



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**PAULA VIRGÍNIA MENDES MAIA**

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton sonderianus* Muell.  
Arg. SOBRE A CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO  
TRAQUEAL DE RATOS**

**FORTALEZA**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Paula Virgínia Mendes Maia

**Efeitos do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. sobre a  
contratilidade do músculo liso traqueal de ratos**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

Co-orientadora: Profa. Dra. Andreлина Noronha Coelho de Souza

Fortaleza  
2007

Universidade Estadual do Ceará  
Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas

Título: EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton sonderianus* Muell. Arg. SOBRE A  
CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS

Autora: Paula Virgínia Mendes Maia

Defesa em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Conceito obtido: \_\_\_\_\_

Nota obtida: \_\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso**  
**Universidade Estadual do Ceará – UECE**

---

**Prof. Dra. Selene Maia de Moraes**  
**Universidade Estadual do Ceará – UECE**

---

**Prof. Dra. Vânia Marilande Ceccato**  
**Universidade Estadual do Ceará – UECE**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, meu orientador, pela orientação sábia e por tornar possível a realização desta pesquisa.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza, pela disponibilidade com que sempre me recebeu e pelos ensinamentos.

A todos os professores do mestrado, pelos conhecimentos repassados que tanto contribuíram para minha formação.

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes e seus orientandos do Laboratório de Química e Produtos Naturais da UECE pelo auxílio durante a fase de extração e análise dos óleos essenciais.

Aos professores: Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, Dra. Vânia Marilande Ceccato e Dra. Sandra Maria Dias por participarem do meu exame de qualificação e por suas críticas e sugestões que me levaram a melhorar a escrita deste trabalho.

Ao Prof. Ms. Gerson Luis Mareghello de Abreu, pela inestimável ajuda na fase de análise histológica da preparação.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Socorro Quintino e Walber Ferreira pelo companheirismo ao longo desta caminhada.

Aos colegas Kalina Kelma, Kátia Virgínia, João Luís, Diênifer Neves, Felipe Crescêncio e Mirizana Alves pela acolhida e auxílio no momento em que precisei aprender as técnicas necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

A Leidiane Pinho da Silva e Taylena Maria do Nascimento Garcia, alunas bolsistas, cuja ajuda na realização dos experimentos foi de fundamental importância para o bom andamento da pesquisa.

Ao Pedro Militão pelo auxílio que sempre prestou a todos do Laboratório de Eletrofisiologia.

Ao Franck pelos cuidados dispensados aos animais do biotério.

A Carlos Henrique Lopes Pinheiro, meu esposo, pela cumplicidade e incentivo, por sempre compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades.

À minha família, em especial meus pais, Paulo de Társo Maia Pereira e Maria Valquíria Mendes Maia, pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Estadual do Ceará pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

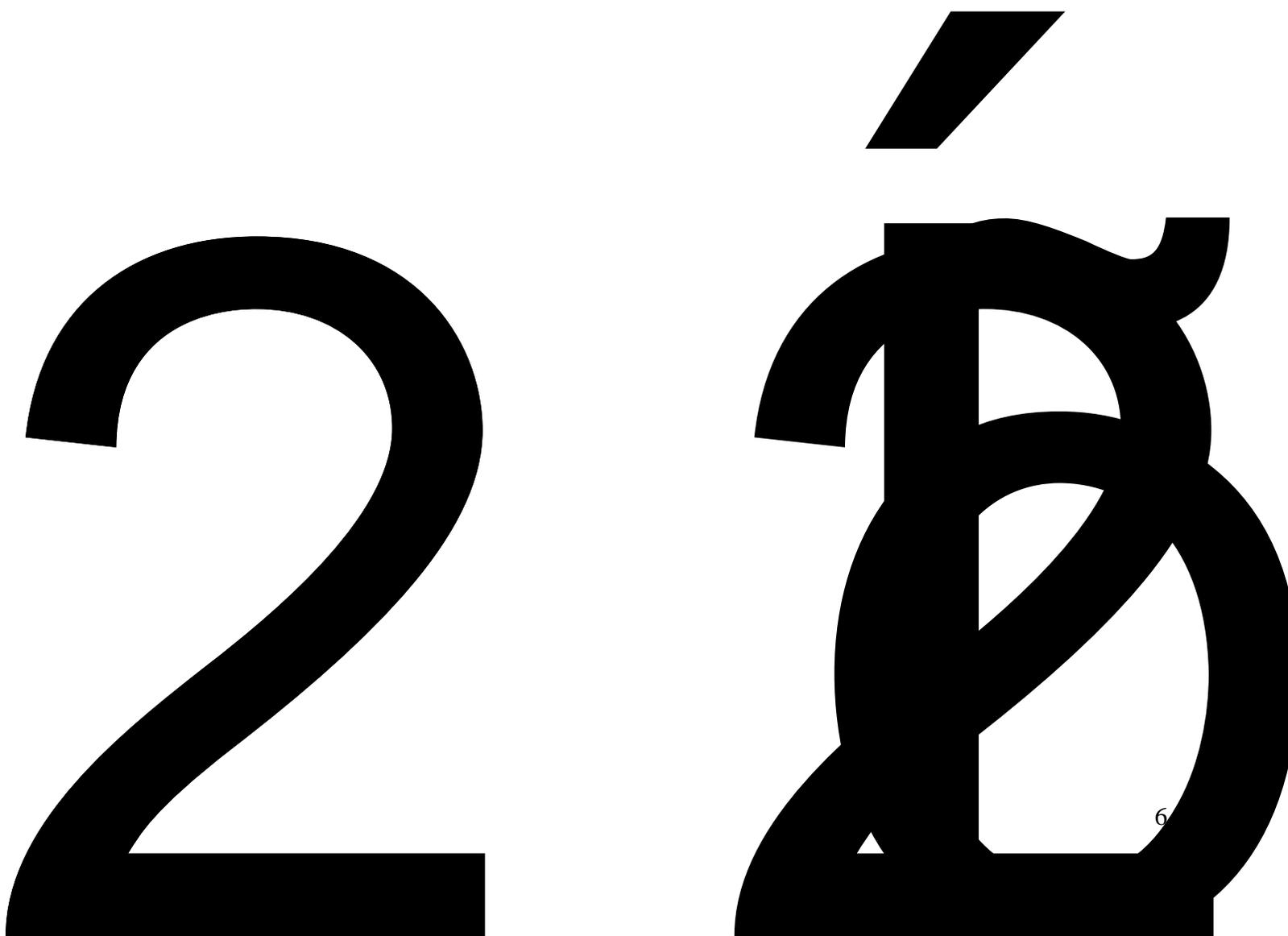
À FUNCAP pelo suporte financeiro, fundamental para que eu pudesse me dedicar integralmente ao mestrado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Plantas Medicinais	15
1.2 Óleos Essenciais	17
1.3 O gênero <i>Croton</i>	19
1.4 <i>Croton sonderianus</i> Muell.Arg.	21
1.5 Anatomia e Fisiologia do músculo liso da via aérea	25
1.6 Acoplamento excitação-contração do músculo liso da via aérea	26
1.7 Relaxamento do músculo liso da via aérea	29
1.8 Epitélio da via aérea	31
2 OBJETIVOS	37
2.1 Geral	37
2.2 Específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1 Material	38
3.1.1 Sais e soluções fisiológicas	38
3.1.2 Óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i> (OECs)	39
3.1.3 Animais	43
3.2 Métodos	43
3.2.1 Preparação <i>in vitro</i> e mensuração da atividade contrátil	43
3.2.2 Análise Histológica	46
3.2.3 Protocolos experimentais	47
3.2.4 Análise estatística	50
4 RESULTADOS	51
4.1 Análise Histológica	51
4.2 Protocolos experimentais	53
4.2.1 Efeito próprio do OECs sobre o tônus espontâneo da traquéia isolada de ratos na presença de epitélio	54

#### 4.2.2 Efeito do OECs sobre as contrações mantidas induzidas por 80 mM de $K^+$



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilil Ciclase
AMPc	3,5-monofosfato cíclico de adenosina
ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração intracelular de cálcio
CaM	Calmodulina
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
COX	Ciclooxigenase
DAG	Diacilglicerol
EGTA	Ácido etileno-bis (β-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
E <sub>m</sub>	Potencial de membrana
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EpDRF	Fator relaxante derivado do epitélio
ET <sub>A</sub>	Receptores A para endotelina
ET <sub>B</sub>	Receptores B para endotelina
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HO	Heme oxidase
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
K <sup>+</sup>	Íon potássio
K <sub>Ca</sub>	Canais para potássio dependentes de cálcio
KCl	Cloreto de potássio
K <sub>v</sub>	Canais para potássio dependentes de voltagem
MAPK	MAP quinase
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio

MLCK	Quinase de cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve da miosina
MLVA	Músculo liso da via aérea
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NO	Óxido nítrico
OECs	Óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i>
OECs 13	Óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i> (amostra de 13 horas)
OECs 21	Óleo essencial de <i>Croton sonderianus</i> (amostra de 21 horas)
PADETEC	Parque de desenvolvimento tecnológico
PG	Prostaglandina
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
ROC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Ca <sup>2+</sup> ATPase do retículo sarcoplasmático
SOC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por estoques
TM	Solução nutritora Tyrode modificada
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TW	Tween 80
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VOC	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por voltagem
0Ca <sup>2+</sup>	Meio isento de cálcio
5-HT	Serotonina
5-HT <sub>2A</sub>	Receptor 2 <sup>a</sup> para serotonina

## RESUMO

*Croton sonderianus*, popularmente conhecido como marmeleiro preto, é uma planta encontrada no Ceará, utilizada popularmente como antiinflamatório, antiparasitário e antiespasmódico. Esta pesquisa objetivou caracterizar as ações farmacológicas de duas diferentes amostras de óleo essencial de *Croton sonderianus* na contratilidade da musculatura lisa da traquéia de ratos e avaliar a participação do epitélio nestas ações. Foram utilizados anéis traqueais de ratos Wistar, montados em sistemas de registro isométrico de contrações. A amostra de OECs de 21 horas (OECs 21) tinha como principais constituintes o espatulenol (18,32%),  $\beta$ -cariofileno (14,58%) e óxido de cariofileno (8,54%), enquanto que a amostra de 13 horas (OECs 13) apresentava biciclogermacreno (16,29%),  $\beta$ -felandreno (15,42%) e  $\beta$ -cariofileno (13,82%). OECs 21 foi testado em preparações com epitélio íntegro, enquanto que OECs 13 foi testado em preparações com e sem epitélio. O principal achado deste estudo foi eficácia farmacológica como antiespasmódico desse óleo essencial. As duas amostras de OECs apresentaram efeito antiespasmódico sobre as contrações evocadas por  $K^+$  e ACh, porém o OECs 21 apresentou efeito contraturante sobre o tônus basal e efeito potencializador da contração evocada por 60 mM de  $K^+$  em pequenas concentrações (0,1 – 30  $\mu$ g/ml), enquanto que o OECs 13 apresentou efeito miorelaxante que aparenta ser dependente do epitélio. O efeito antiespasmódico do OECs 13 foi mais potente sobre o acoplamento eletromecânico ( $IC_{50} = 45,51 \pm 7,58$   $\mu$ g/ml) do que sobre o acoplamento farmacomecânico com ACh ( $IC_{50} = 404,29 \pm 99,93$   $\mu$ g/ml). Na mesma concentração (1000  $\mu$ g/ml) em que bloqueou a contração da ACh com a preparação mantida em concentração normal de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular, o OECs amplificou a contração induzida por ACh em meio sem  $Ca^{2+}$ , em preparações com e sem epitélio. Os resultados indicam que ambas as amostras de OECs apresentam efeito antiespasmódico, porém com potências farmacológicas distintas, e que o efeito antiespasmódico do OECs 13 sobre o músculo liso traqueal de ratos possivelmente se dá pelo bloqueio dos canais para  $Ca^{2+}$  tipo L e também por interferir com o armazenamento de  $Ca^{2+}$  nos compartimentos intracelulares.

Palavras-chave: *Croton sonderianus*, óleos essenciais, músculo liso traqueal, contratilidade.

## ABSTRACT

*Croton sonderianus* is a plant found in Ceara State used in folk medicine as antispasmodic. Previous studies demonstrated that the essential oil of other specimens of *Croton* gender have relaxing effects on tracheal smooth muscle. This study aimed to characterize the effects of *Croton sonderianus* essential oil (EOCs) on tracheal smooth muscle of rats and investigate the role of epithelium in this effect. Wistar rats tracheal rings with and without epithelium were used. The rings were placed in tissue chambers containing modified Tyrode solution (TM) at 37°, pH=7,4, bubbled with air. The mechanical responses in trachea were isometrically recorded with a force transducer and polygraph. Two different EOCs samples were used, EOCs 21 and EOCs 13. The major constituents of EOCs 21 were spathulenol (18,32%),  $\beta$ -caryophyllene (14,58%) and caryophyllene oxide (8,54%). EOCs 13 showed bicyclogermacrene (16,29%),  $\beta$ -phellandrene (15,42%) and  $\beta$ -caryophyllene (13,82%) as main compounds. These samples demonstrated antispasmodic effect on preparations contracted with potassium ( $K^+$ ) and acetylcholine (Ach). EOCs 21 increased basal tonus and enhanced  $K^+$  induced-contraction in low concentrations. EOCs 13 elicited miorelaxant effect on basal tonus and antispasmodic effect on  $K^+$  and Ach induced-contractions ( $IC_{50} = 45,51 \pm 7,58 \mu\text{g/ml}$  and  $404,29 \pm 99,93 \mu\text{g/ml}$ , respectively). The effect on basal tonus appears to be epithelium-dependent. EOCs 13 also enhanced Ach-induced contractions upon extracellular  $Ca^{2+}$  removal. These results show that EOCs is able to relax isolated trachea and to inhibit contractions induced by receptor-dependent and -independent mechanisms, which demonstrate its antispasmodic effect. This study suggests that the relaxing effects of EOCs may involve the blockage of L-type  $Ca^{2+}$  channels and that EOCs may alter the storage of  $Ca^{2+}$  from the internal compartments.

Keywords: *Croton sonderianus*, essential oils, tracheal smooth muscle, contractile responses.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	<i>Croton sonderianus</i> Muell. Arg.	23
Figura 02	Mapa com a localização geográfica e os pontos de coleta do marmeleiro preto no Nordeste.	24
Figura 03	Cromatograma do OECs 21 e do OECs 13.	40
Figura 04	Representação esquemática do sistema de registro das respostas mecânicas da traquéia isolada de ratos.	45
Figura 05	Representação esquemática dos protocolos realizados	49
Figura 06	Fotos dos cortes histológicos dos segmentos de traquéia com e sem desnudamento do epitélio.	52
Figura 07	Efeitos do OECs 21 e OECs 13 sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de ratos.	55
Figura 08	Efeitos do OECs 21 e OECs 13 sobre as contrações induzidas por 80 mM de K <sup>+</sup> no músculo liso traqueal de rato.	57
Figura 09	Efeitos do OECs 21 e OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh no músculo liso traqueal de ratos.	59
Figura 10	Efeitos do OECs 13 sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de ratos, na presença e na ausência de epitélio.	61
Figura 11	Efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por 80 mM no músculo liso traqueal de ratos, na presença e na ausência de epitélio.	63
Figura 12	Efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh no músculo liso traqueal de ratos, na presença e na ausência de epitélio.	65
Figura 13	Efeitos do OECs 13 sobre as contrações fásicas (picos) induzidas por 60 mM de ACh em meio 0Ca <sup>2+</sup> no músculo liso traqueal de ratos, na presença de epitélio.	67
Figura 14	Efeitos do OECs 13 sobre as contrações tônicas (platôs) induzidas por 60 mM de ACh em meio 0Ca <sup>2+</sup> no músculo liso traqueal de ratos, na presença de epitélio.	68

- Figura 15 Efeitos do OECs 13 sobre as contrações fásicas (picos) induzidas por 60 mM 70  
de ACh em meio  $0Ca^{2+}$  no músculo liso traqueal de ratos, em preparações  
sem epitélio.
- Figura 16 Efeitos do OECs 13 sobre as contrações tônicas (platôs) induzidas por 60 mM 71  
de ACh em meio  $0Ca^{2+}$  no músculo liso traqueal de ratos, em preparações  
sem epitélio.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Croton sonderianus</i> (amostra de 21 hs), coletado em abril de 2004, na cidade de Viçosa do Ceará.	41
TABELA 2	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Croton sonderianus</i> (amostra de 13 hs), coletado em julho de 2005 na cidade de Viçosa do Ceará.	42
TABELA 3	Valores comparativos de IC <sub>50</sub> para o OECs 21 e OECs 13	92
TABELA 4	Valores comparativos de IC <sub>50</sub> para o OECs 13 na presença e na ausência de epitélio.	92

## 1- INTRODUÇÃO

A prática da utilização de recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antiga quanto a espécie humana. O uso empírico de espécies vegetais, seguido de avaliação, mesmo que rústica e grosseira, dos sinais e sintomas que apareciam após seu consumo, até a seleção pela qualidade de respostas, se determinada espécie seria útil ou não, caracteriza um processo que visa à seleção do que popularmente denominamos de plantas medicinais (DI STASI, 1996). Desde a última metade do século XX, a utilização dessas plantas tem sido uma tendência mundial. Isto se deve em parte ao reconhecimento do valor das farmacopéias tradicionais e indígenas (ELVIN-LEWIS, 2001).

Especificamente no Nordeste do Brasil a diversidade de espécies, aliada à precária assistência a saúde de boa parte da população torna a utilização dessas plantas uma prática cada vez mais comum para tratamento de diversas enfermidades. As substâncias biologicamente ativas presentes nos óleos essenciais ou extratos de diferentes partes dessas plantas são retidas através de chás ou infusões e utilizadas na medicina popular contra cólicas intestinais, cefaléia e inflamações, dentre outras enfermidades.

