados.....	58
FIGURA 22 - Efeito do composto 3 sobre a contração induzida pela bradicinina e substância P na traquéia isolada de cobaia.....	60
FIGURA 23 - Efeito do composto 3 sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados	61
FIGURA 24 - Efeito do composto 5 sobre a contração induzida pela acetilcolina e bradicinina no íleo isolado de cobaia.....	63

FIGURA 25 - Efeito do composto 5 sobre a contração induzida pela substância P na traquéia isolada de cobaia	64
FIGURA 26 - Efeito do composto 9 sobre a contração induzida pela acetilcolina e bradicinina no íleo isolado de cobaia.....	66
FIGURA 27 - Efeito do composto 9 sobre a contração induzida pela bradicinina e substância P na traquéia isolada de cobaia	67
FIGURA 28 - Efeito do composto 1-β[p-metoxi-coumaroiloxi]poligodial sobre a contração induzida pela bradicinina e substância P na traquéia isolada de cobaia	69
FIGURA 29 - Efeito do composto 1-β[p-metoxi-coumaroiloxi]poligodial sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados	70
FIGURA 30 - Efeito do composto poligodial sobre a contração induzida pela acetilcolina, histamina e bradicinina no íleo isolado de cobaia.....	73
FIGURA 31 - Efeito do composto poligodial sobre a contração induzida pela histamina, bradicinina, composto 48/80 e U46619 na traquéia isolada de cobaia.....	74
FIGURA 32 - Efeito do composto poligodial sobre a contração induzida pela substância P, substância P - metil ester, e neurocinina A na traquéia isolada de cobaia	75
FIGURA 33 - Efeito do composto poligodial sobre a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados.....	76

FIGURA 34 - Efeito do composto poligodial sobre a contração induzida pela bradicinina, U 46619, endotelina - 1, substância P, senktide na veia porta isolada de rato 79

INTRODUÇÃO

Desde a antigüidade, o homem vem utilizando os produtos naturais com propriedades medicinais para o tratamento de várias doenças. Os chineses, mil anos atrás, e mais tarde os egípcios e depois os gregos e romanos tratavam seus males com extratos vegetais, dos quais não se conheciam suas composições.

A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes das plantas é muito diversa e curiosa. Muitas foram as fontes que o auxiliaram: a inspiração, o instinto, o ensinamento dos animais, as analogias de cor, forma exterior, gosto, etc. Foi através da experimentação que praticava o homem primitivo com as plantas que se passou a conhecer as suas propriedades curativas. É possível que o homem tenha levado à boca a maioria das plantas, muitas eram inócuas, outras causavam enfermidades e levavam à morte. Não há dúvida que algumas delas aliviavam sintomas de indisposição e enfermidades, e outras causavam alucinações.

Dos 375 bilhões de toneladas de alimentos que consumimos por ano, a maior parte provém das plantas, sintetizado por elas, do ar e do solo, com a ajuda da luz solar. O homem, desde os primórdios da civilização, nominou as plantas e os animais de seu ambiente, utilizando-se de palavras que os representassem. Desta maneira, na linguagem corrente, foram surgindo mais e mais nomes para os seres vivos em geral. A estes nomes, ditos populares pela origem, foram acrescentados outros nomes, principalmte durante os períodos das

grandes viagens dos descobridores dos continentes e depois dos colonizadores, os quais propiciaram uma mistura de conhecimentos entre os povos e raças distintas.

Surgiu a necessidade de uma uniformização na nomenclatura das plantas com o objetivo de nominá-las de forma segura, foi então a partir do século XVIII que Linné empregou o latim, como idioma científico para descrever uma espécie e caracterizá-la a uma categoria denominada de gênero. Desenvolveu-se desse modo um sistema de identificação de espécies vegetais que em grande parte sanou os problemas referentes à confusão existente a respeito da identidade das plantas.

A utilização de plantas medicinais no Brasil tem origem na cultura dos diversos grupos indígenas que habitavam o País. Alguns exemplos são a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich), o guaraná (*Paullinia cupana* H.B.K.), o taiuiá (*Cayaponia* spp.), etc. Muitas outras espécies foram trazidas pelos europeus, como a camomila (*Matricaria chamomilla* L.), a melissa (*Melissa officinalis* L.), a malva (*Malva sylvestris* L.) e outras ainda são provenientes de outros países sul-americanos, como o boldo (*Peumus boldus* Mol.) e a quilaia (*Quillaja saponaria* Mol.). A utilização terapêutica das plantas difundiu-se devido à grande importância terapêutica a elas atribuídas pela população.

Esse conhecimento acumulado pela medicina popular permitiu o desenvolvimento ao longo dos anos de medicamentos utilizados na clínica

médica como os digitálicos, a quinina, a morfina, a atropina, etc. Contudo, as plantas de uma mesma espécie, crescendo em regiões de climas diferentes, não apresentam necessariamente o mesmo metabolismo secundário; por esta razão, podem apresentar efeitos biológicos diferentes na dependência da concentração relativa desses princípios.

Tendo em vista esta característica vegetal, é possível compreender que a atividade medicinal de uma planta, em diferentes épocas e lugares, pode ter uma variação muito grande: desde atividade benéfica, quando predominam os princípios terapêuticos, até ação tóxica, quando outros produtos predominam ou a síntese daqueles princípios é excessiva. Portanto, somente a perfeita compreensão dos fenômenos que envolvem o cultivo, controle e utilização das plantas medicinais, ou produtos dela extraídos, nos possibilitarão a utilização plena desses recursos.

A própria Organização Mundial de Saúde vem reconhecendo o valor terapêutico das plantas medicinais e estimulando seu uso em países em desenvolvimento, embora tenha recomendado cuidados especiais à população (WHO, 1991). Outra avaliação da WHO indica que cerca de 80 % da população ainda utiliza direta ou indiretamente produtos derivados de plantas para o tratamento dos cuidados primários a saúde (WHO, 1993) Hoje, a medicina alopática utiliza aproximadamente 119 drogas, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores. No entanto, das cerca de 360.000 espécies de plantas superiores conhecidas, somente cerca de 10 % delas

já foram estudadas com a finalidade de verificar suas atividades biológicas, o que permite deduzir que muitas substâncias com atividade medicinal podem ainda ser isoladas (Chadwick e Marsh, 1990). Cerca de 2/3 das espécies estão distribuídas nas florestas tropicais, de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento da Àsia, Àfrica e Àmerica do Sul. Somente o Brasil detém aproximadamente 60.000 espécies representando um total de aproximadamente 20 % de todas as espécies conhecidas da flora mundial, e supõe-se que existam mais de 10.000 espécies ainda não catalogadas na floresta amazônica.. É possível que muitas espécies vegetais estejam praticamente extintas ou serão extintas nos próximos anos, não permitindo assim sequer a análise de seus potenciais terapêuticos e/ou econômicos.

Nas últimas décadas, as plantas medicinais passaram a ser cogitadas, por alguns profissionais da área de saúde e por órgãos governamentais, como um recurso terapêutico passível de utilização no atendimento de algumas das necessidades dos serviços de saúde. Além disso, os produtos naturais, em especial as plantas medicinais, vêm igualmente propiciando a síntese de novas moléculas com potencial medicinal (protótipos) que resultaram no desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica internacional.

São muitos os exemplos de fármacos obtidos a partir de recursos naturais, e assim o valor econômico dos recursos de origem vegetal e animal é imensurável. Os dados disponíveis indicam que cerca de 25 % dos medicamentos atualmente comercializados são obtidos direta ou indiretamente a

partir de recursos naturais, especialmente de plantas (Farnsworth e Morris, 1976; Balandrin et al., 1985). Estima-se que o mercado mundial de medicamentos ultrapasse a US\$ 300 bilhões/ano e assim o valor agregado dos produtos naturais, somente neste setor, pode ser considerado de grande monta.

Uma outra aplicação importante na área de produtos naturais é o uso crescente das toxinas e de venenos de origem animal, e dos produtos derivados de plantas como ferramentas indispensáveis para a compreensão de fenômenos moleculares complexos em nível celular e molecular. Embora não seja conhecido o valor econômico da comercialização desses produtos, certamente eles representam um mercado considerável em todo o mundo. Como exemplos, podem ser mencionados, a rianodina e a cafeína, alcalóides que interferem com o cálcio no retículo sarcoplasmático, a tapsigargina, sesquiterpeno que interfere com a bomba de cálcio ATPase do retículo endoplasmático, a capsaicina, amida que estimula receptores próprios e libera neuropeptídeos de neurônios sensoriais, ácido ocadáico, inibidor de fosfatases, forskolin, diterpeno que ativa a adenilato ciclase, etc. Soma-se a isso a enorme contribuição de várias toxinas animais e vegetais que permitiu, pela especificidade de ação, estudar e clonar vários canais iônicos possibilitando, assim, o entendimento do mecanismo de ação de muitos neurotransmissores.

Nos últimos anos o interesse pelas plantas medicinais, visando ao desenvolvimento de novos medicamentos tem crescido acentuadamente em todo o mundo (Eisenberg 1993; Hoffman e Eskinazi, 1995; Leaders, 1996; Brevoort,

1996). Assim, o interesse e conseqüentemente os investimentos da indústria farmacêutica, particularmente a multinacional, têm crescido de maneira expressiva nesta área. Há 15 anos, poucas das maiores indústrias farmacêuticas mundiais tinham programas de pesquisa na área de plantas. Atualmente, pelo menos metade dessas grandes indústrias está desenvolvendo projetos de pesquisas com plantas (Borris, 1996; Turner, 1996).

Pesquisas realizadas nos últimos anos permitiram o desenvolvimento de medicamentos importantes a partir de plantas. Podem ser mencionadas, entre outras, a descoberta dos alcalóides **vimblastina** e **vincristina** isolados do *Catharantus roseus* o terpenóide **taxol** isolado do *Taxus brevifolia*, (Cragg et al., 1993), drogas utilizadas no tratamento da leucemia e do câncer de ovário e mama, respectivamente, e a **artemisinina**, sesquiterpeno lactona isolado da *Artemisia annua* (Hien e White, 1993), empregada no tratamento da malária. Somente no último ano a Food and Drug Administration (USA) aprovou a liberação de três novas drogas derivadas de plantas: o hycantin isolado da *Camptotheca acuminata* (usada no tratamento do câncer de ovário), taxol isolado do *Taxus brevifolia* (empregado no câncer de ovário e mama) (Wall e Wani, 1996) e a nabilona isolada da *Canabis sativa* (antiemético). Além disso, muitos compostos isolados de plantas estão em fase avançada de estudos clínicos.

Vários fatores têm contribuído para o crescimento do mercado dos medicamentos derivados de plantas em todo o mundo. Entre outros, podem ser

mencionados: 1) grande parte da população procura por medicamentos mais eficazes; 2) em muitas patologias, as drogas sintéticas ainda não demonstraram a eficácia clínica esperada; 3) a população de muitos países, especialmente os mais ricos, vem nos últimos anos procurando por terapias naturais, insatisfeita com a medicação moderna, especialmente face aos seus efeitos indesejáveis. Por categoria terapêutica, o mercado de fitofármacos é formado por medicamentos com ação sobre o sistema cardiovascular (27%), seguido por drogas para o tratamento de afecções respiratórias (15%), do trato digestivo (14%) e como tônicos (14%). Medicamentos, como por exemplo, o **Tebonin**[®], o **Ginsena**[®], produtos derivados do alho (**Kway**[®]), chegam a comercializar 200, 50 e 40 milhões de dólares/ano, respectivamente (Grunwald, 1995; Brevoort, 1995)

Em que pese a necessidade de elevada tecnologia e dos altos custos envolvidos no desenvolvimento de novas moléculas com potencial medicinal, com a aprovação da Lei de Patentes esse quadro deve ser modificado completamente no Brasil. O desenvolvimento de novas moléculas ativas, com mecanismos de ação bem definidos, particularmente a partir de produtos naturais, poderá abrir grandes possibilidades de interação com parte da indústria farmacêutica nacional, mas principalmente com a multinacional, no momento muito interessada no desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de várias patologias onde a síntese orgânica não tem mostrado resultados promissores. Como já mencionado anteriormente, tal fato tem levado a maioria das grandes indústrias farmacêuticas a desenvolver grandes programas visando

ao desenvolvimento de novas drogas a partir de produtos naturais (Turner, 1996; Wall e Wani, 1996).

No Brasil, as pesquisas de plantas medicinais de uso popular foram incentivadas principalmente pelo Ministério da Saúde através da sua Central de Medicamentos (CEME). O objetivo principal do programa foi avaliar pragmaticamente as propriedades farmacológicas e toxicológicas das plantas mais comumente utilizadas, visando à sua validação como alternativas terapêuticas. Validar uma planta medicinal de uso tradicional ou popular é, no sentido estrito do termo, comprovar os benefícios do seu uso na espécie humana, ou seja, garantir que o fitoterápico é eficaz e tem baixa toxicidade, e incluem-se também testes pré-clínicos e clínicos.

Seguindo as diretrizes dessa linha de trabalho, em nossos laboratórios foram realizados estudos prévios com o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae), planta nativa da região Sul do Brasil e também de outros países da América do Sul (figura 1), sendo conhecida popularmente como casca de anta, canela amarga e para tudo. Esta planta é utilizada pela população para o tratamento das patologias relacionadas ao sistema respiratório, incluindo alergia e a asma brônquica. Suas cascas são também empregadas como antiinflamatório, cicatrizante, antiespasmódico e antipirético (Morton, 1981; Simões et al., 1986).

A *Drymis winteri* é uma árvore com até 5 m de altura, com folhas alternas, oblongas e obtusas de aproximadamente 6 a 7 cm de comprimento por

6 cm de largura, com a face inferior branco-prateada. Flores hermafroditas, de 2 a 3 cm de diâmetro, com pétalas brancas, muitos estames e fruto carnosos.

Os estudos fitoquímicos descritos na literatura para essa e outras espécies desse gênero, demonstram a presença de vários metabólitos secundários de diferentes classes químicas, incluindo aldeídos sesquiterpênicos (Appel et al., 1959; Appel e Dohr, 1958; Cortés e Oyarzun, 1981; Brown, 1994) e flavonóides (Cruz e Silva, 1973; Torres et al., 1992). Um dos principais constituintes da *Drymis winteri* foi o sesquiterpeno identificado como poligodial um composto que apresentou atividade inseticida (Caprioli et al., 1987) e antimicrobiana (McCallion et al., 1982; Samuelsson, 1992). Na figura 2 podemos observar alguns dos constituintes isolados da *Drymis winteri* descritos na literatura, e na figura 3 os constituintes isolados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC que foram analisados farmacologicamente neste trabalho.

Os testes “in vivo”, realizados com o objetivo de caracterizar algumas das ações atribuídas pela medicina popular à esta planta, demonstraram que no extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* estão presentes constituintes com potencial atividade analgésica, antiinflamatória e antialérgica (Tratsk et al., 1995; Matta et al., 1994). Estes resultados preliminares mostram claramente que o extrato hidroalcoólico das cascas de *Drymis winteri* apresenta princípio(s) ativo(s) capaz(es) de antagonizar as respostas edematogênicas e contracturantes causadas por vários mediadores químicos diretamente envolvidos nas reações

inflamatórias e alérgicas. Além disso, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foi efetivo em promover analgesia além ter inibido a reação anafilática em animais ativamente sensibilizados à ovalbumina. Em conjunto, estes resultados indicam que as cascas da *Drymis winteri* contêm princípio(s) com potencial atividade antiasmática, antiinflamatória, além de propriedades analgésicas, quando administradas por via oral “in vivo”. Além disso, o efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foi de longa duração. O mecanismo de ação desse(s) composto(s) não está ainda completamente claro, mas os resultados preliminares indicam que o extrato hidroalcoólico dessa planta parece interferir com vários mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório, alérgico e na transmissão dolorosa. Tais resultados apontam uma ação potencialmente benéfica do(s) princípio(s) ativo(s) presente(s) nesta planta para o tratamento de patologias como a asma brônquica, alergia e nos processos inflamatórios e para o tratamento da dor.

A asma brônquica bem como a alergia são patologias até o momento de difícil tratamento devido em grande parte à complexidade de mediadores químicos envolvidos. Assim, é hoje reconhecido que além da participação da histamina já bem estabelecida, muitos outros mediadores químicos como os derivados do metabolismo do ácido araquidônico, incluindo principalmente os leucotrienos e o tromboxano A_2 , o fator de agregação plaquetária (PAF), vários neuropeptídeos como as cininas, taquicininas, CGRP, as citocinas, endotelinas além de fatores presentes no endotélio como o óxido nítrico estão envolvidos

(Frossard e Fajac, 1995; Barnes e Liew, 1995; O'Byrne, 1995; Bai et al., 1995). Considerando a grande ocorrência dessas patologias em todo o mundo e motivado principalmente pela falta de um tratamento efetivo, tem sido intensa a pesquisa nas grandes indústrias farmacêuticas visando desenvolver novos medicamentos mais eficazes no tratamento dessas patologias (Cockcroft e Murdock, 1987; Joos et al., 1995; Kurosawa, 1995; Morley, 1995; Banner e Page, 1995; Howarth, 1995).

Considerando a ampla utilização da infusão das cascas da *Drymis winteri* para o tratamento de patologias relacionadas a doenças do trato respiratório, incluindo a asma brônquica e a alergia, a ausência de estudos farmacológicos com essa planta e principalmente em função dos resultados altamente promissores obtidos nos estudos anteriores de nosso laboratório, julgou-se de interesse dar continuidade aos estudos farmacológicos "in vitro" com o extrato e com alguns dos princípios isolados dessa planta. O conhecimento acerca do mecanismo de ação do extrato, frações semipurificadas e dos compostos puros da *Drymis winteri* poderia contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de processos inflamatórios crônicos como a asma brônquica, no tratamento da alergia e para o alívio da dor.

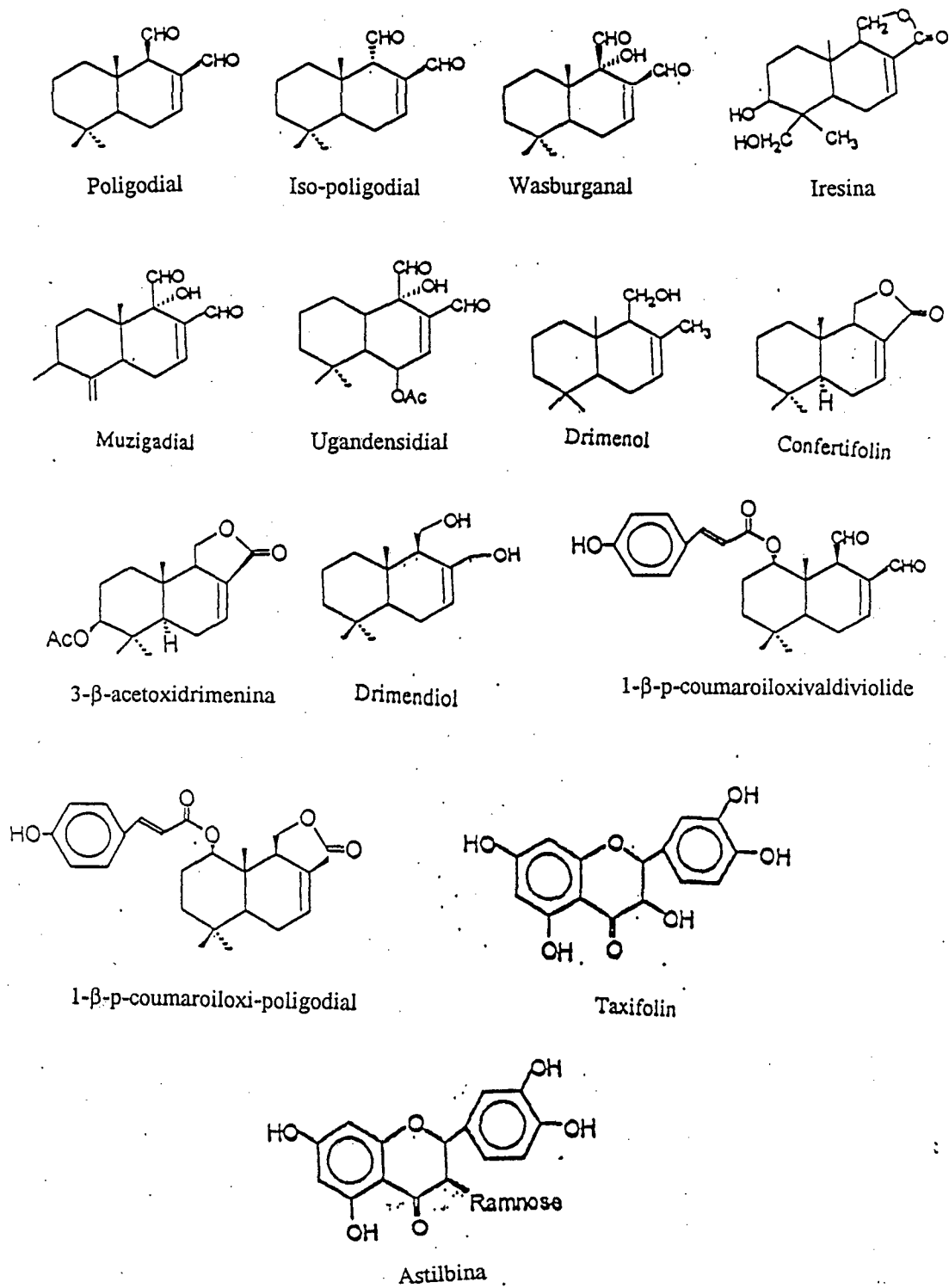


FIGURA 2: Compostos isolados da *Drymis winteri* descritos na literatura.



CASCA DE ANTA

Drymis Winteri Forst.

Figura 1 - Vista de um dos ramos laterais, com flores, da *Drymis winteri*.
Corrêa 1984

2 - OBJETIVOS

O presente estudo foi desenvolvido visando:

1 - Analisar alguns dos mecanismos envolvidos nas ações do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae), planta utilizada no Brasil para o tratamento da asma e da alergia, sobre as respostas contráteis induzidas por vários mediadores químicos envolvidos nos processos inflamatórios, nociceptivo na asma e na alergia, na musculatura lisa vascular e não vascular “in vitro”,

2 - Analisar em diversas preparações de músculos lisos isolados, as ações de algumas frações semipurificadas bem como de compostos isolados das cascas da *Drymis winteri*, com o objetivo de caracterizar o(s) princípio(s) ativo(s) responsável(is) pelo(s) efeitos analgésicos, antiinflamatórios e anti-alérgicos obtidos em estudos anteriores para o extrato hidroalcoólico desta planta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados cobaias de ambos os sexos, pesando entre 200 a 500 g e ratos wistar de ambos os sexos pesando 180 - 350 g, criados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas e em ambiente com temperatura controlada ciclo claro/escuro de 12 h, com água e ração fornecidas *ad libitum*.

3.2 - Classificação Botânica

As cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae) foram coletadas no município de Bom Retiro - SC, e a classificação botânica da espécie foi realizada pela professora Leila da Graça Amaral, do Departamento de Botânica da UFSC, Florianópolis. Uma excicata da planta foi depositada no Herbário FLOR do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina, registrada sob o número 26313.

3.3 - Análise Química

O estudo fitoquímico desta planta foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sendo coordenado pelo Prof. Dr. Rosendo A. Yunes. O material vegetal foi cortado em pequenos pedaços, secos durante dois dias à 40 - 50 °C em estufa e submetido à preparação dos

extratos. Foram obtidos dois extratos, denominados de A (para testes farmacológicos) e B (para análise fitoquímica).

3.3.1 - Preparação do Extrato A (Extrato Hidroalcoólico)

O material vegetal foi macerado com uma mistura de etanol/água 1:1 durante cerca de 10 dias à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até a concentração de $\pm 30\%$, sendo acondicionado em recipientes apropriados e mantidos sob baixa temperatura até a realização dos testes farmacológicos.

3.3.2 - Preparação do extrato B (Extrato Metanólico)

O material vegetal foi macerado com metanol comercial durante cerca de 10 dias à temperatura ambiente, filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até cerca de 1/6 de seu volume inicial para obtenção do extrato metanólico bruto. A este extrato foi adicionado cerca de 50 % v/v de água destilada sendo posteriormente particionado sucessivamente com solventes de polaridades crescentes, como clorofórmio e acetato de etila, para obtenção dos respectivos extratos semipuros, conforme metodologia descrita anteriormente (Miguel, 1987; Cechinel Filho, 1995a). O extrato de clorofórmio foi submetido à cromatografia em coluna sobre sílica gel (Merck 60) eluído com uma mistura de hexano/acetato de etila, com aumento gradativo de polaridade (acetato de etila). Após reunião das frações similares, monitoradas por cromatografia em camada

delgada, e sucessivas cromatografia em coluna, foi possível isolar e identificar quimicamente alguns compostos, como o poligodial e o 1- β [p-metoxicoumaroiloxi] poligodial. Alguns compostos isolados da *Drymis winteri* necessitam ainda ser identificados quimicamente, os testes fitoquímicos indicam que parecem tratar-se de sesquiterpenos (composto 3, 5 e 9).

Do extrato semipuro de acetato de etila foram isolados, por cromatografia em coluna, usando CHCl_3 / MeOH como eluente com aumento gradativo da polaridade (MeOH), os flavonóides astilbina e taxifolin. Todos os compostos foram caracterizados a partir de dados espectroscópicos usuais (IV, RMN - ^1H e ^{13}C) em comparação com aqueles descritos na literatura e através de cromatografia em camada delgada com amostras autênticas (poligodial, astilbina e taxifolin).

3.4 - Isolamento e Montagem das Preparações

3.4.1 - Traquéia de cobaia

Cobaias de ambos os sexos foram sacrificadas com pancada na cabeça, seguido de secção das artérias carótidas. A traquéia foi rapidamente removida e cuidadosamente dissecada dos tecidos adiposos e conectivos. Geralmente quatro anéis transversos (3 - 4 mm de largura) foram obtidos de cada animal. Os anéis foram abertos e as preparações, com cerca de 8 - 10 mm de comprimento, foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução nutritiva de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118,0; KCl 4,4; CaCl_2 2,5;

NaHCO₃ 25,0; MgSO₄ 1,1; KH₂PO₄ 1,2; e glicose 11,0; mantida à 37 °C através de banho circulante, pH 7,2 - 7,4, borbulhada com 5 % de CO₂ e 95 % de O₂. As preparações permaneceram em equilíbrio durante pelo menos 60 min antes da adição das drogas ao banho, sob tensão basal de 1,0 g; sendo a solução nutriente renovada a cada 15 min. As alterações na tensão foram registradas por meio de transdutores de força F-60 acoplados a registrador Narco 40 (ambos da Narco Biosystems). As preparações foram montadas sem epitélio, sendo que a remoção foi feita com auxílio de algodão imerso na solução nutriente. A ausência do epitélio foi confirmada pela falta de relaxamento à bradicinina (100 nM) em preparações sob tônus espontâneo (Schlemper e Calixto, 1994, 1995). Em todos os experimentos somente um agonista foi testado em cada preparação, e quando foram utilizados a substância P e análogos, todos os experimentos foram conduzidos em presença de captopril (3 µM) e fosforamidon (1 µM), adicionados ao banho 15 min antes da adição das drogas para prevenir a ação das peptidases.

3.4.2 - Procedimento Experimental

Após o período de equilíbrio, foram construídas curvas concentração-respostas cumulativas à bradicinina (1 nM - 10 µM), prostaglandina E₂ (1 - 100 nM), acetilcolina (1 nM - 1 mM), capsaicina (0,1 - 100 nM), substância P (0,1 nM - 10 µM), histamina (1 nM - 1 mM), U 46619 (0,1 nM - 1 µM) análogo estável do tromboxano A₂, composto 48/80 (1 - 100 µg/ml), [β-ala⁸]

neurocinina A (4-10) (1 nM -1 μ M), agonista seletivo para o receptor NK₂, substância P-metil éster (1 - 100 nM) agonista seletivo para receptor NK₁ e senktide (1 - 100 nM), agonista seletivo para o receptor NK₃. Os experimentos foram conduzidos na ausência e na presença do extrato hidroalcoólico, frações semipurificadas ou de compostos isolados das cascas da *Drymis winteri*, adicionadas ao banho 20 min antes da obtenção das curvas concentração-resposta. Geralmente 2 a 3 curvas concentração-resposta completas foram obtidas para cada agonista em cada preparação com intervalo de 60 min entre cada curva. Os experimentos com bradicinina foram obtidos na presença de captopril (3 μ M) para evitar sua degradação pelas cininases II.

3.4.3 - Traquéia de cobaia ativamente sensibilizada à ovalbumina

Cobaias de ambos os sexos foram sensibilizadas pela injeção intraperitoneal de 0,5 ml de solução salina 0,9%, contendo 10 μ g de ovalbumina, dispersa em 1 mg de hidróxido de alumínio. A injeção foi repetida 14 dias após e os animais foram sacrificados 7 a 10 dias depois da segunda injeção de ovalbumina (Andersson e Bergstrand, 1981; Pretolani et al., 1989). Após a remoção dos tecidos adjacentes, as preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit (Schlemper e Calixto, 1995). Decorrido o período de equilíbrio de 60 min, as preparações foram contraídas com a adição de carbacol (100 μ M), e após 30 min, as preparações foram lavadas

várias vezes. Após o completo relaxamento foi adicionado ao banho ovalbumina (1 - 3 $\mu\text{g/ml}$) e a resposta contrátil foi analisada em vários períodos 2, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min, após a adição da ovalbumina. A resposta contrátil à ovalbumina, foi obtida na presença ou na ausência do extrato hidroalcoólico, frações e dos compostos isolados da *Drymis winteri* pré-incubados 20 min. A resposta contrátil à ovalbumina, foi comparada como percentagem de contração máxima induzida pelo carbacol (100 μM).

3.4.4 - Bexiga de cobaia

Cobaias de ambos os sexos foram sacrificadas com pancada na cabeça, seguida de secção das artérias carótidas. A bexiga urinária foi isolada e 3 a 4 tiras de 10 a 12 mm de comprimento por 3 a 4 mm de largura foram obtidas de cada animal. As preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução nutritiva de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118,0; KCl 4,4; CaCl_2 2,5; MgSO_4 1,1; NaHCO_3 25,0; KH_2PO_4 1,2 e glicose 11,0; mantida à 37 °C, através de banho circulante, pH 7,2 e 7,4; borbulhada com 5% de CO_2 e 95% de O_2 . As preparações permaneceram em equilíbrio durante 60 min antes da adição das drogas ao banho, sob tensão basal de 1,0 g; sendo a solução nutriente renovada a cada 15 min. As alterações na tensão foram registradas por meio de transdutores de força F-60 acoplados a registrador Narco 40 (ambos da Narco Biosystems).

3.4.5 - Procedimento experimental

Decorrido o período de equilíbrio, foram obtidas curvas concentração-resposta cumulativas ao carbacol (10 nM - 10 μ M), histamina (100 nM - 100 μ M), bradicinina (0,1 nM - 1 μ M) e substância P (0,1 nM - 1 μ M). Os experimentos foram conduzidos na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri* (0,25 - 2 mg/ml), adicionado ao banho 20 min antes da realização das curvas concentração resposta aos agonistas. Geralmente 2 a 3 curvas concentração-resposta foram obtidas para cada agonista em cada preparação com intervalo de 60 min entre cada curva. As respostas contráteis induzidas pela bradicinina foram obtidas na presença de captopril (3 μ M), para evitar sua degradação pelas cininase II, e os experimentos com a substância P foram conduzidos na presença de captopril (3 μ M) e fosforamidon (1 μ M) para evitar a ação das peptidases. A resposta contrátil foi expressa em gramas de tensão.

3.4.6 - Íleo de cobaia

Cobaias de ambos os sexos foram sacrificadas com pancada na cabeça e deslocamento cervical. As tiras do íleo de 10 a 20 mm de comprimento foram obtidas da porção situada 10 a 30 cm próximo a junção ileocecal. Com auxílio de uma pipeta de 10 ml, lavou-se a luz do segmento com 10 a 20 ml de solução

fisiológica de Krebs-Henseleit aquecida, e retirou-se os excessos de tecido adiposo e mesentérico. O segmento de íleo foi então dividido em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento. As preparações foram montadas em cubas de vidro contendo 5 ml de solução nutritiva de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): NaCl 118,0; KCl 4,4; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 0,9; e glicose 11,0; com pH de 7,2 - 7,4 e mantidas à 37°C, através de banho circulante (Calixto et al., 1984). As contrações isotônicas foram registradas em quimógrafo sob carga basal de 1,0 g. As preparações permaneceram em equilíbrio por pelo menos 60 min antes da adição de drogas, e a solução nutritiva foi renovada a cada 15 min.

3.4.7 - Procedimento experimental

Decorrido o período de equilíbrio, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (0,1 nM - 1 mM), bradicinina (0,1 nM - 1 µM), e histamina (1 nM - 10 µM), na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico e dos compostos isolados das cascas da *Drymis winteri*, pré-incubados 20 min antes da curva concentração-resposta. Somente um agonista e de uma a três diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico ou dos compostos isolados foram testados em cada tecido. As respostas à bradicinina no íleo de cobaia foram obtidas na presença de captopril (1 µM) e atropina (0,1 µM) adicionada diretamente a solução fisiológica. Os resultados foram expressos

como porcentagem da resposta máxima de cada agonista tomando-se como 100% a curva concentração-resposta controle (somente na presença do veículo).

3.4.8 - Útero de rata

A musculatura uterina foi obtida de ratas tratadas 24 h antes dos experimentos com benzoato de estradiol (0,5 mg/Kg s.c). Os animais foram sacrificados com pancada na cabeça seguido de deslocamento cervical, e as tiras da musculatura uterina (15 mm de comprimento) livre dos tecidos aderentes foram montados em cubas de vidro contendo 5 ml de solução de De Jalon com a seguinte composição em (mM): NaCl 154,0; KCl 5,6; CaCl₂ 0,3; MgCl₂ 1,4; NaHCO₃ 1,7; e glicose 5,5; mantidas à 30°C através de banho circulante. As contrações isotônicas foram registradas em quimógrafo sob tensão basal de 1,0 g e amplificação de 6 vezes.

3.4.9. Procedimento experimental

Após o período de equilíbrio de 30 - 40 min, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas (Van Rossum, 1963) à acetilcolina (100 nM - 1 mM), bradicinina (0,1 nM - 10 µM), endotelina -1 (0,1 - 100 nM), ocitocina (0,4 - 400 nM) e ao CaCl₂ (10 µM - 10 mM) e curvas concentração-resposta simples à prostaglandina F_{2α} (1 nM - 10 µM) e angiotensina II (0,1 nM - 1 µM). As respostas foram obtidas na ausência ou na presença de diferentes

concentrações do extrato hidroalcoólico obtido das cascas da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) que foi pré-incubado por 20 min antes da adição dos agonistas. Os resultados foram expressos como percentagem da resposta máxima obtida para cada agonista na ausência do extrato.

3.5 - Veia porta de rato

Ratos Wistar machos foram sacrificados com pancada na cabeça seguido do deslocamento cervical. A veia porta foi isolada, fixada em suporte de aço e montada em cuba de 5 ml contendo solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição (mM) 118,0; KCl 4,4; MgSO₄ 1,1; CaCl₂ 2,5; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2; glicose 11,0, mantidas à 37 °C sob tensão basal de 0,5 g e pH 7,2 - 7,4, aeradas com mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂. As preparações permaneceram em equilíbrio durante 60 min antes da adição das drogas ao banho, sendo a solução nutritiva renovada a cada 15 min. As alterações na tensão basal foram registradas por meio de transdutores de força F- 60 acoplados a registrador Narco 40 (ambos da Narco Biosystems).

3.5.1 - Procedimento experimental

Após o período de equilíbrio, foram construídas curvas concentração-resposta cumulativas à bradicinina (0,1 nM - 100 nM), U 46619 (10 nM - 1 µM), endotelina - 1 (1 - 100 nM) e substância P (1 nM - 1 µM), na ausência ou na presença do composto poligodial isolado das cascas da *Drymis winteri*,

adicionado ao banho 20 min antes das curvas concentração-resposta aos agonistas testados. Além disso, foram analisadas as ações do extrato hidroalcoólico e do composto poligodial isolado da *Drymis winteri* sobre a resposta contrátil causada pelo agonista seletivo para o receptor NK₃ das taquicininas, o senktide (0,1 - 100 nM). Geralmente 1 a 3 curvas concentração-resposta foram obtidas para cada agonista por preparação, com intervalo de repouso de 60 min entre cada curva. As respostas contráteis induzidas pelo senktide e a substância P foram obtidas na presença de captopril (3 μM) e fosforamidon (1 μM), para evitar a ação das peptidases. A resposta contrátil foi expressa em gramas de tensão.

3.6 - Drogas e reagentes

As drogas utilizadas foram: iodeto de acetilcolina, hidrocloreto de histamina, captopril, bradicinina, fosforamidon, cloridrato de carbacol, substância P, substância P metil-éster, prostaglandina E₂, U46619 (9,11 - dideóxi - 9α, 11α - metanoepóxi prostaglandina F_{2α}), composto 48/80, albumina bovina (grau V), estradiol benzoato, senktide, angiotensina II e ocitocina (todas obtidas da Sigma Chemical CO., St Louis, MO, USA). Prostaglandina F_{2α} (Enzaport F-Chinoin-Hungria), endotelina - 1 (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japão), [β-ala⁸] neurocinina - A (4 -10) (Peninsula Laboratories, Belmont, California, USA), capsaicina (Calbiochem, San Diego, California, U.S.A), EGTA (etilenoglicol -

bis(β -amino-etil éter) N,N - tetra-ácido-acético), PBS (solução tampão-fosfato, concentração NaCl 137 mmol, KCl 2,7 mmol e tampão fosfato 10 mmol). Os compostos da *Drymis winteri* foram obtidos no laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC. Todos os produtos utilizados apresentaram alto grau de pureza ($> 95\%$). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e de procedência Merck. As soluções estoques das drogas (1 - 100 mM) foram preparadas em água ou em solução de PBS, exceto a capsaicina que foi dissolvida em etanol absoluto e foi mantida sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração final do etanol no banho não excedeu 0,03% e não afetava o tônus da preparação ou a contração induzida pelos agonistas.

3.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, exceto as CE_{50} (concentração do agonista que produz 50% do efeito máximo em experimentos individuais) e as CI_{50} (concentração do extrato hidroalcoólico frações ou dos compostos que produziram 50% de inibição em relação aos grupos controle), que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança a 95% (Fleming et al., 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada através do teste “t” de Student para amostras relacionadas ou não, ou através da análise de variância

seguido pelo teste de Dunnett, quando apropriado. $P < 0,05$ ou menos foi considerado como indicativo de significância.

Quando apropriado os valores de pA_2 foram calculados como o logaritmo negativo (-Log g/ml) da concentração do extrato hidroalcoólico e frações e para os compostos puros (-Log M) que causaram deslocamento de 2 vezes à direita da curva concentração-resposta aos agonistas, ao nível da CE_{50} (Arunlakshana e Schild, 1950, Kenakin, 1993).

4. RESULTADOS

4.1 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo isolado de cobaia.

Os resultados da figura 3 (A, B, e C), demonstram que a pré-incubação do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) por 20 min, causou antagonismo do tipo não-competitivo caracterizado por redução progressiva da resposta máxima associado com deslocamento à direita das curvas concentração-respostas induzidas pela acetilcolina (0,1 nM - 100 µM), histamina (1 nM - 1 µM) e bradicinina (0,1 nM - 1 µM). As CI_{50} médias calculadas para o extrato hidroalcoólico (com limite de confiança de 95%) foram de: 1,27 (0,96 - 1,60), 1,35 (1,03 - 1,67) e 1,46 (1,09 - 1,84) mg/ml, respectivamente. As ações do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*, foram totalmente revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados)

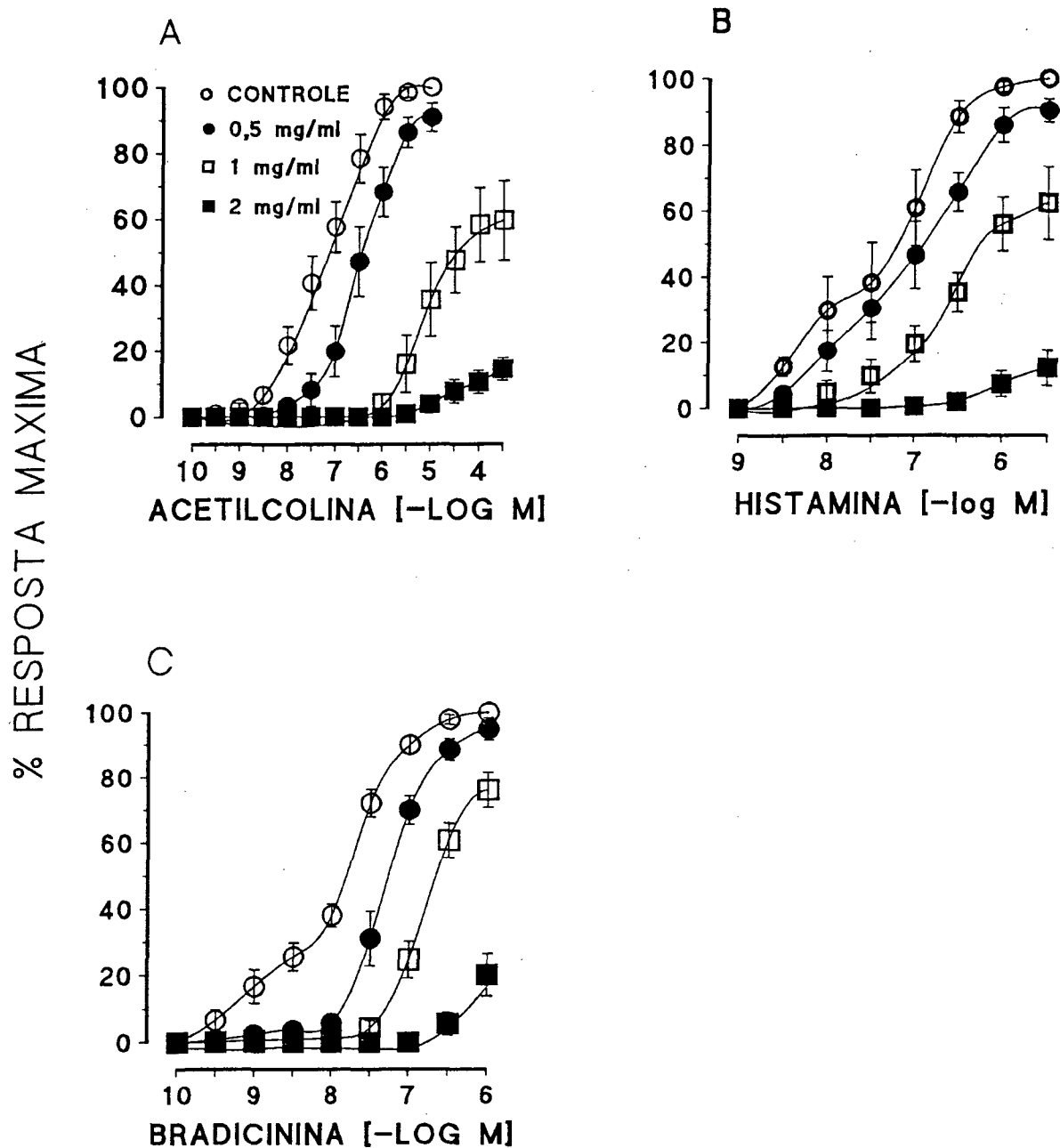


Figura 3: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A), histamina (B) e bradicinina (C) no íleo isolado de cobaia, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.2 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no útero isolado de rata.

A pré-incubação do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) por 20 min, também antagonizou de maneira não competitiva mas de forma concentração-dependente as respostas contráteis induzidas pela acetilcolina (100 nM - 100 μ M), bradicinina (0,1 nM - 10 μ M) e prostaglandina $F_{2\alpha}$ (1 nM - 10 μ M) no útero isolado de rata, (figura 4 A, B, e C). As CI_{50} médias calculadas para o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foram: 1,98 (1,70 - 2,20), 1,30 (1,10 - 1,50) e 1,24 (1,01 - 1,47) mg/ml, em relação as contrações induzidas pela acetilcolina, bradicinina e prostaglandina $F_{2\alpha}$, respectivamente. Além disso, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* antagonizou de forma não competitiva e de maneira concentração-dependente as respostas contráteis induzidas pela endotelina - 1 (0,1 - 100 nM), angiotensina II (0,1 nM - 1 μ M) e ocitocina (0,4 - 4000 nM). Os valores das CI_{50} médias para o extrato hidroalcoólico foram de 0,70 (0,50 - 0,85), 1,01 (0,80 - 1,20) e 1,27 (1,04 - 1,35) mg/ml, respectivamente (figura 5 A, B, e C). Por outro lado, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) também causou deslocamento à direita da resposta contrátil ao $CaCl_2$ (10 μ M - 10 mM) acompanhado de pequena redução das respostas máximas, (figura 5 D). Todas as ações do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*, foram revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

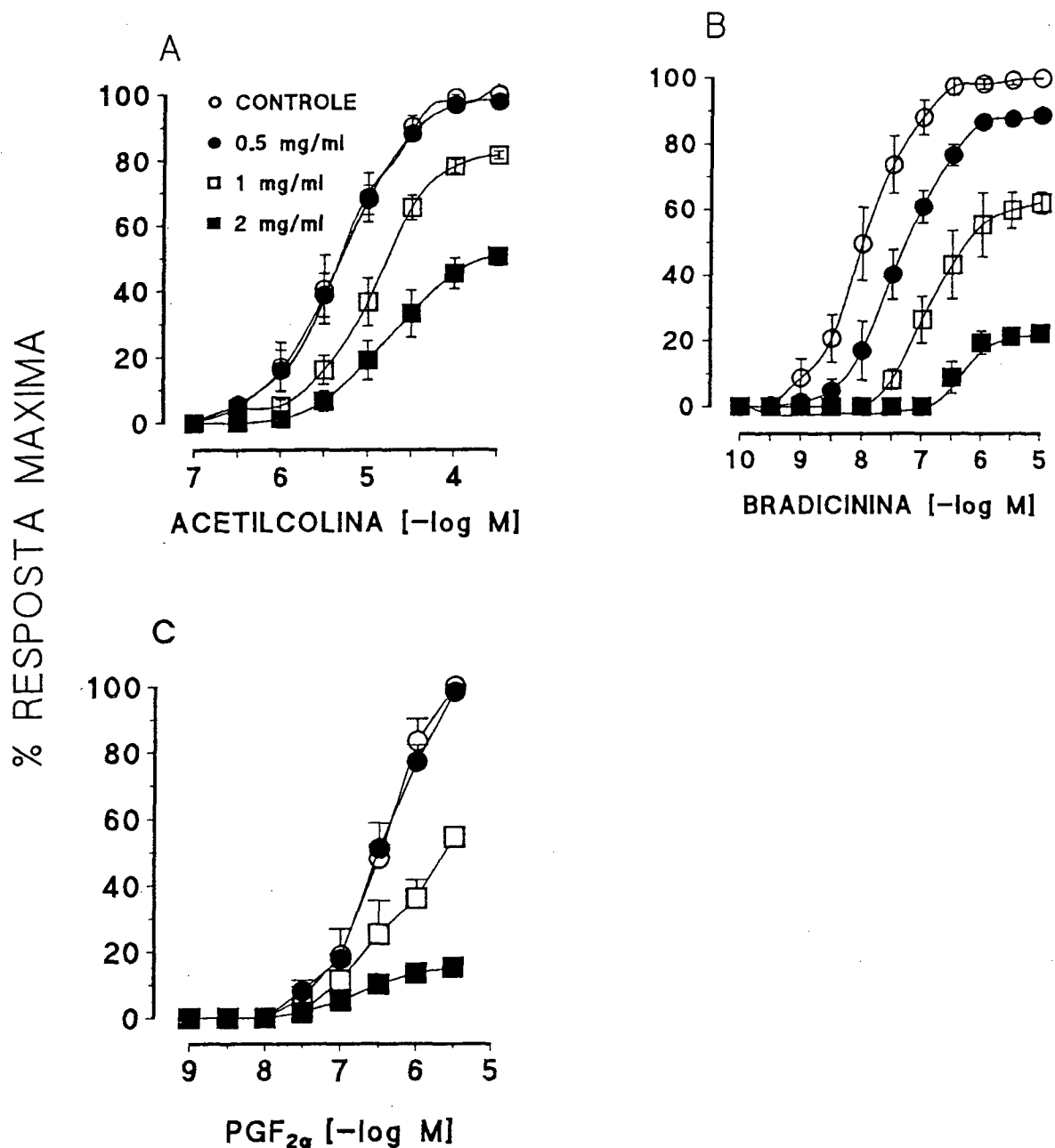


Figura 4: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A), bradicininina (B) e prostaglandina F_{2α} (C) no útero isolado de rata, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

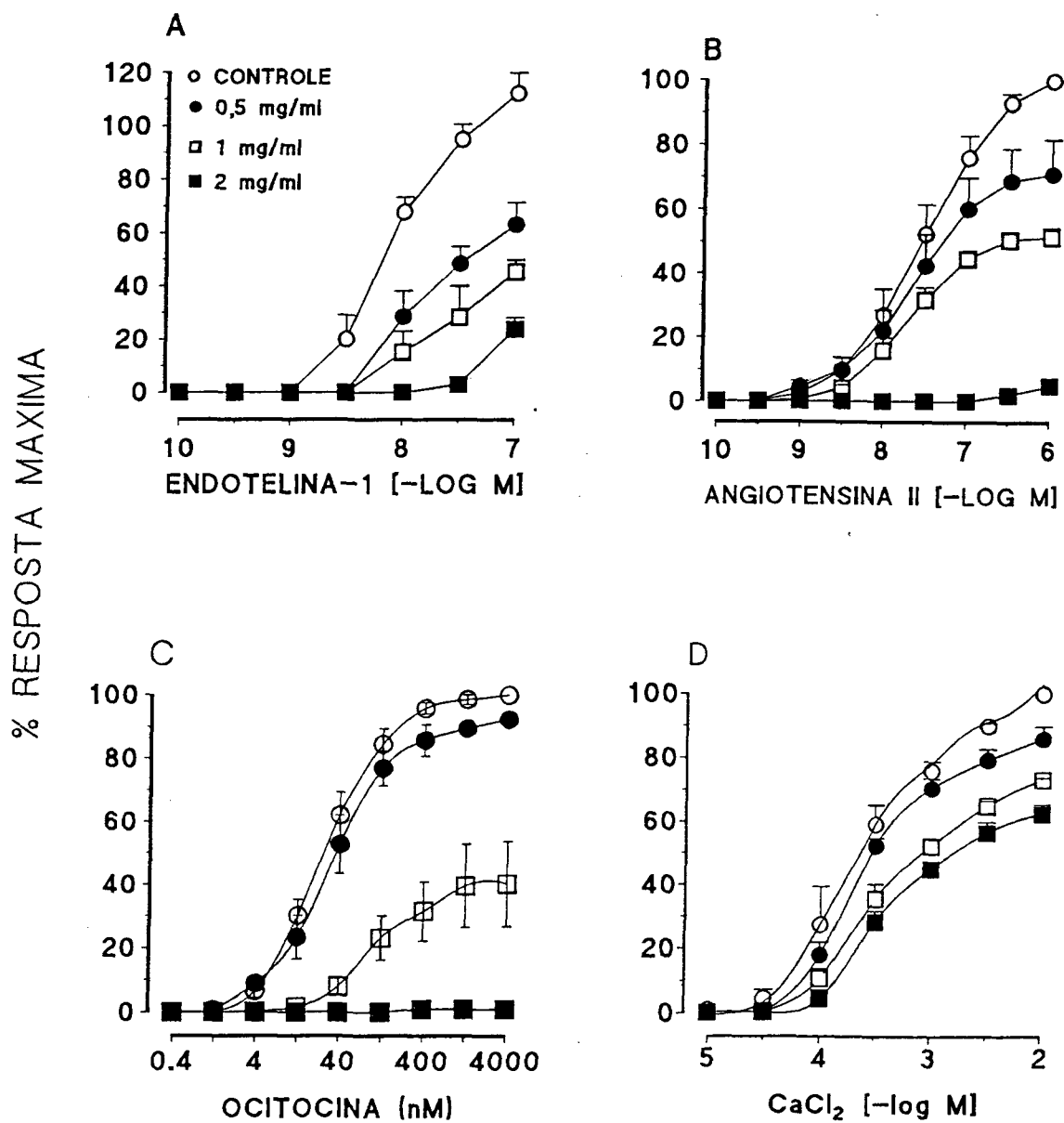


Figura 5: Curvas concentração-respostas obtidas para a endotelina - 1 (A), angiotensina II (B), ocitocina (C) e ao cloreto de cálcio (D) no útero isolado de rata, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.3 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na bexiga isolada de cobaia.

A incubação das preparações com o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (1 - 2 mg/ml) por 20 min, não interferiu com a resposta contrátil induzida pelo carbacol (10 nM - 10 μ M), (figura 6 A). Os valores das CE_{50} para o carbacol foram 0,17 (0,12 - 0,25), 0,35 (0,19 - 0,48) e 0,50 (0,23 - 0,76) μ M, respectivamente na ausência e na presença de 1 e 2 mg/ml do extrato hidroalcoólico. Porém, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (2 mg/ml) causou deslocamento parcial, porém significativo à direita da curva concentração-resposta induzida pela histamina (100 nM - 100 μ M) (figura 6 B). Os valores das CE_{50} calculados para a histamina foram: 15,20 (3,60 - 65,00) μ M na ausência e 39,80 (18,00 - 52,00) μ M na presença do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*. Por outro lado, observa-se também na figura 6 (C) que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,25 - 0,50 mg/ml) inibiu significativamente a resposta contrátil à bradicinina (0,1 nM - 1 μ M), com $CI_{50} < 0,50$ mg/ml. Pode ser observado ainda na figura 6 (D), que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) inibiu de forma significativa a curva concentração-resposta induzida pela substância P, sendo que o valor calculado da CI_{50} média foi de 1,05 (0,34 - 1,87) mg/ml e inibição máxima de 80 ± 4 %. As ações do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*, foram revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

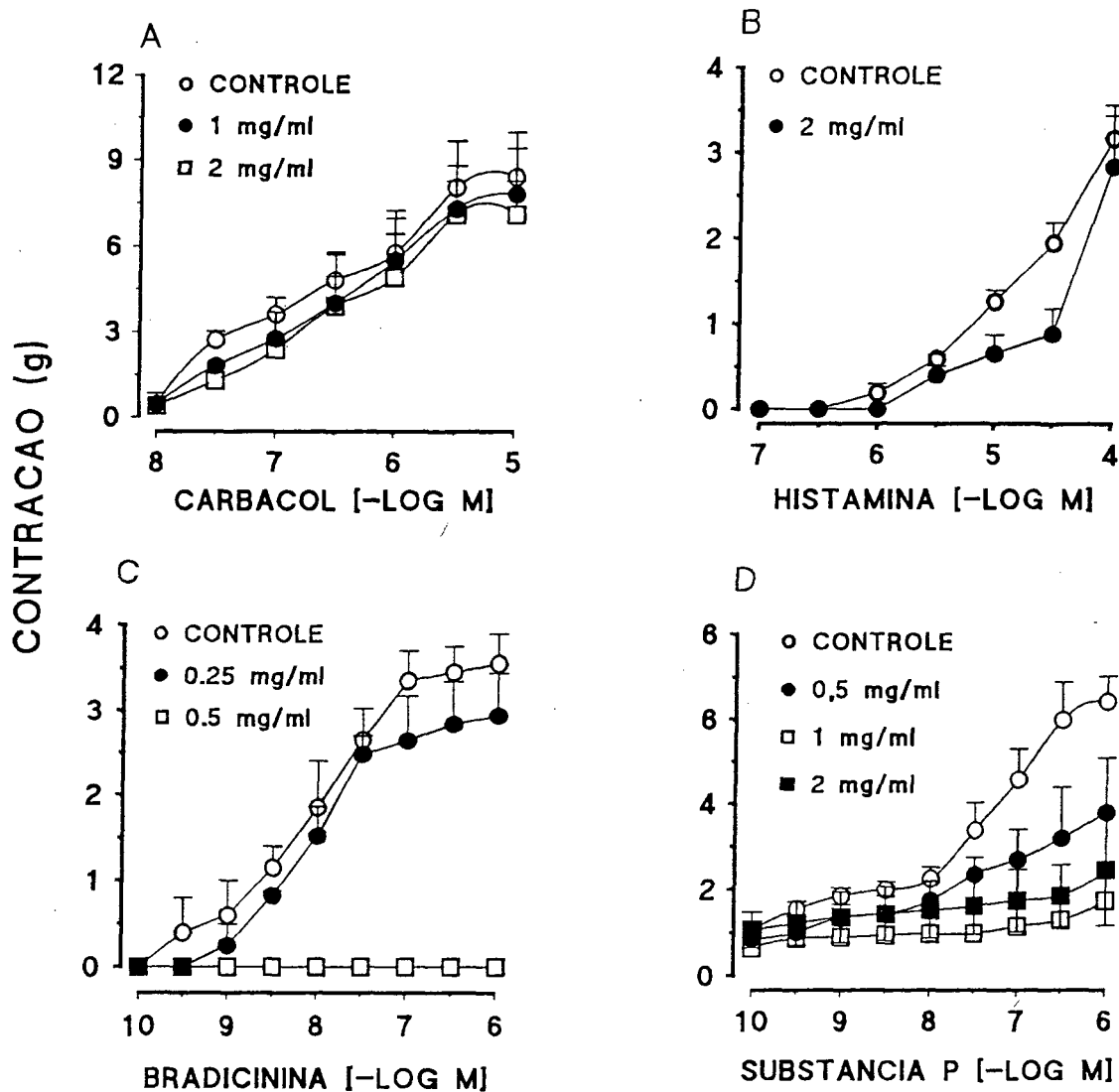


Figura 6: Curvas concentração-respostas obtidas para o carbacol (A), histamina (B), bradicnina (C) e substância P (D) na bexiga isolada de cobaia, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.4 - Efeito do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia e na veia porta de rato.

A pré-incubação das preparações com o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,125 - 0,5 mg/ml) inibiu de forma significativa mas independente da concentração usada, a resposta contrátil induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 μ M), (figura 7 A). A CI_{50} média foi de 0,33 (0,12 - 0,54) mg/ml com inibição máxima de 75 ± 3 %. Os resultados da figura 7 (B) e os dados da tabela 1 mostram que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) causou deslocamento à direita da curva concentração-resposta à prostaglandina E_2 (1 - 100 nM) associado com progressiva inibição da resposta máxima. O valor calculado da CI_{50} para o extrato foi de 1,63 (0,60 - 2,58) mg/ml e inibição máxima de 65 ± 4 %. Porém, os resultados da figura 7 (C) e os dados da tabela 1 demonstram que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (1 - 2 mg/ml) produziu deslocamento à direita de maneira aparentemente competitiva em relação a resposta contrátil induzida pelo análogo estável do tromboxano A_2 o U 46619 (0,1 nM - 1 μ M), com valor estimado de pA_2 (-Log g/ml) de $3,21 \pm 0,03$. Pode ser ainda observado na figura 7 (D) e na tabela 1, que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,25 - 0,5 mg/ml) causou deslocamento à

direita sem interferir com a resposta máxima da contração induzida pelo composto 48/80 (1 - 100 µg/ml).

Os resultados da figura 8 (A e B) e os dados da tabela 1 mostram que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) causou deslocamento concentração-dependente à direita da resposta contrátil à pela substância P (0,1 nM - 1 µM) e à [β -ala⁸] neurocinina A (4 - 10) (1 nM - 1 µM), com característica de antagonismo competitivo. Os valores médios de pA₂ (-Log g/ml) calculados foram: $3,84 \pm 0,06$ e $3,05 \pm 0,13$, respectivamente. No entanto, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (2 mg/ml) não interferiu com a contração induzida pelo agonista seletivo do receptor do tipo NK₁, a substância P - metil éster (0,1 - 100 nM) (figura 8 C). Os resultados da figura 8 (D) e os dados da tabela 1 mostram que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml) causou inibição parcial, mas significativa ($44 \pm 6\%$) da resposta contrátil à capsaicina (0,1 - 10 nM) na traquéia isolada de cobaia. Além disso, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (2 mg/ml) causou deslocamento parcial à direita, mas de maneira significativa da curva concentração-resposta à histamina (1 nM - 1000 µM), sem afetar contudo, a contração induzida pela acetilcolina (1 nM - 1000 µM) (figura 9 A e B e tabela 1).

Por outro lado, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 - 2 mg/ml), inibiu de forma concentração e tempo-dependentes a contração induzida pela ovalbumina nas traquéias de cobaias obtidas de animais

ativamente sensibilizados a esse antígeno. O valor médio da CI_{50} para o extrato em inibir a resposta à ovalbumina foi de 0,92 (0,35 - 1,24) mg/ml, (figura 10).

Quando testado na veia porta isolada de rato, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* (0,5 mg/ml), causou inibição significativa da curva-concentração resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo do receptor NK_3 o senktide (1 - 100 nM); com percentual de inibição de $64 \pm 3 \%$, (figura 11). As ações do extrato hidroalcoólico foram revertidas nestas preparações após várias lavagens com líquido nutriente (resultados não apresentados).