Muitas espécies de plantas encontradas no Nordeste, especialmente no Ceará apresentam ampla distribuição geográfica e boa adaptação ao clima semi-árido. Estas características têm chamado a atenção de cientistas para o estudo de seus extratos e óleos essenciais, sob aspectos químico, farmacológico e terapêutico (LEAL-CARDOSO & FONTELES, 1999).

O gênero *Croton* representa um dos mais abundantes e dispersos dessa região, sendo muitas de suas espécies utilizadas como antiespasmódicos (CRAVEIRO *et al.*, 1981). No entanto, apesar de amplamente utilizado na medicina popular contra hemoptise, dor de estômago e diarreia, dentre outros, raros são os estudos envolvendo ações antiespasmódicas do *Croton sonderianus*.

No Brasil, as doenças respiratórias agudas são responsáveis por aproximadamente um quinto das admissões no Sistema Único de Saúde (SUS), (FAÇANHA & PINHEIRO, 2004). As doenças do aparelho respiratório são responsáveis por aproximadamente 10% das mortes entre os menores de um ano, a segunda causa de óbito na população de zero a um ano de idade e a primeira causa entre as crianças de um a quatro anos (SIGAUD, 2003) e representaram uma das principais causas de mortalidade entre idosos brasileiros no período compreendido entre 1980 e 2000 (LIMA-COSTA *et al.*, 2004).

A alta incidência de afecções respiratórias relacionadas ao espasmo da musculatura lisa da via aérea no Nordeste, como a asma (SANTO, 2006) e o já conhecido papel que o epitélio desempenha nas respostas contráteis da via aérea, tornam evidente a importância do estudo do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre o músculo liso traqueal, em preparações com e sem epitélio.

Isto posto, esta pesquisa trata-se de um estudo de caráter experimental realizado no Laboratório de Eletrofisiologia do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará – UECE, tendo por finalidade a caracterização dos efeitos do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos. Neste sentido, este estudo visa uma real contribuição para o conhecimento do mecanismo de ação do OECs sobre a musculatura lisa da traquéia. Ademais, a importância da continuidade desta pesquisa faz-se de fundamental importância uma vez que abre novas perspectivas para uma possível utilização de recursos naturais abundantes nesta região para tratamento de enfermidades do trato respiratório.

### **1.1) Plantas medicinais**

As plantas medicinais correspondem, incontestavelmente, às mais antigas armas empregadas no tratamento de enfermidades humanas e animais (OLIVEIRA, 1997). A utilização de plantas medicinais no Brasil é uma das mais antigas formas de tratamento de doenças. Os

indígenas já pontificavam, pelos seus pajés, no uso da imensa flora medicinal brasileira (ARAÚJO, 1999).

A arte dos benzedores, curandeiros e xamãs, caracterizada pela utilização dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças, pode ser comprovada hoje, em teste, nos laboratórios científicos, os quais passaram a avaliar experimentalmente a veracidade destas informações (DI STASI, 1996).

A medicina do mato - fitoterapia - baseia sua prática no uso das plantas medicinais, aproveitando a rica flora brasileira, com variantes de região a região (ARAÚJO, 1999).

Durante a última parte do século XX, a prática da fitoterapia tornou-se difundida por todo mundo. Isto é suficiente, em parte, para o reconhecimento do valor do sistema de medicina tradicional e a identificação de plantas medicinais, que têm mostrado um significativo poder de cura no seu estado natural ou como fonte de novos agentes farmacológicos (ELVIN-LEWIS, 2001).

Segundo Campos (2002), existem 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), das quais 11% são exclusivamente originadas de plantas e uma quantidade significativa são drogas sintéticas obtidas a partir de precursores naturais.

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes (como flavonóides, alcalóides, triterpenos e sesquiterpenos) tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Em países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças (COSTA *et al.*, 1997; MATOS *et al.*, 2001).

De fato, o conhecimento sobre plantas medicinais representou, e ainda representa, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (DI STASI, 1996). E este conhecimento orienta os pesquisadores na busca de atividades biológicas destas plantas. Estima-se que cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Atualmente, o número de plantas nativas do Brasil usadas *in natura* ou manufaturadas como fitomedicamentos já ultrapassa uma centena (CALIXTO, 2000).

Especialmente na região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assume importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS & MATOS, 1989).

Existem várias plantas aromáticas no Nordeste brasileiro, muitas delas com peculiaridades devido à sua adaptação ao clima semi-árido, algumas das quais são consideradas medicinais pela população local. Estas características têm atraído recentemente a atenção de muitos cientistas para o estudo de seus extratos, incluindo os óleos essenciais, sob aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos (LEAL-CARDOSO & FONTELES, 1999).

## **1.2) Óleos essenciais**

O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte quase sempre agradável, que são extraídos de plantas por processos específicos.

Os óleos essenciais são fontes de moléculas biologicamente ativas, que têm produzido de maneira direta ou através de modificações na estrutura molecular de seus constituintes, compostos de grande importância terapêutica e científica (TISSERAND & BALACS, 1995).

Muitos fornecem compostos de partida para a síntese de substâncias úteis nas indústrias química e farmacêutica (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Os óleos essenciais são substâncias que ocorrem naturalmente e que são freqüentemente responsáveis pelo aroma e sabor específico das plantas. Estes óleos desempenham um importante papel como aromatizantes na indústria alimentícia e como fragrâncias na indústria de perfumes (BRUNETON, 1999)

Os óleos consistem em misturas muito heterogêneas de substâncias individuais e suas ações biológicas são primariamente devidas a seus componentes, num complicado concerto de atividades sinérgicas e antagônicas (LAHLOU, 2004).

Os óleos essenciais podem ser extraídos a partir de flores, folhas, frutos, sementes, parte aérea, raízes, cascas, tubérculos, capítulos florais e bulbos (TISSERAND & BALACS, 1995; CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Na verdade, há uma carência de informação sobre a distribuição da atividade biológica em diferentes partes da planta, essencialmente relatada como diferença na distribuição dos componentes ativos ou princípios ativos, que são mais freqüentes em algumas partes da planta que em outras (LAHLOU, 2004).

Os óleos essenciais desempenham papel ecológico, possuindo propriedades atrativas e repelentes de várias espécies de insetos. Outras evidências sugerem que os óleos, e particularmente os monoterpenóides que o constituem, são produzidos para manter a atividade do sistema enzimático das plantas (ENAM, 2001).

Em geral os óleos essenciais são líquidos, porém alguns podem se apresentar sólidos ou semi-sólidos à temperatura ambiente. A maioria é transparente e incolor ou fracamente amarelado, poucos são profundamente coloridos (TISSERAND & BALACS, 1995).

Quimicamente, são constituídos por substâncias que vão desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos com enxofre (SIMÕES *et al.*, 1999).

A extração dos óleos essenciais é feita por processos específicos, sendo o mais freqüente o arraste com o vapor d'água, chamado de hidrodestilação ou coobação (MATOS & MATOS, 1989). O material vegetal, após trituração ou moagem é colocado em um recipiente por onde passa o vapor d'água, que arrasta as substâncias voláteis. O vapor é, em seguida, condensado por resfriamento e as fases hidrofílica e hidrofóbica são separadas por decantação (MAGALHÃES, 1998, MATOS & MATOS, 1989).

Muitos fatores como a idade da planta, percentual de umidade do material colhido e método de extração têm sido identificados como possíveis fontes de variação na composição química, toxicidade e bioatividade dos extratos (LAHLOU, 2004).

Devido à sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram uma variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas (LAHLOU, 2004).

### **1.3) O gênero *Croton***

O gênero *Croton*, cujo nome significa “carrapato”, é o segundo maior da família *Euphorbiaceae* e pertence à subfamília *Crotonoideae* e tribo *Crotonaeae* (BRAGA, 1976). Compreende cerca de 1000 espécies, 650 das quais encontram-se na América e 300 no Brasil, sendo o gênero de maior dispersão no Nordeste (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Existem sob a forma de ervas perenes, subarbustos e arbustos (BRAGA, 1976). Neste gênero é onde se encontram as grandes populações vegetais de marmeleiros e velames na vegetação secundária, principalmente da caatinga (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Muitas espécies do gênero *Croton* são odoríferas e apresentam conteúdo relativamente rico em óleo essencial, que está distribuído em todos os órgãos da planta, principalmente nas folhas e nas cascas do caule (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Essas espécies mostram-se de potencial valor terapêutico em virtude do amplo uso popular como plantas medicinais, na forma de chás, infusões, cataplasmas e laxativos (DOURADO, 2003).

Espécies de *Croton* atraem o interesse para o seu estudo devido à diversidade do uso popular, atividades biológicas e como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (DOURADO, 2003).

Uma grande variedade de espécies de *Croton* é utilizada com frequência na medicina popular, apresentando atividade biológica relevante. Os óleos essenciais e muitos de seus constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides apresentam propriedades terapêuticas comprovadas (RANDAU *et al.*, 2002).

Estudos fitoquímicos têm demonstrado que os metabólitos secundários não voláteis mais abundantes das espécies deste gênero são produtos naturais pertencentes principalmente à classe dos terpenos, especialmente diterpenos, que isolados mostraram-se bioativos. Apresentaram interessantes propriedades biológicas como atividade antitumoral, antiinflamatória, antimicrobiana, inseticida e antiespasmódica (DOURADO, 2003).

Um grande número de espécies de *Croton* continua sendo estudado sob o aspecto químico e farmacológico e têm revelado diversas e importantes atividades biológicas.

Os óleos essenciais de algumas espécies de *Croton* encontradas frequentemente no Ceará – *Croton zehntneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides* – apesar de apresentarem constituição química diferente têm, de forma geral, revelado atividades farmacológicas em comum, como efeito antiespasmódico (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998, MAGALHÃES *et al.*, 2004), antioxidante (MORAIS, 2006), antinociceptivo e antiedematogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2001; ABDON, 2002; MARQUES-CANUTO, 2005).

Além disso, o óleo essencial do *Croton nepetaefolius* demonstrou atividade hipotensora (LAHLOU *et al.*, 1999; LAHLOU *et al.*, 2000), antimicrobiana e antivirótica (LEMOS *et al.*, 1992) e bloqueadora da excitabilidade neuronal (LIMA-ACCIOLY *et al.*, 2006). O óleo essencial do *Croton argyrophylloides*, apresentou efeito antibacteriano (FORTES *et al.*, 2003), e o do *Croton zehntneri* mostrou-se eficaz no bloqueio da transmissão neuromuscular (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995).

#### **1.4) *Croton sonderianus* Muell. Arg.**

*Croton sonderianus*, popularmente conhecido como “marmeleiro preto” é uma das plantas do gênero *Croton* mais abundantes e dispersas, sendo encontrada em toda a região Nordeste, especialmente no estado do Ceará (SILVEIRA, 1979).

Originária do Brasil, cresce de forma silvestre desde o Piauí e o Nordeste até Minas Gerais, ocupando as áreas desmatadas e formando grandes conjuntos relativamente homogêneos na caatinga que somam alguns milhares de hectares (LORENZI & MATOS, 2002).

Craveiro *et al.* (1981) o descrevem da seguinte forma:

A planta é uma árvore caducifólia, até 4 m, com ramos, folhas e cascas aromáticas. As folhas são pilosas, oblongo lanceoladas, de tamanho médio e nervação pinada, base cordada e ápice acuminado. Os ramos possuem traços escuros que justificam o nome de marmeleiro preto com o qual a planta é vulgarmente conhecida. As flores são dispostas em racemos alongados.

Trata-se de uma espécie colonizadora, considerada praga invasora de pastagens e campos de cultivo, apresentando grande poder reprodutivo e difícil erradicação. Popularmente conhecido como “marmeleiro-escuro” ou “marmeleiro-preto”, em virtude de seu tronco e ramos possuírem

um aspecto geral escuro (Figura 1), *Croton sonderianus* é a mais comum das plantas conhecidas pela denominação genérica popular de marmeleiro. Habita principalmente a região entre as bacias do Rio São Francisco e Parnaíba (CRAVEIRO *et al.*, 1981). A figura 2 mostra as regiões do Nordeste onde esta espécie pode ser encontrada.

*Croton sonderianus* apresenta-se como arbusto nas capoeiras do sertão, ou árvore quando cresce nas matas (MATOS, 1997). Fornece estacas e varas curtas para cercas, bem como para preparação de armadilhas para pesca da lagosta. É usado como forragem para alimentação de bovinos, ovinos e caprinos. A literatura etnofarmacológica registra o uso de suas cascas como medicação afamada para combater problemas estomacais, ora mastigando-se diretamente pequenos pedaços, ora na forma de chá abafado; cita também o emprego desta mesma preparação no tratamento de hemorróidas inflamadas e nos casos de hemorragia uterina (LORENZI & MATOS, 2002; LIMA, 1996). Na medicina popular é utilizado por via oral, contra hemoptise, dor de estômago, vômitos, diarreia, cefaléia e ainda, como antiparasitário (MATOS, 1999; MATOS, 1997).

Estudo fitoquímico realizado com o extrato benzênico do lenho do caule de *Croton sonderianus* (coletado em Sobral – Ceará) revelou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*. A literatura também relata o estudo do extrato hexânico das raízes desta espécie, coletada no mesmo local, onde os ensaios biológicos revelaram interessantes resultados contra bactérias Gram-positivo: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, e bactérias Gram-negativo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*; contra fungos: *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* e outros microorganismos (McCHESNEY *et al.*, 1991; DOURADO, 2003).

Recentemente, foi demonstrado o efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Croton sonderianus* (SANTOS *et al.*, 2005; CARNEIRO-LOUREIRO, 2003).



**Figura 1:** *Croton sonderianus* Muell. Arg.

**FONTE:** Fotos cedidas do arquivo pessoal do Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

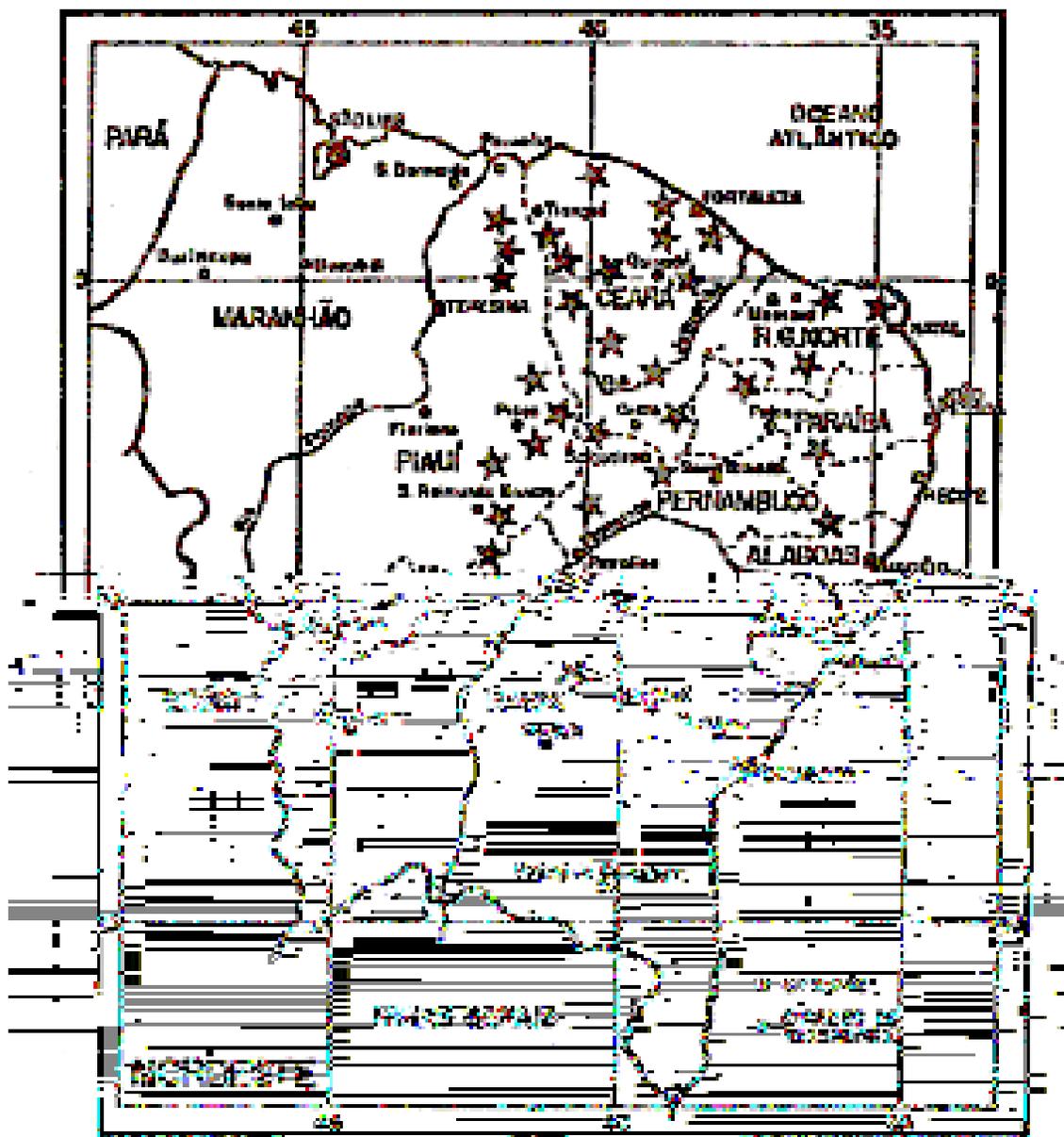


Figura 2: Mapa evidenciando a localização geográfica e os pontos de coleta e observação do Marmeleiro Preto no Nordeste ( )

FONTE: Craveiro *et al*, 1981.