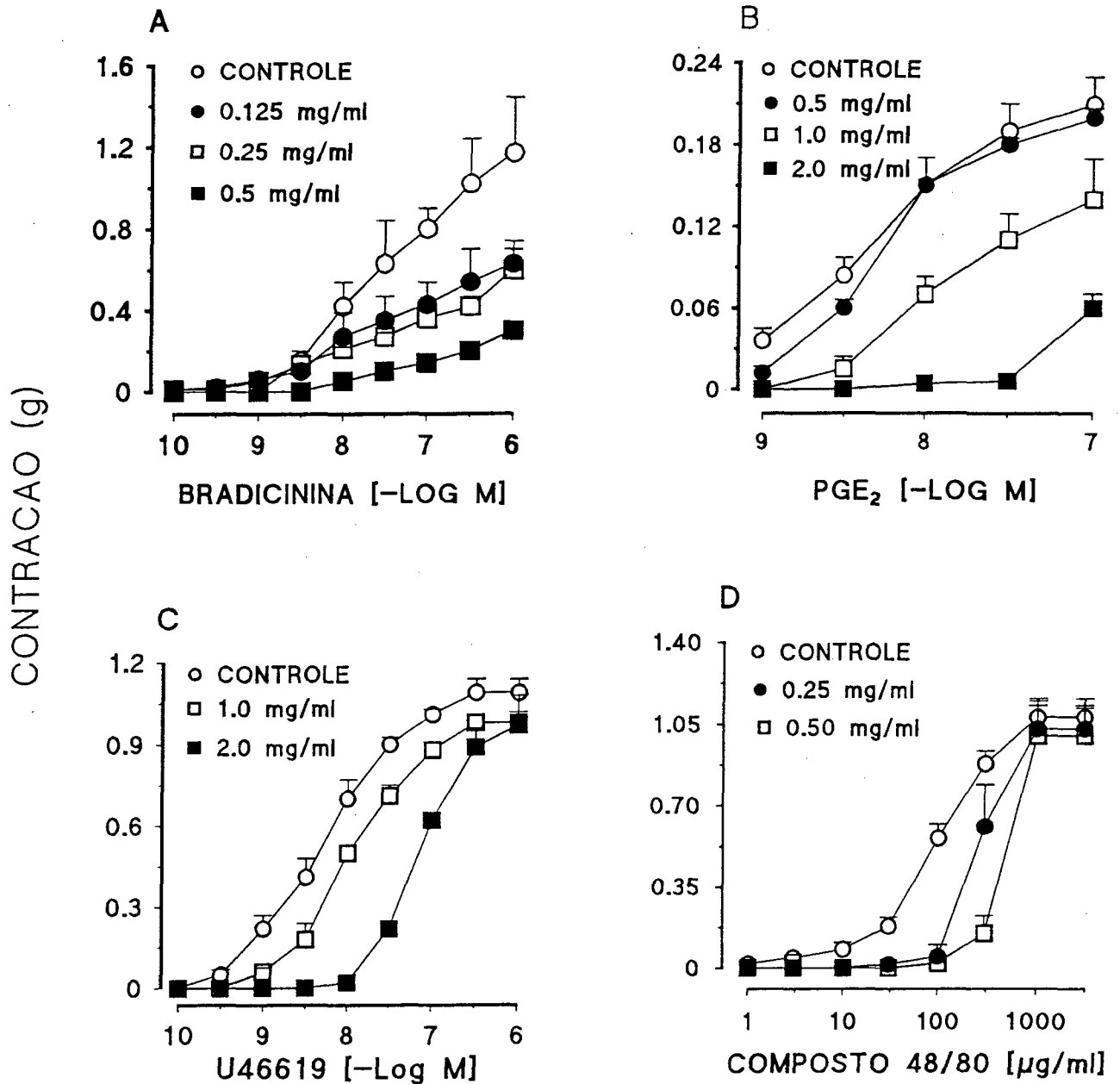


Figura 7: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycinin (A), prostaglandina E₂ (B), U 46619 (C) e composto 48/80 (D) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

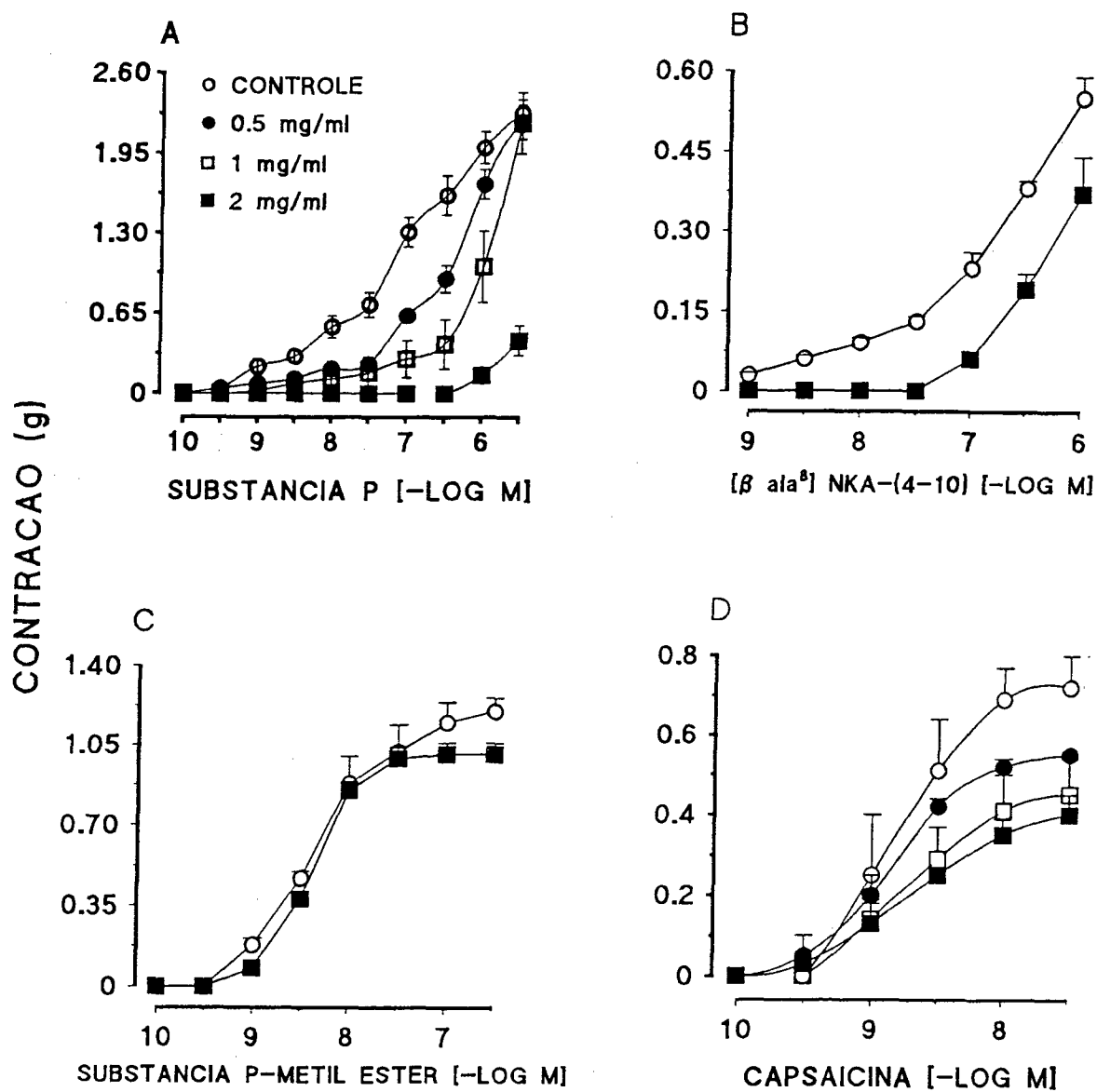


Figura 8: Curvas concentração-respostas obtidas para a substância P (A), neurocinina A (B), substância P - metil ester (C) e capsaicina (D) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

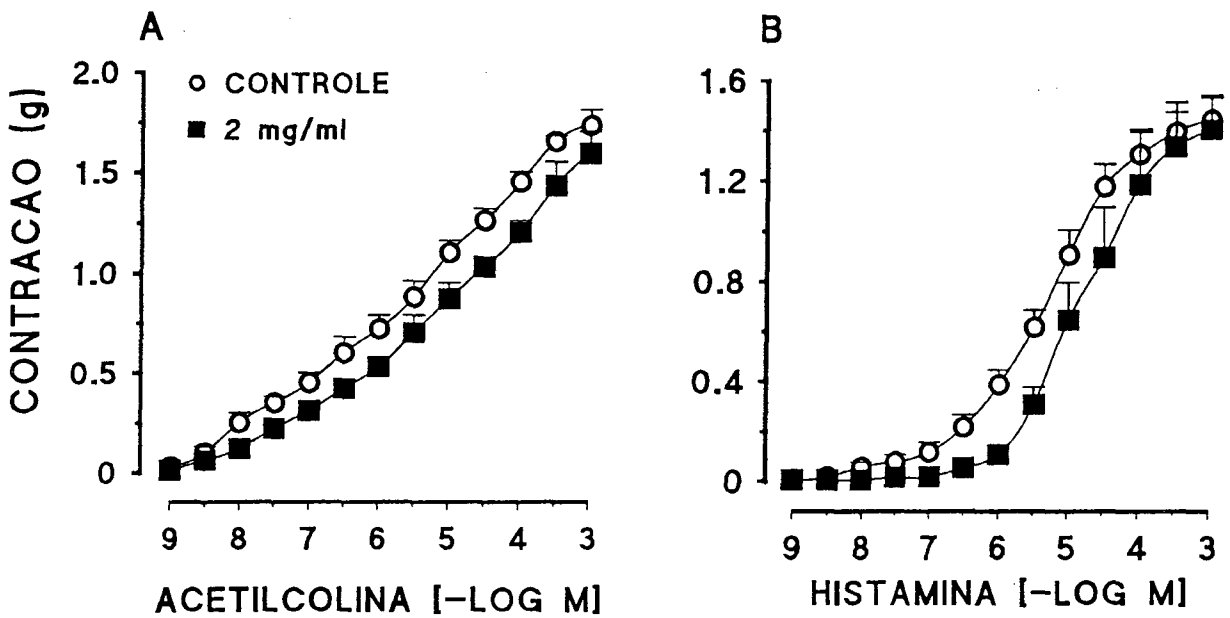


Figura 9: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A) e a histamina (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

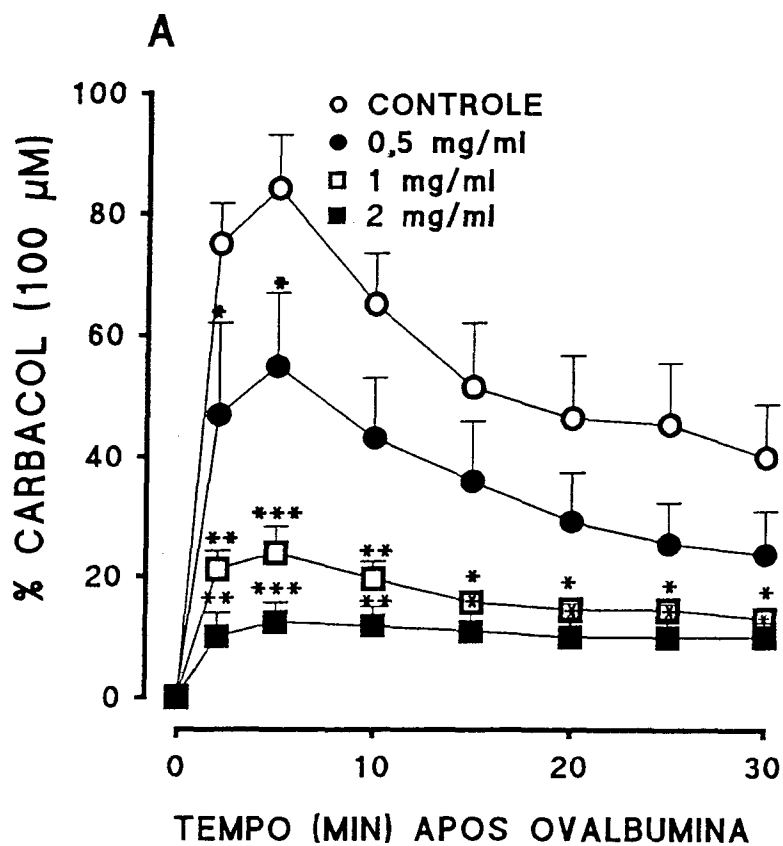


Figura 10: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

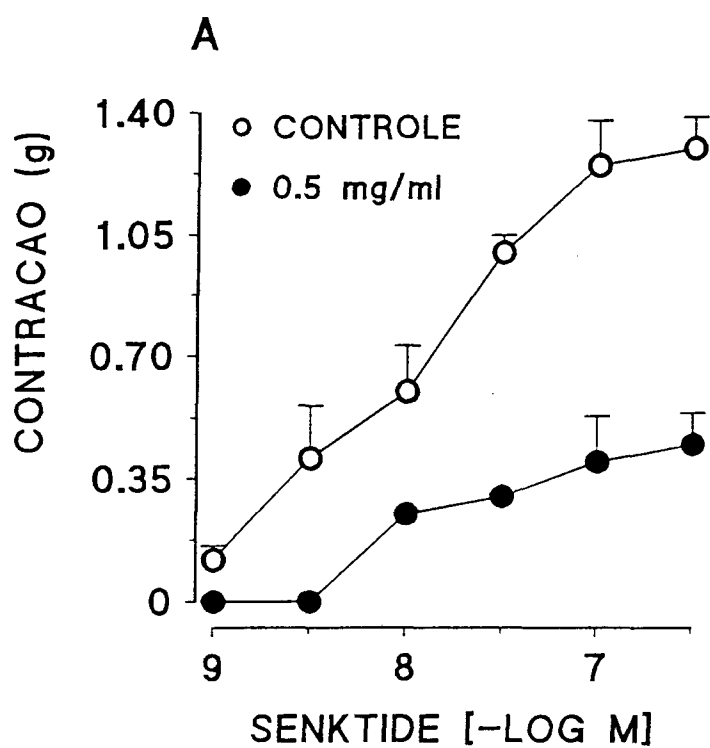


Figura 11: Curvas concentração-respostas obtidas para o senktide (A) na veia porta isolada de rato, na ausência ou na presença do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

TABELA 1: Valores das CE₅₀ para vários agonistas na traquéia de cobaia, obtido na ausência ou na presença das cascas da *Drymisd winteri*.

Agonistas	Extrato hidroalcoólico (mg/ml)					
	Controle	0.25	0.5	1.0	2.0	
U46619 (nM)	5.5 (1.2 - 24.0) ^a	-	-	9.3 (5.2-16.5)*	67.6 (38.0-120.0)*	
Substância P (µM)	0.07 (0.02 - 0.1)	-	0.4 (0.2-0.6)*	1.2 (0.7-2.3)*		
[β-ala ⁸]NKA (4-10) (µM)	0.1 (0.07 - 0.2)	-	-	-	0.3 (0.3 -0.4)*	
Substancia P-metil ester (nM)	4.3 (3.3 - 6.9)	-	-	-	4.6 (3..8-5.0)	
Acetilcolina (µM)	2.7 (0.8 - 9.8)	-	-	-	5.6 (0.8-10.8)	
Histamina (µM)	3.7 (1.2 - 10.9)	-	-	-	11.7 (4.9-20.8)	
Composto 48/80 (µg/ml)	96.6 (93.1-100.0)	269.1(100.0-524.4)*	537.0 (478.6-602,5)*	-	-	

^a Limite de confiança de 95%. Cada grupo representa a média de 4 a 6 experimentos. Difere significativamente dos valores controles (* P<0.05).

4.5 - Efeito das frações semipurificadas obtidas do extrato da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.

4.5.1 - Fração aquosa

Como pode ser observado na figura 12 (A) a fração aquosa obtida das cascas da *Drymis winteri* (20 - 80 µg/ml), causou inibição parcial da resposta contrátil induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 µM). As CE₅₀ médias obtidas para a bradicinina foram de 2,50 (1,25 - 4,20), 5,00 (2,30 - 6,70), 49,00 (28,00 - 68,00) e 63,00 (53,50 - 74,00) nM, respectivamente, na ausência e na presença 20, 40 e 80 µg/ml da fração aquosa. Porém, a pré-incubação das preparações com a fração aquosa (20 - 80 µg/ml) determinou deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida pela substância P (0,1 nM - 1 µM), sem interferir contudo, com a resposta máxima, caracterizando um antagonismo do tipo competitivo, com valor estimado de pA₂ (- Log g/ml) 4,80 ± 0,04 (figura 12 B). As ações da fração aquosa obtida das cascas da *Drymis winteri*, foram revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

Quando a fração aquosa da *Drymis winteri* (20 - 80 µg/ml) foi pré-incubada por 20 min na traquéia cujos animais haviam sido previamente sensibilizados à ovalbumina, foi observado inibição concentração e tempo-dependente da resposta contrátil à ovalbumina, com CI₅₀ média de 58,73 (39,40 - 61,10) µg/ml, (figura 13).

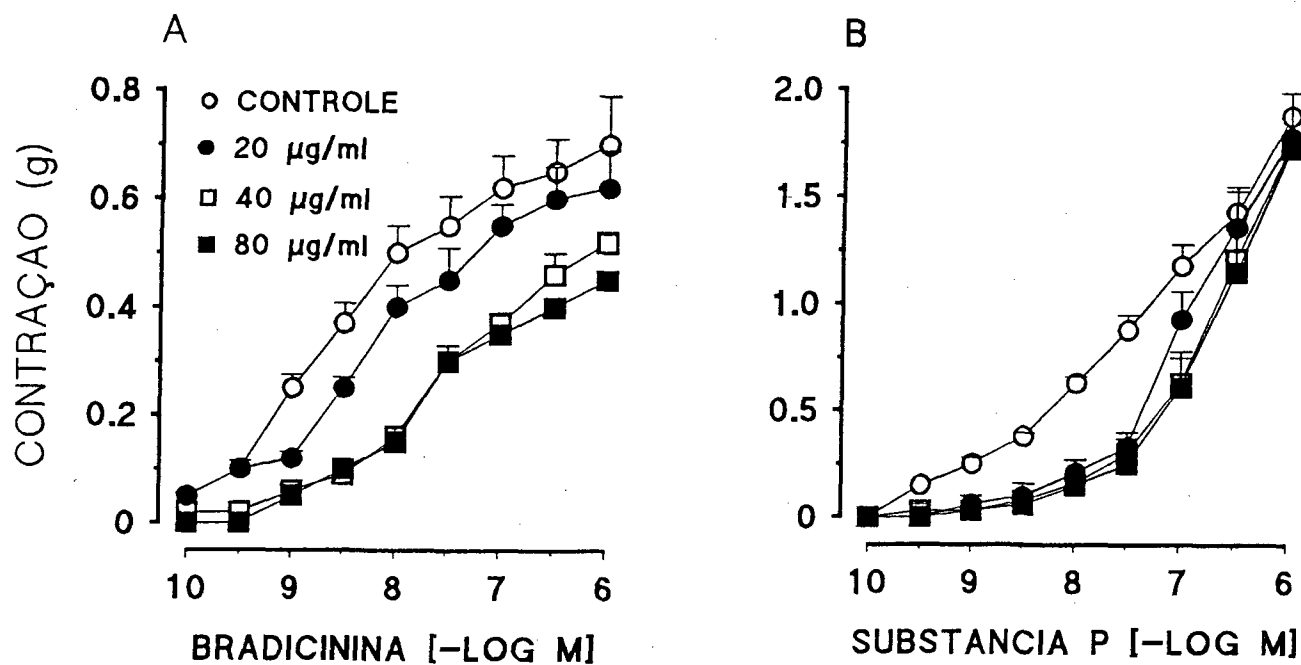


Figura 12: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycininina (A) e substância P (B) na traquéia isolado de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença da fração aquosa da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

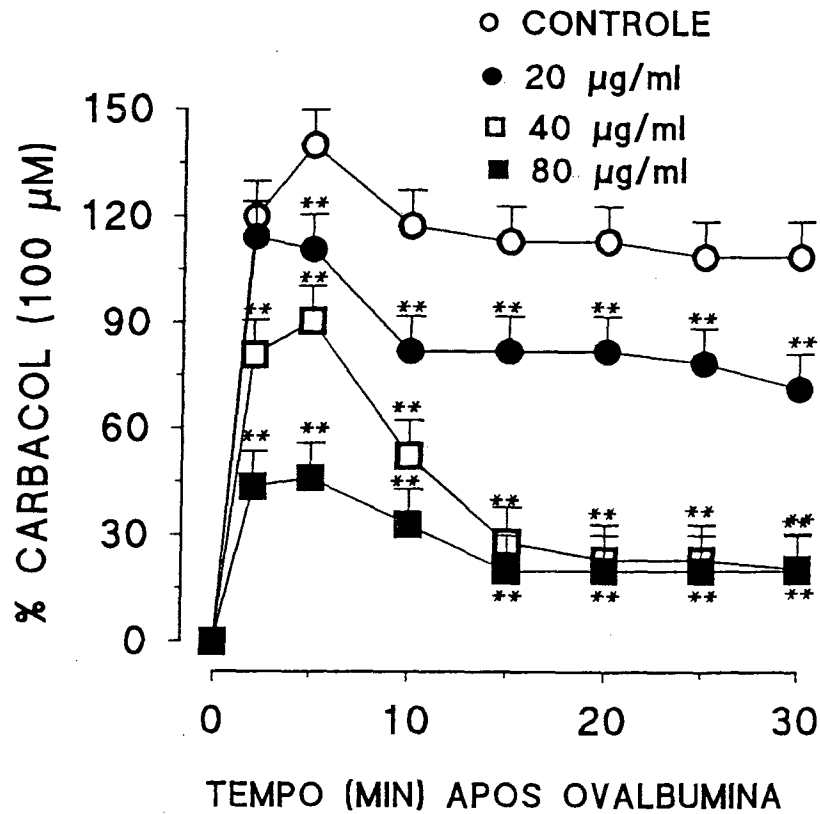


Figura 13: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença da fração aquosa da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.5.2 - Fração acetato de etila

A fração acetato de etila obtida do extrato da *Drymis winteri* (20 - 80 $\mu\text{g/ml}$) causou deslocamento parcial à direita da curva concentração-resposta induzida pela histamina (1 nM - 100 μM), (figura 14 A). As CE_{50} médias para a histamina foram de 2,70 (2,00 - 3,60), 4,10 (3,70 - 4,50), 4,80 (3,80 - 6,03) e 8,30 (7,10 - 9,70) μM , respectivamente na ausência e na presença de 20, 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$ da fração acetato de etila. A figura 14 (B) mostra que a fração acetato de etila, também causou pequeno deslocamento à direita da contração à acetilcolina (10 nM - 1 mM). As CE_{50} médias calculadas para a acetilcolina foram da ordem de: 3,30 (1,50 - 5,30), 16,00 (6,8 - 23,40) e 31,60 (17,00 - 51,00), respectivamente na ausência e na presença de 20, 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$ da fração acetato de etila. Por outro lado, a figura 14 (C) mostra que esta fração inibiu de maneira concentração-dependente a contração induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 μM). O valor da CI_{50} foi de: 68,30 (58,30 - 77,80) $\mu\text{g/ml}$ e o percentual de inibição foi de $57 \pm 3 \%$. Esses efeitos foram revertidos após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados)

Os resultados da figura 15 mostram que a fração acetato de etila (80 $\mu\text{g/ml}$), não foi capaz de inibir de forma significativa com a resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia de animais sensibilizados ao antígeno.

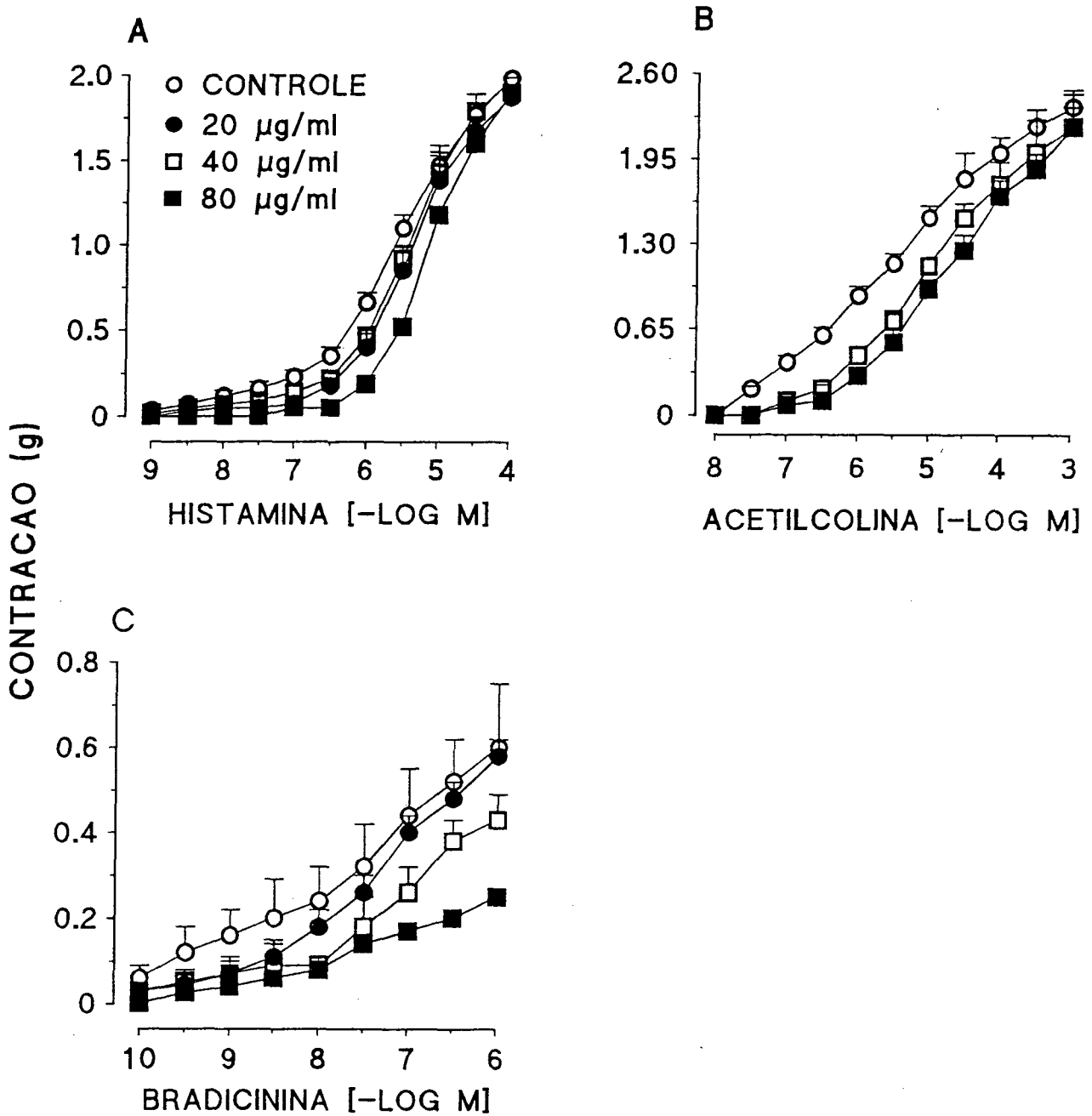


Figura 14: Curvas concentração-respostas obtidas para a histamina (A), acetilcolina (B) e bradicinina (C) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença da fração acetato de etila obtida da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

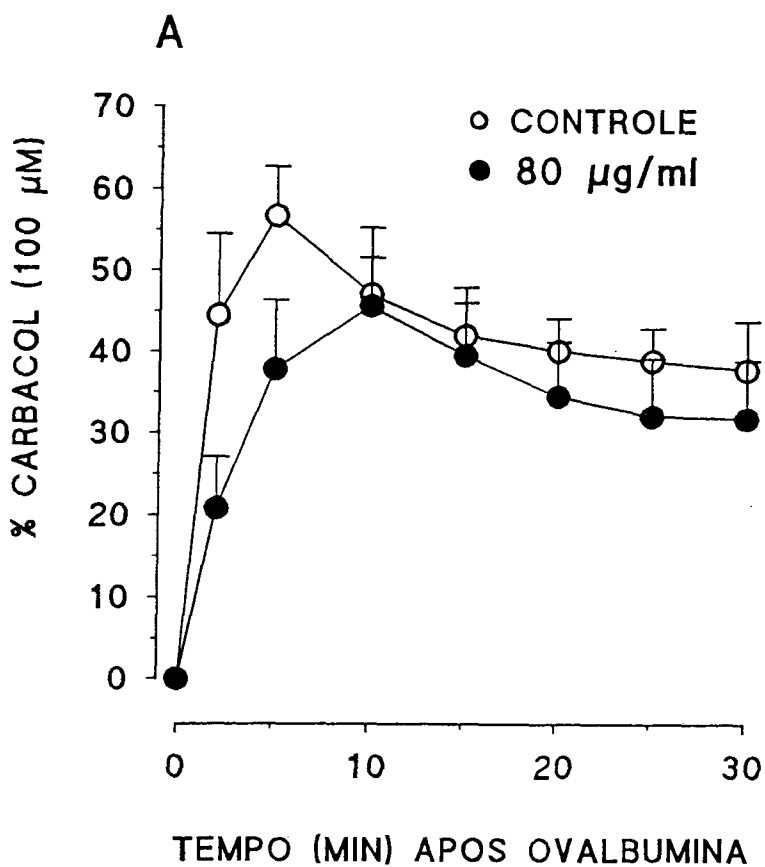


Figura 15: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença da fração acetato de etila da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.5.3 - Fração clorofórmica

A pré-incubação das preparações de traquéia de cobaia por 20 min com a fração clorofórmica (80 µg/ml), não interferiu de forma significativa com a curva concentração-resposta à histamina (100 nM - 1 mM). As CE_{50} médias foram de 1,06 (0,53 - 1,84) na ausência e 2,80 (1,98 - 3,97) µM na presença da fração clorofórmica obtida da *Drymis winteri*, (figura 16 A). Por outro lado, a fração clorofórmica (20 - 80 µg/ml) inibiu de maneira significativa a resposta máxima da curva concentração-resposta induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 µM), com CI_{50} de 28,60 (25,00 - 32,00) µg/ml e inibição máxima de $65 \pm 5\%$, (figura 16 B). Porém, observa-se na figura 16 (C) que a fração clorofórmica (40 e 80 µg/ml) causou pequena inibição da curva concentração-resposta induzida pela substância P (0,1 nM - 1 µM). As CE_{50} para a substância P foram de: 25,10 (17,20 - 85,00) (controle) e 32,30 (22,00 - 96,00) e 158,00 (80,00 - 230,00) nM, respectivamente para 40 e 80 µg/ml da fração clorofórmica na traquéia de cobaia. Esses efeitos foram revertidos após lavagem das preparações (resultados não apresentados).

Quando a fração clorofórmica (20 - 80 µg/ml) foi testada na traquéia de cobaia obtida de animais que haviam sido ativamente sensibilizados à ovalbumina, foi observado inibição significativa e concentração dependente da contração induzida pela ovalbumina, com CI_{50} média de 55,72 (29,80 - 84,60) µg/ml, (figura 17).

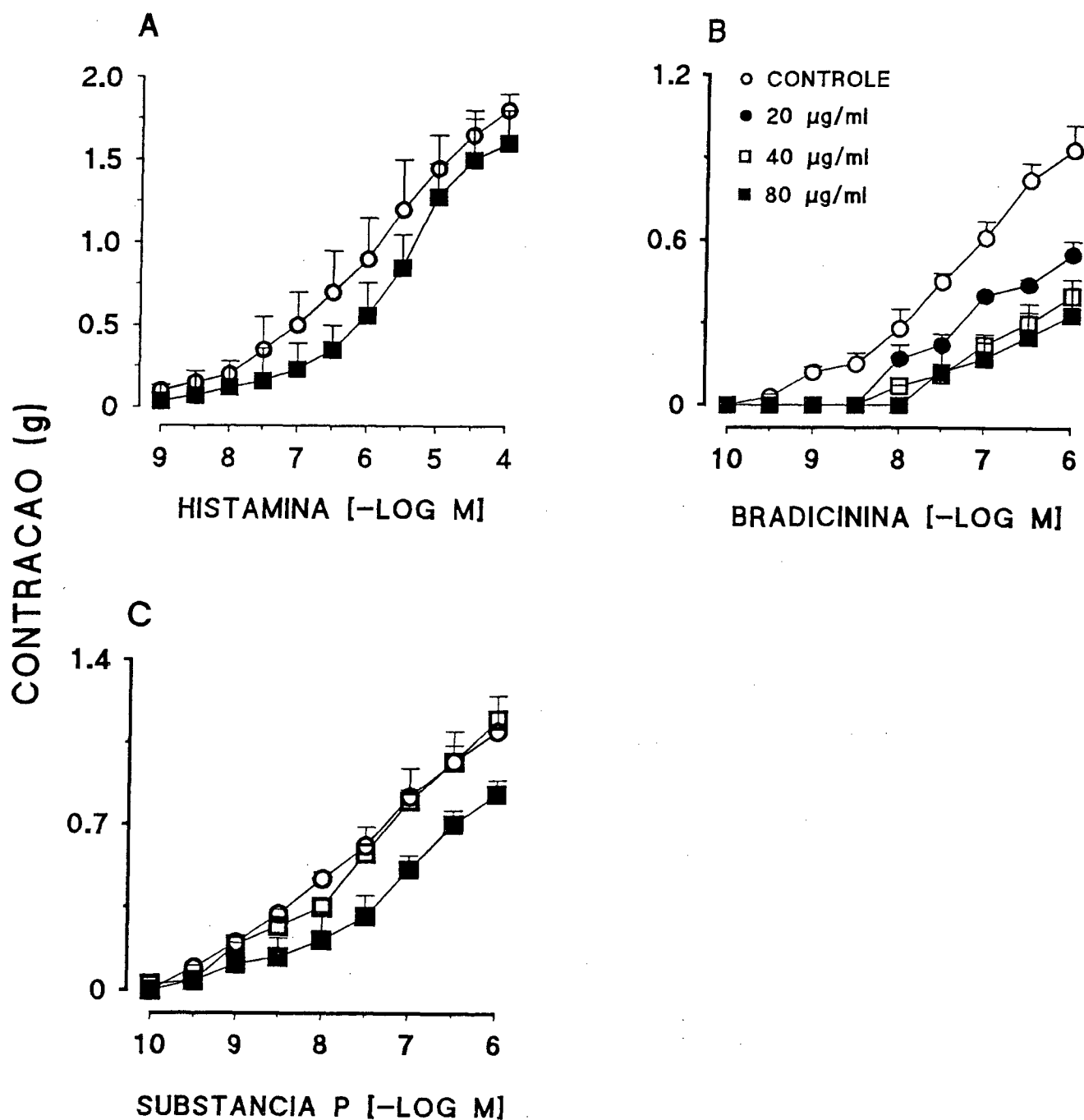


Figura 16: Curvas concentração-respostas obtidas para a histamina (A), bradycinin (B) e substância P (C) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença da fração clorofórmica da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

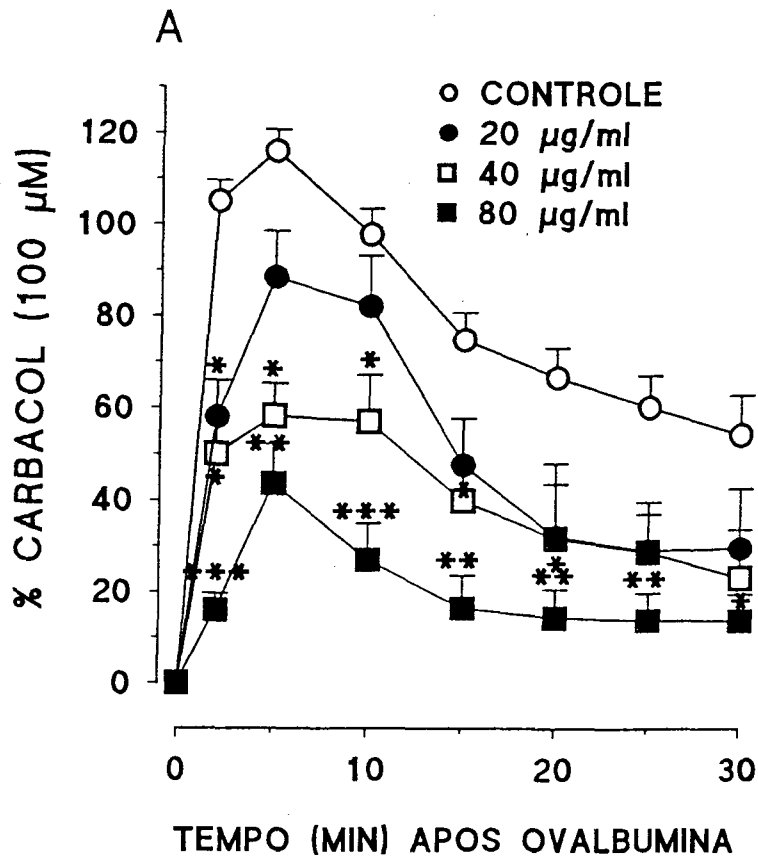


Figura 17: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença da fração clorofórmica da *Drymis winteri*. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.6 - Efeito da astilbina isolada da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.

Os resultados da figura 18 (A) mostram que a astilbina (178 - 222 μM) pré-incubada com as preparações durante 20 min, não interferiu com a curva concentração-resposta induzida pela acetilcolina (1 nM - 100 μM). As CE_{50} médias para a acetilcolina foram: 1,08 (0,60 - 1,90), 1,99 (0,95 - 2,90) e 3,23 (1,71 - 4,74) μM , respectivamente na ausência e na presença de 178 e 222 μM do composto. No entanto, a astilbina (222 μM) causou inibição significativa da resposta contrátil induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 μM), com inibição máxima de $45 \pm 4 \%$; (figura 18 B). As ações da astilbina foram totalmente revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados). Ao contrário do que foi observado para o extrato hidroalcoólico e das frações obtidas das cascas da *Drymis winteri*, a astilbina (222 μM) não causou inibição significativa da contração induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia sensibilizada à ovalbumina, (figura 19).

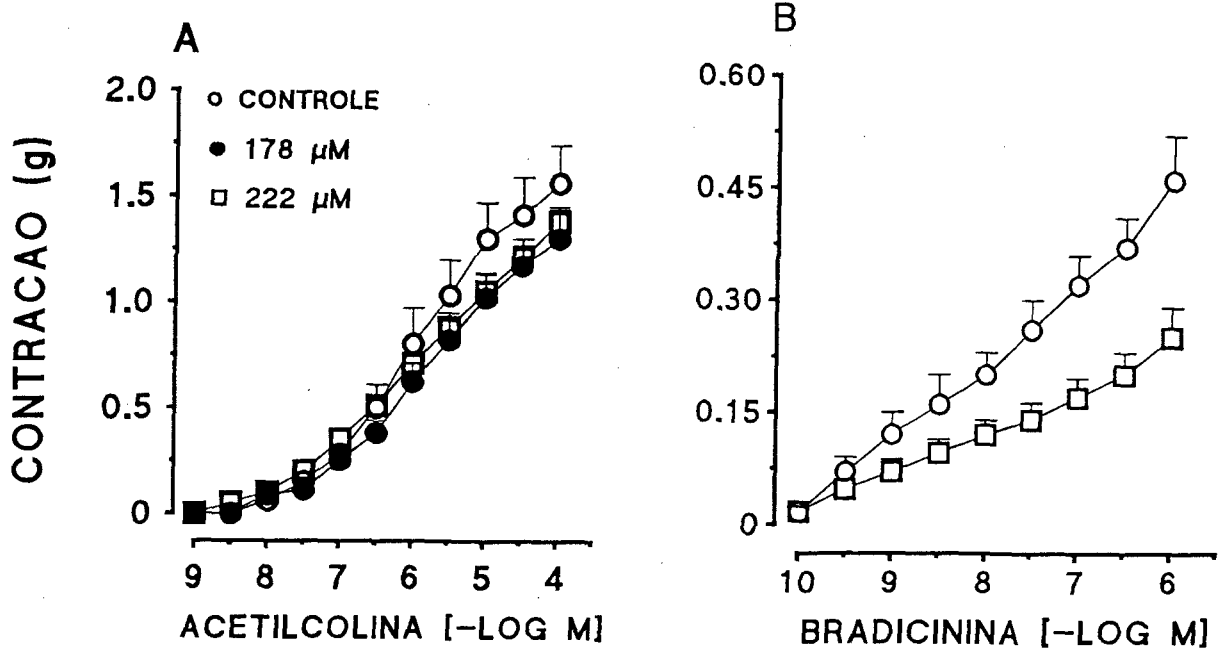


Figura 18: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A) e à bradicinina (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença da astilbina. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

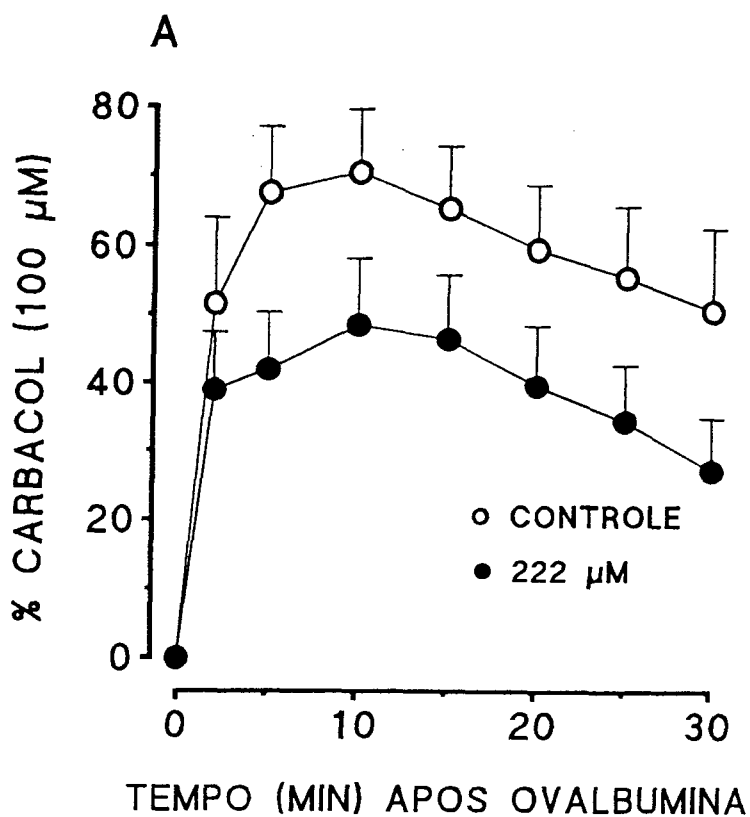


Figura 19: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença da astilbina. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.7 - Efeito do taxifolin isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia.

Os resultados da figura 20 (A) demonstram que o taxifolin (61 - 488 μM), causou inibição concentração-dependente sobre a contração induzida pela acetilcolina (0,1 nM - 1 μM) no íleo isolado de cobaia. O valor calculado para a CI_{50} foi de 416,00 (390,00 - 445,00) μM . Porém, o taxifolin (122 - 488 μM) causou inibição parcial da curva concentração-resposta induzida pela histamina (0,1 nM - 1 μM) no íleo de cobaia (figura 20 B). As CE_{50} para a histamina foram de 63,10 (41,40 - 85,00), 119,00 (63,40 - 174,00), 501,00 (399,00 - 597,00) e 794,00 (726,00 - 856,00) nM, respectivamente na ausência e na presença de 122, 244 e 488 μM do composto.

A figura 21 mostra que a pré-incubação das preparações com o taxifolin (305 μM), não resultou em inibição significativa da resposta contrátil à ovalbumina na traquéia de cobaia de animais previamente sensibilizados ao antígeno.

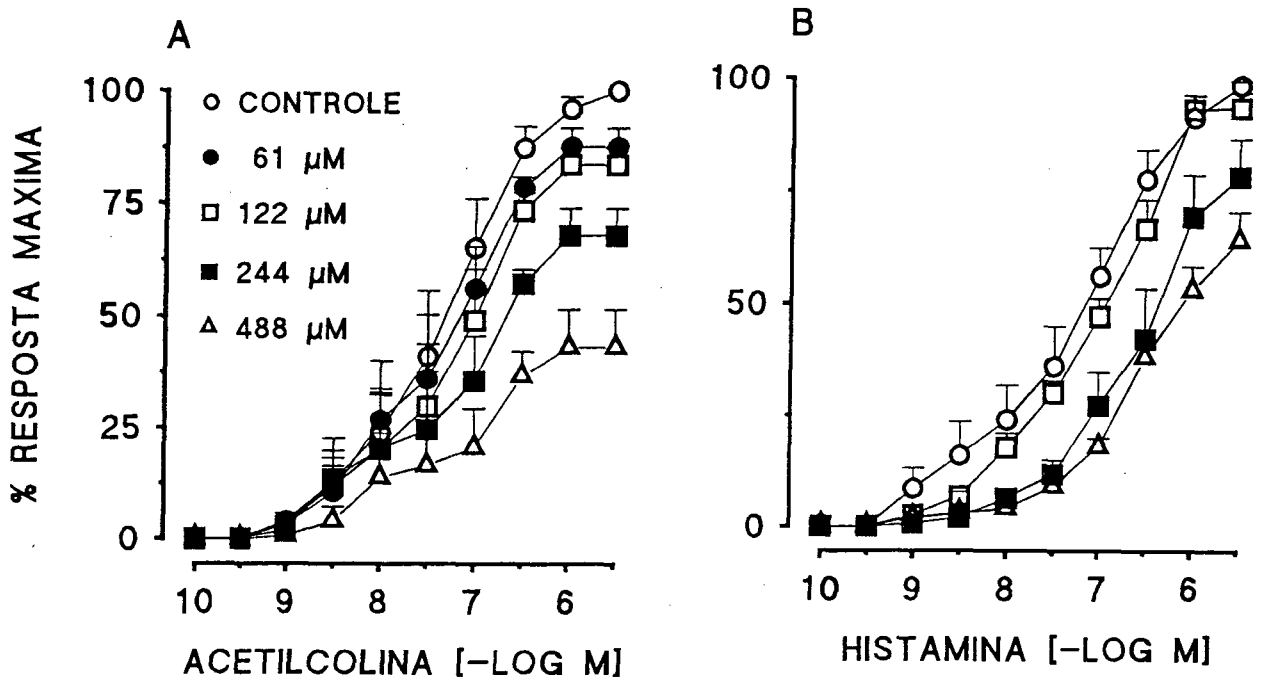


Figura 20: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A) e histamina (B) no íleo isolado de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do taxifolin. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

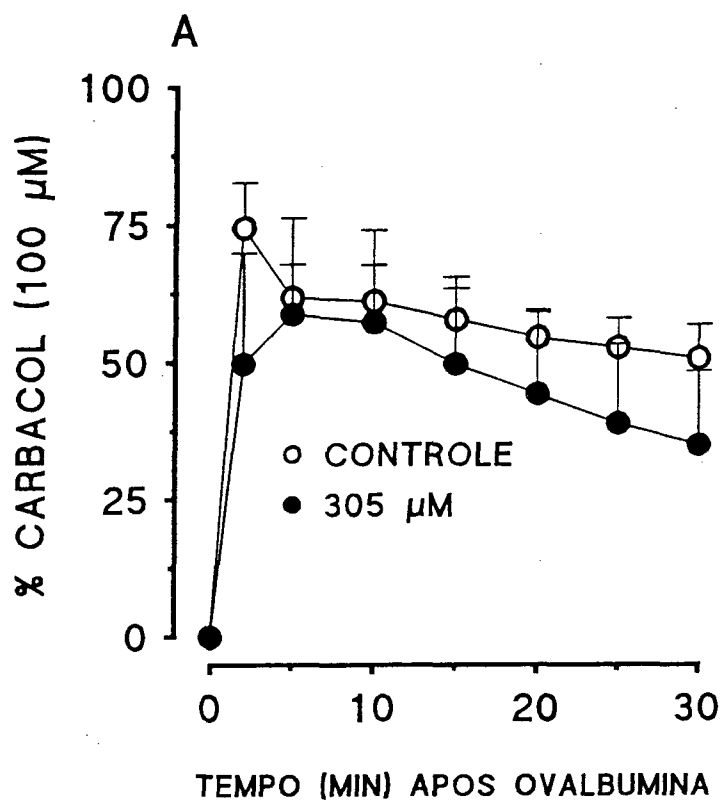


Figura 21: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença do taxifolin. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.8 - Efeito do composto 3 isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.

A incubação das preparações com o composto 3 (sesquiterpeno ainda não identificado) (40 - 80 $\mu\text{g/ml}$) isolado da *Drymis winteri*, causou inibição de maneira concentração-dependente da contração induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 μM) com inibição máxima de $65 \pm 8 \%$, (figura 22 A). Já em relação a substância P (0,1 nM - 1 μM) o composto 3 (20 - 80 $\mu\text{g/ml}$) causou pequena inibição da resposta contrátil (figura 22 B). As CE_{50} médias calculadas para a substância P foram: controle 31,60 (29,20 - 37,30), e 158,00 (139,00 - 180,00), 207,00 (187,00 - 230,00) e 316,00 (255,00 - 370,00) nM, respectivamente na presença de 20, 40 e 80 $\mu\text{g/ml}$ do composto 3. Esses efeitos foram revertidos após lavagem das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

Por outro lado, o composto 3 também causou inibição parcial, mas significativa da contração induzida pela ovalbumina na traquéia de cobaia obtida de animais previamente sensibilizados ao antígeno, (figura 23).

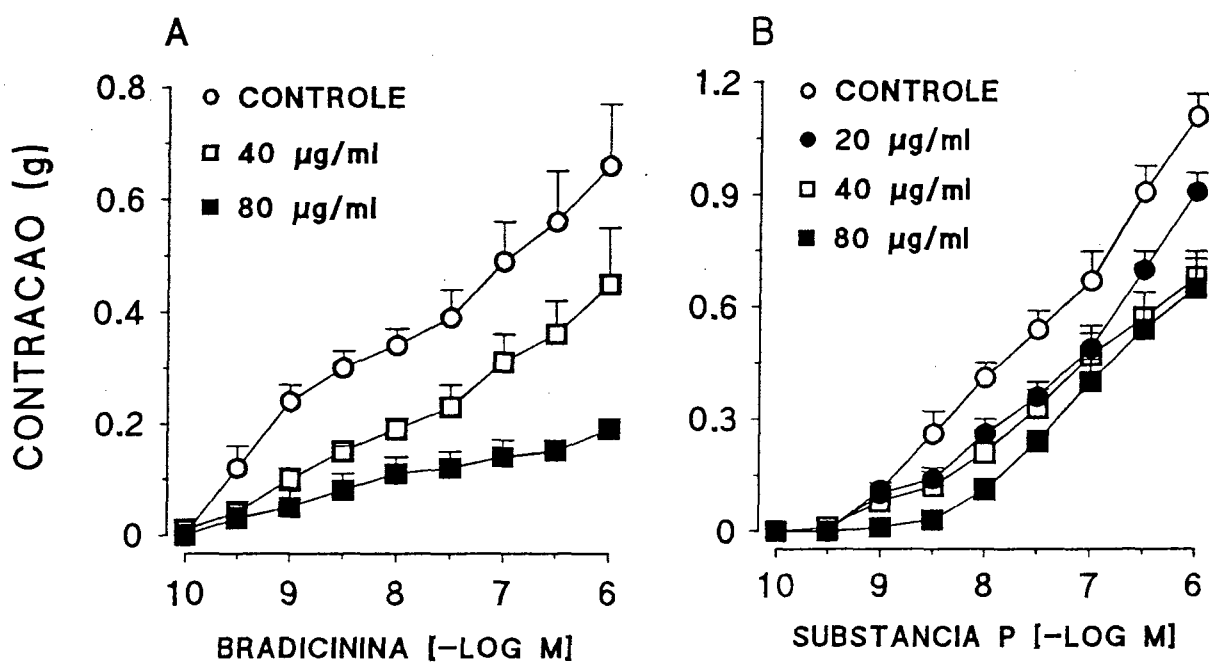


Figura 22: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycinin (A) e substância P (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto 3. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

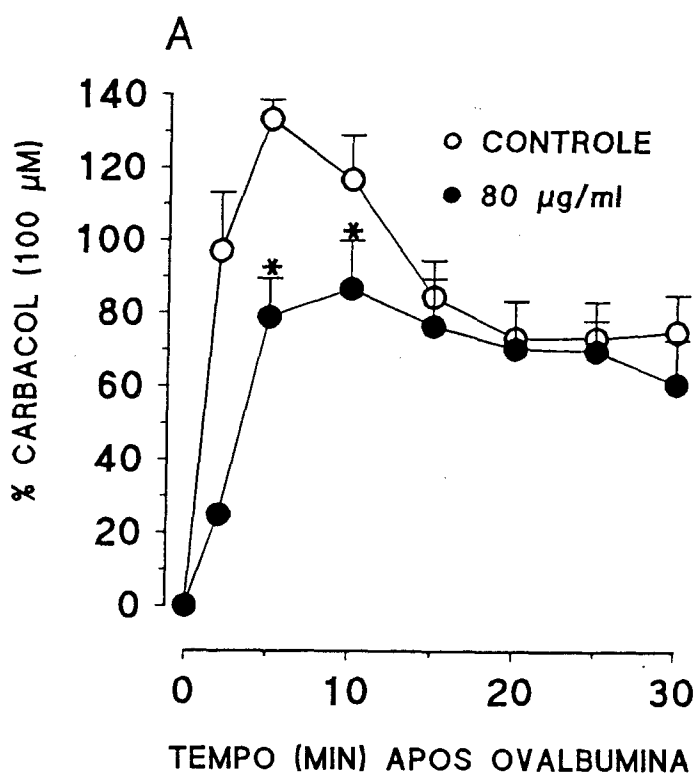


Figura 23: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença do composto 3. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

4.9 - Efeito do composto 5 isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia.

A figura 24 (A) demonstra que o composto 5 (sesquiterpeno ainda não identificado) isolado das cascas da *Drymis winteri* (2,5 - 10,0 µg/ml) causou deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida pela acetilcolina (0,1 nM - 10 µM), no íleo isolado de cobaia com característica de antagonismo não competitivo. A CI_{50} média foi de 6,20 (2,90 - 9,40) µg/ml com inibição máxima de 55 ± 8 %. Na figura 24 (B) pode ser observado que o composto 5 (2,5 - 10 µg/ml), causou inibição de forma concentração-dependente da contração induzida pela bradicinina (0,1 nM - 1 µM) no íleo isolado de cobaia. A CI_{50} média foi de 5,10 (1,70 - 8,90) µg/ml, com inibição máxima de 61 ± 12 %. Já a figura 25 (A) mostra que o composto 5 (5 - 20 µg/ml) causou pequena, porém significativa inibição da contração induzida pela substância P (10 pM - 1 µM) na traquéia de cobaia. As CE_{50} calculadas para a substância P foram : 7,94 (2,81 - 14,50), 39,80 (21,20 - 60,50) e 501,00 (484,00 - 512,00) nM, respectivamente na ausência e na presença de 5 e 10 µg/ml do composto. Os efeitos do composto 5 foram totalmente revertidos após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

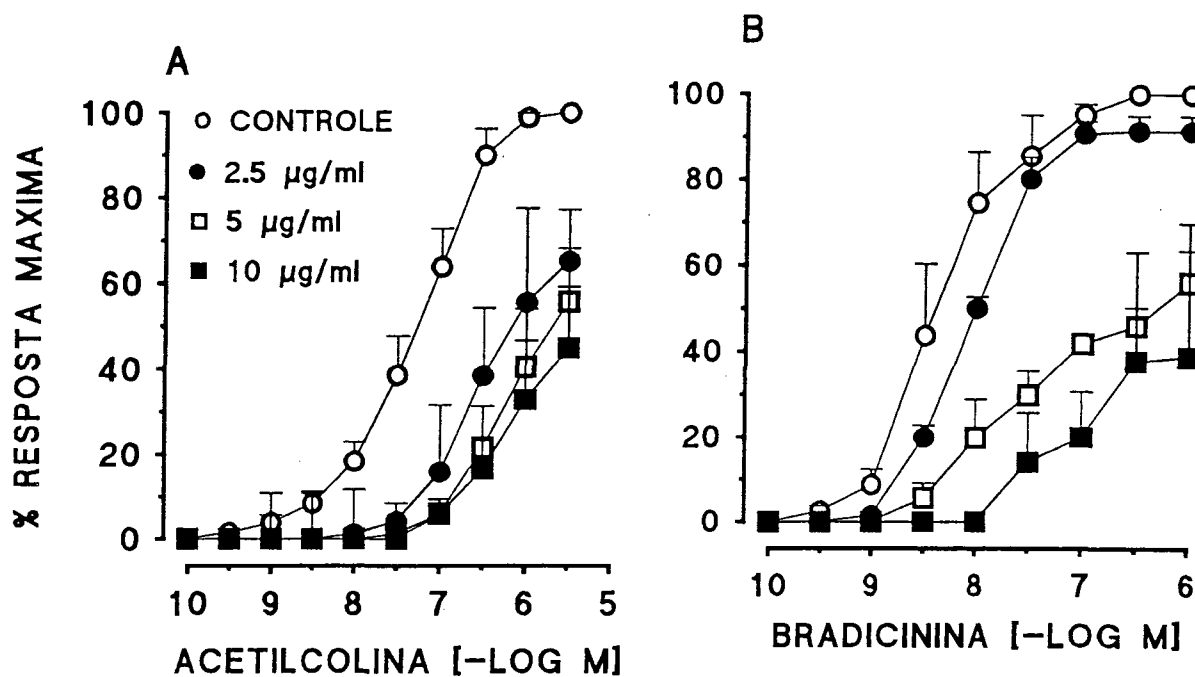


Figura 24: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A) e bradycinin (B) no íleo isolado de cobaia, na ausência ou na presença do composto 5. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

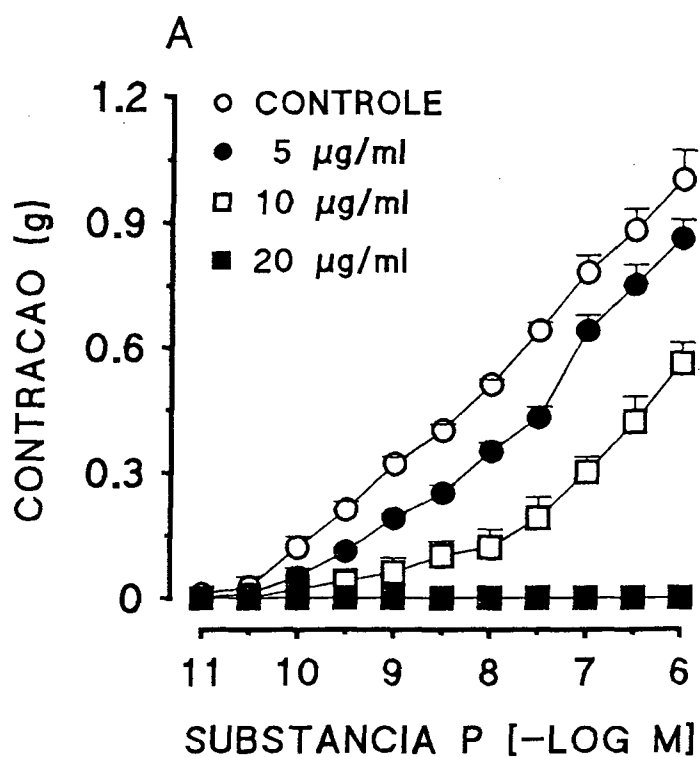


Figura 25: Curva concentração-resposta obtida para a substância P (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto 5. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

5.0 - Efeito do composto 9 isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas no íleo e na traquéia de cobaia.

Os resultados da figura 26 (A e B) mostram que o composto 9 (sesquiterpeno ainda não identificado) isolado da *Drymis winteri* (5 - 20 $\mu\text{g/ml}$), causou deslocamento à direita associado com inibição da resposta contrátil à acetilcolina (0,1 nM - 10 μM) e à bradicinina (0,1 nM - 1 μM) no íleo isolado de cobaia. Os valores das CI_{50} médias foram de: 11,20 (8,15 - 14,30) e 12,20 (9,90 - 14,40) $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Por outro lado, pode ser observado na figura 27 (A) que o composto 9 (5 - 20 $\mu\text{g/ml}$), causou inibição de forma significativa das respostas contráteis à bradicinina (10 pM - 1 μM) na traquéia isolada de cobaia, com CI_{50} média de 14,74 (11,61 - 17,87) $\mu\text{g/ml}$. No entanto, na figura 27 (B), observa-se que o composto 9 (10 - 40 $\mu\text{g/ml}$), causou pequena inibição sobre a resposta contrátil induzida pela substância P (10 pM - 1 μM). As CE_{50} foram de: 7,41 (4,60 - 12,00), 7,40 (4,20 - 13,20), 79,4 (37,70 - 117,90) e 251,20 (120,00 - 366,60) nM, respectivamente na ausência e na presença de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$ do composto.