## 1.5) Anatomia e fisiologia do músculo liso da via aérea

A traquéia é a principal via aérea condutora, tendo como característica marcante a presença de peças cartilaginosas do tipo hialino em forma de C, em número variável, cujas extremidades livres estão voltadas para a região dorsal. Esta região encontra-se próxima ao esôfago e é destituída de cartilagem, apresentando feixes musculares lisos que também podem ser encontrados entre os anéis cartilagosos (BEST & TAYLOR, 1990).

O músculo liso das vias aéreas (MLVA) está distribuído desde a traquéia até os ductos alveolares. Anatomicamente circunda o lúmen dos brônquios e bronquíolos, sendo este último o sítio de maior proporção de músculo liso na parede, em relação ao diâmetro da luz. É encontrado nas vias aéreas superiores, na região posterior da traquéia, juntando e fixando os anéis cartilagosos e, nas vias aéreas inferiores, é orientado dentro de um padrão de hélice-anti-hélice sugerindo uma arquitetura altamente eficiente que aumenta grandemente a habilidade de sustentação do músculo (AMRANI & PANETTIERI, 2003).

A traquéia é uma fonte conveniente de músculo liso para estudos bioquímicos e biofísicos de elementos contráteis. O MLVA de mamífero controla o diâmetro das vias aéreas e a resistência à passagem do ar. O tônus muscular é controlado por vários sinais externos que são traduzidos em trabalho útil através de proteínas contráteis (GERTHOFFER, 1991).

Assim como no músculo esquelético e cardíaco, as células do MLVA contêm miofibrilas constituídas de actina, miosina e tropomiosina. Outros componentes protéicos (como caldesmon, calponina, MLCK e fosfatases) são similares aos encontrados em outros músculos lisos (RUSSELL, 1986; GERTHOFFER, 1991).

As células do músculo liso da via aérea *in vivo* funcionam como um grupo, um sincício, um ambiente mecanicamente ativo. Quando o comprimento do músculo é alterado, muitos componentes intra e extracelulares são afetados (BAI *et al.*, 2004, STEVEN & HAI, 2000).

O MLVA utiliza os reservatórios de cálcio intra e extracelular para a contração. Estas fontes de  $\text{Ca}^{2+}$ , bem como os tipos de canais, são utilizadas dependendo do agonista usado para contrair, sua concentração, o tipo e local de músculo liso a ser investigado. (RUSSELL, 1986).

### 1.6) Acoplamento excitação-contração do músculo liso das vias aéreas

O termo acoplamento excitação-contração está relacionado à cadeia de processos que ligam um estímulo a seus efeitos subsequentes no nível de cálcio livre no citoplasma, sem incluir a contração propriamente dita (SPERELAKIS, 1993).

A regulação do tônus do MLVA, *in vitro*, é feita por um sinal extracelular que provoca uma resposta celular de força através de dois tipos gerais de transdução de sinal, eletromecânico (dependente da função de canal e fluxos iônicos, caracterizado pelas mudanças no  $E_m$ ) e farmacomecânico (mediado por substância química independente de mudanças no  $E_m$ ) (GERTHOFFER, 1991).

No MLVA, a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é um elemento crítico para a transdução de sinais na regulação da contração muscular, proliferação celular e expressão de genes. Uma grande variedade de eventos celulares é controlada por um aumento transiente na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . As duas maiores fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  são o meio extracelular e os estoques intracelulares. Sabe-se que a liberação dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , presumivelmente do RS, desempenha papel principal na iniciação da contração do MLVA de várias espécies, incluindo de humanos (MARTHAN, 2004; GÓMEZ-VIQUEZ *et al.*, 2003, SWEENEY *et al.*, 2001).

Janssen (2002) relata que o RS forma camadas ao redor da superfície interna da célula, dessa forma dividindo o citosol em dois compartimentos: um espaço periférico imediatamente sob a plasmalema, onde os canais iônicos são encontrados (muitos sendo regulados por  $\text{Ca}^{2+}$ ) e o espaço citosólico profundo, onde o aparato contrátil é encontrado.

Deste modo, a célula poderia dissociar a influência do  $\text{Ca}^{2+}$  nas atividades mecânicas e elétricas. Este modelo de “barreira superficial de tamponamento” enfatiza que o RS funcionaria como uma barreira ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e então a presença de um agonista tornaria esta barreira permeável (ETHIER *et al.*, 2001).

O RS, que atua como uma fonte limitada de  $\text{Ca}^{2+}$ , apresenta canais para  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por  $\text{IP}_3$  e canais que são ativados pelo próprio  $\text{Ca}^{2+}$  (liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$ ), também chamados receptores de rianodina (BAZÁN-PERKINS *et al.*, 1998).

O aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é um passo essencial para o acoplamento excitação-contração do MLVA. Nestas células a excitação é acompanhada pela despolarização da membrana mediada primeiramente por ativação de correntes de  $\text{Cl}^-$  e de cátions não-seletivas, bem como supressão de correntes de  $\text{K}^+$ . A despolarização ativa correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes que são suficientes para desencadear contração em resposta ao cloreto de potássio (BAZÁN-PERKINS *et al.*, 1998; JANSSEN, 2002).

Existem evidências eletrofisiológicas que indicam a presença de duas classes de canais para  $\text{K}^+$  no MLVA: canais  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) e voltagem-dependentes ( $\text{K}_{\text{V}}$ ). Pesquisas sobre a existência de outras classes de canais para  $\text{K}^+$  no MLVA ainda estão sendo realizadas (JANSSEN, 2002).

Muitos estudos têm caracterizado as correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  no MLVA (geralmente o traqueal) como sendo quase exclusivamente utilizando canais do tipo L. No entanto, a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no MLVA pode também envolver canais para cátions não-seletivos e/ou canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor. Janssen *et al.* (1999) demonstraram um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  subsarcolemal e na atividade das correntes de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana, sem ativação de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem.

Sweeney *et al.* (2001) relatam que nas células do MLVA existem pelo menos três classes de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcolema: canais dependentes de voltagem (VOC), canais operados por receptor (ROC) e canais operados por estoques (SOC), que são ativados pela depleção dos

estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além destes, foi demonstrado que a membrana celular também apresenta canais para  $\text{Ca}^{2+}$  ativados por estiramento. A abertura destes canais ocorre quando pressão ou outras forças distorcem a membrana, permitindo que o  $\text{Ca}^{2+}$  entre e inicie a contração que, por partir de uma propriedade da própria fibra muscular, é conhecida como contração miogênica.

Numerosas funções do MLVA são mediadas por sinalização através de receptores acoplados à proteína G incluindo contração, crescimento celular e secreção de várias citocinas, eicosanóides e fatores de crescimento que orquestram a inflamação e promovem o remodelamento da estrutura da VA. Esta sinalização transmembrana envolve ativação em cascata do receptor, proteína G e efetor. O receptor, ao se ligar ao agonista, sofre uma mudança conformacional que expõe um sítio com alta afinidade para ligar uma proteína G em seu estado inativo, especificamente o terminal C da subunidade  $\alpha$ . A ligação da proteína G ao receptor leva à substituição de GDP por GTP e induz uma mudança conformacional, com dissociação da subunidade  $\alpha$  do dímero  $\beta\gamma$ . A subunidade  $\alpha$  da proteína G ativa a PLC que, por sua vez, promove a hidrólise de  $\text{PIP}_2$  em DAG e  $\text{IP}_3$ . DAG permanece ligado à membrana e promove a translocação da PKC da membrana para o citoplasma e sua subsequente ativação. A PKC ativada é capaz de ativar vários substratos, inclusive a calponina, levando à perda de sua habilidade em inibir a actomiosina ATPase. A fosforilação de intermediários da via da MAPK – que ativa fatores de transcrição de genes envolvidos na promoção do crescimento do MLVA – também é mediada pela PKC. MAPK e PKC fosforilam e estimulam a atividade catalítica da  $\text{PLA}_2$ , com liberação de ácido araquidônico (BILLINGTON & PENN, 2003).

Já o  $\text{IP}_3$ , outro produto da hidrólise do  $\text{PIP}_2$ , interage com receptores de  $\text{IP}_3$  localizados no RS, resultando na abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  e conseqüente efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol. A elevação na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  promove a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM, que então ativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK catalisa a fosforilação das cadeias leves da miosina, causando a contração por estimulação da atividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase da miosina ativada (BILLINGTON & PENN, 2003; RUSSEL, 1986).

A fosforilação da miosina aparenta ser um evento passageiro que é responsável por uma alta velocidade de encurtamento. O mecanismo responsável pela manutenção da força isométrica é desconhecido, embora um segundo mecanismo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  com uma maior sensibilidade para  $\text{Ca}^{2+}$  que para MLCK-ativada tenha sido hipotetizado. A força deveria ser mantida pelo ciclo lento das pontes cruzadas não-fosforiladas ou por uma pequena quantidade de pontes cruzadas fosforiladas (RUSSELL, 1986).

Outras possíveis vias de sinalização envolvidas no acoplamento excitação-contração no MLVA têm sido investigadas: a fosforilação das proteínas do citoesqueleto, a fosforilação da tirosina mediada por integrinas, a fosforilação de caldesmon/calponina mediada por quinase, com regulação extracelular e as mudanças induzidas por agonistas na sensibilidade do aparato contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$ , fazendo com que o próprio nível basal de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fosse suficiente para evocar contração (JANSSEN *et al.*, 2001; GUNST & TANG, 2000; TOLLOCZKO *et al.*, 2000).

A ativação de quinase com regulação extracelular mediada por endotelina foi recentemente mostrada como sendo dependente do influxo de Ca, indicando certo cruzamento das vias  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente e  $\text{Ca}^{2+}$ -independente (JANSSEN, 2002).

Outro mecanismo recentemente discutido envolve a ativação da proteína monomérica Rho que por sua vez transloca a membrana e ativa a Rho quinase. Esta última fosforila, e deste modo inativa, a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), levando à contração por acúmulo em rede de cadeias leves de miosina fosforiladas (JANSSEN, 2002).

### **1.7) Relaxamento do músculo liso da via aérea**

O mecanismo envolvido no relaxamento do MLVA envolve a redução dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ . A redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ocorre, dentre outras formas, pela ação de uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do RS (SERCA) e pelo transporte do  $\text{Ca}^{2+}$  para fora da célula por um antiportador  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e uma  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sarcolemal. (BINNAZ *et al.*, 2006; MARTHAN, 2004)

Roux e Marhl (2004) propuseram que a diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  se deve, pelo menos em parte, à recaptação do  $Ca^{2+}$  que foi liberado do RS pela mitocôndria.

A depleção do  $Ca^{2+}$  intracelular ativa os canais operados por estoque (SOCs), que desencadeiam um influxo de  $Ca^{2+}$  para reabastecer os estoques do RS (GÓMEZ-VIQUEZ, 2003).

Também tem sido proposto que os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem do sarcolema podem desempenhar um papel importante no reabastecimento do RS (BOURREAU *et al.*, 1993; JANSSEN & SIMS, 1993)

RUSSELL (1986) relata que o relaxamento do MLVA ocorre com estimulação dos receptores beta-adrenérgicos, levando provavelmente a um aumento no AMPc intracelular que estimula uma proteína quinase dependente de AMPc (PKA) a catalisar a fosforilação de uma proteína que conduz ao relaxamento por redução da  $[Ca^{2+}]_i$ .

O relaxamento por estimulação da proteína G ocorre quando a proteína  $G_s$  é ativada por agentes endógenos catecolaminas circulantes, PGs, iso-prostanos, adenosina e VIP. A ativação da proteína  $G_s$ , a subunidade  $\alpha$  ativa a adenilil ciclase, que catalisa a formação de AMPc. Este, por sua vez, ativa a PKA induzindo uma mudança conformacional que força a liberação de suas subunidades catalíticas ativas. A PKA pode fosforilar várias proteínas intracelulares, certos receptores acoplados à proteína Gq e, ainda, a PLC. Desta forma, ao inibir o complexo receptor-proteína G e a PLC, a PKA inibe a lise de  $PIP_2$  e por conseqüência, o fluxo de  $Ca^{2+}$ . Também promove a fosforilação do receptor de  $IP_3$ , reduzindo sua afinidade por  $IP_3$  e limitando a mobilização de mais  $Ca^{2+}$ . Além disso, a PKA fosforila a MLCK, diminuindo sua afinidade para Ca-CaM, o que reduz a atividade e a fosforilação das cadeias leves de miosina. PKA também fosforila  $K_{Ca}$ , promovendo hiperpolarização por aumentar a probabilidade de seu estado aberto e portanto, o efluxo de  $K^+$  (BILLINGTON & PENN, 2003).

Estudos mostram que existe uma provável interação entre substâncias biologicamente ativas produzidas pelo epitélio da via aérea e o relaxamento do MLVA (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

O mecanismo envolvido nos relaxamentos espontâneos é claramente diferente do que é provocado eletricamente. Este último parece não ser mediado por autacóides liberados pelo epitélio (JANSSEN & WATTIE, 1996; JANSSEN & NANA, 1997).

Alguns agonistas como o NO promovem broncodilatação por ativação de  $K_{Ca}$ , promovendo hiperpolarização e, supressão de correntes de entrada de  $Cl^-$  (JANSSEN *et al.*, 2000)

Janssen (2002) relata, no entanto, que a hiperpolarização sozinha não é suficiente para promover o relaxamento do MLVA. Portanto, um melhor entendimento do relaxamento evocado por agonistas demanda uma nova ênfase em outros mecanismos que não a ativação de canais para  $K^+$ . A maioria dos broncodilatadores que ativa canais para  $K^+$  é conhecida por exercer outros efeitos no MLVA, incluindo a diminuição da sensibilidade do aparato contrátil ao  $Ca^{2+}$ , inibição do  $IP_3$  por ligação com seu receptor no RS, promovendo supressão da liberação de  $Ca^{2+}$  induzida por  $IP_3$  e melhora da recaptação/extrusão de  $Ca^{2+}$ .

## 1.8) Epitélio da via aérea

As vias respiratórias, como a traquéia, são revestidas por um epitélio pseudo-estratificado, cilíndrico e ciliado. Este epitélio é assim chamado porque, apesar de apresentar apenas uma camada de células, os núcleos celulares se apresentam em alturas diferentes entre as células vizinhas, dando a impressão de sobreposição. Esse fenômeno ocorre especialmente na microscopia de luz onde não é muito clara a visualização da membrana plasmática, o que pode ser explicado pelo fato de nem todas as células apoiadas na lâmina própria alcançarem a superfície apical exatamente na mesma altura o que também deslocaria os núcleos no eixo longitudinal. Nesse epitélio podemos observar projeções ciliares cujos movimentos ajudam a

deslocar o muco produzido pelas células caliciformes sobre a superfície basal (CORMACK, 1979).

O epitélio das vias aéreas consiste em uma população heterogênea de células que formam junções muito próximas, chegando a impedir o acesso a estruturas subjacentes e agindo como uma barreira física a irritantes. Também executa diversas funções como motilidade ciliar, secreção mucosa e transporte de íons, além de apresentar propriedades de barreira imunológica, visto que suas células são dendríticas, dotadas de histocompatibilidade (SPINA, 1998). A camada epitelial apresenta, ainda, função metabólica e secretória (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

As células epiteliais das vias aéreas são capazes de sintetizar, além do muco, ampla variedade de substâncias biologicamente ativas, como enzimas, citocinas, quimiocinas, o óxido nítrico (NO), produtos da ciclooxigenase (COX), endotelinas, acetilcolina (ACh), além do ainda não reconhecido fator relaxante derivado do epitélio (EpDRF) (MOFFATT *et al.*, 2004; FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

Desta forma, torna-se evidente o papel ativo do epitélio na resposta a diversos agentes farmacológicos, bem como na modulação da função do músculo liso da via aérea (MLVA) em muitas espécies (SPINA, 1998).

Na via aérea, as endotelinas são sintetizadas e liberadas pelas células epiteliais. Em coelhos, a endotelina, agindo em dois principais subtipos de receptores (ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub>) pode contrair o MLVA diretamente ou indiretamente via facilitação da neurotransmissão parassimpática (HATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2005).

Em 2004, Moffatt e cols. demonstraram que a serotonina (5-HT), atuando em receptores 5-HT<sub>2A</sub> em células epiteliais da traquéia de camundongos, estimula estas células a liberar ACh, que então causa contração do músculo liso traqueal. Estes resultados sugerem que a ACh derivada do epitélio pode ser o mediador final da broncoconstrição anafilática em camundongos, podendo desempenhar um papel importante na responsividade alterada da via aérea em modelos de doença respiratória.

No entanto, estudos mais recentes relatam que a constrição da VA induzida por 5-HT se deve à liberação de um fator broncoconstrictor derivado do epitélio que é diferente da ACh (KUMMER *et al.*, 2006).

O epitélio produz, ainda, substâncias relaxantes, como o NO, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e EpDRF, que podem gerar relaxamento do MLVA diretamente e assim, modular a responsividade da via aérea, protegendo-a de uma constrição excessiva.

O NO e seus doadores relaxam o músculo liso respiratório de humanos *in vitro* provavelmente através da ativação da guanilato ciclase, associado ao aumento do GMPc. De forma geral, os vários achados apontam o NO como supressor da responsividade da via aérea. Vários dados experimentais sugerem que o NO derivado do epitélio está implicado no antagonismo funcional das contrações da via aérea induzidas por diversos espasmógenos (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998; KLOEK *et al.*, 2002).

Hatziefthimiou *et al.* (2005) demonstraram que o epitélio participa da modulação da responsividade do músculo liso traqueal dependendo da tensão de repouso aplicada e que este efeito era devido, pelo menos em parte, ao aumento da produção endógena de NO decorrente do estiramento.

As células epiteliais expressam a enzima óxido nítrico sintase (isoforma eNOS) e alguns agentes contráteis, como a histamina, estimulam sua atividade, levando à produção de NO pelo epitélio. Por outro lado, também é possível que o estiramento do tecido altere a atividade da eNOS (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998; HATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2005).

A prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) é um produto da COX que apresenta atividade relaxante. A PGE<sub>2</sub> pode ser liberada pela camada epitelial após estimulação por grande número de agentes farmacológicos e atua suprimindo as contrações da via aérea (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

Alguns estudos mostram que forças mecânicas podem afetar a expressão da COX e estimular a produção de prostaglandinas (HATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2005). Assim como o NO, as prostaglandinas contrapõem-se às contrações induzidas por histamina nas vias aéreas. Além disso, dados experimentais mostram que a PGE<sub>2</sub> derivada do epitélio constitui um dos mediadores que causam taquifilaxia à histamina, o que justifica o aumento da sensibilidade da via aérea a este agente após lesão epitelial (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998; KLOEK *et al.*, 2002).

O epitélio está envolvido na regulação da reatividade da via aérea a agentes broncoativos também através da liberação do chamado fator de relaxamento derivado do epitélio (EpDRF).

Foi demonstrado que o EpDRF é liberado em resposta a mudanças incrementais na osmolaridade das soluções que banham o epitélio. Evidências têm indicado que o EpDRF liberado em resposta à solução hiperosmolar não é nem um prostanóide, nem o óxido nítrico. Ademais, a liberação do EpDRF está associada a mudanças na atividade bioelétrica do epitélio (FEDAN *et al.*, 2004).

Miwa *et al.* (2007) demonstraram que solução salina hipertônica leva a alterações da barreira epitelial, aumentando sua permeabilidade, embora não altere o transporte de macromoléculas a curto-prazo.

A camada epitelial apresenta, ainda, função metabólica. O epitélio contém enzimas degradativas, incluindo endopeptidases neutras que metabolizam uma gama de extensiva de peptídeos biologicamente ativos, enzimas envolvidas na conjugação de sulfato, e enzimas do sistema oxidases de função mista como o citocromo P-450 (SPINA, 1998). A enzima heme oxidase (HO), expressa no epitélio, pode modular a reatividade do MLVA a agonistas como o carbacol (FEDAN *et al.*, 2004). Além disso, a atenuação da contração induzida por histamina no músculo liso traqueal de bovinos tem um componente metabólico exercido pelo epitélio, visto que este manifesta atividade histaminase, pela expressão da enzima histamina-N-metil-transferase (JOLLY & DESMECHT, 2003).

A importância do epitélio na responsividade da via aérea é notória quando se avaliam as repercussões provocadas pelo dano epitelial, uma das conseqüências da inflamação da via aérea.

O epitélio traqueobrônquico está sujeito a muitas lesões, tanto biológicas (como *S. aureus* e *influenza virus*) quanto químicas, como os oxidantes presentes no tabaco, que invariavelmente provocam inflamação. Como conseqüência da inflamação, o epitélio é bombardeado com citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e radicais livres liberados pelas células inflamatórias (NETTESHEIN & BADDER, 1996).

Especificamente o cigarro promove anormalidades estruturais e funcionais no epitélio traqueal, como perda dos cílios, hiperplasia das células basais e aumento no número de células inflamatórias subepiteliais (ISIK *et al.*, 2006).

Netteshein & Badder (1996) relataram que a exposição do epitélio ao TNF  $\alpha$  induz a um aumento da produção de PGE<sub>2</sub> e de muco, que representa um mecanismo de proteção contra as agressões.

Pesquisas recentes têm demonstrado que fibroblastos também atuam sobre o epitélio, aumentando a secreção de muco e gerando efeitos estimulatórios na migração, proliferação e diferenciação de células epiteliais (KOBAYASHI, 2006).

Muitos estudos *in vitro* têm mostrado que a lesão epitelial leva a um aumento da responsividade brônquica a diferentes agonistas farmacológicos (BOSKABADY & TEYMOORY, 2003).

Holroyde (1986) mostrou que a remoção do epitélio da via aérea provoca um aumento da responsividade à histamina, acetilcolina, cloreto de potássio e isoprenalina, que se justificaria pelo aumento da permeabilidade e mais fácil acesso dos ligandos aos receptores, levando à potencialização dos efeitos do agonista quando o epitélio era removido.

Atualmente sabe-se que a perda da integridade epitelial pode levar à hiperresponsividade da via aérea por vários mecanismos, que incluem: o aumento da permeabilidade a antígenos; exposição das fibras nervosas sensoriais e ativação de mecanismos reflexos locais; mudanças na osmolaridade do fluido da superfície de revestimento brônquico; perda da inativação da peptidase ligada à membrana (endopeptidase natural), que degrada a substância P em metabólitos inativos; ou pela redução dos fatores de relaxamento derivados do epitélio e liberação de mediadores espasmógenos, como a endotelina (BOSKABADY & TEYMOORY, 2003).

Portanto, a deterioração funcional do epitélio, como ocorre comumente nas doenças inflamatórias, promove uma resposta exagerada da via aérea aos agentes constrictores. Neste sentido, para a execução deste trabalho foram consideradas, no seu desenvolvimento, amostras de traquéia isolada de ratos com e sem epitélio, para averiguação mais fidedigna das propriedades antiespasmódicas do OECs sobre o MLVA.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1) Geral**

Avaliar as ações farmacológicas de diferentes amostras de óleo essencial de *Croton sonderianus* na contratilidade da musculatura lisa da traquéia.

### **2.2) Específicos**

Investigar os efeitos do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre o tônus basal da traquéia isolada de ratos.

Caracterizar o efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre o músculo liso da traquéia, estudando sua atividade sobre as contrações desse músculo induzidas por potássio (acoplamento eletromecânico) e acetilcolina (acoplamento farmacomecânico).

Verificar o papel desempenhado pelo epitélio da via aérea nas ações do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre músculo liso traqueal.

Investigar a participação do  $\text{Ca}^{2+}$  no(s) possível (is) mecanismo(s) de ação deste óleo essencial sobre a contratilidade do músculo liso da traquéia de ratos.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1) MATERIAL**

##### **3.1.1) Sais e soluções fisiológicas**

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas são de grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagem (Rio de Janeiro, RJ, Br). As concentrações estão expressas em milimol/litro (mM) ou micromol/litro ( $\mu$ M).

Cloridrato de acetilcolina (ACh), polyoxyethylenesorbitan Tristearate ou Tween 80 (TW) e ácido etileno-bis ( $\beta$ -amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA) foram adquiridos da Sigma Chemical Corporation.

Foi utilizada solução nutritora de Tyrode modificada (TM), com a seguinte composição, em mM: NaCl 136; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; CaCl<sub>2</sub> 2,0 e glicose 5,0. A solução nutritora foi mantida em aeração constantemente por borbulhamento de ar, à temperatura de 37°C e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH 1M.

A solução de Tween 80 a 0,5% foi preparada diluindo-se TW diretamente em TM e em seguida agitando-se manualmente.

O OECs foi utilizado a partir de soluções estoques, preparadas através da diluição do óleo em solução de TM + TW, com homogeneização por agitação manual.

As adições de OECs, cloreto de potássio (KCl) e acetilcolina (ACh) foram feitas de forma hipertônica, ou seja, estas substâncias foram adicionadas em volumes específicos diretamente no banho para atingir as concentrações finais desejadas nas câmaras de órgão isolado.

A solução livre de cálcio ou “zero cálcio” ( $0Ca^{2+}$ ) foi preparada por omissão de  $CaCl_2$  da solução de TM e adição de 0,2 mM de EGTA.

### **3.1.2) Óleo essencial de *Croton sonderianus* (OECs)**

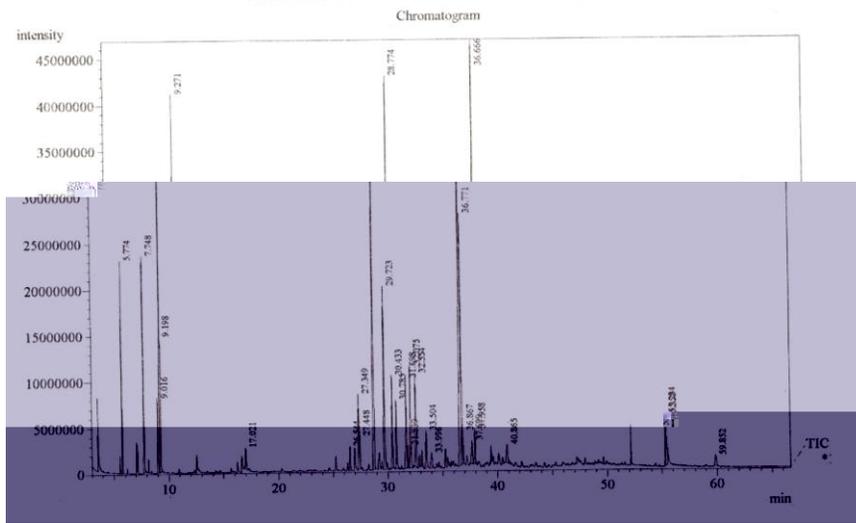
As amostras de OECs utilizadas neste trabalho provêm de plantas coletadas no município de Viçosa do Ceará. Uma das amostras advém de plantas coletadas no horário de 21 horas (OECs 21) enquanto para a outra amostra as plantas foram coletadas às 13 horas (OECs 13). A coleta foi realizada por uma equipe conduzida pelo Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso e a identificação botânica da espécie foi confirmada pelo doutor Afrânio Fernandes, da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Amostras das plantas foram depositadas no herbário Prisco Bezerra (UFC).

A extração do óleo essencial foi feita no laboratório de química da Universidade Estadual do Ceará, através do método de hidrodestilação ou arraste por vapor d'água.

As amostras foram analisadas no Parque de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal do Ceará (PADETEC/UFC) e a composição de cada uma foi determinada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (Figura 3). Os espectros de massa foram comparados com espectros que constam no computador do espectrômetro de massa e foram confirmados pelo índice Kovats (CRAVEIRO *et al.*, 1984).

A composição das diferentes amostras de OECs é mostrada nas tabelas 1 e 2.

a



b



**Figura 3:** Cromatograma do OECs 21 (a) e OECs 13 (b).

**FONTE:** Parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará (PADETEC/UFC)

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton sonderianus* (amostra de 21 hs), coletado em abril de 2004, na cidade de Viçosa do Ceará.

<b>Composto</b>	<b>Conteúdo (%)</b>
Espatuleno	18,32
$\beta$ -cariofileno	14,58
Óxido de cariofileno	8,54
1,8-cineol	8,38
Aromadendreno	6,42
Mirceno	4,18
$\alpha$ -selineno	4,02
$\beta$ -selineno	3,59
Germacreno-D	3,30
$\alpha$ -pineno	3,18
$\beta$ -felandreno	3,03
$\alpha$ -humuleno	2,83
Alloaromadendreno	2,31
p-cimeno	1,77
$\gamma$ -cadineno	1,29
Epóxido de humuleno	1,19
$\beta$ -elemeno	0,90
$\alpha$ -cubebeno	0,77
$\delta$ -cadineno	0,76
Globulol	0,76
<b>Total identificado</b>	<b>90,12</b>

**Tabela 2.** Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton sonderianus* (amostra de 13 hs), coletado em julho de 2005 na cidade de Viçosa do Ceará.

<b>Composto</b>	<b>Conteúdo (%)</b>
Biclogermacreno	16,29
$\beta$ -felandreno	15,42
$\beta$ -cariofileno	13,82
$\alpha$ -pineno	9,87
Espatuleno	9,09
$\beta$ -pineno	5,53
Aromadendreno	4,70
Germacreno-D	3,63
Mirceno	3,43
$\alpha$ -humuleno	2,30
$\delta$ -cadineno	2,16
Alloaromadendreno	2,10
$\gamma$ -muruoleno	1,66
Sabineno	1,41
$\alpha$ -felandreno	1,38
$\beta$ -selineno	0,99
Globulol	0,97
$\alpha$ -copaeno	0,96
$\beta$ -burbuneno	0,91
$\alpha$ -tujeno	0,73
Canfeno	0,67
$\gamma$ -cadineno	0,62
$\gamma$ -terpineno	0,46
$\beta$ -pineno	0,35
<b>Total identificado</b>	<b>99,45</b>

### **3.1.3) Animais**

Foram utilizados ratos albinos, *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, do sexo masculino, com massa corporal entre 250-350 gramas, provenientes do biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais foram mantidos em caixa de propileno em ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram realizados obedecendo-se aos padrões éticos de manipulação e utilização de animais experimentais estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

## **3.2) MÉTODOS**

### **3.2.1) Preparação *in vitro* e mensuração da atividade contrátil**

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e em seguida pesados. As regiões cervical e torácica foram abertas cirurgicamente por incisão longitudinal para exposição dos órgãos internos, seguida do afastamento das glândulas e músculos e cuidadosa remoção da traquéia. Esta foi rapidamente transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva TM e manuseada para eliminação dos tecidos anexos e seccionamento de segmentos transversos circulares, cada um contendo 3-5 anéis cartilagosos traqueais.

Foram realizados alguns experimentos onde a traquéia foi cuidadosamente manuseada para preservar o epitélio, enquanto em outros experimentos o epitélio foi retirado mecanicamente através da inserção de hastes com algodão na superfície interna do anel de traquéia.

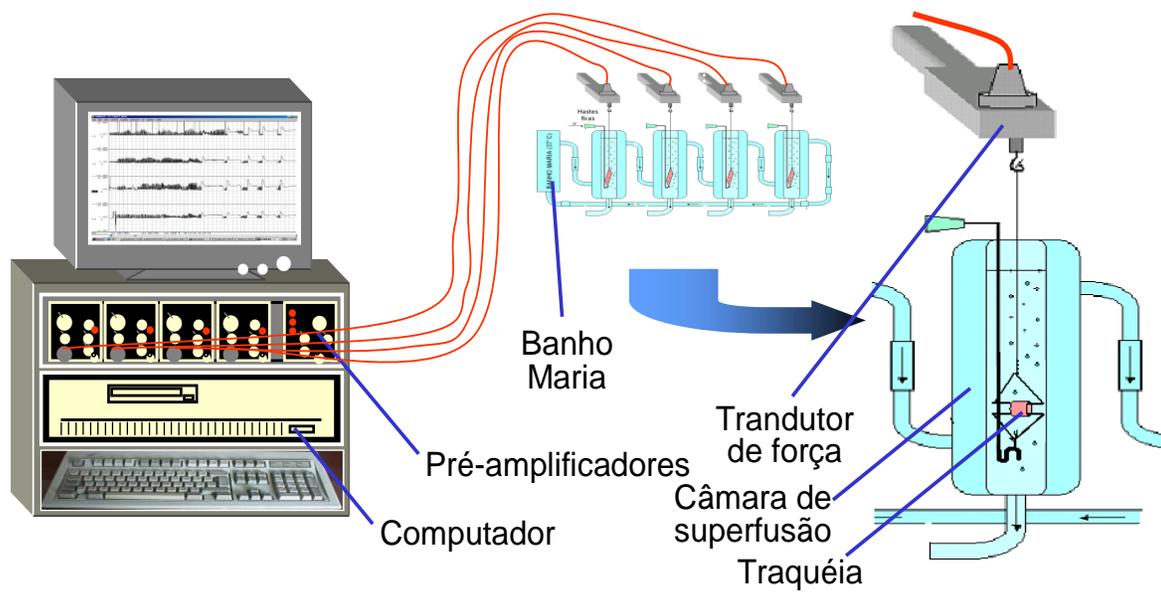
Quatro segmentos traqueais foram montados verticalmente em câmaras para órgão isolado com 5 ml de capacidade, contendo solução de TM oxigenada por borbulhamento de ar, mantida a 37°C e pH 7,40.

Em uma das extremidades, a preparação foi conectada a uma base fixa, enquanto a outra foi conectada a um transdutor de força do tipo “Strain Gage” (Grass Instruments, modelo FT.03, Quincy, Mass, EUA) através de fixadores triangulares de aço inoxidável ligados a fio de algodão.

As respostas musculares mecânicas, geração de força ou relaxamento, foram transformadas em sinal elétrico por um transdutor de força conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA) e este na entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada num computador IBM Pentium. Os dados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ versão 1,65 (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para posterior análise (Figura 4).

Após a montagem da preparação, o tecido foi submetido à estabilização sob tensão de 1 grama por uma hora, para manutenção do tensionamento fisiológico. Em seguida foi considerado como zero, linha de base ou tônus basal da preparação, o valor de tensão no qual ela se estabilizou. Alterações desta linha para cima foram consideradas como contrações e para baixo, como relaxamento.

Os experimentos foram realizados de forma a sempre existirem 4 peças de traquéia montadas em paralelo, onde 2 eram expostas ao OECs e 2 ao veículo (TM + TW). Estas preparações, controles e experimentais, foram submetidas a situações idênticas.



**Figura 4:** Representação esquemática do sistema de registro das respostas musculares mecânicas  
**FONTE:** Desenho elaborado por João Luís Carvalho de Souza – Laboratório de Eletrofisiologia –  
 Universidade Estadual do Ceará

### **3.2.2) Análise Histológica**

Após os protocolos experimentais a preparação foi cuidadosamente retirada do sistema e colocada em recipientes que foram submersos em solução formaldeído 10%. Em seguida, os anéis traqueais foram incluídos em parafina e seccionados em fragmentos de aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$  de espessura, que foram analisados ao microscópio óptico.