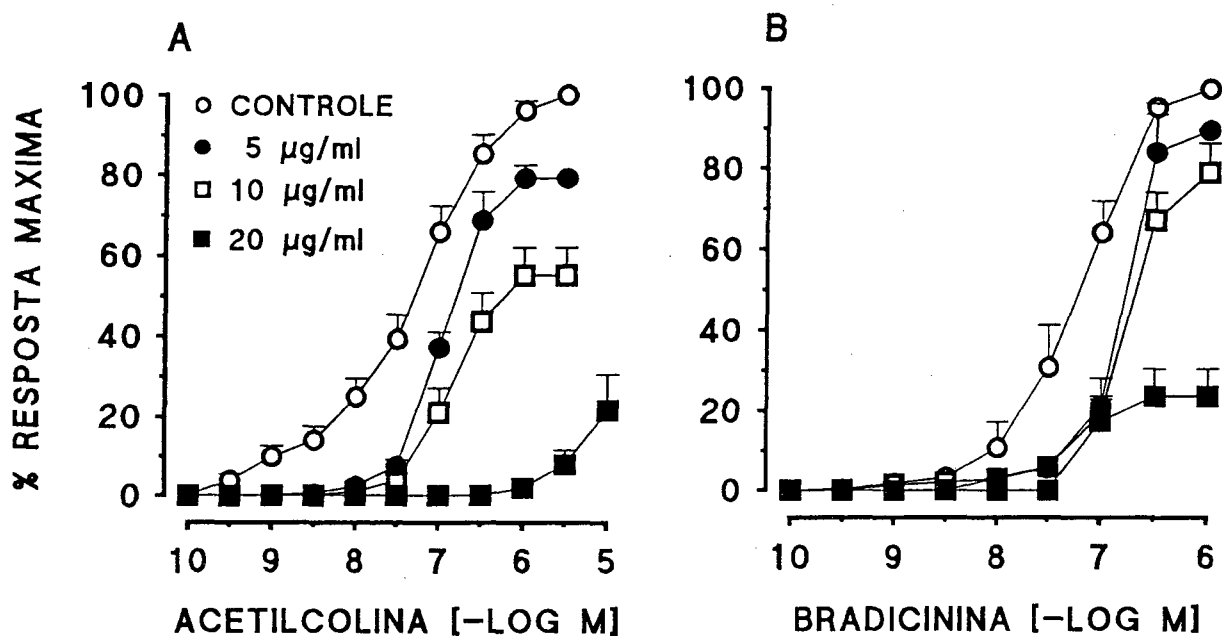


Figura 26: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A) e bradycinin (B) no íleo isolado de cobaia, na ausência ou na presença do composto 9. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

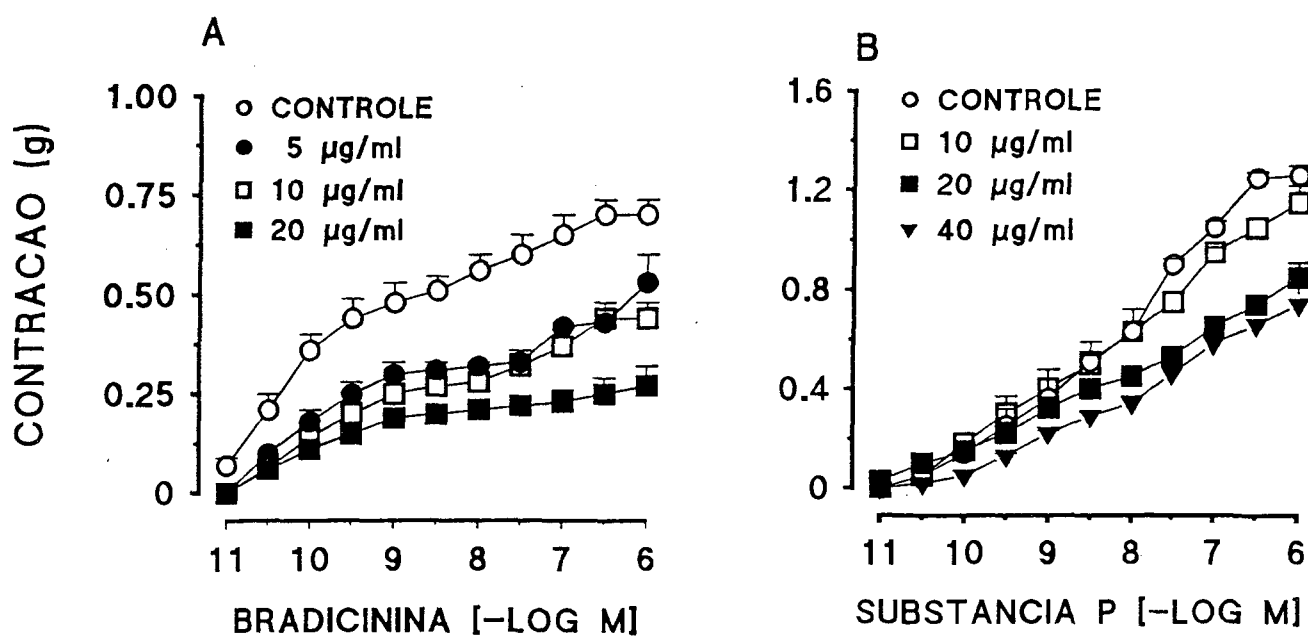


Figura 27: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycinin (A) e substância P (B) na traquéia isolado de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto 9. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

5.1 - Efeito do composto 1- β -[P-metoxi-coumaroiloxi] poligodial isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por diferentes agonistas na traquéia de cobaia.

A figura 28 (A) mostra que o composto caracterizado como sendo o 1- β -[P-metoxi-coumaroiloxi] poligodial (20 - 80 $\mu\text{g/ml}$) causou inibição significativa e de forma concentração-dependente da resposta contrátil à bradicinina (0,1 nM - 1 μM) na traquéia de cobaia. A CI_{50} média calculada para esse composto foi de 30,30 (23,30 - 37,20) μM . Porém, o composto 1- β -[P-metoxi-coumaroiloxi] poligodial, não interferiu com a resposta contrátil induzida pela substância P (0,1 nM - 1 μM) nesta preparação. As CE_{50} médias para a substância P foram: controle 29,06 (12,20 - 49,70) e 66,27 (33,30 - 102,00) nM, na presença de 80 $\mu\text{g/ml}$ do composto, (figura 28 B).

Já na preparação obtida de animais previamente sensibilizados à ovalbumina, o composto 1- β -[P-metoxi-coumaroiloxi] poligodial (40 - 80 $\mu\text{g/ml}$), causou inibição concentração e tempo-dependente da resposta contrátil induzida pela ovalbumina, com inibição máxima de $55 \pm 7\%$ (figura 29).

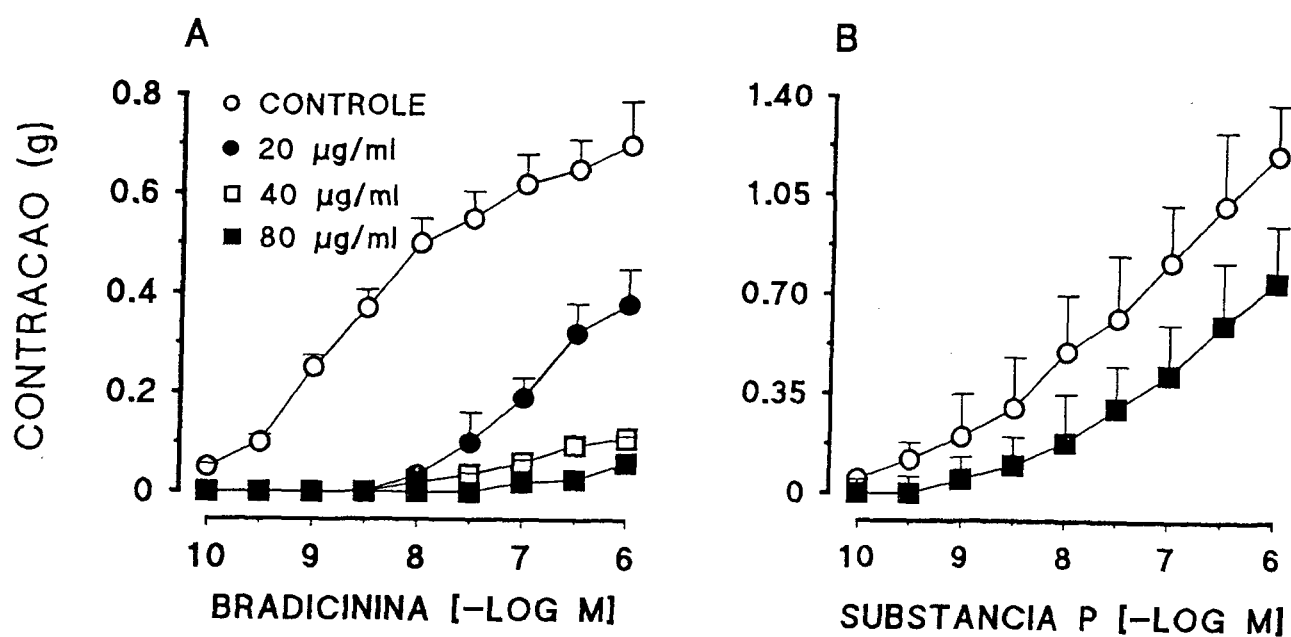


Figura 28: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycinin (A) e substância P (B) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto 1-β-[p-metoxi-coumaroiloxi] poligodial. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

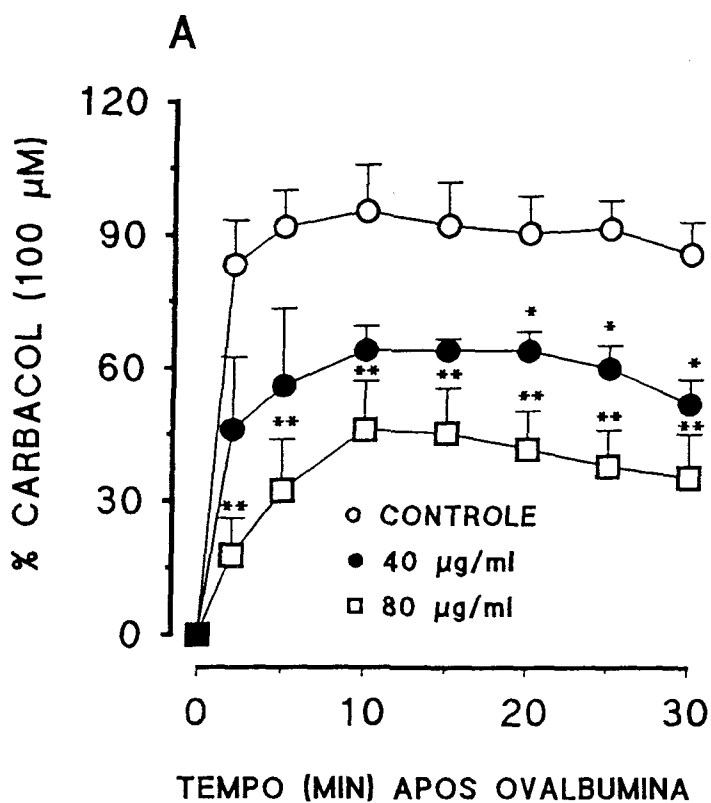


Figura 29: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença do composto 1- β -[p-metoxi-coumaroiloxi] poligodial. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

5.2 - Efeito do composto poligodial isolado da *Drymis winteri* sobre as contrações induzidas por agonistas em diversos músculos lisos “in vitro”.

5.2.1 - Óleo isolado de cobaia

Os resultados da figura 30 (A, B, e C) mostram que a incubação prévia das preparações com o poligodial (5 - 128 μM) causou deslocamento à direita da curva concentração-resposta à acetilcolina, histamina (1 nM - 10 μM) e para a bradicinina (0,1 nM - 1 μM), associado com inibição da resposta máxima. As CI_{50} médias foram de 87,00 (72,30 - 99,40), 41,63 (30,80 - 52,60) e 13,25 (4,50 - 22,00) μM , respectivamente. Esses efeitos foram revertidos após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

5.2.2 - Traquéia isolada de cobaia

A pré-incubação das preparações com o poligodial (171 - 342 μM), causou inibição parcial, mas de forma significativa da curva concentração-resposta induzida pela histamina (100 nM - 1 mM) (figura 31 A e tabela 2). Porém, os resultados da figura 31 (B) e os dados da tabela 2, mostram que o poligodial (5 - 20 μM), inibiu a curva concentração-resposta induzida pela bradicinina (10 pM - 1 μM), embora essa inibição não tenha sido de forma concentração-dependente. Já na figura 31 (C e D), pode ser observado que o composto poligodial (10 - 342 μM) causou inibição de forma significativa e concentração-dependente da curva concentração-resposta induzida pelo composto 48/80 (1 - 1000 $\mu\text{g/ml}$) e pelo análogo estável do

trombaxano A₂, U 46619 (0,1 nM - 1 µM). O valor médio das CI₅₀ foram: 318,00 (285,00 - 323,00) e 30,00 (17,00 - 39,00) µM, respectivamente. Podemos também observar que o composto poligodial (20 - 80 µM), causou deslocamento à direita da curva concentração-resposta induzida pela substância P (10 pM - 1 µM), sem interferir com a sua resposta máxima, com característica de antagonismo do tipo competitivo. O valor médio de pA₂ (-Log M) foi de 4,41 ± 0,03 (figura 32 A e tabela 2). Porém, o poligodial (342 µM) não interferiu de modo significativo com a contração induzida pela substância P - metil ester (0,1 nM - 1 µM); (figura 32 B e tabela 2). Por outro lado, a pré-incubação das preparações com o poligodial (5 - 20 µM) causou inibição significativa e de modo concentração-dependente da curva concentração-resposta induzida pelo agonista seletivo do receptor NK₂ para as taquicininas, a [β-ala⁸] neurocinina A (4 -10) (0,1 nM - 1 µM) (figura 32 C) e tabela 2. Como já descrito, as ações do poligodial das cascas da *Drymis winteri*, foram totalmente revertidas após várias lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

Já na traquéia de cobaia obtida de animais ativamente sensibilizados à ovalbumina, o poligodial (30 - 40 µM), causou inibição significativa da resposta contrátil induzida pela ovalbumina na traquéia de animais sensibilizados ao antígeno, com inibição máxima de 96 ± 7% (figura 33).

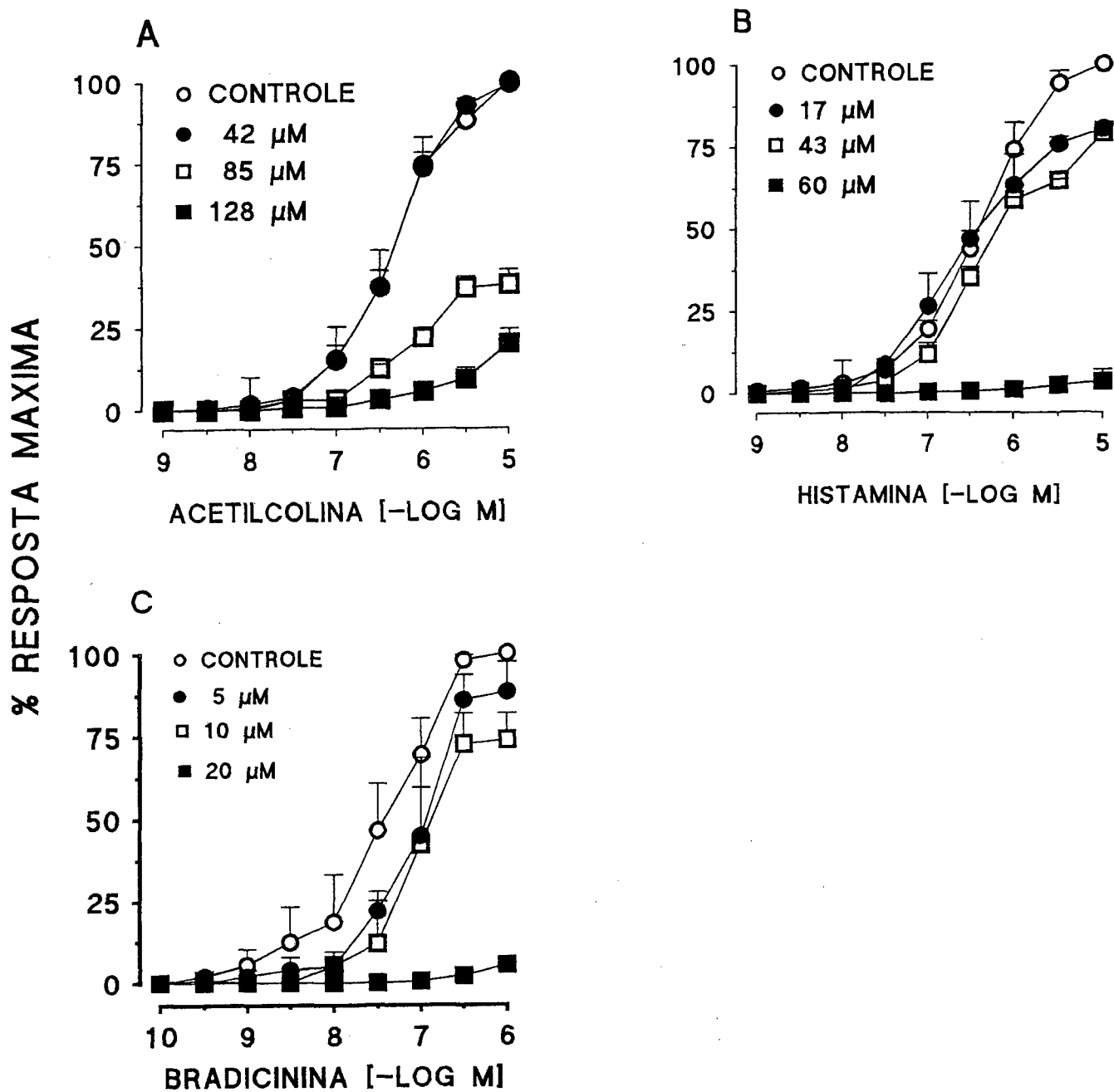


Figura 30: Curvas concentração-respostas obtidas para a acetilcolina (A), histamina (B) e bradicinina (C) no íleo isolado de cobaia, na ausência ou na presença do composto poligoidal. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

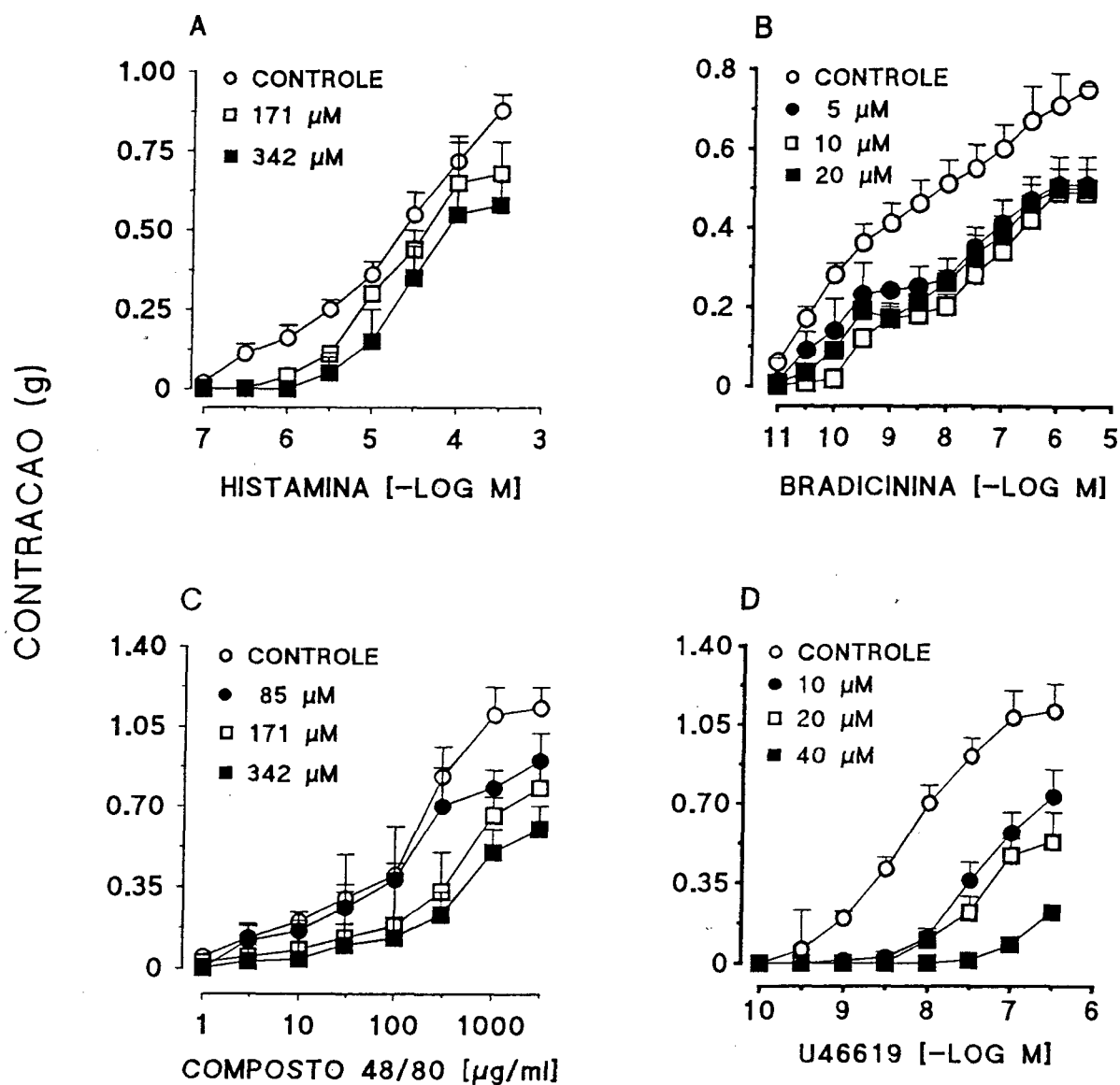


Figura 31: Curvas concentração-respostas obtidas para a histamina (A), bradycinin (B) composto 48/80 (C) e U 46619 (D) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto poligoidal. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

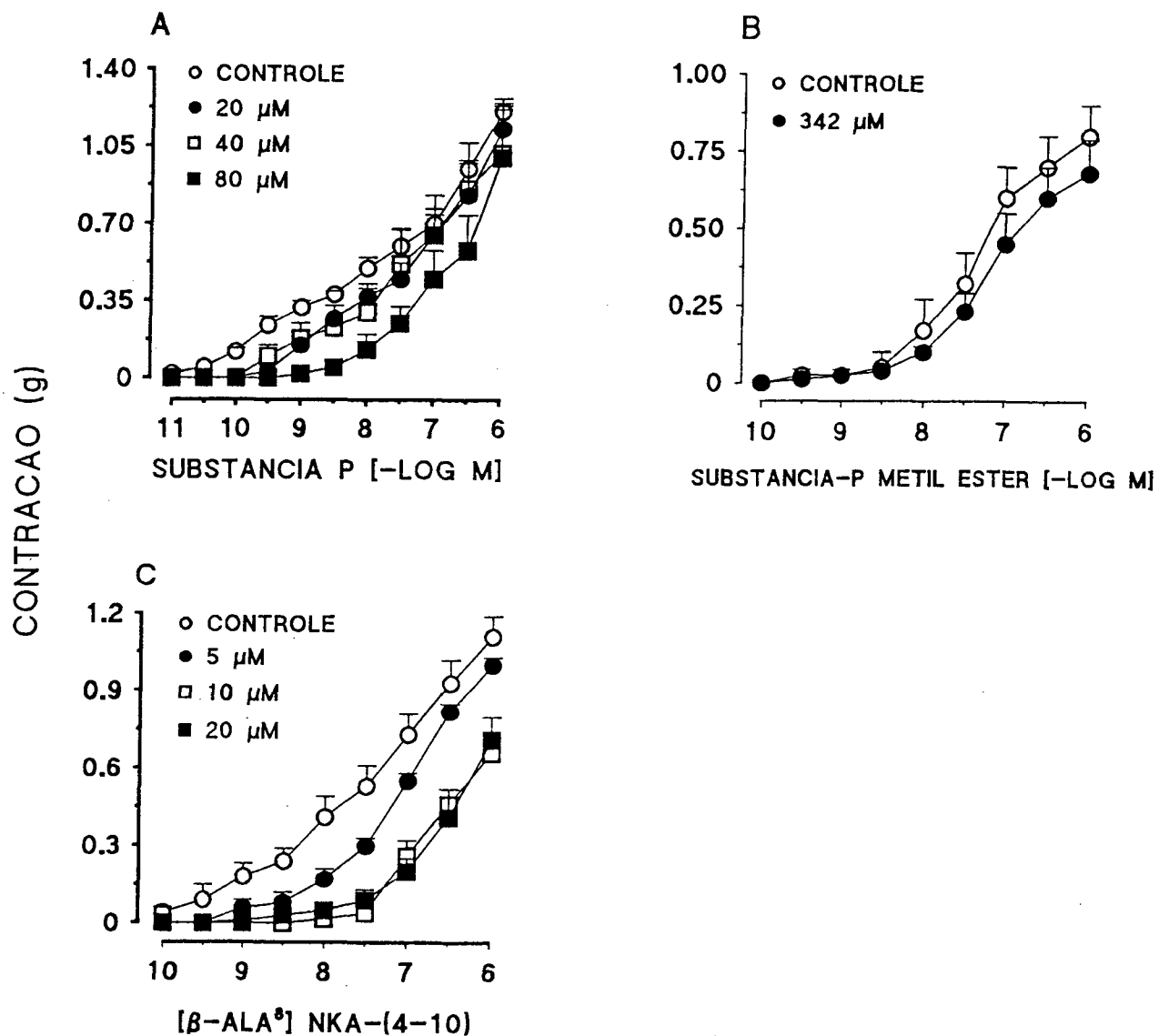


Figura 32: Curvas concentração-respostas obtidas para a substância P (A), substância P - metil ester (B) e neurocinina A (C) na traquéia isolada de cobaia sem epitélio, na ausência ou na presença do composto poligoidal. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

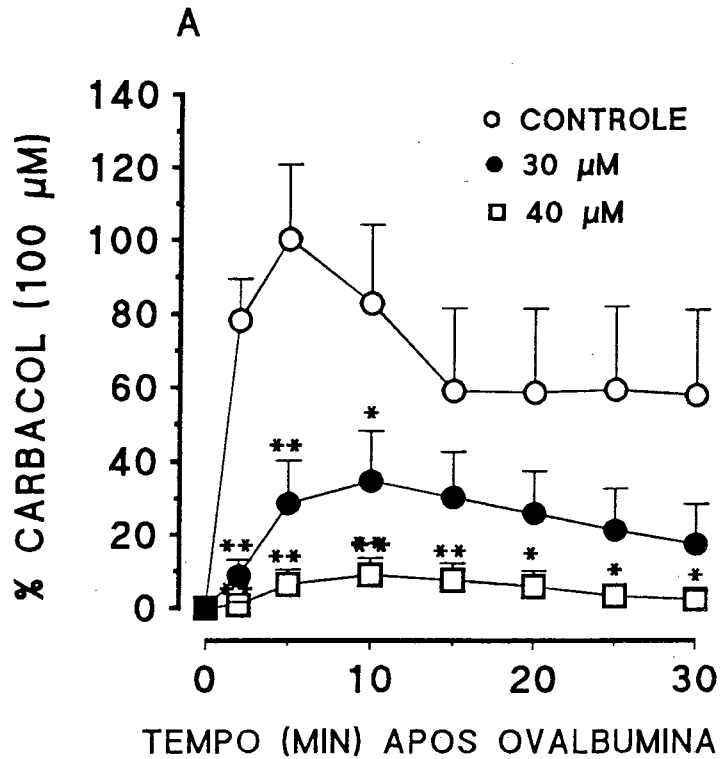


Figura 33: Resposta contrátil tempo-dependente induzida pela ovalbumina na traquéia isolada de cobaia com epitélio de animais ativamente sensibilizados ao antígeno. Respostas obtidas na ausência ou na presença do composto poligodial. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

TABELA 2: Valores médios das CE₅₀ para vários agonistas na traquéia isolada de cobaia na ausência ou na presença do composto poligodial.

Agonistas	Controle	Concentração (µM)							
		5	10	20	40	80	171	342	
Histamina (µM)	16,0 (6,3 - 23,7) ^a	-	-	-	-	-	22,0*	50,1*	(14,0-28,0) (41,0-59,0)
Bradicina (nM)	0,4 (0,1 - 0,8)	63,0 * (31,9- 95,1)	100,0* (53,0-150,0)	199,0* (102,0-293,0)	-	-	-	-	-
Substância P (nM)	36,0 (16,4 - 53,3)	-	-	47,6* (17,3 - 78,1)	54,0* (16,0-92,4)	323,0* (189,6-450,0)	-	-	-
Substância P metil ester (nM)	44,9 (30,2 - 61,8)	-	-	-	-	-	-	-	66,7 (57,2-77,7)
[β-ala ⁸]NKA (4-10) (nM)	31,6 (23,0 - 40,5)	100,00 * (91,0-110,5)	500,2* (493,0-507,0)	502,3* (495,0-509,0)	-	-	-	-	-

^a Limite de confiança de 95%. Cada grupo representa a média de 4 a 6 experimentos. Difere significativamente dos valores controles (* P < 0,05).

5.2.3 - Veia porta isolada de rato

Na veia porta isolada de rato a pré-incubação do composto poligodial (21 - 84 μM), inibiu significativamente e de maneira não competitiva a curva concentração-resposta à bradicinina (0,1 - 100 nM) com CI_{50} de 58 (46 - 72) μM e inibição máxima de $86 \pm 4\%$; (figura 34 A). Podemos observar na figura 34 (B) que o composto poligodial (21 - 84 μM) causou inibição de modo concentração-dependente da resposta contrátil causada pelo U 46619 (10 nM - 1 μM), com CI_{50} de 73,00 (62,00 - 81,00) μM . Além disso, o poligodial (85 - 342 μM) inibiu significativamente a resposta contrátil causada pela endotelina -1 (1 nM - 100 nM) com CI_{50} de 303 (288 - 320) μM e inibição máxima de $92 \pm 3\%$; (figura 32 C). Os resultados da figura 34 (D) mostram que o poligodial (4 - 17 μM) deslocou à direita a curva concentração-resposta induzida pela substância P, associada com a inibição da resposta máxima, com CI_{50} média de 9,00 (4,90 - 14,30) μM e inibição máxima de $86 \pm 2\%$. Por outro lado, o poligodial (0,4 μM) causou inibição significativa da curva concentração-resposta induzida pelo senktide (1 - 100 nM), com percentual de inibição de $56 \pm 3\%$; (figura 34 E). As ações inibitórias do poligodial foram revertidas após lavagens das preparações com líquido nutriente (resultados não apresentados).