Foram utilizados anéis traqueais com e sem desnudamento mecânico do epitélio. Alguns segmentos de traquéia não foram montados nos fixadores triangulares de aço inoxidável e submetidos à tensão de 1 g. Esses segmentos foram expostos ao OECs e ao veículo seguindo o mesmo protocolo experimental dos experimentos com registro de tensão, para verificar-se se o OECs lesava o epitélio.

### **3.2.3) Protocolos experimentais**

Foram realizadas curvas concentração-resposta para determinar os efeitos do de OECs sobre o músculo liso traqueal de ratos. Elas foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações crescentes de OECs , cumulativas ou não, adicionadas diretamente ao banho, por período suficiente para a formação de um platô de resposta, para cada concentração.

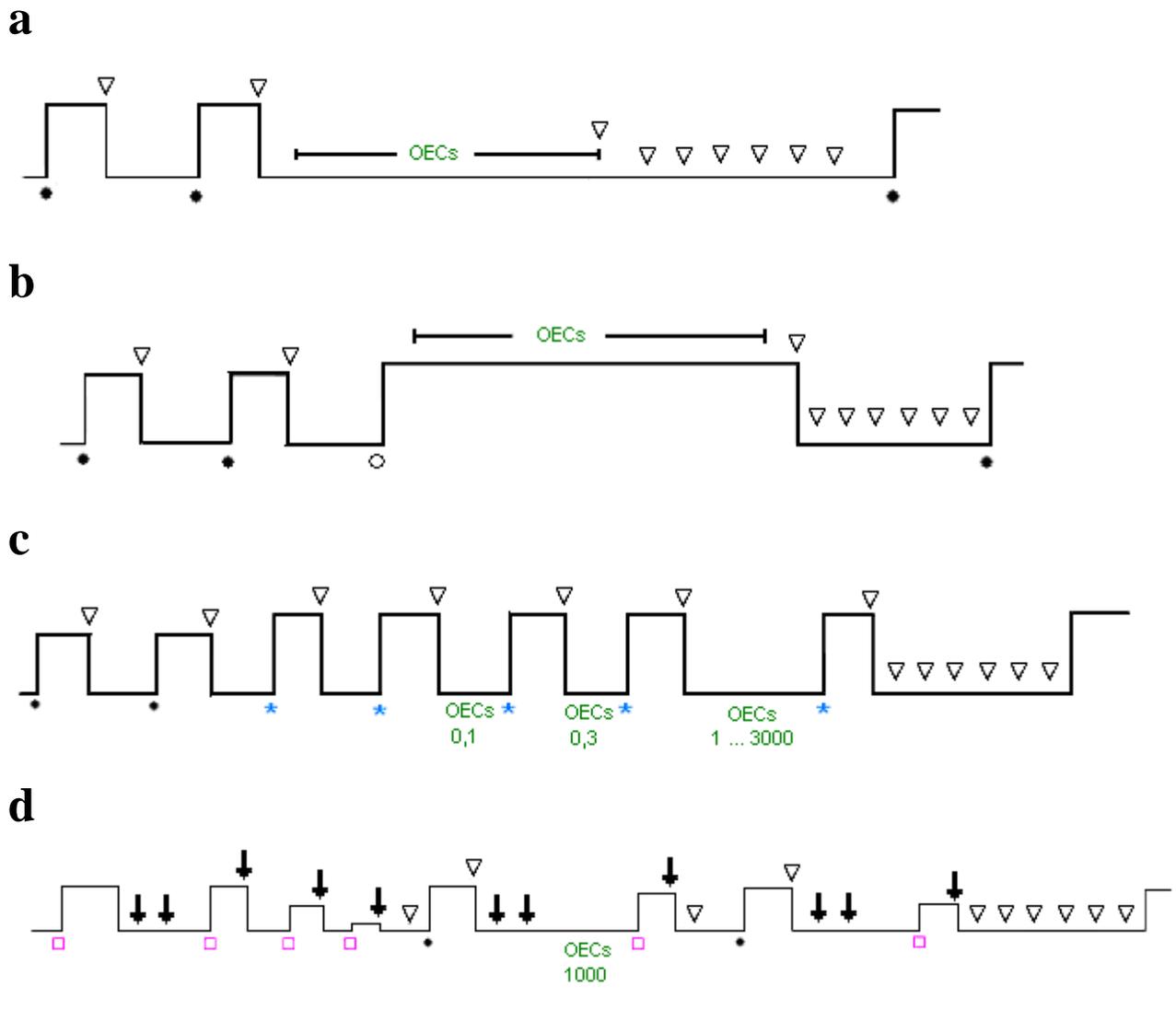
Os protocolos descritos a seguir

Os efeitos do OECs sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de ratos foram testados através da administração de concentrações crescentes e cumulativas de OECs diretamente na câmara contendo os anéis de traquéia (Figura 6a)

Para avaliar os efeitos do OECs sobre contrações induzidas por  $K^+$  (Figura 6b) foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas destas substâncias à preparação pré-contraída por 80 mM de KCl ( $K_{80}$ ).

Em outro protocolo, a preparação foi exposta a contrações induzidas por ACh (10 $\mu$ M) na ausência e em seguida, na presença de concentrações crescentes e não-cumulativas de OECs, a fim de averiguar a capacidade destas substâncias em inibir uma contração subsequente de ACh (Figura 6c).

Os efeitos do OECs sobre o componente da contração induzida por ACh que independe de  $Ca^{2+}$  extracelular também foram avaliados, visando elucidar a participação do cálcio extracelular no efeito destas substâncias. Para tanto, foi induzida uma contração em resposta a 60  $\mu$ M de ACh, em meio  $0Ca^{2+}$  em presença e ausência de OECs. (Figura 6d)



**Figura 5. Desenho representativo dos protocolos realizados**

- a. Efeito do OECs sobre o tônus espontâneo da traquéia isolada de ratos.
- b. Efeito do OECs sobre contrações submaximais induzidas por K<sup>+</sup> (80mM)
- c. Efeito do OECs sobre as contrações induzidas por ACh (10µM)
- d. Efeito do OECs sobre as contrações induzidas por ACh(60µM) em meio 0Ca<sup>2+</sup>

∇ indica lavagem com solução TM; OECs indica a adição de concentrações crescentes (cumulativas ou não) de OECs; o número logo abaixo de OECs indica a concentração em que o óleo foi usado (em µg/ml); • indica contração evocada por 60mM de K<sup>+</sup> e ○, por 80mM de K<sup>+</sup>; \* representa contração evocada por 10µM de ACh e □ indica contração por 60 µM de ACh; ↓ indica a solução nutritora isenta de Ca<sup>2+</sup>

### **3.2.4) Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n), onde n representa o número de experimentos. Os gráficos foram produzidos através do software Sigma Plot 9.0 e foi utilizado o software Sigma Stat 3.1 para a análise estatística.

Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t pareado ou não e para mais de dois grupos experimentais, análise de variância (ANOVA), seguido de técnica de contraste (testes paramétricos ou não paramétricos), conforme apropriado.

As  $IC_{50}$  foram calculadas por interpolação semi-logarítmica a partir dos experimentos individuais, sendo consideradas neste trabalho como a concentração da substância capaz de produzir 50% de seu efeito máximo.

## 4- RESULTADOS

### 4.1) Análise Histológica

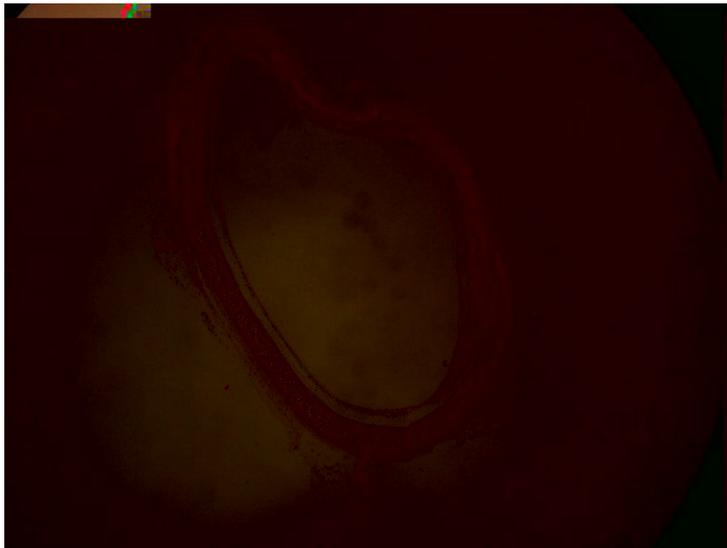
A análise histológica foi realizada em preparações com e sem desnudamento do epitélio. Ambas apresentaram características histológicas normais, mas foi possível perceber a preservação do epitélio nos segmentos que foram manipulados de forma a não agredí-lo. Também foi observado que o método utilizado para a remoção mecânica do epitélio foi eficaz, visto que a superfície interna da traquéia foi desepitelizada e houve preservação do tecido conjuntivo da mucosa, a lâmina própria.

As diferenças observadas nestas preparações experimentais em relação às que não foram montadas nos fixadores triangulares consistem em pequenas zonas com ausência de epitélio e compressão do tecido conjuntivo no local onde os triângulos sustentavam os segmentos traqueais. Isto ocorreu porque as preparações não foram bem feitas.

**a**



**b**



**FIGURA 6:** Fotos dos cortes histológicos dos segmentos de traquéia com epitélio íntegro (a) e com desnudamento do epitélio (b).

**FONTE:** Fotos realizadas no laboratório de histologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), cedidas pelo Prof. Ms. Gerson Abreu

## 4.2) Protocolos experimentais

As duas amostras do óleo essencial de *Croton sonderianus*, de 21 e 13 horas (OECs 21 e OECs 13, respectivamente) foram testadas sobre o tônus basal e a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos.

Visando à caracterização da resposta máxima, OECs 21 foi utilizado na faixa de concentração entre 0,1 – 3000 µg/ml, enquanto a amostra de 13 horas foi utilizada na faixa de concentração de 0,1 – 5000 µg/ml. Para lavagens da preparação durante 60 minutos após a exposição ao óleo essencial, quando as concentrações de OECs 21 e OECs 13 foram inferiores a 1000 e 3000 µg/ml, respectivamente, houve recuperação.

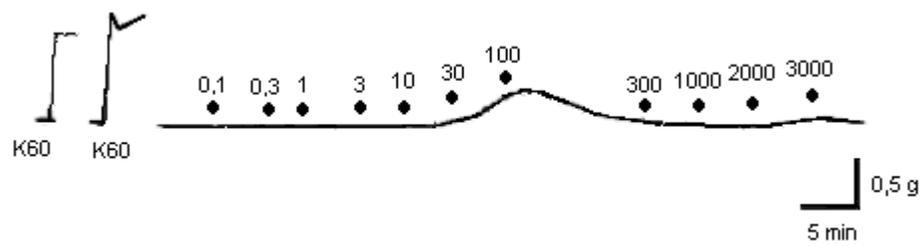
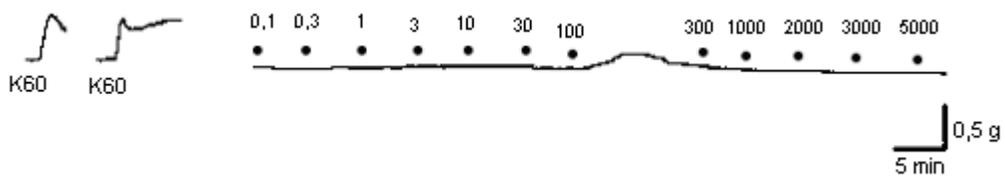
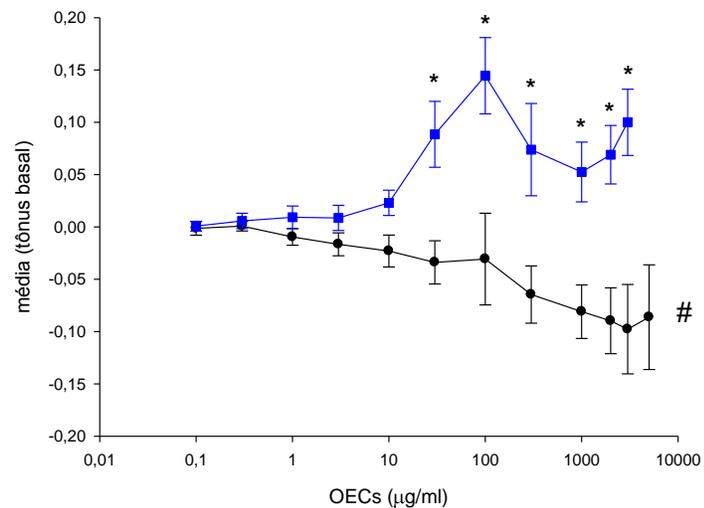
As respostas de modificação do tônus basal e alterações na resposta contrátil a agonistas específicos foram quantificadas e os resultados são apresentados a seguir.

#### **4.2.1) Efeito próprio do OECs sobre o tônus espontâneo da traquéia isolada de ratos na presença de epitélio.**

As duas amostras de OECs (13 e 21 horas) foram testadas no tônus basal do músculo liso traqueal de ratos, em preparações com epitélio íntegro.

O OECs 21 foi utilizado na faixa de concentração compreendida entre 0,1 e 3000 µg/ml. Abaixo de 10 µg/ml OECs 21 não alterou significativamente o tônus basal, porém entre 10 e 3000 µg/ml promoveu um aumento do tônus basal do músculo liso traqueal, que atingiu um valor máximo em 100 µg/ml ( $0,144 \pm 0,036$  g, n=8), quando a contração induzida pelo OECs foi aproximadamente 19% da contração induzida por 60 mM de  $K^+$ . Este efeito contraturante foi estatisticamente significativo em relação ao controle (One way ANOVA).

OECs 13 (0,1 – 5000 µg/ml) apresentou efeito relaxante, que foi dependente de concentração e estatisticamente significativo em relação ao controle (Two Way ANOVA), (Figura 7).

**a****b****c**

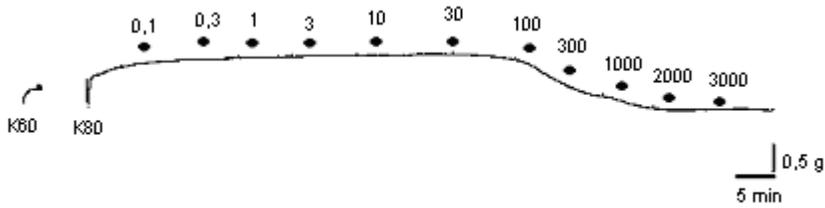
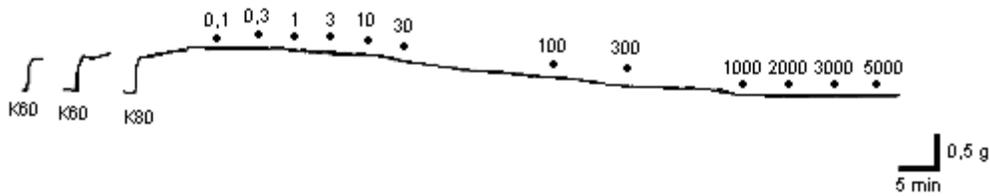
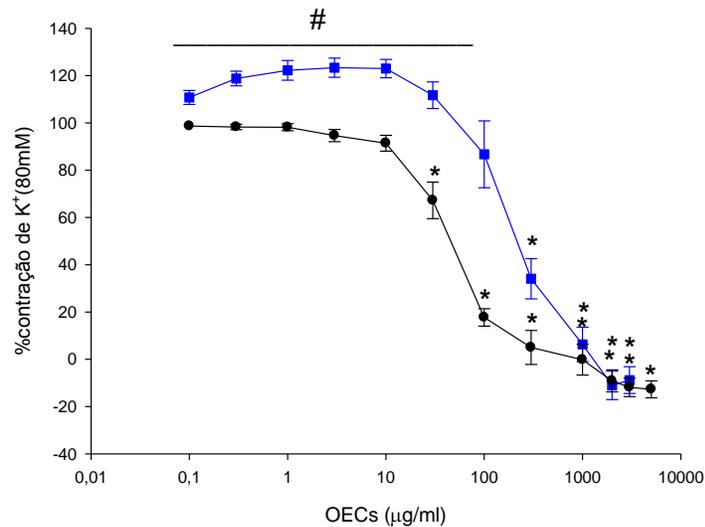
**Figura 7 . Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostras de 21 hs (OECs 21) e 13 hs (OECs13) sobre o tônus muscular basal da traquéia isolada de ratos. a) Traçado representativo do efeito do OECs 21 sobre o tônus basal. b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre o tônus basal. K60 contração induzida por 60 mM de  $K^+$ ; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 21 (a) e OECs 13 (b). c) Gráfico representativo dos efeitos do OECs 21 e OECs 13 sobre o tônus basal da traquéia (média  $\pm$  E.P.M.).  $\blacksquare$  OECs 21;  $\bullet$  OECs 13; \* valor significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ , ANOVA “on Ranks” seguido de Tukey); # curva significativa em relação à curva controle ( $p < 0,05$ , Two Way ANOVA).**

#### **4.2.2) Efeito do OECs sobre as contrações mantidas induzidas por 80 mM de K<sup>+</sup> em traquéia isolada de ratos com epitélio íntegro.**

Os efeitos do OECs 21 (0,1 – 3000 µg/ml) e OECs 13 (0,1 – 5000 µg/ml) sobre a contratura potássica foram testados através da administração de concentrações crescentes e cumulativas destes óleos sobre as contrações induzidas por 80 mM de K<sup>+</sup>. Em cada concentração do OECs esperou-se o tempo necessário para a formação de um platô de resposta.

As duas amostras de óleo essencial de *Croton sonderianus* apresentaram efeito inibitório, dependente de concentração, sobre preparações em que foi empregada alta concentração de K<sup>+</sup>, apresentando como efeito máximo o relaxamento do músculo liso traqueal para valores de força inferiores aos da linha de base (Figura 8). O OECs 13 apresentou esse efeito relaxante em concentrações iguais ou superiores a 30 µg/ml. As IC<sub>50</sub> para este efeito foram de 174,31 ± 25,25 µg/ml (n=8) e 45,51 ± 7,58 µg/ml (n=8) para OECs 21 e OECs 13, respectivamente. Estas IC<sub>50</sub> foram comparadas através de seus limites de confiança 95% e mostraram diferença estatisticamente significativa.

Foi observado, adicionalmente, que OECs 21 administrado diretamente ao banho, entre 0,1 – 30 µg/ml, apresentou efeito amplificador da contração induzida por K<sup>+</sup> que foi estatisticamente significativa em relação ao controle (Two way ANOVA).

**a****b****c**

**Figura 8. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostras de 21 hs (OECs 21) e 13 hs (OECs13) sobre as contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 80 mM de K<sup>+</sup>. a) Traçado representativo do efeito do OECs 21 sobre a contração induzida por K<sup>+</sup>. b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre a contração induzida por K<sup>+</sup>. K60 contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>; K80 contração induzida por 80 mM de K<sup>+</sup>; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 21 (a) e OECs 13 (b). c) Gráfico representativo dos efeitos de OECs 21 e OECs 13 sobre as contrações induzidas por 80 mM de K<sup>+</sup>, (média ± E.P.M.). —■— OECs 21; —●— OECs 13; \* valor significativo em relação ao controle (p<0,05, One Way ANOVA); # segmento da curva (0,1 a 30 mg/ml) significativo em relação à curva controle (p<0,05, Two Way ANOVA).**

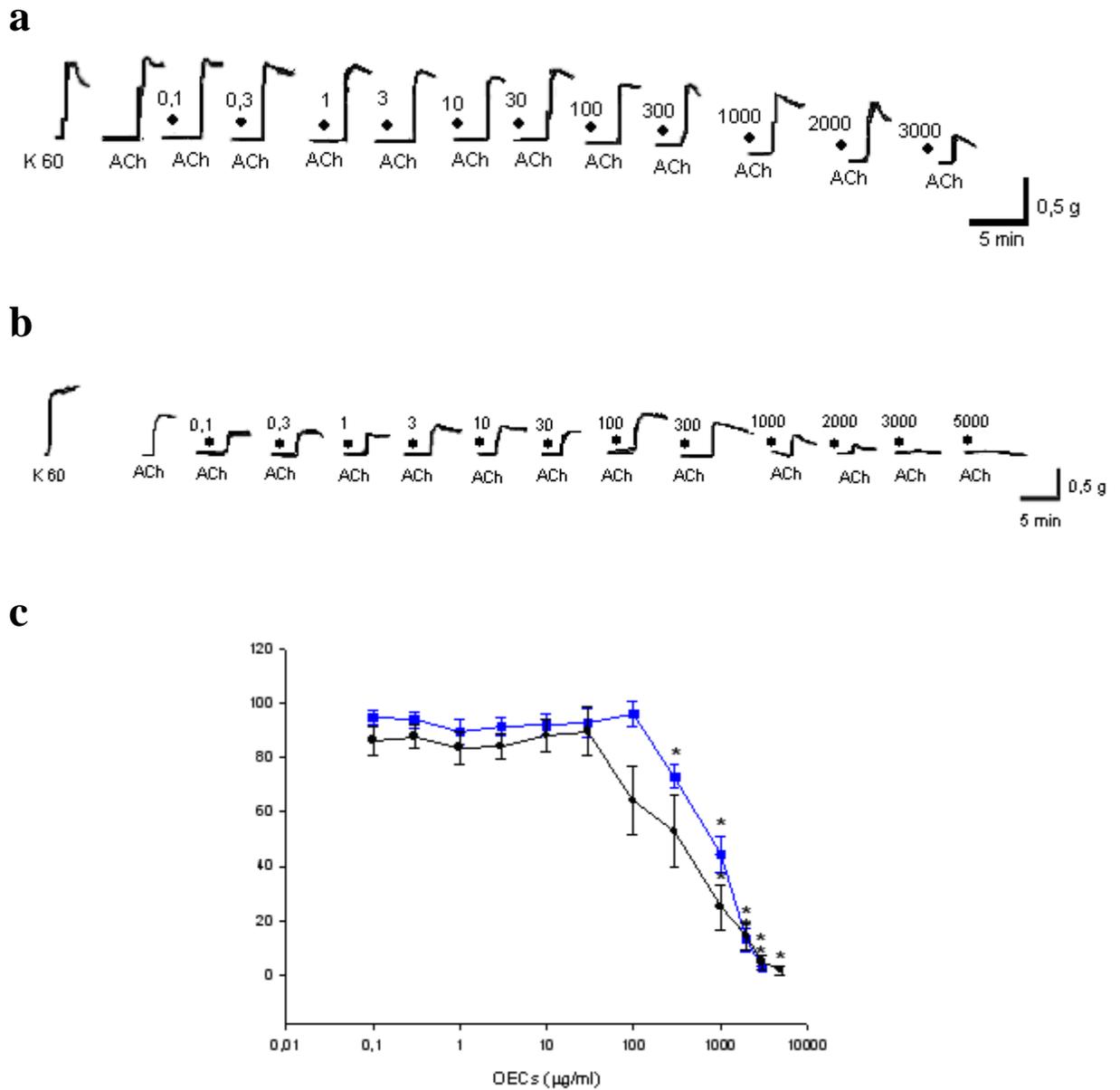
#### **4.2.3) Efeito do OECs sobre contrações de traquéia isolada de ratos com epitélio íntegro promovidas por 10 $\mu$ M de acetilcolina.**

Foram pesquisados os efeitos das duas amostras de óleo, OECs 21 e OECs 13, administradas de forma crescente e não-cumulativa sobre as contrações submaximais induzidas por 10  $\mu$ M de ACh.

OECs 21 foi capaz de inibir quase completamente as contrações induzidas por ACh, de maneira dependente de concentração (Figura 9). O efeito máximo foi observado na concentração de 3000  $\mu$ g/ml, quando a preparação relaxou cerca de 97% em relação à contração inicial e a  $IC_{50}$  foi  $825,56 \pm 158,79$   $\mu$ g/ml, n=13.

Foi possível observar que o efeito inibidor máximo do OECs 13 foi bem semelhante ao do OECs 21, elicitando o bloqueio de aproximadamente 98% da contração induzida por ACh na ausência do óleo, na concentração de 5000  $\mu$ g/ml. A  $IC_{50}$  para este efeito relaxante foi de  $404,29 \pm 99,93$   $\mu$ g/ml, n=8.

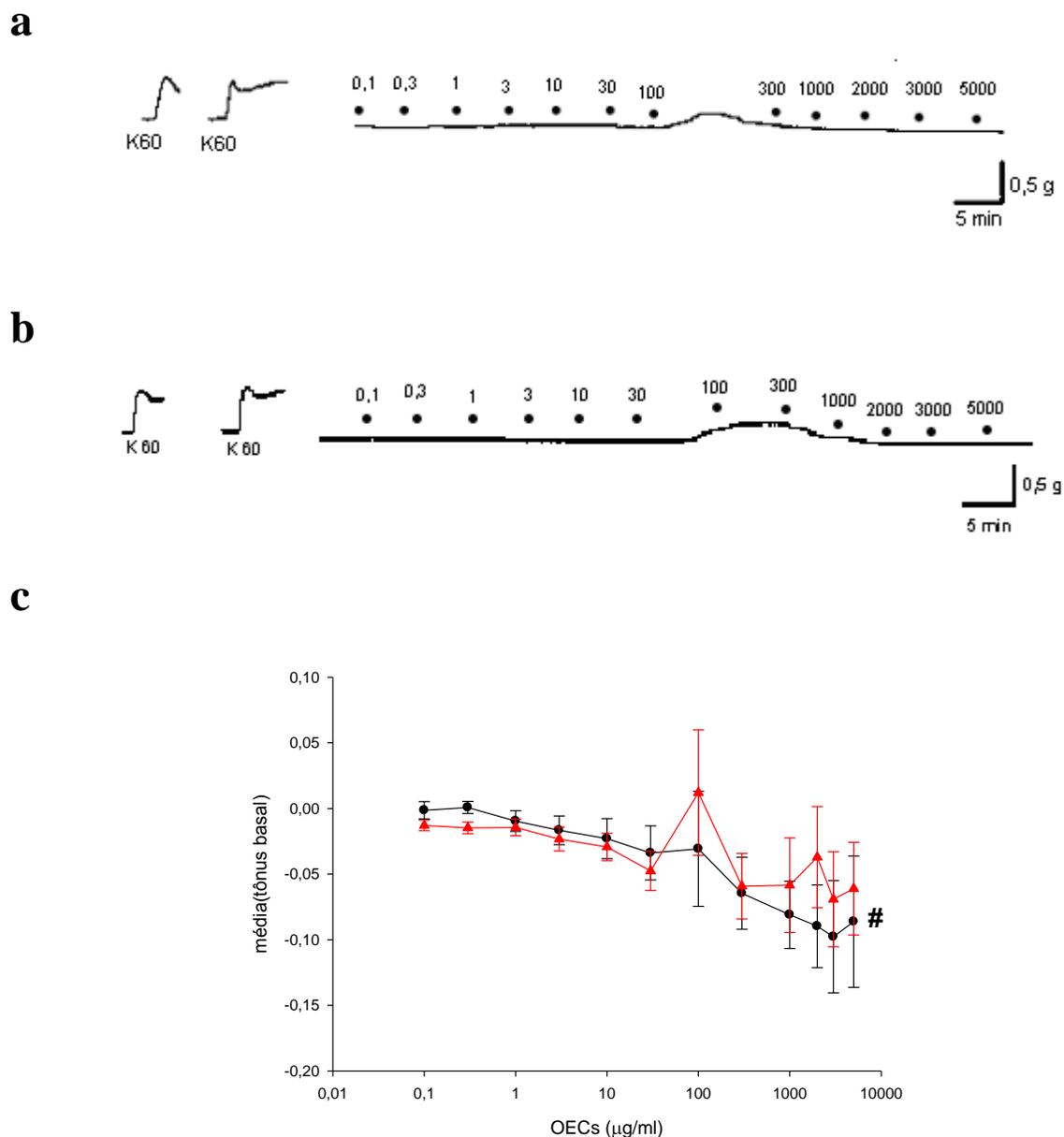
As  $IC_{50}$  foram comparadas através da análise de seus limites de confiança de 95% e não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.



**Figura 9. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostras de 21 hs (OECs 21) e 13 hs (OECs13) sobre as contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 10 µM de ACh. a) Traçado representativo do efeito do OECs 21 sobre as contrações induzidas por ACh. b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh. K60 contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>; ACh contração induzida por 10µM de ACh; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 21 (a) e OECs 13 (b). c) Gráfico representativo dos efeitos de OECs 21 e OECs 13 sobre as contrações induzidas por 10µM de ACh, (média ± E.P.M.). ■ OECs 21; ● OECs 13; \* valor significativo em relação ao controle (p<0,05, One Way ANOVA).**

Tendo em vista que a amostra de OECs 13 apresentou maior potência farmacológica no protocolo de reversão da contratatura potássica e considerando ainda a maior especificidade de efeito relaxante que este óleo apresenta, visto que OECs 21 apresentou efeito contraturante sobre o tônus basal e em pequenas concentrações, efeito contraturante adicional sobre as contrações induzidas por  $K^+$ , foi escolhida a amostra OECs 13 para a realização de estudos adicionais, visando uma melhor caracterização de seu efeito sobre a traquéia isolada de ratos. Levando em consideração a importância do epitélio da via aérea na modulação da contratilidade do músculo liso traqueal, investigaram-se os efeitos do OECs 13 em preparações de traquéia com epitélio removido.

Foram realizados

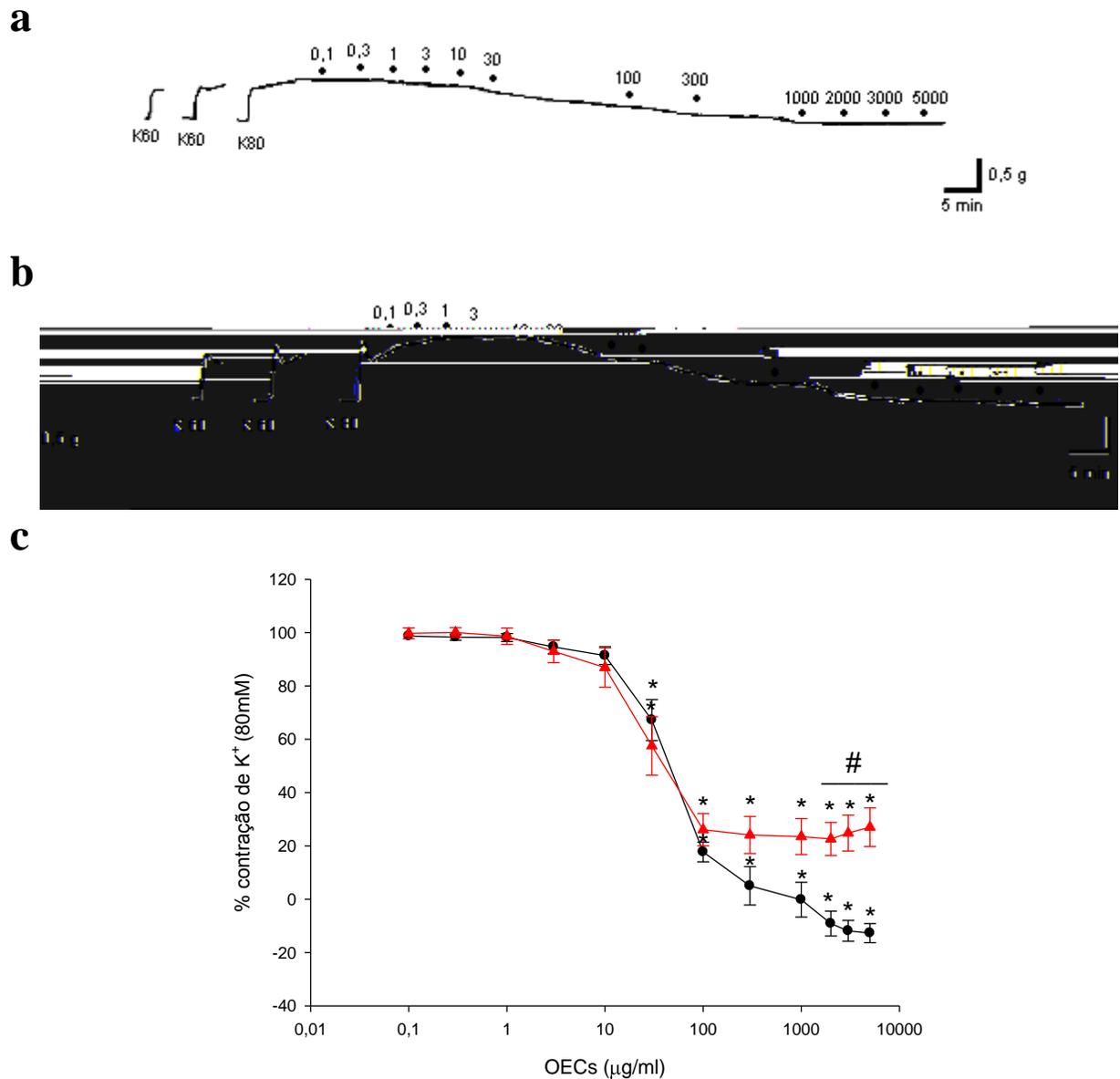


**Figura 10. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre o tônus muscular basal da traquéia isolada de ratos, na presença e na ausência de epitélio. a) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre o tônus basal, na presença e epitélio b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre o tônus basal, na ausência de epitélio. K60 contração induzida por 60 mM de  $K^+$ ; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 13. c) Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre o tônus basal da traquéia, na presença e na ausência de epitélio (média  $\pm$  E.P.M.).  $\bullet$  OECs 13 (preparações com epitélio);  $\blacktriangle$  OECs 13 (preparações sem epitélio); # curva significativa em relação à curva controle ( $p < 0,05$ , Two Way ANOVA).**

#### **4.2.5) Comparação entre o relaxamento promovido pelo OECs 13 em traquéia isolada de ratos despolarizada com 80 mM de K<sup>+</sup>, na presença e na ausência de epitélio.**

OECs 13 promoveu relaxamento nas preparações pré-contraídas por 80 mM de K<sup>+</sup>, na presença e na ausência de epitélio (Figura 11). Nas preparações com epitélio íntegro foi possível perceber que o efeito máximo ocorreu com relaxamento total do músculo liso traqueal (tônus abaixo da linha de base), enquanto naquelas em que o epitélio foi removido o efeito máximo, que ocorreu na concentração de 2000 µg/ml, correspondeu a uma redução da contração para 22,62% do valor de estado estacionário da contração induzida pelo K<sup>+</sup>. A IC<sub>50</sub> para este efeito foi de 26,03 ± 1,82 µg/ml (n=8) nas preparações sem epitélio e de 45,51 ± 7,58 µg/ml (n=8) na presença de epitélio.

O efeito máximo, que em ambas as preparações ocorreu entre 2000 – 5000 µg/ml, apresentou diferenças estatisticamente significantes entre elas (p<0,05; comparação entre valores dos efeitos promovidos por OECs 2000 – 5000 µg/ml nas preparações com e sem epitélio por ANOVA bidimensional).