CONTRACAO (g)

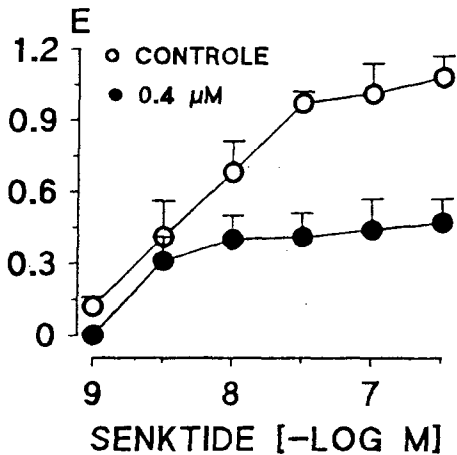
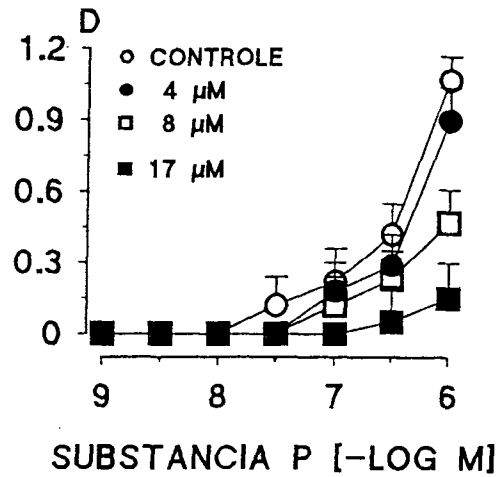
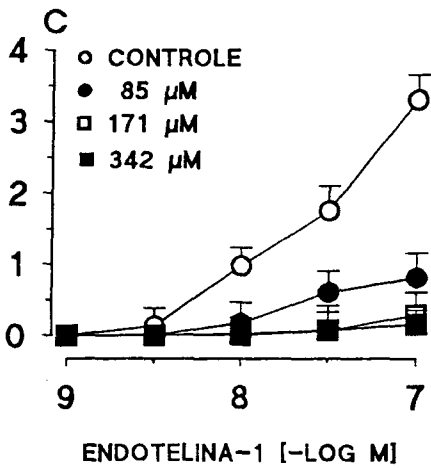
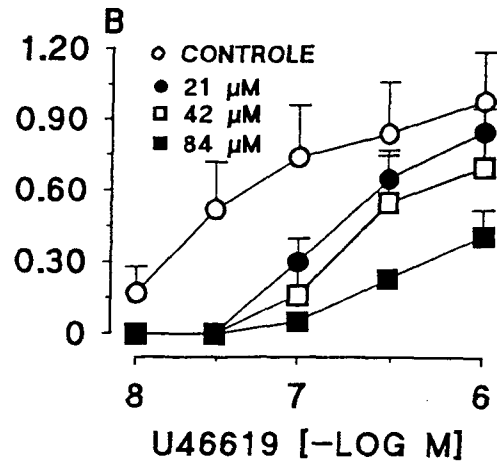
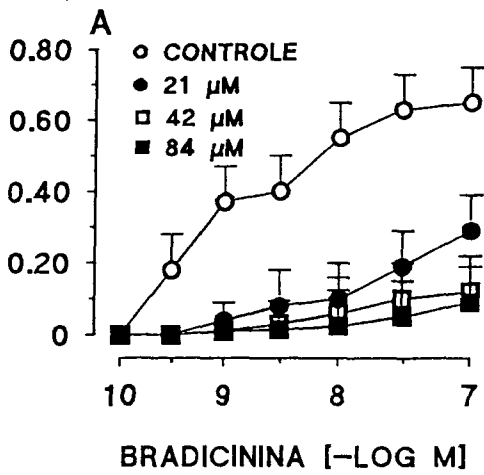


Figura 34: Curvas concentração-respostas obtidas para a bradycinin (A), U 46619 (B), endotelina - 1 (C), substância P (D) e senktide (E) na veia porta isolada de rato, na ausência ou na presença do composto poligodal. Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos e as barras verticais indicam os erros padrão das médias.

5 - DISCUSSÃO

Extrato Hidroalcoólico

A infusão obtida das cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae), planta nativa da região Sul do Brasil e de alguns países sula-americanos, é utilizada no Sul do Brasil para o tratamento de várias patologias, incluindo entre elas a asma brônquica, doenças alérgicas e também como antiespasmódica, antidiarréica entre outras (Morton, 1981; Simões et al., 1986).

Em trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório, foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico obtidos de suas cascas apresentou duradoura ação antiedematogênica tanto quando administrado por via intraperitoneal como por via oral, em relação aos edemas induzidos por vários mediadores químicos que reconhecidamente participam dos processos inflamatórios, bem como da alergia e da asma, além de irritantes como a carragenina e a dextrana (Tratsk et al., 1995). Assim, foi verificado que o pré-tratamento dos animais com o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* inibiu de maneira dose e tempo dependentes os edemas causados pela bradicinina, substância P, PAF acéter, carragenina, dextrana, mas foi menos ativo em inibir o edema causado pela prostaglandina E₂ e inativo em relação ao edema induzido pela histamina. Além disso, nas mesmas doses o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*, como a dexametasona, foi capaz de prevenir de

maneira dose e tempo dependentes o edema alérgico, bem como a morte causada pela injeção de ovalbumina nos animais que haviam sido ativamente sensibilizados com esse antígeno (Tratsk et al., 1995).

Em outro estudo, demonstramos também que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* apresentou ação antinociceptiva duradoura em camundongos, tanto quando foi administrado por via intraperitoneal como por via oral em diferentes modelos de nocicepção, incluindo a dor neurogênica causada pela formalina e a capsaicina (Matta et al., 1994). Como observado no edema de pata, as ações antinociceptivas do extrato desta planta foram de longa duração (até 8 h) após sua administração. Mais recentemente (resultados não publicados), demonstramos que o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*, administrado por via oral, foi capaz de reverter de maneira dose-dependente a hiperalgesia causada pela injeção subplantar de bradicinina e substância P em ratos. Analisados em conjunto, esses resultados parecem confirmar pelo menos em parte, o uso medicinal dessa planta mencionado na medicina popular e mostram também a existência de princípio(s) ativo(s) com interessante potencial medicinal para o desenvolvimento de novas drogas e/ou fitoterápicos de interesse para o tratamento da dor, inflamações e de doenças alérgicas e na asma.

No presente estudo procurou-se, numa primeira etapa, analisar as ações do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sobre as respostas contráteis para alguns mediadores químicos que reconhecidamente participam dos processos inflamatórios, na dor, na asma e na alergia, em vários músculos lisos “in vitro”.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam e ampliam aqueles obtidos anteriormente nos modelos de dor, alergia e inflamação. Por exemplo, quando o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foi testado no íleo isolado de cobaia foi observado antagonismo do tipo não competitivo e proporcional à concentração empregada em relação às respostas contráteis causadas pela acetilcolina, histamina e bradicinina. Contudo, as CI_{50} calculadas para o extrato não diferiram estatisticamente em função do neurotransmissor usado. Além disso, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* causou deslocamento importante à direita das respostas contráteis para esses mediadores, sugerindo talvez alguma interação de seus princípio(s) ativo(s) com os receptores para essas substâncias. Resultados semelhantes foram observados para o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* no útero isolado de rato. Nessa preparação as respostas contráteis causadas pela acetilcolina, bradicinina, prostaglandina $F_{2\alpha}$, endotelina-1, angiotensina II e ocitocina foram também antagonizadas aparentemente através de antagonismo não competitivo, associado em alguns casos com marcado deslocamento à direita das curvas concentração respostas aos agonistas.

Com o objetivo de estender esses achados, foram realizados experimentos semelhantes para o extrato na bexiga isolada de cobaia estimulada por diversos mediadores químicos envolvidos nos processos alérgicos, asma, inflamação e nocicepção. Uma característica interessante para a escolha desta preparação de músculo liso em relação ao útero de rata e ao íleo de cobaia é sua maior dependência da mobilização de cálcio intracelular para a contração dos

neurotransmissores estudados (Bhat et al., 1989; Yoshida et al., 1992; Maggi et al., 1989; Lowe e Noronha-Blob, 1991; Elliot et al., 1992; Perls, 1976; Forster e Ramage, 1981). Dessa forma, o uso dessa preparação poderia evidenciar uma possível ação seletiva dos princípios ativos presentes nas cascas da *Drymis winteri* sobre as respostas aos agonistas estudados. De fato, os resultados obtidos neste modelo experimental indicam uma ação bastante seletiva do extrato em inibir as respostas contráteis à substância P e à bradicinina, quando comparado com as respostas à histamina e ao carbacol. Por outro lado, os efeitos da bradicinina, taquicininas nos processos inflamatórios como na cistite (Marceau et al., 1980; Torrens et al., 1995; Conte et al., 1996) provavelmente possam estar relacionados aos efeitos reflexos regulados pela motilidade da bexiga e estimulação dos nervos sensíveis à capsaicina, os quais regulam as ramificações aferentes dos reflexos da micção na bexiga urinária de cobaia. Isto pode ocorrer pela estimulação direta dos nervos sensoriais ou pela via de produção de prostanóides (Maggi et al., 1987b, 1991a,b). Dados descritos na literatura também indicam a existência de receptores específicos do tipo B₂ para a bradicinina (Maggi et al., 1987b; Calixto, 1995; Dray e Perkins, 1993; Hall, 1992; Farmer e Burch, 1992) e dos subtipos NK₁ e NK₂ (Maggi et al., 1986, 1987a, 1991b; Dias et al., 1995) para a substância P nessa preparação. As taquicininas liberadas localmente aumentam a contração da bexiga pela ação direta nas células musculares envolvendo a liberação de acetilcolina pelos neurônios parassimpáticos (Shirakawa et al., 1989), e também facilitam os

reflexos da micção. Além disso, localmente a liberação das taquicininas pode causar resposta inflamatória (Lundberg et al., 1984a; Maggi et al., 1987a; Abelli et al., 1989). Considerando que ambos os peptídeos estão intimamente relacionados com a mediação dos processos inflamatórios, alérgicos e na nocicepção, esses resultados confirmam e também estendem as observações descritas em nosso laboratório para o extrato da *Drymis winteri*.

A partir desses resultados iniciais e também baseados nos estudos realizados “in vivo” com o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*, optou-se também por melhor caracterizar as ações do extrato hidroalcoólico, e posteriormente das frações semipurificadas e de alguns compostos isolados desta planta na traquéia de cobaia “in vitro”. A escolha dessa preparação foi baseada na existência de uma vasta bibliografia sobre as ações dos vários mediadores químicos que participam da asma, alergia, inflamação, nocicepção nesse tecido, especialmente dos neuropeptídeos envolvidos na dor e na inflamação neurogênica, como a bradicinina e a substância P (Barnes, 1992a; Regoli et al., 1994; Bertrand e Geppetti, 1996). Além disso, a traquéia recebe inervação do sistema simpático, parassimpático, e sensorial (Richardson, 1979), e é ricamente inervada por fibras contendo vários peptídeos, como neuropeptídeo Y, peptídeo vasoativo, peptídeos histidina-isoleucinamida, substância P, neurocinina A, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), galanina além de inervação colinérgica (Uddmann e Sundler, 1987, Frossard e Advenier, 1991). Estudos imuno-histoquímicos e farmacológicos revelaram a presença de óxido nítrico ou

substância relacionada nas vias aéreas de várias espécies incluindo a cobaia (Li e Rand, 1991; Tucker et al., 1990; Belvisi et al., 1991; Schlemper e Calixto, 1994). É conhecido que os prostanóides, também desempenham papel fundamental na contratilidade e no controle da responsividade das vias aéreas, seja na manutenção do tônus intrínseco da traquéia de cobaia (Ito e Tajima, 1981; Aikawa et al., 1990; Raeburn e Webber, 1994; Charette et al, 1995), ou por modular a liberação de peptídios dos neurônios sensoriais (Mapp et al., 1991).

A análise dos resultados obtidos para o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* na traquéia de cobaia mostra uma ação aparentemente seletiva e relevante do(s) princípio(s) desta planta contra as respostas contráteis para os mediadores químicos envolvidos na etiologia da asma, alergia, inflamação e na nocicepção (Schlosber, et al., 1993; Thien e Walters, 1995). Novamente, observa-se uma ação bastante seletiva do extrato hidroalcoólico em relação as respostas para os neuropeptídeos em especial para a substância P e bradicinina. É interessante notar que nesses experimentos o perfil de ação do extrato assemelha-se mais a um antagonismo do tipo competitivo, produzindo marcado deslocamento à direita da curva concentração-resposta aos agonistas. Contudo, a limitação de concentrações maiores dos agonistas usados impediu uma melhor caracterização farmacológica desses efeitos.

Diversas evidências sugerem que neuropeptídeos como a substância P e a neurocinina A localizados nos nervos sensoriais mielinizados do pulmão de mamíferos, podem regular o tonus vascular, brônquico, a permeabilidade

vascular, a função epitélio celular (incluindo secreção de muco), a proliferação celular e a resposta imuno-específica (Helke et al., 1990; Barnes et al., 1991; Solway e Leff, 1991; Bertrand e Geppetti, 1996). Dessa forma, esses neuropeptídeos exercem um papel importante nas reações inflamatórias nas vias aéreas, especialmente em fumantes (Barnes et al., 1991, Mantyh, 1991, Solway e Leff 1991). Além disso, os neuropeptídeos pró-inflamatórios possuem importantes efeitos destacando-se a estimulação da proliferação dos linfócitos T, e estimulação de macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Payan, 1992; Numao e Agrawal, 1992; Smitt et al., 1993). Em razão dos inúmeros efeitos descritos para os neuropeptídeos, eles estão geralmente implicados em várias patologias, incluindo as desordens das vias aéreas, como a rinite e a asma, entre outros (Baranuik e Kaliner, 1990; Solway e Leff, 1991; Joos et al., 1994), além de estarem intimamente relacionados com os processos nociceptivos e inflamatórios de origem neurogênica. Tem sido proposto que a substância P e outras neurocininas atuam como neurotransmissores e/ou moduladores na transmissão da informação nociceptiva principalmente a nível da medula espinhal (Otsuka e Yoshioka, 1993).

As neurocininas encontradas no sistema nervoso central de mamíferos são: substância P, neurocinina A (substância K, neuromedina ou neurocinina), neurocinina B (neuromedina K) (Kanawaga et al., 1983; Kimura et al., 1983; Maggio et al., 1983; Schimada et al., 1987), neurocinina K (neuropeptídeo K) e a neurocinina G (neuropeptídeo G) (Tatemoto et al., 1985; Kage et al., 1988). As

neurocininas são armazenadas em grandes vesículas sinápticas localizadas na região terminal do axônio (Maggi et al., 1993b). A liberação do conteúdo dessas vesículas para a fenda sináptica ocorre por: 1) estímulos externos como pela capsaicina, potássio ou outros agentes capazes de induzir despolarização neuronal, ou 2) em condições fisiopatológicas, podendo ocorrer durante o peristaltismo intestinal, após estímulos térmicos na pele, por aplicação de estímulos dolorosos e não dolorosos na medula espinhal, ou ainda podem ser liberados durante os processos inflamatórios. Atualmente, existem várias evidências experimentais indicando que as neurocininas estão amplamente distribuídas tanto no sistema nervoso central quanto periféricamente (Helke et al., 1990; Otsuka e Yoshioka, 1993). A nível periférico, as neurocininas são encontradas numa variedade de tecidos, principalmente nos neurônios aferentes primários da raiz do gânglio dorsal sensíveis à capsaicina, que na verdade constitui a fonte neuronal mais comum de neurocininas. A substância P frequentemente coexiste com outras neurocininas no mesmo neurônio, mas também comumente coexiste ou interage com neurotransmissores clássicos, tais como dopamina, acetilcolina, opiáceos, serotonina, GABA e aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), todos mediadores envolvidos na nocicepção (Pernow, 1986; Hökfelt et al., 1988; Chang, 1988; Battaglia e Rustioni, 1988; Debiasi e Rustioni, 1988).

O aumento da excitabilidade central pode ser responsável por algumas mudanças na sensação da dor caracterizada por lesão e/ou inflamação dos

tecidos periféricos (Treede et al., 1992). Leah et al. (1985) demonstraram que as fibras aferentes do tipo C podem ser “receptores silenciosos” para as neurocininas, sendo esses sensibilizados pelo processo inflamatório do tecido periférico (Habler et al., 1990). Essas observações foram confirmadas por Hope et al. (1990), que demonstraram que a substância P e a neurocinina A têm seus níveis aumentados nos gânglios dorsais da medula de gato após a aplicação de estímulo mecânico (Schaible et al., 1990).

Outros estudos utilizando técnicas de imunohistoquímica, demonstraram a presença de Substância P e neurocinina A nas vias aéreas (Hua et al., 1985; Lundberg et al., 1984b), sendo que os receptores das taquicinininas do subtipo NK₂ são identificados como sendo os responsáveis por induzir broncoconstrição nas vias aéreas, tanto de humanos como de cobaias (Naline et al., 1989; Dion et al., 1990; Rhoden e Barnes, 1990; Emonds-Alt et al., 1992, Ellis e Undem, 1992, Bertrand e Geppetti, 1996). Nos estudos “in vitro” tem sido demonstrado que a neurocinina A é menos potente do que substância P em contrair a musculatura lisa brônquica humana, indicando que os receptores NK₂ provavelmente estão envolvidos (Daniele et al., 1992; Solway e Leff, 1991). No entanto, na estimulação da secreção mucosa das vias aéreas, a substância P é menos potente que a neurocinina A, indicando que os receptores NK₁ parecem estar também envolvidos nesse efeito (Solway e Leff, 1991). Assim, procuramos analisar no presente estudo se os princípio(s) ativo(s) presente(s) nas cascas da *Drymis winteri* eram capazes de interferir seletivamente com os receptores NK₁ e NK₂

para as taquicininas nessa preparação. Os resultados obtidos indicam com bastante clareza que o extrato hidroalcoólico dessa planta foi capaz de deslocar à direita a curva concentração-resposta ao agonista seletivo do receptor NK₂, a [β -ala⁸] neurocinina A (4-10) mas, no entanto, nas mesmas concentrações, ele não interferiu com a resposta contrátil ao agonista seletivo de receptor NK₁, a substância P - metil éster. Em conjunto, esses resultados parecem indicar uma seletividade de ação dos princípios ativos dessa planta sobre as ações das taquicininas via ativação dos receptores NK₂.

Outro dado interessante observado no presente estudo foi a inibição observada para a resposta da capsaicina. Os dados descritos na literatura indicam que as fibras sensoriais das vias aéreas são ativadas e dessensibilizadas pela capsaicina, um princípio pungente isolado da pimenta vermelha (Lundberg, 1993). A capsaicina se liga a receptores de membrana denominados de receptores vanilóides (Szallasi e Blumberg, 1990; Szallasi, 1994), sendo seletivamente ativado pela resineferatoxina e antagonizada competitivamente pela capsazepina (Bevan et al., 1992; Szallasi et al., 1993; Ellis e Undem, 1994; Foulon et al., 1993). Estes receptores estão distribuídos em vários tecidos de mamíferos incluindo a medula espinhal (Szallasi e Blumberg, 1991), bexiga e vias aéreas (Szallasi et al., 1993). A estrutura proposta para esse receptor indica que ele está associado a um canal iônico permeável a cátions, especialmente ao cálcio (Wood et al., 1988, revisado por Szolcsanyi, 1990; Bevan e Szolcsanyi, 1990).

O receptor vanilóide, que é seletivamente ativado pela capsaicina e pela resineferatoxina (Szallasi e Goso, 1994; Szallasi, 1994; Szallasi et al., 1993; Charette et al., 1993), promove a excitação das terminações nervosas causando liberação de taquicininas incluindo a substância P, neurocinina A e CGRP. A resineferatoxina é um produto natural obtido da planta *Euphorbia resinifera* e *Euphorbia poissonii* (Hergenhahn et al., 1974), a sua estrutura mostra alguma similaridade com o forbol éster tanto quanto com a capsaicina.

Vários trabalhos têm proposto que o ligante endógeno para o receptor específico da capsaicina e de seu análogo natural, o diterpeno resineferatoxina, seja os prótons H^+ . Esses prótons seriam produzidos nas proximidades dos neurônios sensoriais por alterações fisiológicas ou patológicas, como por exemplo, na inflamação neurogênica. O estímulo ácido pode funcionar como um ativador endógeno para a corrente ativada pela capsaicina, e que isso justificaria aumento do pH do meio, como por exemplo onde ocorre redução brusca do pH do meio, como por exemplo no caso das isquemias e nos processos inflamatórios (Liu e Simon, 1994). Assim, a interação ainda que parcial do extrato da *Drymis winteri* com as respostas da capsaicina poderia ser importante para explicar suas ações antiedematogênicas e antiinflamatórias.

Outro resultado também interessante que poderia também contribuir para explicar as possíveis ações antialérgicas e antiasmáticas descritas para o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foi o antagonismo concentração dependente e aparentemente do tipo competitivo observado em relação à contração causada

pelo análogo estável do tromboxano A₂, o U 46619. Além disso, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* produziu deslocamento importante e concentração dependente à direita da resposta contrátil à prostaglandina E₂ na traquéia de cobaia. Existem várias evidências indicando a participação dos metabólitos do ácido araquidônico nos processos inflamatórios, alérgicos e na asma (Hamberg et al., 1975; Svensson et al., 1977; Barnes, 1992b; Kawikova et al., 1993; Saito et al., 1992). Nas vias aéreas, os produtos derivados da ciclooxigenase estão associados com significativo aumento da reatividade brônquica (Walters 1983; Fuller et al., 1986), causando broncoconstrição (Mathe e Hedqvist, 1975, Hardy et al., 1984). Também na dor de origem neurogênica e inflamatória, os derivados do metabolismo do ácido araquidônico, entre eles as prostaglandinas, leucotrienos e ácidos hidroxil, são sintetizados pela atividade das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase.

É conhecido que as prostaglandinas são capazes de excitar os nociceptores, ou seja, são as principais causadoras da redução do limiar de dor, contribuindo assim para o estabelecimento da hiperalgesia. As prostaglandinas são geralmente geradas por uma forma constitutiva da enzima, a cicloxigenase (COX-1) que apresenta inúmeras funções fisiológicas (Mitchell et al., 1994; Coleman et al., 1994). Recentemente uma segunda forma denominada de cicloxigenase (COX-2) foi descrita durante o processo inflamatório. Recentemente, Charette et al. (1995) demonstraram que a produção de prostanóides responsáveis pelo tônus intrínseco na traquéia isolada de cobaia se

deve principalmente a atividade da COX-2. A precisa origem celular dessa enzima não foi ainda elucidada, mas a sua presença já havia sido descrita em outras células como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e na própria camada muscular lisa (Battistini et al., 1994; Pitchard et al., 1994; Vane et al., 1994). A natureza do estímulo para a expressão da COX-2 não está ainda bem explicada, mas o trauma da remoção e dissecação do tecido pode induzir o aumento da expressão dessa enzima. Outros fatores, como o sangue, a presença das citocinas como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, além de certos fatores de crescimento, já foram descritos como sendo responsáveis pela ativação da expressão da COX-2 (Battistini et al., 1994). Várias evidências indicam que as prostaglandinas são sintetizadas e liberadas em diversos tecidos incluindo os do trato respiratório (Moncada e Vane, 1983). Quando analisada “in vitro” a prostaglandina E₂ e o análogo do tromboxano A₂ o U 46619, aumentam as respostas (Omini et al., 1986; Armour et al., 1988) e induzem mudança no tono da musculatura lisa das vias aéreas (Sweatman e Collier, 1968; Gardiner e Collier, 1988; Coleman et al., 1981; Black et al., 1986).

Finalmente, o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* deslocou à direita de maneira proporcional à concentração usada a resposta contrátil para o composto 48/80, conhecido por liberar histamina de mastócitos (Paton, 1951; Maling et al., 1974). Considerando que nas mesmas concentrações o extrato hidroalcoólico desta planta causou apenas discreto efeito na resposta contrátil à histamina nesta preparação, é bastante razoável supor que esses princípio(s)

ativo(s) possa(m) estar interferindo com a liberação de histamina, sem interferir com as ações desse mediador ao nível do receptor e/ou do sistema de efetador nesta preparação. Reconhecidamente a histamina é um importante mediador pró-inflamatório, sendo liberada pela degranulação de mastócitos causada por vários agentes mecânicos e inúmeros mediadores inflamatórios como substância P, interleucina -1 e fator de crescimento neural (Bevan, 1982; Hill, 1990; Schwartz et al., 1991). A histamina pode atuar nos neurônios sensoriais produzindo irritação em baixas concentrações e dor em altas concentrações (Dray, 1994). A ativação dos receptores H_1 pela histamina a nível dos neurônios sensoriais pode resultar em aumento da permeabilidade ao cálcio provocando, assim, a liberação de neuropeptídeos sensoriais além de prostaglandinas e ácidos mono-hidróxidos eicosatetraenóicos pelas células endoteliais, levando à hiperalgesia e a outros efeitos pró-inflamatórios (Rang et al., 1994). Além disso, como demonstrado na bexiga e na traquéia de cobaia, o extrato hidroalcoólico não parece interferir de maneira importante com o sistema colinérgico muscarínico.

Considerando os resultados interessantes obtidos nos estudos realizados “in vivo” indicando uma ação analgésica, antialérgica e antiedematogênica e também as ações “in vitro” em relação aos mesmos neurotransmissores para o extrato desta planta, decidiu-se analisar as ações do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* na traquéia de cobaia de animais ativamente sensibilizados à ovalbumina. Mais uma vez nossos resultados confirmam e estendem os estudos realizados “in vivo” com a extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* sugerindo a

existência de princípio(s) ativo(s) com propriedade(s) antialérgica e/ou antiasmática nesta planta. Em muitas espécies animais, incluindo os humanos e cobaias a prévia sensibilização das vias aéreas quando expostas à antígeno específico, resulta na liberação de mediadores inflamatórios, como por exemplo a histamina (Adams e Lichtenstein, 1979), leucotrienos (Burka e Paterson, 1981; Dahlen et al., 1983) e prostaglandinas (Burka et al., 1981). Estes mediadores podem contrair diretamente a musculatura lisa das vias aéreas (Dahlen et al., 1983) e induzir ou aumentar a reação inflamatória “in vivo” (Chung e Barnes, 1992).

A contração causada pelo antígeno na traquéia de cobaia sensibilizada, resulta primariamente na ação da histamina e de produtos da liberação da via do ácido araquidônico via 5-lipoxigenase (leucotrienos) e do metabolismo da ciclooxigenase (prostaglandinas e tromboxanos) (Adams e Lichtenstein, 1979; Saad et al., 1983). As respostas contráteis monofásicas da contração ao antígeno consiste da fase anti-histamínica-sensível e de uma fase lenta mediada por leucotrienos (Adams e Lichtenstein, 1979; Burka e Paterson, 1981; Fishleder e Buckner, 1984). Administrados simultaneamente, os antagonistas desses mediadores químicos reduzem a amplitude da resposta contrátil ao antígeno (Adams e Lichtenstein, 1979; Hand e Buckner, 1979).

O mecanismo de ação do extrato da *Drymis winteri* não foi investigado em maior profundidade, mas os resultados do presente estudo permitem sugerir que esses efeitos podem estar relacionados com a ação dos princípio(s) ativo(s) desta

planta em vários sítios incluindo, entre outros, uma interação com os receptores e/ou transdução de sinal das respostas para as taquicininas, cininas, derivados do ácido araquidônico especialmente com o tromboxano A_2 , além da inibição da liberação de histamina.

Em nossos estudos procuramos também analisar as ações do extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* na veia porta isolada de rato, preparação conhecida por apresentar receptores do subtipo NK_3 para as taquicininas (Mastrangelo et al., 1986; Maggi, 1995; Dias et al., 1996). Os resultados permitem evidenciar que os princípios ativos presentes no extrato hidroalcoólico desta planta nas mesmas concentrações, além de interferir com as ações das taquicininas mediadas pelo receptor NK_2 , também interfere com aquelas mediadas pela estimulação do receptor NK_3 . Os receptores NK_3 são abundantemente expressos no sistema nervoso central e na medula espinhal (Otsuka e Yoshioka, 1993). No sistema nervoso periférico as respostas funcionais deste receptor têm sido detectadas na musculatura circular e longitudinal do íleo e no cólon de cobaia. A estimulação desses receptores produz indiretamente contração e relaxamento no músculo liso por liberação de vários mediadores (Laufer et al., 1986; Maggi et al., 1993a, 1994) e diretamente contração no esôfago de rato (Stables et al., 1991), útero de rata (Barr et al., 1991), despolarização neuronal no gânglio cervical superior de cobaia (Seabrook et al., 1992) e gânglio taqueobronquial (Myers e Undem, 1993). A relevância desses resultados para explicar as ações medicinais das cascas da *Drymis winteri*

não está clara no momento, pois ainda permanece por ser melhor esclarecido a participação dos receptores NK₃ das taquicininas em processos fisiopatológicos (Otsuka e Yoshioka, 1993; Patacchini e Maggi, 1995)

Frações semipurificadas e compostos isolados da *Drymis winteri*

Com o objetivo de isolar e caracterizar o(s) composto(s) ativo(s) presente(s) no extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* foram inicialmente obtidas várias frações com o emprego de diferentes solventes orgânicos com distintos graus de polaridade. A primeira fração testada na traquéia de cobaia, foi a aquosa que causou deslocamento concentração dependente à direita da curva concentração resposta à bradicinina e a substância P, um efeito que foi de certa forma semelhante ao descrito para o extrato total desta planta. Quando testada nas traquéias de cobaias de animais previamente sensibilizados à ovalbumina e exposto ao antígeno, a fração aquosa nas mesmas concentrações antagonizou de maneira concentração e tempo dependentes a reação anafilática decorrente da interação do antígeno com o anticorpo. Tais resultados, indicam claramente a presença de princípio(s) ativo(s) nesta fração com ações semelhante(s) aquelas observadas no extrato total desta planta.

Ao contrário do que foi observado para a fração aquosa, a fração acetato de etila nas mesmas concentrações apresentou apenas discreto efeito inibitório sobre as respostas contráteis aos agonistas testados sem causar nenhuma inibição

sobre a ovalbumina nas traquéias de cobaias sensibilizadas ao antígeno. Dessa forma essa fração foi descartada nos futuros estudos.

A fração clorofórmica que extrai principalmente compostos de características mais apolares, nas mesmas concentrações, antagonizou de maneira semelhante a fração aquosa, as respostas contráteis causadas pela substância P e a bradicinina na traquéia de cobaia. Também similar a fração aquosa, a fração clorofórmica, causou inibição concentração e tempo dependentes da contração causada à ovalbumina nas traquéias de cobaias sensibilizadas ao antígeno. Tais resultados indicam que composto(s) apolares presentes na fração clorofórmica parece também contribuir para os efeitos observados para o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*.