**Figura 11. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre as contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 80 mM de  $K^+$ , na presença e na ausência de epitélio. a) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre a contração induzida por  $K^+$ , na presença de epitélio b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre a contração induzida por  $K^+$ , na ausência de epitélio. K60 contração induzida por 60 mM de  $K^+$ ; K80 contração induzida por 80 mM de  $K^+$ ; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 13. c) Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre a contração induzida por 80 mM de  $K^+$ , na presença e na ausência de epitélio (média  $\pm$  E.P.M.).  $\bullet$ — OECs 13 (preparações com epitélio);  $\blacktriangle$ — OECs 13 (preparações sem epitélio); \* valor significativo em relação ao controle ( $p < 0,05$ , One Way ANOVA); # curva significativa em relação à curva controle ( $p < 0,05$ , Two Way ANOVA).**

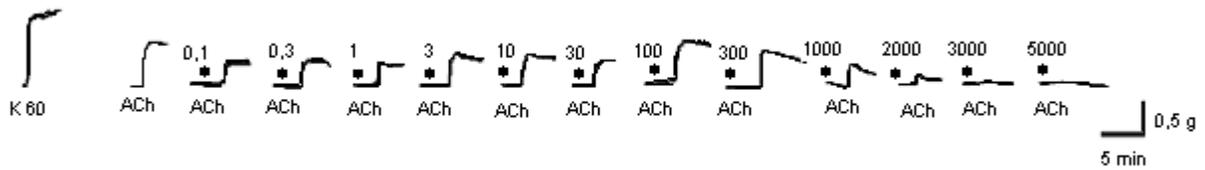
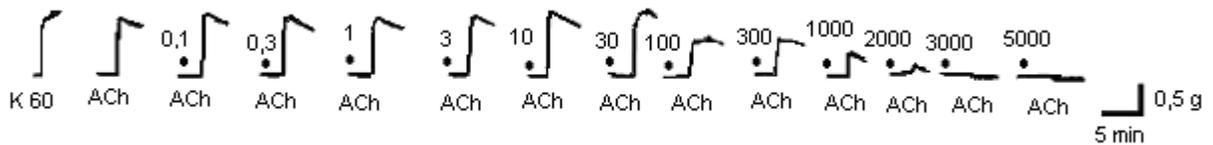
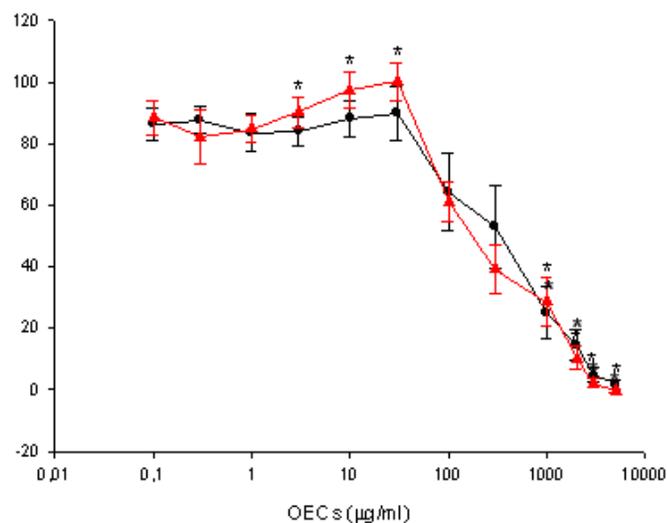
#### **4.2.6) Comparação entre os efeitos promovidos pelo OECs 13 sobre as contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por acetilcolina, em preparações com e sem epitélio.**

Foram avaliados os efeitos do OECs 13 nas contrações submaximais promovidas por ACh em experimentos realizados em preparações com epitélio e em outros realizados com anéis de traquéia desepitelizados.

A média dos valores absolutos da contração induzida por ACh 10  $\mu$ M em preparações com e sem desnudamento do epitélio foram  $1,050 \pm 0,152$  g (n=8) e  $1,137 \pm 0,078$  g (n=8), respectivamente.

O OECs 13, em contato prévio com a preparação por 10 minutos (ou intervalo de tempo suficiente para a formação de um platô de resposta) antes da adição do agonista, bloqueou cerca de 98% da contração induzida por ACh na presença de epitélio ( $0,088 \pm 0,070$  g, n=8). Nas preparações em que foi removido o epitélio o bloqueio foi além da linha de base ( $-0,001 \pm 0,006$  g, n=8), (Figura 12). Estes efeitos máximos ocorreram quando foram administradas as concentrações 5000  $\mu$ g/ml em ambas preparações e os valores de  $IC_{50}$  para este efeito relaxante foram de  $404,29 \pm 99,93$  e  $284,86 \pm 117,15$  para preparações com e sem epitélio, respectivamente. A análise do intervalo de confiança de 95% para estas  $IC_{50}$  mostra que estas não apresentam diferenças estatisticamente significantes.

O gráfico mostra que em preparações sem epitélio, OECs 13 apresentou efeito contraturante adicional entre 3 e 30  $\mu$ g/ml, que foi estatisticamente significativo em relação ao controle (One Way ANOVA), com a força máxima de contração atingindo um valor de 100,28 % para a concentração de 30  $\mu$ g/ml.

**a****b****c**

**Figura 12. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre as contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 10  $\mu$ M de ACh, na presença e na ausência de epitélio. a) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh, na presença de epitélio b) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh, na ausência de epitélio. K60 contração induzida por 60 mM de  $K^+$ ; ACh contração induzida por 10  $\mu$ M de ACh; pontos sobre o traçado experimental mostram o momento da aplicação de uma dada concentração (número imediatamente acima do ponto) do OECs 13. c) Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por 10  $\mu$ M de ACh na presença e na ausência de epitélio (média  $\pm$  E.P.M.). —●— OECs 13 (preparações com epitélio); —▲— OECs 13 (preparações sem epitélio); \* valor significante em relação ao controle ( $p < 0,05$ , One Way ANOVA).**

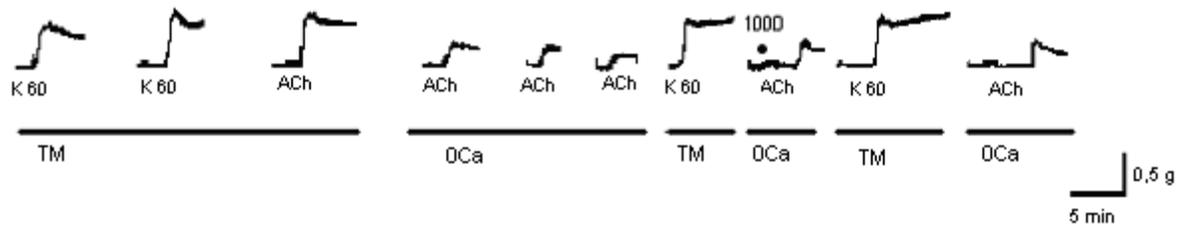
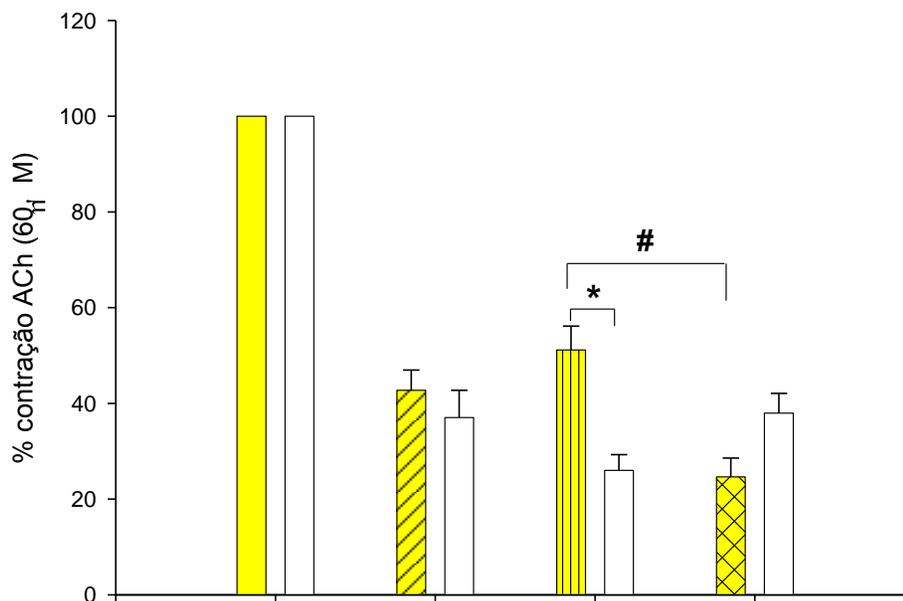
#### **4.2.7) Efeito do OECs 13 sobre a indução de contração de 60 $\mu$ M de ACh em meio isento de Ca<sup>2+</sup> no músculo liso traqueal de ratos, na presença e na ausência de epitélio.**

Para elucidar o efeito do Ca<sup>2+</sup> extracelular na ação do OECs 13 foi realizado o protocolo em que foi observado o efeito de uma alta concentração de OECs 13 na contração induzida por 60  $\mu$ M de ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup>.

Observou-se que, em meio 0Ca<sup>2+</sup>, as amplitudes das sucessivas contrações evocadas por ACh (60 $\mu$ M) foram progressivamente reduzidas, sugerindo a depleção dos estoques intracelulares, ou seja, do RS (BOURREAU *et al.*, 1991).

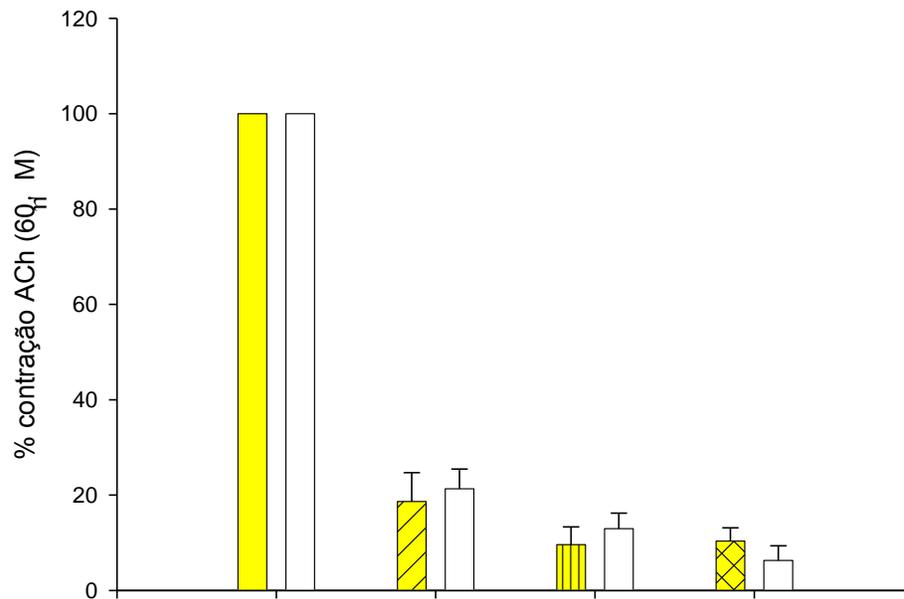
Na presença de epitélio, considerando-se o componente fásico de cada contração (picos de contração), a amplitude da primeira contração promovida por ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup> foi de 42,74  $\pm$  4,23 % da contração controle (1,13  $\pm$  0,07 g, n=8), isto é, aquela promovida por 60  $\mu$ M de ACh em meio contendo Ca<sup>2+</sup> (TM). Em presença de 1000  $\mu$ g/ml de OECs 13 a contração induzida por ACh em meio isento de Ca<sup>2+</sup> foi de 51,15  $\pm$  4,99% da contração de ACh em TM (Figura 12). Por conseguinte, não houve diferença estatisticamente significativa entre as contrações do mesmo grupo experimental evocadas por ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup>, na presença ou não de OECs 13 (ANOVA on ranks), em preparações com epitélio íntegro.

No entanto, comparando-se a preparação experimental com o controle externo (no qual foi administrado apenas o veículo), na etapa intermediária do protocolo, ou seja, no momento da administração de OECs 13 (nas preparações experimentais), as amplitudes de contração entre preparações experimentais e controles mostraram diferenças estatisticamente significantes (One way ANOVA seguido de Holm-Sidak), (Figura 13).

**a****b**

**Figura 13. Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre os valores máximos do componente fásico (picos) das contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 60  $\mu$ M de ACh, na presença de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup>. a) Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh, na presença de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup>. K60 contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>; ACh contração induzida por 60  $\mu$ M de ACh; ponto sobre o traçado experimental mostra o momento da aplicação de OECs 13 (1000  $\mu$ g/ml); 0Ca<sup>2+</sup> solução nutritiva isenta de Ca<sup>2+</sup>; TM solução nutritiva Tyrode modificada; b) Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por 60  $\mu$ M de ACh na presença de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup> (média  $\pm$  E.P.M.). ■ ACh em TM; ▨ ACh em 0Ca<sup>2+</sup>; ▤ ACh + OECs13 em 0Ca<sup>2+</sup>; ▩ recuperação(ACh em 0Ca<sup>2+</sup>); □ preparações controle; \* valor significativo em relação ao controle externo ( $p < 0,05$ , One Way ANOVA), # valor significativo em relação à recuperação (contração de ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup> após exposição ao OECs ou ao veículo), ( $p < 0,05$ , One Way ANOVA seguido de Holm-Sidak).**

Os mesmos experimentos, quando analisados de forma a ser considerado o componente tônico das contrações (platôs de resposta), a contração induzida por ACh em meio  $0Ca^{2+}$  foi de  $18,64\% \pm 6,04$  da contração inicial evocada por ACh em meio TM ( $1,12 \pm 0,08g$ ,  $n=8$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo experimental e grupo controle em nenhuma das etapas do protocolo (One Way ANOVA), vide figura 14.



2+

$^{2+}$ );  preparações controle.

**Croton sonderianus**. Efeito do óleo essencial de **Croton sonderianus**, amostra de 13 hs (OECs13) sobre os valores das contrações induzidas por ACh, na presença de epitélio em meio  $0Ca^{2+}$ . Gráfico

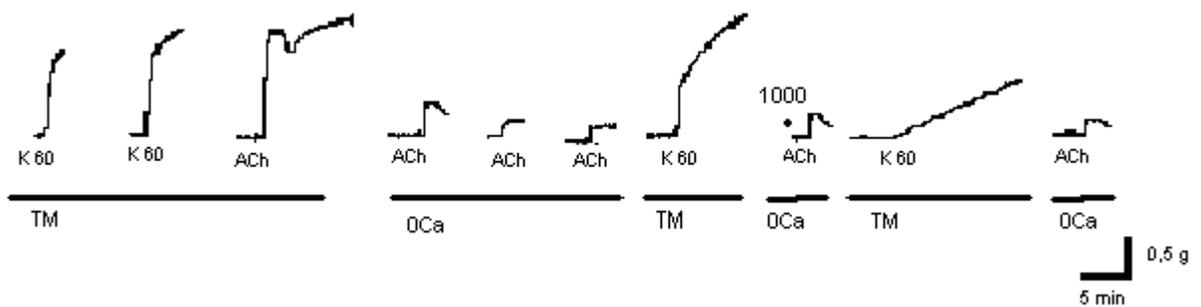
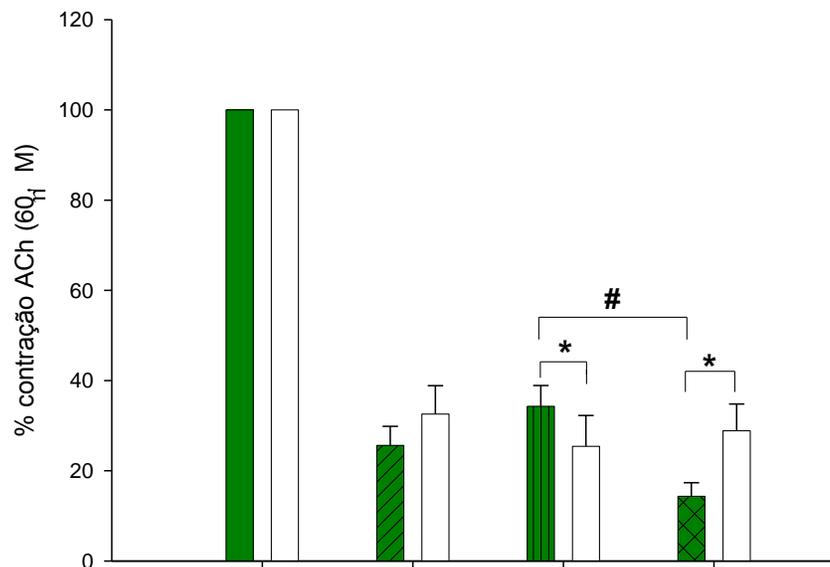
as contrações induzidas por 60 μM de ACh na presença de epitélio em meio  $0Ca^{2+}$  (média ± desvio padrão) em OECs 13

.  ACh em TM;  ACh em  $0Ca^{2+}$ ;  ACh + OECs13 em  $0Ca^{2+}$ ;  recuperação(ACh)

Nos experimentos em que foram utilizados anéis de traquéia sem epitélio, considerando-se o componente fásico de cada contração (picos de contração), a primeira contração evocada por ACh em meio  $0Ca^{2+}$  foi de  $25,62 \pm 4,24$  % da contração de ACh em TM ( $1,80 \pm 0,18$  g, n=8). A contração evocada por ACh em meio  $0Ca^{2+}$  na presença de  $1000 \mu\text{g/ml}$  de OECs 13 foi de  $34,29 \pm 4,60$  % em relação à contração evocada por ACh em TM. Não houve diferença estatisticamente significativa na amplitude da contração de ACh em meio isento de  $Ca^{2+}$  com a adição de OECs 13 em relação à contração induzida por ACh antes da adição de óleo em preparações com desnudamento do epitélio (One Way ANOVA).