O fracionamento das frações que mostraram atividade farmacológica “in vitro” permitiu isolar vários compostos, sendo que alguns deles já haviam sido descritos na literatura como por exemplo os flavonóides (astilbina e taxifolin), conhecidos por suas propriedades antialérgicas, antiinflamatórias (Middleton e Kandaswami, 1992), e hipotensor (Sawada et al., 1989; Wu et al., 1989). As atividades dos flavonóides são frequentemente associadas com seus efeitos sobre os radicais livres, especialmente ao ânion superóxido, que está relacionado com muitos estados patológicos, como a inflamação (Sies, 1987; Robak e Gryglewski, 1988; Jovanovic et al., 1994).

O flavonóide astilbina isolado da fração acetato de etila, em altas concentrações ($> 200 \mu\text{M}$) causou parcial inibição sobre a resposta contrátil à

bradicinina, mas não interferiu com a resposta à acetilcolina na traquéia de cobaia. No entanto, esse composto, nas mesmas concentrações, não inibiu significativamente a contração causada pela ovalbumina nas traquéias de cobaias ativamente sensibilizadas ao antígeno. Esses resultados sugerem portanto, que muito provavelmente a astilbina não contribui de maneira importante para as ações farmacológicas observadas para o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*. A astilbina foi anteriormente isolada das cascas da *Hymenaea martiana* (Leguminosae) (Carneiro, 1989), planta conhecida como jatobá e usada na medicina popular em algumas regiões do Brasil para o tratamento das doenças das vias aéreas, incluindo a bronquite e a asma (Morton, 1981)

Um outro composto isolado da fração acetato de etila obtida das cascas da *Drymis winteri* foi o flavonóide taxifolin (di-hidroquercitina) que quando analisado no íleo isolado de cobaia, em altas concentrações antagonizou através de mecanismo não competitivo a contração à acetilcolina e à histamina. No entanto, a exemplo do que foi observado para a astilbina, o taxifolin não foi capaz de inibir de maneira significativa a contração causada pela exposição de ovalbumina nas traquéias de cobaias sensibilizadas ao antígeno. Tais resultados, indicam que também o taxifolin não parece contribuir de maneira importante para os efeitos observados “in vitro” para o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*. No entanto, vários relatos descritos na literatura demonstraram que o taxifolin apresenta ações farmacológicas interessantes podendo ser mencionadas suas ações antinociceptivas, antiedematogênicas e antiinflamatórias

(Cechinel-Filho et al., 1995b; Kollir et al., 1996). Assim, estudos adicionais ainda são necessários para confirmar se o taxifolin realmente contribui ou não para os efeitos antinociceptivos, antiedematogênicos e antiinflamatórios observados para o extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*.

Uma série de compostos apolares provavelmente sesquiterpenos foram isolados da fração clorofórmica, confirmando assim trabalhos descritos na literatura (Wenkert e Strike, 1964; Appel, 1956; Sierra et al., 1985). O composto 3 (sesquiterpeno ainda não identificado) causou inibição concentração dependente, mas do tipo não competitivo sobre as respostas contráteis à bradicinina e para a substância P na traquéia de cobaia. Essas ações foram bastantes semelhantes às observadas para o extrato hidroalcoólico e para algumas frações obtidas desta planta. Além disso, o composto 3 causou discreta, porém significativa inibição da resposta contrátil à ovalbumina na traquéia de cobaia. A análise desses resultados indica que esse sesquiterpeno parece contribuir, pelo menos em parte, para os efeitos observados “in vitro” e “in vivo” para o extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri*.

Um segundo sesquiterpeno (ainda não identificado quimicamente) foi isolado da fração clorofórmica, denominado compostos 5. Quando testado no íleo de cobaia esse composto foi capaz de antagonizar as respostas contráteis à acetilcolina e bradicinina no íleo de cobaia e para a substância P na traquéia de cobaia. Infelizmente, os experimentos realizados com o composto 5 nas contrações induzidas pela ovalbumina ficaram inconclusivos, não permitindo até

o momento, avaliar o papel desse terpenóide na anafilaxia. De qualquer maneira, as ações farmacológicas observadas para o composto 5 sugerem que o mesmo deva desempenhar papel importante nas ações “in vitro” e talvez “in vivo” do extrato hidroalcoólico desta planta.

O terceiro sesquiterpeno (ainda não identificado quimicamente) foi o composto 9 também isolado da fração clorofórmica que causou significativa inibição da contração induzida pela acetilcolina e bradicinina no íleo isolado de cobaia, e pela bradicinina e substância P na traquéia de cobaia. Estes resultados demonstram que este composto parece interferir com os receptores muscarínicos no íleo de cobaia, e também sugerem ser esse composto um dos responsáveis pelas ações antiinflamatórias e antinociceptiva presentes nas cascas da *Drymis winteri*.

Um quarto sesquiterpeno isolado e identificado quimicamente como sendo o poligodial foi isolado da fração clorofórmica. Este composto é reconhecido como sendo o mais importante sesquiterpeno isolado desta planta e apresenta atividade inseticida (Sierra et al., 1985). Estudos descritos na literatura indicam que o poligodial é um composto ativo que tem a ação de inibir o desenvolvimento de larvas de *Gusanos cogolleros spodoptera littoralis* e *S. exempta* (lepidoptera) (Kubo et al., 1976). Considerando que o poligodiol é o terpenóide majoritário existente nesta fração, foi possível explorar em mais detalhes suas ações farmacológicas na musculatura lisa vascular e não vascular “in vitro”, e assim comparar seus efeitos com os observados para o extrato hidroalcoólico desta

planta. O poligodial em concentrações variando entre 5 a 20 μM causou inibição concentração dependente sobre as respostas à bradicinina, substância P e para o agonista seletivo do receptor NK_2 , a $[\beta\text{-Ala}^8]$ neurocinina A (4-10) na traquéia de cobaia. Da mesma forma que foi observado para o extrato hidroalcoólico desta planta, o poligodial, mesmo em concentrações muito elevadas (342 μM), não interferiu com a resposta contrátil ao agonista seletivo do receptor NK_1 , a substância P- metil éster na traquéia de cobaia. No entanto, como observado para o extrato hidroalcoólico, o poligodial nas mesmas concentrações, antagonizou as respostas contráteis para o composto 48/80 e para o análogo estável do tromboxano A_2 , o U 46619 na traquéia de cobaia. Em ambos os casos, ao contrário do que foi observado para o extrato hidroalcoólico, ocorreu redução significativa da resposta máxima para esses agonistas. Além disso, concentrações entre 17 a 128 μM desse composto foram capazes de antagonizar as contrações à acetilcolina e histamina no íleo de cobaia. Porém, o poligodial em concentrações menores (5 a 20 μM) antagonizou a resposta contrátil à bradicinina nesta preparação.

Outro resultado interessante foi a inibição concentração tempo dependente causada pelo poligodial sobre a resposta contrátil à ovalbumina nas traquéia de cobaias obtidas de animais sensibilizados ativamente ao antígeno. Também relevantes foram as ações inibitórias do poligodial sobre a contração à bradicinina, substância P e para o U 46619 na veia porta de rato, confirmando

assim os resultados obtidos para esses mesmos agonistas na traquéia de cobaia. Além disso, o poligodial em concentrações mais elevadas, foi capaz de inibir a contração à endotelina 1 nesta preparação. Mais importante, em concentrações muito baixas (0.4 μM), o poligodial inibiu aproximadamente 50% da resposta contrátil ao agonista seletivo do receptor NK_3 , o senktide na veia porta de rato.

Esses resultados analisados em conjunto indicam que o poligodial parece ser o principal composto ativo presente nas cascas da *Drymis winteri*. Suas ações farmacológicas, como descrito para o extrato hidroalcoólico desta planta, estão relacionadas principalmente com a interferência com os neuropeptídeos pro-inflamatórios incluindo entre eles a bradicinina e a substância P, esse último efeito decorrente de uma ação bastante seletiva sobre os receptores NK_2 e NK_3 para as taquicinininas. Além disso, o poligodial mostrou ser eficaz em antagonizar as respostas ao U 46619 e ao composto 48/80, bem como a contração à ovalbumina em animais sensibilizados, mas foi apenas parcialmente ativo contra a histamina e acetilcolina. Assim, esses resultados sugerem fortemente que o poligodial apresenta um importante perfil de ação farmacológica “in vitro” e, conseqüentemente, revela ser uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas drogas potencialmente uteis para o tratamento da alergia, asma, processos inflamatórios e/ou como analgésico. Contudo, estudos farmacológicos “in vivo” e “in vitro” e bioquímicos são ainda necessários para a melhor caracterização de seu perfil de ação farmacológica, bem como para esclarecer seu mecanismo de ação em nível celular.

Além desses terpenóides já descritos, a fração clorofórmica das cascas da *Drymis winteri* também revelou mais um sesquiterpeno caracterizado como sendo o 1-β-[p-metóxi-coumaroiloxil] poligodial. Embora ligeiramente menos potente que o poligodial, esse composto inibiu com as mesmas características do poligodial as respostas contráteis à bradicinina e à substância P na traquéia de cobaia e também parcialmente, mas

sign*****

*****lanta não pode ser descartada, mas essa hipótese precisa ser melhor investigada em estudos futuros. Porém, outros compostos existentes nesta planta e ainda não identificados podem também estar contribuindo para as ações do extrato hidroalcoólico.

Concluindo, os resultados do presente estudo e aqueles obtidos anteriormente em nosso laboratório nos estudos “in vivo” sugerem fortemente a existência de princípios ativos nas cascas da *Drymis winteri* que justificam seu uso medicinal no tratamento das doenças das vias aéreas, particularmente na asma brônquica e na alergia, bem como nos processos inflamatórios e no controle

da dor. Vários princípios ativos presentes nesta planta parecem contribuir para esses efeitos farmacológicos, mas uma mistura de sesquiterpenos, onde o poligodial é o composto majoritário, parecendo ser o principal responsável pelos efeitos observados. O mecanismo de ação desses compostos não está ainda completamente esclarecido, mas os resultados até aqui obtidos sugerem sua interação com a ação dos neuropeptídeos, incluindo a bradicinina, e a substância P (via ativação NK₂ e NK₃), além de inibição das ações mediadas pelo tromboxano A₂ e também de uma possível ação inibitória sobre a liberação de histamina.

RESUMO E CONCLUSÕES

1. No presente estudo foram analisados alguns dos mecanismos envolvidos nas ações do extrato hidroalcoólico e de alguns dos constituintes químicos isolados das cascas da *Drymis winteri* (Winteraceae) na musculatura hsa vascular e não vascular.

2. O extrato hidroalcoólico da *Drymis winteri* causou antagonismo do tipo não competitivo no íleo isolado de cobaia para as curvas concentração respostas induzidas pela acetilcolina, histamina e bradicinina. Esse mesmo perfil de ação também foi observado no útero isolado de rata para a acetilcolina, bradicinina, prostaglandina $F_{2\alpha}$, endotelina - 1 e angiotensina II, além de ter causado deslocamento à direita da resposta contrátil ao $CaCl_2$. Por outro lado na bexiga isolada de cobaia, o extrato hidroalcoólico não interferiu com a resposta contrátil induzida pelo carbacol, porém causou deslocamento parcial da curva concentração-resposta induzida à histamina, mas inibiu significativamente a resposta contrátil à bradicinina e a substância P. Já na traquéia isolada de cobaia o extrato inibiu de forma significativa a resposta contrátil induzida pela bradicinina e a prostaglandina E_2 . Porém, o extrato hidroalcoólico antagonizou de maneira aparentemente competitiva a resposta contrátil induzida pelo análogo do tromboxano A_2 o U 46619, composto 48/80, substância P e o agonista seletivo do tipo NK_2 , o $[\beta\text{-ala}^8]$ neurocinina A-(4-10). No entanto, o extrato

hidroalcoólico não interferiu com a contração induzida pelo agonista seletivo do tipo NK_1 , a substância P - metil ester, porém causou inibição parcial à capsaicina. Ainda na traquéia de cobaia, o extrato hidroalcoólico causou deslocamento parcial à direita para a histamina, sem afetar contudo a contração induzida pela acetilcolina. Por outro lado, na traquéia de animais sensibilizados à ovalbumina o extrato hidroalcoólico causou significativa inibição de forma concentração e tempo dependente da resposta contrátil induzida pelo antígeno. Quando o extrato hidroalcoólico foi testado na veia porta isolada de rato, observou-se inibição significativa da resposta contrátil induzida pelo agonista seletivo do receptor NK_3 , o senktide.

3. A fração aquosa obtida das cascas da *Drymis winteri* quando testada na traquéia de cobaia, causou inibição parcial da resposta contrátil induzida pela bradicinina, porém antagonizou de maneira aparentemente competitiva a resposta contrátil à substância P. Na traquéia de animais sensibilizados à ovalbumina a fração aquosa causou inibição concentração e tempo-dependentes da resposta à ovalbumina. Já a fração acetato de etila causou pequeno deslocamento à direita da curva concentração-resposta à histamina e à acetilcolina na traquéia de cobaia, porém, inibiu de maneira concentração dependente a contração induzida pela bradicinina nesta preparação. Por outro lado, na traquéia de animais sensibilizados à ovalbumina essa fração não foi capaz de inibir de forma significativa a resposta contrátil ao antígeno. Outra fração também analisada na

traquéia de cobaia, foi a clorofórmica que não interferiu de modo significativo com a curva concentração induzida à histamina, mas inibiu de forma significativa a resposta contrátil à bradicinina, porém, causou pequena inibição da curva concentração-resposta à substância P. Quando a fração clorofórmica foi testada em traquéia de cobaia ativamente sensibilizada à ovalbumina, observou-se inibição significativa e concentração-dependente da contração induzida pelo antígeno.

4. O composto astilbina isolado das cascas da *Drymis winteri*, quando testado na traquéia de cobaia não interferiu com a curva concentração-resposta à acetilcolina. No entanto, causou inibição significativa da resposta contrátil à bradicinina. Porém na traquéia de cobaia previamente sensibilizada à ovalbumina, esse composto não interferiu com a resposta contrátil ao antígeno. Já o composto taxifolin isolado das cascas da *Drymis winteri* causou inibição concentração-dependente sobre a contração à acetilcolina, mas inibiu parcialmente a curva concentração-resposta induzida à histamina no íleo isolado de cobaia. Porém, o composto taxifolin não causou inibição significativamente da resposta contrátil ao antígeno.

5. Três compostos sesquiterpenos ainda não identificados isolados da *Drymis winteri* foram testados, sendo o primeiro denominado de composto 3 que causou inibição de maneira concentração-dependente da contração à bradicinina, mas

em relação à substância P causou pequena inibição da resposta contrátil. Porém na traquéia de animais sensibilizados à ovalbumina esse composto causou inibição parcial da contração induzida pelo antígeno. O outro composto denominado composto 5, antagonizou de maneira não competitiva a resposta contrátil à acetilcolina, e inibiu a curva concentração-resposta à bradicinina no íleo isolado de cobaia. Porém, na traquéia de cobaia o composto 5 inibiu de maneira significativa a resposta contrátil à substância P. O terceiro composto denominado de composto 9, causou deslocamento à direita associado com inibição da resposta contrátil à acetilcolina e à bradicinina no íleo isolado de cobaia. Por outro lado, na traquéia de cobaia esse composto inibiu de forma significativa a resposta contráteis á bradicinina, e causou pequena inibição da resposta à substância P.

6. O composto caracterizado como sendo o 1- β -[p-metoxi-coumaroilixi] poligodial, inibiu significativamente e de forma concentração dependente a resposta contrátil à bradicinina, porém não interferiu com a resposta contrátil à substância P na traquéia de cobaia. Já na preparação obtida de animais previamente sensibilizados á ovalbumina, o composto 1- β -[p-metoxi-coumaroilixi] poligodial causou inibição contração e tempo-dependente da resposta contrátil induzida pelo antígeno.

7. O composto sesquiterpeno identificado como sendo o poligodial quando testado no íleo isolado de cobaia causou deslocamento à direita da curva concentração-resposta à acetilcolina, histamina e bradicinina, associado com inibição da resposta máxima. Já na traquéia de cobaia, o poligodial causou inibição parcial da resposta contrátil à histamina, mas inibiu a curva concentração-resposta à bradicinina. Por outro lado, o poligodial inibiu de forma significativa e concentração dependente a resposta induzida pelo composto 48/80 e pelo análogo estável do tromboxano A_2 o U 46619. Porém, o composto poligodial antagonizou de maneira aparentemente competitiva à resposta contrátil à substância P, mas não interferiu com a resposta contrátil do agonista seletivo do receptor NK_1 a substância P metil-éster, mas inibiu significativamente a curva concentração-resposta induzida pelo agonista seletivo do receptor NK_2 o $[\beta\text{-ala}^8]$ neurocinina A (4-10). Já na traquéia de animais ativamente sensibilizados ao antígeno o composto poligodial causou inibição significativa da resposta contrátil à ovalbumina. O composto poligodial também foi testado na veia porta isolada de rato e causou significativa inibição da curva concentração-resposta induzida pela bradicinina, U 46619, endotelina - 1, substância P e ao senktide.

8. Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo demonstram que o extrato hidroalcoólico obtido das cascas da *Drymis winteri* apresenta um perfil de ação farmacológica que ainda não está totalmente esclarecida, mas permitem sugerir que esses efeitos podem estar relacionados com a ação dos princípio(s)

ativo(s) desta planta em vários sítios, incluindo entre outros, uma interação com os receptores e/ou transdução de sinal das respostas para as taquicininas, cininas, derivados do ácido araquidônico, especialmente o tromboxano A₂. Além disso, o mecanismo de ação dos compostos isolados dessa planta também não está ainda esclarecido, mas os resultados sugerem uma interação desses compostos com a ação dos neuropeptídeos, incluindo a bradicinina e a substância P (via ativação NK₂ e NK₃), além de inibição das ações do tromboxano A₂.

Analisados em conjunto, esses resultados podem contribuir, pelo menos em parte, para explicar as ações antiinflamatórias, antinociceptivas e antialérgicas demonstradas em estudos anteriores para o extrato desta planta. Finalmente, o diterpeno poligodial parece ser o principal composto ativo presente nas cascas da *Drymis winteri*.

Parte desses resultados foram aceitos para publicação no General Pharmacology.

8. ABSTRACT

1. In this study we analyzed some mechanisms involved in the actions of hydroalcoholic extract (HE) and chemical constituents isolated from barks of *Drymis winteri* (Winteraceae) in vascular and non-vascular smooth muscles.

2. The HE of *Drymis Winteri* caused noncompetitive antagonism in guinea-pig isolated ileum concentration-response curves, induced by acetylcholine, histamine and bradykinin. This profile was the same as that observed in rat isolated uterus for acetylcholine and bradykinin, prostaglandin $F_{2\alpha}$, endothelin-1 and angiotensin II. However, the HE caused displacement to the right of the contractile response to $CaCl_2$. On the other hand, in guinea-pig isolated urinary bladder, this extract did not interfere with the contractile response induced by charbacol; but caused partial displacement of the concentration-response curve for histamine, and significantly inhibited the contraction elicited response to bradykinin and substance P. In the guinea-pig isolated trachea, the HE significantly inhibited the contractile response induced by bradykinin and prostaglandin E_2 . Nevertheless, the HE antagonized, in an apparently competitive manner, the contractile response induced by the analogue of thromboxane A_2 (U 46619), compound 48/80, substance P and the selective

agonist NK₂, [β -ala⁸]neurokinin A (4-10). However, the HE did not interfere with the contraction induced by substance P methyl ester, an NK₁ selective agonist, but caused partial inhibition to capsaicin. In guinea-pig trachea, the HE caused partial displacement to the right for histamine, without affecting the contraction induced by acetylcholine. Otherwise, in trachea from animals previously sensitized to ovalbumin, the HE caused significant inhibition in a time and concentration-dependent manner, of the contractile response induced by antigen. When the HE was tested in rat portal vein it caused a significant inhibition of the contractile response induced by the selective agonist of NK₃ receptor senktide.

3. The aqueous fraction obtained from barks of *Drymis winteri*, when tested in guinea pig trachea, caused partial inhibition of contractile response induced by bradykinin, despite antagonizing, in an apparently competitive manner, the contractile response to substance P. In the trachea from animals that had been previously sensitized to ovalbumin, the aqueous fraction caused partial and time-dependent inhibition to ovalbumin. The ethyl acetate fraction caused a slight displacement to right of the concentration response curve induced by histamine and acetylcholine in the guinea-pig isolated trachea, but inhibited in a concentration-dependent manner, the contraction induced by bradykinin. In the

trachea from animals sensitized to ovalbumin, the aqueous fraction was not able to inhibit, in a significant fashion, the contractile response to antigen. In guinea pig trachea, the chloroformic fraction did not interfere, in a significant manner, with the concentration response curve induced by histamine, but inhibited, in a significant manner, the contractile response to bradykinin, and also caused a slight inhibition of the concentration-response curve for substance P. When the chloroformic fraction was tested in guinea pig trachea actively sensitized to ovalbumin, a significant and concentration-dependent inhibition of the contraction induced by antigen was observed.

4. The compound astilbin, isolated from *Drymis winteri*, when tested in guinea pig trachea did not interfere with the contraction induced by acetylcholine. However, it was able to induce significant inhibition of contractile response to bradykinin. In guinea pig trachea previously sensitized to ovalbumin, this compound did not induce significant inhibition of contractile response to antigen. The compound taxifolin caused concentration-dependent inhibition of contraction induced by acetylcholine, but only partially inhibited the concentration-response curve induced by histamine in guinea pig isolated ileum. However, this compound did not cause significant inhibition in the contractile response to antigen.

5. Three sesquiterpene compounds isolated from *Drymis winteri* not yet identified were studied. The first, named compound 3, caused inhibition in a concentration-dependent manner of contraction induced by bradykinin, but in regard to substance P, it caused only a slight inhibition in its contractile response. In the trachea from animals sensitized to ovalbumin, compound 3 caused partial inhibition of contraction induced by the antigen. The other compound, identified as compound 5, antagonized in a noncompetitive manner, the contractile response to acetylcholine and inhibited the concentration-response curve to bradykinin in the guinea-pig isolated ileum. On the other hand, in the guinea-pig trachea, this compound inhibited, in a significant manner, the contractile response to substance P. The third compound, named compound 9, caused a marked displacement to the right associated with inhibition of contractile response to acetylcholine and bradykinin in guinea-pig isolated ileum. In the guinea-pig trachea, compound 9 inhibited, in a significant manner the contractile responses to bradykinin, but caused only a slight inhibition in substance P induced contraction.

6. The compound characterized as being 1- β -[p-metoxi-coumaroilixi]pohgoidal inhibited, in a significant and concentration-dependent manner, the contractile

response to bradykinin. However, it did not interfere with the contractile response to substance P in the guinea pig trachea. In preparations obtained from animals previously sensitized to ovalbumin this compound caused contraction and time-dependent inhibition of contractile response induced by antigen.

7. The sesquiterpene compound identified as poligoidal, when tested in the guinea-pig isolated ileum, caused a displacement to right in the concentration-response curve to acetylcholine, histamine and bradykinin, associated with inhibition of maximal response. In the guinea pig trachea, the poligoidal caused partial inhibition of contractile response induced by histamine and inhibition of the concentration-response curve to bradykinin. On the other hand, the poligoidal inhibited, in a significant and concentration-dependent manner, the response induced by the compound 48/80 and by the stable analogue of tromboxane A_2 , U 46619. The poligoidal compound antagonized, in a competitive manner, the contractile response to substance P, but did not interfere with the contractile response by the substance P methyl ester, an NK_1 selective agonist, but significantly inhibited the concentration-response curve induced by $[\beta\text{-ala}^8]$ neurokinin A (4-10), a selective agonist of the NK_2 receptor. In the trachea obtained from animals actively sensitized to antigen, the

compound caused significant inhibition of ovalbumin induced contraction. When tested in rat portal vein, the poligodial caused significant inhibition to the concentration-response curve induced by bradykinin, U 46619, endothelin-1, substance P and senktide.

8. In conclusion, these results demonstrate that the hydroalcoholic extract obtained from barks of *Drymis winteri* show an interesting pharmacological profile and suggest that these effects can be related to the actions of active principles of this plant at several sites, including interaction with receptors and/or signal transduction in responses to tachykinins, kinins, and thromboxane A_2 . In addition, although the precise mechanism of action of the compounds obtained from this plant is not clear, the interaction of these compounds with the action of neuropeptides, including bradykinin and substance P (via NK_2 and NK_3 receptor), and inhibition of thromboxane A_2 actions, seems to be an important target for future investigation. Taken together, these results can contribute, at least in part, to the explanation of the antiinflammatory, antinociceptive and antiallergic actions demonstrated in previous studies for the HE of this plant. Further, the diterpene poligodial seems to be the main active compound present in the barks of *Drymis winteri*.

REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

- ABELLI, L.; SOMMA, V.; MAGGI, C. A.; REGOLI, D.; ASTOLFI, M.; PARLANI, M.; ROVERO, P.; CONTE, B.; MELI, A. Effects of tachykinins and selective tachykinin receptor agonists on vascular permeability in the rat lower urinary tract: evidence for the involvement of NK-1 receptors. *J. Auton. Pharmacol.* 9: 253-263, 1989.
- ADAMS, G. K.; LICHTENSTEIN, L. In vitro studies of antigen-induced bronchospasm: response of sensitized guinea-pig and human airways to antigen. *J. Immun.* 122: 555-562, 1979.
- AIKAWA, T.; SEKIZAWA, K.; ITABASHI, S.; SASAKI, A.; TAKISHIMA, T. Inhibitory actions of prostaglandin E₁ on non-adrenergic, non-cholinergic contractions in guinea-pig bronchi. *Br. J. Pharmacol.* 101: 13-14, 1990.
- ANDERSSON, P.; BERGSTRAND, H. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pig: effect of long-term treatment with sodium cromoglycate and aminophylline. *Br. J. Pharmacol.* 74: 601, 1981.
- APPEL, H. Estudios sobre la estructura del drimenol. *Scientia.* 23: 19-21, 1956.
- APPEL, H.; BROOKS, C. J. W.; OVERTON, K. H. The constitution and stereochemistry of drimenol, a novel bicyclic sesquiterpenoid. *J. Chem. Soc.* 673: 3322-3332, 1959.

- APPEL, H.; DOHR, R. Terpenos del canelo chileno III. *Scientia*. 25: 135-142, 1958.
- ARMOUR, C. L.; BLACK, J. L.; JOHNSON, P. R. A. A role for inflammatory mediators in airway hyperresponsiveness, in: *Mechanisms in asthma, Pharmacology, Physiology and Management*, eds. C.L. Armour and J.L. Black (Alan R. Liss Inc., New York) p. 99, 1988a.
- ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 14: 48-58, 1959.
- BAI, T. R.; ZHOU, D.; WEIR, T.; WALKER, B.; HEGELE, R.; HAYASHI, S.; MCKAY, K.; BONDY, G.P.; FONG, T. Substance P (NK1) and neurokinin A (NK2) receptor gene expression in inflammatory airway diseases. *Am. J. Physiol.* 269: 309-317, 1995.
- BALANDRIN, M. F.; KLOCKE, J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 228: 1541-1560, 1985.
- BANNER, K. H.; PAGE, C. P. Immunomodulatory actions of xanthines and isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* 50: 286-292, 1995.
- BARANUIK, J.N.; KALINER, M.A. Neuropeptides and nasal secretion. *J.Allergy Clin. Immunol.* 86: 620-627, 1990.
- BARNES, P. J. Bradykinin and asthma. *Thorax*. 47: 979, 1992a.

- BARNES, P. J. Control of airway caliber. In "Update: Pulmonary diseases and Disorders" (A. P. Fishman, ed.). McGraw-Hill, New York, 1992b.
- BARNES, P. J.; BARANIUK, J. N.; BELVISI, M. G. Neuropeptide in the respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 1187-1198, 1991.
- BARNES, P. J.; LIEW, F.Y. Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunol - Today.* 16: 128-130, 1995.
- BARR, A. J.; WATSON, S. P.; LOPEZ BERNAL, A.; NIMMO, A. J. The presence of NK-3 tachykinin receptors on rat uterus. *Eur. J. Pharmacol.* 203: 287-290, 1991.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.*, 277: 302-312, 1988.
- BATTISTINI, B.; BOTTING, R.; BAKHLE, Y.S. COX-1 and COX-2: toward the development of more selective NSAIDS. *Drug. News Perspect.* 7: 501-512, 1994.
- BELVISI, M. G.; STRETTON, D.; BARNES, J. P. Nitric oxide as an endogenous modulator of cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. *Eur. J. Pharmacol.* 198: 219-221, 1991.
- BERTRAND, C.; GEPPETTI, P. Tachykinin and kinin receptor antagonists: therapeutic perspectives in allergic airway disease. *TiPS.* 17: 255-259, 1996.

- BEVAN, M. A. In *Pharmacology of Histamine Receptors* (Ganelin, C.R., Parsons, M.E., Eds) pp. 103-145, Wright, Bristol, 1982.
- BEVAN, S. SZOLCSANYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trend Pharmacol. Sci.* 11: 330-333, 1990.
- BEVAN, S.; HOTH, S.; HUGHES, G.; JAMES, I. F.; RANG, H.P.; SHAH, K.; WALPOLE, C. S. J.; YEATS, J. C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107: 544-552, 1992.
- BHAT, M. B.; MISHRA, S.K.; RAVIPRAKASH, V. Differential susceptibility of cholinergic and noncholinergic neurogenic responses to calcium channel blockers and low Ca^{++} medium in rat urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 96:837-842, 1989.
- BLACK, J. L.; ARMOUR, C. L.; VINCENT, K. S.; JOHNSON, P. R. A. A comparison of the contractile activity of PGD_2 and $PGF_{2\alpha}$ on human isolated bronchus. *Prostaglandins.* 32: 25, 1986.
- BORRIS, R. P. Natural products research: Perspective from a major pharmaceutical company. *J.Ethnopharmacol.* 51: 29-38, 1996.
- BREVOORT, P. Botanical (herbal) medicine in the united states. *Pharmaceutical News.* 3: 26-28, 1996.
- BROWN, G. D. D rimendiol, a sesquiterpene from *Drymis winteri*. *Phytochemistry.* 35: 975-977, 1994.

- BURKA, J. F.; PATERSON, N. A. M. The effects of SRS-A and histamine antagonists on antigen-induced contraction of guinea-pig trachea. *Europ. J. Pharmacol.* 70: 489-499, 1981.
- BURKA, J.F.; ALI, M.; McDONALD, W. D; PATERSON, N. A. M. Immunological and nonimmunological synthesis and release of prostaglandins and thromboxanes from isolated guinea-pig trachea. *Prostaglandins.* 22: 683-691, 1981.
- CALIXTO, J. B. Multiple mechanisms of bradykinin-induced contraction in rat and guinea pig smooth muscles in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 281: 279-288, 1995.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A; NETO, A.S.O.; VALE, R.M.R.; RAE, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 17: 313, 1984.
- CAPRIOLI, V.; CIMINO, G.; COLLE, R.; GAVAGNIN, M.; SODANO, G.; SPINELLA, A. Insect antifeedant activity and hot taste for humans of selected natural and synthetic 1,4-dialdehydes. *J. Nat. Prod.* 50: 146-151, 1987.
- CARNEIRO, E. Identificação de glicosídeos na Hymineae martiana. estruturas e atividades farmacológicas. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, 211p., 1989.

CECHINEL FILHO, V. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais correlação estrutura química - atividade biológica. Tese de doutorado, UFSC, Florianópolis, 1995a.

CECHINEL FILHO, V.; MIGUEL, O.G.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Antispasmodic activity of xanthoxylone derivatives: structure-activity relationships. *J. Pharmaceutical Sci.* 84: 473-475, 1995b.

CHADWICK, D. J.; MARSH, J. Bioactive compounds from plants, John Wiley, New York, 1990.

CHANG, M.T. Substance P - dopamine relationship in the substantia nigra: a light electron microscopic study of double immunocytochemical labeled materials. *Brain Res.*, 448: 391-396, 1988.

CHARENTE, L.; FOULON, D.; RODGER, I. W.; JONES, T.R. Neurokinin (NK2) receptors mediate nonadrenergic noncholinergic contractile responses to electrical stimulation and resiniferatoxin in guinea pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 182-188, 1993.

CHARENTE, L.; MISQUITTA, C.; GUAY, J.; RIENDEAU, D.; JONES, T.R. Involvement of cyclooxygenase 2 (COX2) in intrinsic tone of isolated pig trachea. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1561-1567, 1995.

CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Role of inflammatory mediators in asthma. *Brit. Med. Bull.* 48: 135-148, 1992.

COCKCROFT, D.W.; MURDOCK, K.Y. Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate, and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses, and increased bronchial responsiveness to histamine. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 79: 734-740, 1987.

COLEMAN, R. A.; HUMPHREY, P. P. A.; KENNEDY, I.; LEVY, G. P.; LUMLEY, P. Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.* 73: 773, 1981.

COLEMAN, R.A.; SMITH, W.L.; NARUMIYA, S. Classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* 46: 205-229, 1994.

CONTE, B.; CUTRUFO, C.; MANZINI, S. Electrocorticographic desynchronization after application of visceral and somatic noxious stimuli in urethane-anesthetized rats: effects of intrathecal administration of tachykinin (NK1 or NK2) receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276:212-218, 1996.

CORTÉS, M. M.; OYARZUN, M. L. Tadeonal and isotadeonal from *Drymis winteri*. *Fitoterapia.* 52: 33-35, 1981.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da agricultura - Instituto brasileiro de desenvolvimento florestal - Rio de Janeiro, 3 ed., vol.1, pg 438, 1984.

- CRAGG, G. M.; SCHEPARTZ, S. A.; SUFFENESS, M.; GREVER, M. R.
The taxol supply crises. New NCL policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. *J. Nat. Prod.* 56: 1657-1658, 1993.
- CRUZ, A.; SILVA, M. Further terpenoids and phenolics of *Drymis winteri*. *Phytochemistry*. 12: 2549-2550, 1973.
- DAHLEN, S. E.; HANSSON, G.; HEDQVIST, P.; BJÖRCK, T.; GRANSTRÖM, E.; DAHLEN, B. Allergen challenge of lung tissue from asthmatics elicits bronchial contraction that correlates with the release of leukotrienes C₄, D₄ and E₄. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* 80: 1712-1718, 1983.
- DANIELE, R. P.; BARNES, P. J.; GOETZL, E. J.; NADEL, J.; O'DORISIO, S.; KILEY, J.; JACOBS, T. Neuro-immune interactions in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145: 1230-1235, 1992.
- DEBIASI, S.; RUKSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7820-7824, 1988.
- DIAS, M. A.; CAMPOS, A. H.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig urinary bladder in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 47: 846-851, 1995.

- DIAS, M. A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B.
Efeito relaxante do extrato do *Phyllanthus urinaria* na veia porta isolada de rato. XI Reunião Anual da FESBE, Caxambu - MG., 21-24, agosto, 1996
- DION, S.; ROUISSI, N.; NANTEL, F.; DRAPEAU, G.; REGOLI, D.
NALINE, E.; ADVENIER, C. Receptor for neurokinins in human bronchus and urinary bladder are of the NK₂ type. *Eur. J. Pharmacol.*, 178, 215-219, 1990.
- DRAY, A. Tasting the inflammatory soup: role of peripheral neurones. *Pain Review*. 1: 153-171, 1994
- DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16: 99-104, 1993.
- EISENBERG, D. M. D. Unconvencional medicine in the United States. *New England J. Medicine*, June 1993.
- ELLIOT, R. A.; CASTLEDEN, C. M.; MIODRAG, A.; KIRWAN, P. The direct effects of diethylstilboesterol and nifedipine on the contractile responses of isolated human and rat detrusor muscles. *Eur. J. Pharmacol.* 43:149-155, 1992.
- ELLIS, J. L.; UNDEM, B. J. Inhibition by capsazepine and capsaicin-induced contractions of guinea-pig trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 85-89, 1994.

ELLIS, J.L.; UNDEN, B.J. Tachykinin receptor subtypes in human bronchi. *Am. Rev. Resp. Dis.* 145, A260, 1992.

EMONDS-ALT, E.; VILAIN, P.; GOULAOUIC, P.; PROIETTO, V.; VAN BROECK, D.; ADVENIER, C.; NALINE, E.; NELIAT, G.; LEFUR, G.; RELIERE, J.C. A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK₂) receptor. *Life Sci.* 50, 101-106, 1992.

FARMER, S. G.; BURCH, R. M. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 511, 1992.

FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. Higher plants. The sleeping giant of the drug development. *A. J. Pharm. Educ.* 148: 46-62, 1976.

FISHLEDER, R. I.; BUCKNER, C. K. Studies on the relationship between contraction and mediator release produced by ovalbumin in superfused trachea isolated from the actively sensitized guinea pig. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 230: 534-540, 1984.

FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 181: 339-345, 1972.

FORSTER, R. W.; RAMAGE, A. G. The action of some chemical irritants on somatosensory receptors of the cat. *Neuropharmacology.* 20, 191-198, 1981.

- FOULON, D. M.; CHAMPION, E.; MASSON, P.; RODGER, I. W.; JONES, T.R. NK₁ and NK₂ receptors mediate tachykinin and resiniferatoxin-induced bronchospasm in guinea-pigs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148: 915-921, 1993.
- FROSSARD, N.; ADVENIER, C. Tachykinin receptors and the airways. *Life Sci.* 49: 1941-1953, 1991.
- FROSSARD, N.; FAJAC, I. Airway neuropeptides - what is their role in physiopathology? *Allerg. Immunol.* 27: 74-79, 1995
- FULLER, R. W.; DIXON, C. M. S.; DOLLERY, C. T.; BARNES, P. J. Prostaglandin D₂ potentiates airway responsiveness to histamine and methacholine. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133:252, 1986.
- GARDINER, P. J.; COLLIER, H. O. J. Specific receptors for prostaglandins in airways. *Prostaglandins* 35: 959, 1988.
- GRUNWALD, J. The european phythomedicines market. *Herbal Gram.* 34 60-65, 1995.
- HÄBLER, H. J.; JAMG, W.; KOLTEZENBURG, M. Activation of unmyelinated afferent fibres by mechanical stimuli and inflammation of the urinary bladder in the cat. *J. Physiol.* 425: 545-562, 1990.
- HALL, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* 56: 131, 1992.

- HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B. Thromboxane: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72: 2994 - 2998, 1975.
- HAND, J. M., BUCKNER, C. K. Effects of selected antagonists on ovalbumin-induced contraction of tracheal strips from the actively sensitized guinea-pig. *Int. J. Immunopharmacol.* 1: 189-195, 1979.
- HARDY, C.C.; ROBINSON, C.; TATTERSFIELD, A. E.; HOLGATE, S. T. The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D₂ in normal and asthmatic men. *N. Engl. J. Med.* 311: 209, 1984.
- HELKE, C. J.; KRAUSE, J. E.; MANTYH, P. W. M; COUTURE, R.; BANNAN, M. J. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors and regulatory mechanisms. *FASEP J.* 4: 1606-1615, 1990.
- HERGENHAHN, H.; KUSUMOTO, S.; HECKER, E. Diterpene esters from "Euphorbium" and their irritant and cocarcinogenic activity. *Experientia* 30: 1438-1440, 1974.
- HIEN, T.T.; WHITE, N. J. Quinhaosu. *Lancet.* 341: 603-908, 1993.
- HILL, S. J. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev.* 42: 45-83, 1990.
- HOFFMAN, F.A.; ESKINAZI, D. NIH office of alternative medicine conference: federal agencies explore the potential role of botanicals in

U.S health care. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 1: 305-308, 1995.

HÖKFELT, T.; MILLHORN, D.; SEROOGY, K.; TSURUO, Y.; CECCATELLI, S.; LINDH, B.; MEISTER, B.; MELANER, T.; SCHALLING, M.; BARTFAI, T.; TERENUIS, L. Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia*. 43: 768-780, 1987.

HOPE, P. J.; JARROT, B.; SHAIBLE, H.G.; CLARKE, R.W.; DUGGAN, A.W. Release and spread of immunoreactive neurokinin A in the cat spinal cord in a model of acute arthritis. *Brain Res*. 533: 292-299, 1990.

HOWARTH, P. H. The airway inflammatory response in allergic asthma and its relationship to clinical disease. *Allergy*. 50: 13-21, 1995.

HUA, X. Y.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; BRADIN, E.; LUNDBERG, J.M.; HÖKFELT, T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Reg. Pept.* 13:1, 1985.

ITO, Y.; TAJIMA, K. Actions of indomethacin and prostaglandins on neuro-effector transmission in the dog trachea. *J. Physiol.* 319: 379-392, 1981.

JOOS, G. F.; GERMONPERÉ, P.R.; KIPS, J.C.; PELEMAN, R.A.; PAUWELS, R.A. Sensory neuropeptides and the human lower airways: Present state and future direction. *Eur. Respir. J.* 7: 1161-1171, 1994.

- JOOS, G. F.; KIPS, J. C.; PELEMAN, R. A.; PAUWELS, R. A. Tachykinin antagonists and the airways. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 329: 205-219, 1995.
- JOVANOVIC, S.V.; STEENKEN, S.; TOSIC, M.; MARJANOVIC, B.; SIMIC, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116: 4846-4851, 1994.
- KAGE, R.; MCGREGOR, G.P.; THIM, L.; CONLON, J.M. Neuropeptide g, a peptide isolated from rabbit intestine that is derived from g proprotachykin mRNA in the female rat brain. *J. Neurochem.* 50: 1412-1427, 1988.
- KANAGAWA, K.; MINAMINO, N.; FUKUDA, A.; MATSUDO, M. Neuromedin K: A novel mammalian tachykinin identified in porcine spinal cord. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 533-540, 1983.
- KAWIKOVA, I. H.; ARAKAWA, C. G.; LÖFDAHL, B. E.; SKOOGH, J. L. Bradykinin-induced airflow obstruction and airway plasma exudation: effects of drugs that inhibit acetylcholine, thromboxane A₂ or leukotrienes. *Br. J. Pharmacol.* 110: 657, 1993.
- KENAKIN, T. Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction. Raven Press, Ltd. (2 ed) New York, 1993.
- KIMURA, S.; OKADA, M.; SUGITA, Y.; KANAZAWA, I.; MUNEKATA, E. Novel neuropeptides, neurokinin a and b, isolated from porcine spinal cord. *Proc. Jpn. Acad. Series B.* 59: 101-104, 1983.

- KOLHIR, V.K.; BYKOV, V.A.; BAGINSKAJA, A.I.; SOKOLOV, S.Y.; GLAZOVA, N.G.; LESKOVA, T.E.; SAKOVICH, G.S. Antioxidant activity of a dihydroquercetin isolated from *Larix gmelinii* (rupr.) ruprud.wood. *Phytotherapy Research*. 10: 478-482, 1996.
- KUBO, I.; MIURA, I.; NAKANISHI, K. The structure of xylomollin, a secoiridoid hemiacetal acetal. *J. Am. Chem. Soc.* 98: 6704-6705, 1976.
- KUROSAWA, M. Role of thromboxane A₂ synthetase inhibitors in the treatment of patients with bronchial asthma. *Clin. Ther.* 17: 2-11, 1995.
- LAUFER, R.; GILON, C.; CHOREV, M.; SELINGER, Z. Characterization of a Neurokinin B receptor site in rat brain using a highly selective radioligand. *J. Biol. Chem.* 261: 10257-10263, 1986.
- LEADERS, F. Alternative medicine: the renewed interest in health care. *Pharmaceutical News*. 3: 19-22, 1996.
- LEAH, J.D.; CAMERON, A.A.; SNOW, P.J. Neuropeptides in physiologically identified mammalian sensory neurons. *Neurosc. Lett.* 56: 257-262, 1985.
- LI, C. G.; RAND, M. J. Evidence that participation of the NANC relaxant responses of guinea-pig trachea to electrical field stimulation is mediated by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 102: 91-94, 1991.
- LIU, L; SIMON, S.A. A rapid capsaicin-activated current in rat trigeminal ganglion neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 738-741, 1994.

- LOWE, V. C.; NORONHA-BLOB, L. Effect of extracellular Ca^{++} on cholinergic, KCl and phorbol ester-mediated phosphoinositide turnover and guinea-pig urinary bladder contraction. *Eur. J. Pharmacol.* 195:273-279, 1991.
- LUNDBERG, J. M.; BRODIN, E.; HUA, X. Y.; SARIA, A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* 120: 217-227, 1984a.
- LUNDBERG, J.M. Capsaicin-sensitive sensory nerves in the airways: implications for protective reflexes and disease. In J.N. Wood, editor. Capsaicin in the study of Pain. *Academic Press, London.* 220-237, 1993.
- LUNDBERG, J.M.; HOKFELT, T.; MARTLING, A.; CUELLO, C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res.* 235-251, 1984b.
- MAGGI, C. A.; ASTOLFI, M.; GIULIANI, S.; GOSO, C.; MANZINI, S.; MEINI, S.; PATACCHINI, R.; PAVONE, V.; PEDONE, C.; QUARTARA, L.; RENZETTI, A.; GIACHETTI, A. MEN 10627, a novel polycyclic peptide antagonist of tachykinin NK_2 receptors. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 271: 1489-1500, 1994.
- MAGGI, C. A.; GIULIANI, S.; PATACCHINI, R.; TURINI, D.; BARBANTI, G.; GIOCHETTI, A.; MELI, A. Multiple sources of calcium for contraction of the human urinary bladder muscle. *Br. J. Pharmacol.* 98:1021-1031, 1989.

MAGGI, C. A.; MELI, A. The role of neuropeptides in the regulation of the micturition reflex. *J. Auton. Pharmacol.* 6:133-162, 1986.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; MEINI, S.; GIULIANI, S. Nitric oxide is the mediator of tachykinin NK₃ receptor-induced relaxation in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmac.* 240: 45-50, 1993a.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; SANTICIOLI, P.; GIULIANI, S. Tachykinin antagonists and capsaicin-induced contraction of the rat isolated urinary bladder: evidence for tachykinin-mediated cotransmission. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1535-1541, 1991a.

MAGGI, C. A.; SANTIOLI, P.; ABELLI, L.; PARLANI, M.; CAPASSO, M.; CONTE, B.; GIULIANI, S.; MELI, A. Regional differences in the effects of capsaicin and tachykinins on motor activity and vascular permeability of the rat lower urinary tract. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 335: 636-645, 1987a.

MAGGI, C.A. The mammalian tachykinin receptors. *Gen. Pharmac.* 26: 911-944, 1995.

MAGGI, C.A.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P.; ABELLI, L.; GEPPETTI, P.; SOMMA, V.; RENZI, D.; MELI, A. Species-related variations in the effects of capsaicin on urinary bladder functions: relation to bladder content of substance P-like immunoreactivity. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. pharmacol.* 336, 546-555, 1987b.

MAGGI, C.A.; PATACHINI, R.; ROVAIS, P; GIANCHETTI, A. Review tachykinin receptors and tachykinin receptors antagonists. *J. Auton. Pharmacol.* 13: 23-93, 1993b.

MAGGI, C.A. The role of peptides in the regulation of the micturition reflex: an update. *Gen Pharmacol.* 22: 1-24, 1991b.

MAGGIO, J.E.; SANDBERG, B.E.B.; BRADLEY, C. V.; IVERSEN, L.L.; SANTIKAN, S. Substance K: A novel tackykinin in mammalian spinal cord. In: Skrabanek, P. (Ed.) *Substance P*. Dublin: Boole, p.p. 20-21, 1983.

MALING, H. M.; WEBSTER, M. E.; WILLIAMS, M. A.; SAUL, W.; ANDERSON, W. Inflammation induced by histamine, serotonin, bradykinin and compound 48/80 in the rat: antagonists and mechanisms of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 191: 300-310, 1974.

MANTYH, P. W. Substance P, and the inflammatory and immune response. *Ann. NY Acad. Sci.* 632: 263-271, 1991.

MAPP, C. E.; FABBRI, L. M.; BONIOTTI, A.; MAGGI, C. A. Prostacyclin activates tachykinin release from capsaicin-sensitive afferents in guinea-pig bronchi through a rutenium red-sensitive pathway. *Br. J. Pharmacol.* 104: 49-52, 1991.

MARCEAU, F.; BARABÉ, J.; ST PIERRE, S.; REGOLI, D. Kinin receptors in experimental inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 536-542, 1980.

- MASTRANGELO, D.; MATHISON, R.; HUGGEL, H. G.; DION, S.; D'ORLEANS-JUSTE P.; RHALEB, N. E.; DRAPEAU, G.; ROVERO, P.; REGOLI, D. The rat isolated portal vein: a preparation sensitive to neurokinins, particularly neurokinin B. *Eur. J. Pharmac.* 134: 321-326, 1986.
- MATHE, A. A.; HEDQVIST, P. Effects of prostaglandins $F_{2\alpha}$ and E_2 on airway conductance in healthy subjects and asthmatic patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 111: 313, 1975.
- MATTA, L.; SANTOS, A.R.S.; SCHELEMPER, V.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Efeito analgésico do extrato hidroalcoólico das cascas da *Drymis winteri*. XIII Simpósio de Plantas Mediciniais, Fortaleza - CE, 1994.
- McCALLION, R.F.; COLE, A. L.; WALKER, J.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H. Antibiotic substances from New Zealand plants. II. Polygodial, an anti-Candida agent from *Pseudowintera colorata*. *Planta Med.* 44: 134-138, 1982.
- MIDDLETON, E. Jr.; KANDASWAMI, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* 43: 1167-1179, 1992.
- MIGUEL, O.G. Identificação de compostos químicos de *Sebastiania schottiana*. Estrutura e atividade farmacológica. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, 1987

- MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P.; THIEMERMANN, C.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 11693-11697, 1994.
- MONCADA, S.; VANE, J.R. Prostacyclin, thromboxane and leukotrienes. Introduction to symposium. *Br. Med. Bull.* 39: 209, 1983.
- MORLEY, J. K⁺ channel openers and suppression of airway hyperreactivity. *Trends. Pharmacol. Sci.* 15: 463-468, 1995.
- MORTON, J. F. Atlas of medicinal plants in middle America-Bahamas to Yucatan. 1 st. ed., Springfield: Charles C. Thomas (ed), 457-463, 1981.
- MYERS, A. C.; UNDEM, B. J. Electrophysiological effects of tachykinins and capsaicin on guinea-pig bronchial parasympathetic ganglion neurones. *J. Physiol. Lond.* 470: 665-679, 1993.
- NALINE, E.; DEVILLIER, P.; DRAPEAU, G.; TOTY, L.; BAKDACH, H.; REGOLI, D.; ADVENIER, C. Characterization of neurokinin effects and receptor selectivity in human isolated bronchi. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 140, 679-686, 1989.
- NUMAO, T.; AGRAWAL, D. K. Neuropeptides modulate human eosinophil chemotaxis. *J. Immunol.* 149: 3309-3315, 1992.
- O'BYRNE, P. M. What is asthma? An update on the mechanisms. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 5: 6-11, 1995.

- OMINI, C.; BRUNELLI, G.; DAFFONCHIO, L.; MAPP, C.; FABBRI, L.; BERTI, F. Prostaglandin D₂ (PGD₂) potentiates cholinergic responsiveness in guinea-pig trachea. *J. Autonom. Pharmacol.* 6: 181, 1986.
- OTSUKA, M.; YOSHIOKA, K. Neurotransmitter function of mammalian tachykinin. *Physiol. Rev.* 73: 229-307, 1993.
- PATACCHINI, R.; MAGGI, C.A. Tachykinin receptors and receptor subtypes. Reprinted from *Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie.* 329: 161-183, 1995.
- PATON, W. D. M. Compound 48/80: A potent histamine liberator. *Br. J. Pharmacol.* 6: 499-508, 1951.
- PAYAN, D. The role of neuropeptides in inflammation. In: Gallin, J. E., Goldsteins, I. M., Snyderman, R. (Eds). *Inflammation: Basic Principle and Clinical Correlates.* New York: Raven Press, p.p. 177-192, 1992.
- PERLS, E. R. Sensitization of nociceptors and its relation to sensation. In: *Advances in Pain Research and Therapy* (Eds Bonica & D. Albe-Fessard), pp 17-28. Raven Press, New York, 1976.
- PERNOW, B. Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35: 85-141, 1986.
- PITCHARD, K.A.; O'BANION, M.K.; VLASIC, N.; BHATIA, U.G.; YOUNG, D.A.; STEMERMAN, M.B. Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 269: 8504-8509, 1994.

- PRETOLANI, M. ; LEFORT, J.; DUMAREY, C.; VARGAFTIG, B.B.
Role of lipoxygenase metabolites for the hyper-responsiveness to platelet-activating factor of lungs from actively sensitized guinea-pigs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248: 353-359, 1989.
- RAEBURN, D.; WEBBER, S. E. Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* 7: 2226-2233, 1994.
- RANG, H. P; BEVAN, S. J.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties In: Wall PD, MELZACK, R., Eds. Textbook of Pain. Edinburgh: Churchill Livingstone, 57-78, 1994.
- REGOLI, D.; NGUYEN, Q. T.; JUKIC, D. Minireview: Neurokinin receptor subtypes characterized by biological assays. *Life Sci.* 54: 2035-2047, 1994.
- RHODEN, K. J.; BARNES, P. J. Classification of tachykinin receptors on guinea-pig and human airway smooth muscle. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141, A276, 1990.
- RICHARDSON, J. B. Nerve supply to the lungs. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119: 785-802, 1979.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37: 837-841, 1988.
- SAAD, M.H.; WILSON, M. A.; BURKA, J. F. Release of leukotriene C₄ from guinea pig trachea. *Prostaglandins.* 25: 741-752, 1983.

- SAITO, M.; FUJIMURA, M.; SAKAMOTO, S.; MIYAKE, Y.; SHINTANI, H.; YASUI, M.; MATSUDA, T. Involvement of arachidonate cyclooxygenase products in bronchial hyperresponsiveness induced by subthreshold concentration of aerosolized thromboxane A₂ analogue in guinea-pigs. *Allergy* 47: 181-184, 1992.
- SAMUELSSON, G.; FARAH, M. H.; CLAESON, P.; HAGOS, M.; THULIN, M.; HEDBERG, O.; WARFA, A. M.; HASSAN, A. O.; ELMI, A. H.; ABDURAHMAN, A.D. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia. III. Plants of the families Lauraceae-Papilionaceae. *J. Ethnopharmacol.* 37: 93-112, 1992.
- SAWADA, A.; MATSUBARA, Y.; LIZUKA, Y.; OKAMOTO, K. Structures and hypotensive effect of flavonoid glycosides in Young Citrus Unshin peelings. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 38: 53-59, 1989.
- SCHAIBLE, H.G.; JARROTT, B.; HOPE, P.J.; DUGGAN, A. W. Release of immunoreactive substance P in the spinal cord during development of acute arthritis in the knee joint of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res.* 529: 214-223, 1990.
- SCHELEMPER, V. ; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the relaxant response of bradykinin in epithelium intact strips of the guinea-pig trachea. *Eur. J. Pharmacol.* 282: 177-184, 1995.
- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J. B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 111: 83-88, 1994.

- SCHLOSBERG, M.; LIU, M. C.; BOCHNER, B. S. Pathophysiology of asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 13: 721-743, 1993.
- SCHWARTZ, J. C.; ARRANG, J. M.; GARBARG, M.; POLLARD, H.; RUAT, M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol. Rev.* 71: 1-51, 1991.
- SEABROOK, G. R.; MAIN, M.; BOWERY, B.; WOOD, N.; HILL, R. G. Differences in neurokinin receptor pharmacology between rat and guinea-pig superior cervical ganglia. *Br. J. Pharmacol.* 105: 925-928, 1992.
- SHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; KITO, S.; SHIOTANI, Y.; TOHYAMA, M. Coexistence on substance P - and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. *Brain Res.*, 425: 256-262, 1987.
- SHIRAKAWA, J.; NAKANISHI, T; TANIYAMA, K.; KAMIDONO, S.; TANAKA, C. Regulation of the substance P-induced contraction via the release of acetylcholine and γ -aminobutyric acid in the guinea-pig urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 98 : 437-444, 1989.
- SIERRA, J.R.; LÓPEZ, J.T.; CÓRTEZ, M.J.(-)-3 β -ACETOXYDRIMENIN FROM THE LEAVES OF *Drymis winteri*. *Phytochemistry*. 25: 253-254, 1985.
- SIES, H. Oxidative stress. Academic Press, London, 1987.

- SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; Stehmann, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto alegre: ed. da UFRGS, 46-47, 1986.
- SMITT, C. H.; BARKER, J.N.W.N.; MORRIS, R.W.; McDONALD, D. M.; LEE, T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J.Immunol.* 155: 3274-3282, 1993.
- SOLWAY, J. , AND LEFF, A. R. Sensory neuropeptides and airway function. *J. Appl. Physiol.* 71:2077-2087, 1991.
- STABLES, J. M.; HAGAN, R. M.; IRELAND, S. J. Characterization of tachykinin receptors in the rat isolated oesophagus. *Reg. Peptides.* 35: 260, 1991.
- SVENSSON, J.; STRANBERG, K.; TUVEMO, T.; HAMBERG, M. Tromboxane A₂ : effects on airway and vascular smooth muscle. *Prostaglandins.* 14: 425-436, 1977.
- SWEATMAN, W. J. F.; COLLIER, H. O. J. Effects of prostaglandins on human bronchial muscle. *Nature* 217: 69, 1968.
- SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor type and species differences. *Gen. Pharmacol.* 25: 223-243, 1994.
- SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Resiniferatoxin and analogs provide novel insights into the pharmacology of the vanilloid (capsaicin) receptor. *Life Sci.* 47: 1399-1408, 1990.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Characterization of vanilloid receptor in the dorsal horn of pig spinal cord. *Brain Res.* 547: 335-338, 1991.

SZALLASI, A.; GOSO, C. Characterization by [³H] resiniferatoxin binding of a human vanilloid (capsaicin) receptor in post-mortem spinal cord. *Neurosc. Letters.* 165: 101-104, 1994.

SZALLASI, A.; GOSO, C.; BLUMBERG, P.M.; MANZINI, S. Competitive inhibition by capsazepine of [³H] resiniferatoxin binding to central (spinal cord, dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder, airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267:728-733, 1993.

SZOLCSANYI, J. Capsaicin, irritation, and desensitization: neuropharmacological basis and future perspectives. In: *Chem. Sens.* vol. 2 ed. Green. B. G. Mason, J. R. e Kare, M. R. pp. 141-168. New York marcel Dekker inc. 1990.

TATEMOTO, K.; LUNDBERG, J.M.; JORNVALL, M.; MUTT, V. Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 947-953, 1985.

THIEN, F. C. K. ; WALTERS, E. H. Eicosanoids and asthma: an update. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 52: 271-288, 1995.

TORRENS, Y.; BEAUJOUAN, J. C.; SAFFROY, M. ; GLOWINSKI, J. Involvement of septide-sensitive tachykinin receptors in inositol

phospholipid hydrolysis in the rat urinary bladder. *Peptides*. 16: 587-594, 1995.

TORRES, R.; PARDO, F.; VELASCO, M.V. Flavonoid from *Drymis winteri*. *Fitoterapia*. 58: 553-558, 1992.

TRATKS, K. S.; CAMPOS, M. M.; SCHLEMPER, V.; VAZ, Z. R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Resultados adicionais sobre as ações antiedematogênicas e antialérgicas do extrato das cascas da *Drymis winteri*. X Reunião Anual da FESBE, Serra Negra - SP, 23-26, agosto, 1995.

TREEDE, R.D.; MEYER, R.A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J.N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Progress in Neurobiol.* 38: 397-421, 1992.

TUCKER, J. F.; BRANE, S. R.; CHARALAMBONS, L.; HOBBS, A. J.; GIBSON, A. L-N^G -Nitro arginine inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of the guinea pig isolated tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 100: 663-664, 1990.

TURNER, D.M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: The glaxo experience. *J. Ethnopharmacol.* 51: 39-43, 1996.

UDDMAN, B. J.; SUNDLER, F. Sites and synthesis. Neuropeptides in the airway: A review. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: S3-S8, 1987.

VANE, J. R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; BISHOP-BAILEY, D.; CROSTALL, J. AND WILLOUGHBY, D.A.

Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2046-2050, 1994.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Comptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J. Ethnopharmacol.* 51: 239-254, 1996.

WALTERS, E. H. Effect of inhibition of prostaglandin synthesis on induced bronchial hyperresponsiveness. *Thorax.* 38: 195, 1983.

WENKERT, E.; STRIKE, D. P. Synthesis of some drimanic sesquiterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 2044-2049, 1964.

WOOD, J. N.; WINTER, J.; JAMES, I. F.; RANG, H. P.; YEATS, J.; BEVAN, S. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8: 3208-3220, 1988.

WU, E.S.; COLE, T.E.; DAVIDSON, T. A.; DAILEY, M. A.; DORING, K. G.; FEDORCHUK, M.; LOCH, J. T.; THOMAS, T. L.; BLOSSER, J. C.; BORELLI, A.R.; KINSOLVING, C. R.; PARKER, R. B.; STRAND, J. C.; WATKINS, B. E. Flavones 2. Synthesis and structure-activity relationships of flavodilol and its analogs, a novel class of antihypertensive agents with catecholamine depleting properties. *J. Med. Chem.* 32: 183-192, 1989.

YOSHIBA, M.; NISHI, K.; MACHIDA, J.; SAKIYAMA, H.; IKEDA, K.; UEDA, S. Effects of phorbol ester on lower urinary tract smooth muscle in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 222: 205-211, 1992.

WHO/TRM/91.4 Pautas para la evaluacion de medicamento herbarios, Programa de Medicina Tradicional Organizaciona Mundial de La Salud, genebra, 1991.

WHO regional office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluatiating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila: WHO, 1993.