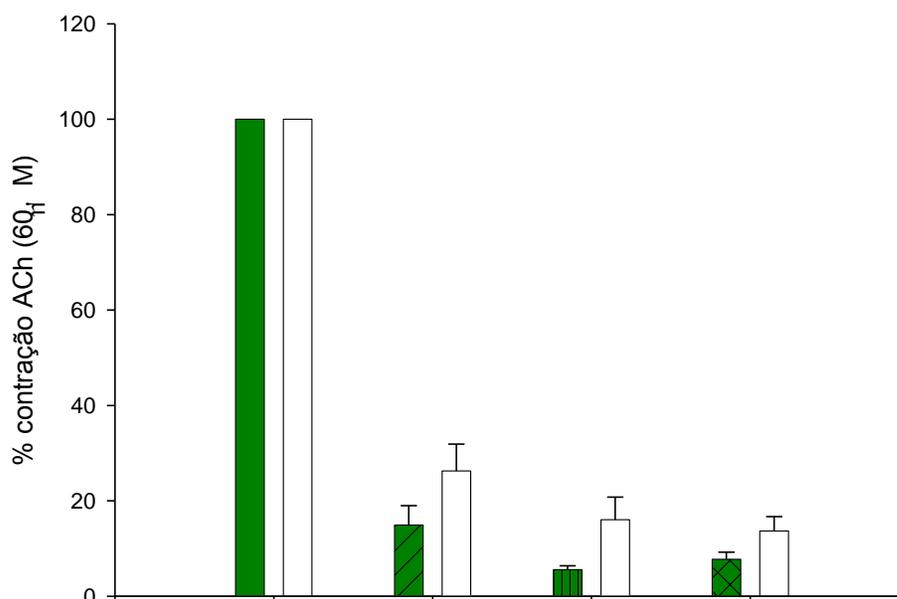
Na etapa intermediária do protocolo, onde foi administrado  $1000 \mu\text{g/ml}$  de OECs 13 às preparações experimentais e a mesma concentração de veículo nas preparações controle, a amplitude destas contrações apresentou diferenças estatisticamente significantes (One Way ANOVA).

Também apresentaram diferenças estatisticamente significantes as contrações evocadas por ACh em meio  $0Ca^{2+}$  após a contração em presença de óleo ( $14,35 \pm 3,02$  % da contração em meio TM) ou veículo ( $28,87 \pm 5,94$  % da contração em TM), ou seja, na última etapa do protocolo, designada como recuperação (One Way ANOVA), (Figura 15).

**a****b**

**Figura 15.** Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre os valores máximos do componente fásico (picos) das contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por 60 μM de ACh, na ausência de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup>. **a)** Traçado representativo do efeito do OECs 13 sobre as contrações induzidas por ACh, na ausência de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup>. K60 contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>; ACh contração induzida por 60 μM de ACh; ponto sobre o traçado experimental mostra o momento da aplicação de OECs 13 (1000 μg/ml); 0Ca<sup>2+</sup> solução nutritora isenta de Ca<sup>2+</sup>; TM solução nutritora Tyrode modificada; **b)** Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por 60 μM de ACh na ausência de epitélio em meio 0Ca<sup>2+</sup> (média ± E.P.M.). ■ ACh em TM; ▨ ACh em 0Ca<sup>2+</sup>; ▩ ACh + OECs13 em 0Ca<sup>2+</sup>; ▤ recuperação(ACh em 0Ca<sup>2+</sup>); □ preparações controle; \* valor significativo em relação ao controle externo (p<0,05, One Way ANOVA), # valor significativo em relação à recuperação (contração de ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup> após exposição ao OECs ou ao veículo), (p<0,05, ANOVA on ranks seguido de Tukey).

Quando foi considerado o componente tônico das contrações (platôs de resposta) das preparações com desnudamento do epitélio, observou-se que a contração induzida por ACh em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$  era de  $14,91 \pm 4,07$  % da contração inicial, evocada por  $60 \mu\text{M}$  de ACh em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  ( $1,72 \pm 0,20$  g,  $n=8$ ). Também neste caso não houve diferenças estatisticamente significante (One Way ANOVA) entre preparações experimentais (expostas ao OECs 13) e preparações controle (expostas ao veículo), como mostra a figura 16.



**Figura 16.** Efeito do óleo essencial de *Croton sonderianus*, amostra de 13 hs (OECs13) sobre os valores máximos do componente tônico (platôs de resposta) das contrações da traquéia isolada de ratos induzidas por  $60 \mu\text{M}$  de ACh, na ausência de epitélio em meio  $0\text{Ca}^{2+}$ . Gráfico representativo dos efeitos do OECs 13 sobre as contrações induzidas por  $60 \mu\text{M}$  de ACh na ausência de epitélio em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  (média  $\pm$  E.P.M.). ■ ACh em TM; ■ ACh em  $0\text{Ca}^{2+}$ ; ■ ACh + OECs13 em  $0\text{Ca}^{2+}$ ; ■ recuperação (ACh em  $0\text{Ca}^{2+}$ );  preparações controle.

## 5- DISCUSSÃO

Vários estudos têm demonstrado que óleos essenciais de diversas plantas do gênero *Croton*, apesar de apresentarem constituições químicas diferentes, apresentam ação antiespasmódica (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2004). No entanto, após extensiva revisão da literatura, não encontramos registros sobre a atividade antiespasmódica do óleo essencial de *Croton sonderianus*. Assim, baseado em exaustivo levantamento bibliográfico, podemos dizer que esta demonstração da eficácia antiespasmódica do óleo essencial de *Croton sonderianus* é um estudo original.

### 5.1) Comparação entre os efeitos do OECs 21 e OECs 13

Neste estudo foi possível observar que, embora se tratasse do óleo essencial da mesma espécie, com a variação de horário houve uma alteração na constituição das duas amostras, que se refletiu em diferenças de efeitos farmacológicos. Esse dado não foi surpreendente. De fato, tem-se relatado que alguns fatores, relacionados com o meio ambiente da planta, condições de solo e de crescimento, hora da coleta e técnicas de destilação podem levar óleos essenciais da mesma espécie a apresentarem composições químicas diferentes (TISSERAND & BALACS, 1999). Morais *et al.* (2006) demonstraram que diferenças na constituição química dos óleos essenciais de *Croton zenhtneri*, *Croton nepetaefolius* e *Croton argyrophyloides* ocasionadas por diferentes horários de coleta das plantas estudadas refletiam modificações nas potências farmacológicas para atividade antioxidante destes óleos.

Em relação ao tônus espontâneo da traquéia isolada de ratos, as duas amostras de OECs apresentaram efeitos opostos. O OECs 21 apresentou efeito contraturante e o OECs 13 promoveu relaxamento do músculo liso traqueal de ratos. Este efeito contraturante do OECs 21 foi

evidenciado por contrações fásicas que ocorreram ao longo do protocolo experimental. Estas contrações corresponderam a aproximadamente 19% da contração evocada por 60 mM de  $K^+$  nas mesmas preparações.

Em relação a preparações pré-contraídas por 80 mM de  $K^+$ , onde foi possível avaliar o acoplamento eletromecânico, O OECs 21, quando utilizado em pequenas concentrações, apresentou efeito amplificador da contração induzida por  $K^+$ , seguido por efeito relaxante em concentrações maiores. Já o OECs 13 apresentou apenas efeito relaxante em preparações idênticas. Essas não similaridades são muito provavelmente atribuíveis às diferenças na constituição química das duas amostras. Como o teor de um dos principais constituintes, o  $\beta$ -cariofileno, é muito similar no OECs 21 e OECs 13, essas diferenças sugerem que o efeito potencializador da contração pelo OECs 21 talvez venha do seu alto teor de espatulenol. Essa hipótese da tendência a amplificar a contração em concentrações menores (comparadas com aquelas que induzem conspícuo relaxamento) está em coerência com os dados de Quintino-Farias (2006). A diferença observada entre as  $IC_{50}$  demonstra uma maior potência farmacológica para efeito miorelaxante da amostra de 13 horas. Contudo, ambas apresentaram a mesma eficácia, o que sugere que o efeito principal dos constituintes das duas amostras é a atividade antiespasmódica.

O efeito do OECs sobre o acoplamento farmacomecânico foi observado em preparações contraídas por 10  $\mu$ M de ACh. Neste caso foi observada uma maior potência farmacológica da amostra de 13 horas em relação ao OECs 21, que pode ser evidenciada pela diferença entre os valores de  $IC_{50}$ . No entanto, os valores de  $IC_{50}$  não diferiram estatisticamente entre si (One Way ANOVA). Isso sugere que a atuação dos constituintes das duas amostras de OECs nas etapas intracelulares do mecanismo da contração induzida por ACh deve ser, pelo menos em parte, semelhante. Posto que a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo RS e alteração da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $Ca^{2+}$  são importantes etapas da contração induzida por ACh, sugere-se que elas estejam envolvidas. Também é possível que o OECs bloqueie o componente da contração da ACh que depende da despolarização da membrana.

Os dados de IC<sub>50</sub> apresentados, que mostram que as IC<sub>50</sub> do OECs 13 para o bloqueio do acoplamento eletromecânico e farmacomecânico, em preparações com epitélio íntegro, são diferentes, sugerem especificidade de atuação desse agente nas menores concentrações efetivas. Esse fato, em decorrência, sugere especificidade de atuação em alguma das etapas do acoplamento eletromecânico, talvez bloqueio de canais para Ca<sup>2+</sup>. Como em muitos casos de especificidade, esta em epígrafe é dependente de concentração e desapareceu nas concentrações maiores que também bloquearam o efeito contrátil da ACh. A perda de especificidade com o aumento da concentração é muito comum nos bloqueadores de canais iônicos (HILLE, 1992).

O protocolo experimental utilizado nos permite descartar a hipótese de que o efeito antiespasmódico do OECs se deve a ativação de canais para K<sup>+</sup> ou mediação neural, visto que a concentração de K<sup>+</sup> utilizada (80 mM) é capaz de despolarizar o potencial transmembrana da célula que inativam canais para Na<sup>+</sup>.

Outras hipóteses que podem ser aventadas incluem uma ação do OECs de forma a alterar a abertura ou a dependência de voltagem dos canais para Ca<sup>2+</sup>, ou ainda, a alteração da condutância da membrana plasmática ao K<sup>+</sup>.

As mesmas conclusões e hipóteses se aplicam também ao OECs 21.

## **5.2) Efeito relaxante induzido pelo OECs 13 e a influência do epitélio**

Em relação ao tônus espontâneo, nas preparações em que o epitélio foi preservado, o OECs 13 induziu relaxamento estatisticamente significativo, comparado ao controle, o que não ocorreu nas preparações em que o epitélio foi removido. Este fato sugere a participação de fatores liberados pelo epitélio no efeito miorelaxante do OECs 13. Sabe-se que o epitélio secreta fatores que modulam o estado contrátil do músculo liso traqueal (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998), tais como endotelina (HATZIEFTHIMIOU *et al.*, 2005), acetilcolina (MOFFATT *et al.*, 2004) e fator broncoconstrictor derivado do epitélio (KUMMER *et al.*, 2006), que favorecem o estado

contrátil. O epitélio traqueal libera também fatores moduladores que antagonizam o estado contrátil ou favorecem o relaxamento do músculo (SPINA, 1998), como o NO (KLOEK, 2002), a PGE<sub>2</sub> (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998), a PGI<sub>2</sub> e o fator relaxante derivado do epitélio (EpDRF, FEDAN *et al.*, 2004). Pode-se sugerir que o OECs 13 incremente a liberação de fatores relaxantes ou bloqueie a ação dos fatores contraturantes ou promova ambas as ações. Na presente investigação não foi pesquisado qual mecanismo estaria envolvido.

Comparando-se os efeitos do OECs 13 sobre as contrações submaximais evocadas por 80 mM de K<sup>+</sup>, observou-se que esta amostra apresentou, em relação ao efeito relaxante, diferenças de potência e eficácia para preparações com e sem epitélio. Essa diferença de potência deve ser interpretada com cautela. As curvas concentração-resposta da reversão da contração potássica pelo OECs 13 nas preparações com e sem epitélio apresentam boa superposição, exceto nas concentrações que promovem a resposta máxima. Dessa maneira, as diferentes IC<sub>50</sub> são devidas a diferentes respostas máximas e a potência na faixa de atuação em que o efeito varia com a concentração provavelmente deve, mais apropriadamente, ser considerada similar.

Em preparações com epitélio íntegro, OECs 13 foi capaz de reverter completamente o espasmo muscular induzido por K<sup>+</sup> (80 mM), abolindo totalmente a contração. Portanto, os dados indicam que o OECs 13 é capaz de antagonizar totalmente (preparações com epitélio) ou parcialmente (preparações sem epitélio) os componentes relacionados ao mecanismo de ação do acoplamento eletromecânico.

O OECs 13, na ausência de epitélio, apresentou como efeito máximo o bloqueio apenas parcial das contrações evocadas por K<sup>+</sup>. Esses dados sugerem que exista uma interação entre o mecanismo de ação antiespasmódica do OECs e os mecanismos moduladores da contração via mediadores relaxantes derivados do epitélio, à semelhança do que foi previamente discutido em relação à atividade do OECs 13 sobre o tônus basal.

De fato, tem-se evidenciado na literatura científica (MOFFATT *et al.*, 2004; KLOEK, 2002; FOLKERTS & NIJKAMP, 1998) que as células epiteliais das vias aéreas são capazes de

sintetizar diversas substâncias relaxantes que podem estar implicadas no antagonismo das contrações induzidas por espasmógenos, de forma a evitar uma constrição excessiva.

Os dados mostram que o OECs 13 foi capaz de inibir totalmente as contrações induzidas por 10  $\mu\text{M}$  de ACh, sugerindo que o óleo também é eficaz sobre o acoplamento farmacomecânico. Nos experimentos em que houve remoção do epitélio foi possível perceber que o OECs 13, em concentrações intermediárias (em relação à faixa de valores utilizada) promoveu efeito contraturante adicional, que atingiu um valor máximo em 30  $\mu\text{g/ml}$ . Esse dado está em coerência com os dados anteriormente discutidos e com a hipótese da interação entre o mecanismo de ação do OECs 13 e a modulação da contração pelo epitélio.

Aventou-se a hipótese de que o OECs poderia interferir na recaptção do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. De fato, algumas substâncias que apresentam este mecanismo de ação em pequenas concentrações induzem contração por aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e em concentrações maiores, promovem relaxamento por esvaziamento dos estoques intracelulares deste íon. O  $\alpha$ -pineno (um dos constituintes majoritários da amostra do OECs 13, também presente na composição do OECs 21) em pequenas concentrações tem sido implicado neste mecanismo de ação (CÂMARA *et al.*, 2003). No entanto, é pouco provável que isto seja verdadeiro para a amostra aqui considerada, visto que este efeito só foi observado em preparações cujo epitélio havia sido retirado, não aparecendo naquelas que apresentavam epitélio íntegro.

O relaxamento máximo foi aproximadamente o mesmo em preparações com e sem epitélio, o que indica que a eficácia do efeito relaxante do OECs 13 sobre a contração induzida por ACh não foi alterada com a remoção do epitélio.

### **5.3) Influência do cálcio no mecanismo de ação do OECs 13**

O protocolo em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  possibilitou a observação da ação do OECs 13 sobre uma contração que depende unicamente do acoplamento farmacomecânico e independe totalmente do

influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular (60  $\mu\text{M}$  de ACh). De fato, muitos estudos relatam que as contrações evocadas por agonista no músculo liso da via aérea aparentemente não são afetadas sob condições em que o influxo de cálcio voltagem-dependente é prevenido pela remoção do cálcio extracelular. (JANSSEN, 2002; FARLEY & MILES, 1978)

Pode-se trabalhar com esta hipótese, pois o acoplamento eletromecânico foi, neste protocolo experimental presumivelmente bloqueado totalmente, visto que a solução nutritora foi preparada sem adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e ainda com adição de 200  $\mu\text{M}$  de quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  (EGTA), anulando, assim, qualquer participação de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Foi possível comprovar que a solução nutritora estava realmente livre de  $\text{Ca}^{2+}$  ao se induzirem contrações subseqüentes de ACh, em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$ , e observar que a segunda contração era claramente menor que a primeira e a terceira, menor ainda (vide figuras 13 e 15) ou nula (ALVES-DE-ALMEIDA, 2003).

OECs 13 (1000  $\mu\text{g/ml}$ ), tanto em preparações com epitélio quanto naquelas em que o epitélio havia sido mecanicamente removido, potencializou a contração evocada por 60  $\mu\text{M}$  de ACh em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  (figuras 13 e 15). Este resultado foi claro quando foram tomados como medida os valores máximos do componente fásico de cada contração (picos), visto que este componente diz respeito à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS. Quando foram considerados os valores do componente tônico (platôs) de contração, foi possível observar que as contrações eram, em percentuais, bem menores do que as contrações evocadas por ACh em meio TM (figuras 14 e 16). Este dado é coerente, visto que nesta fase da contração (platô) ocorre perda de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular.

Considerando que no protocolo em questão o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da membrana foi descartado, é possível que o efeito potencializador do OECs 13 sobre a contração evocada por ACh em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  ocorra por liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, ou seja, do RS (BAZÁN-PERKINS *et al.*, 1998).

Observou-se ainda que o OECs 13, na mesma concentração utilizada no protocolo experimental em meio  $0\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, 1000  $\mu\text{g/ml}$ , foi capaz de bloquear a contração induzida por ACh (10  $\mu\text{M}$ ) em meio contendo  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 11). Estes efeitos aparentemente paradoxais não são

irreconciliáveis. A literatura científica mostra que algumas substâncias que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares funcionam como relaxantes do MLVA. Isto se deve à disposição do RS, que divide o citosol em dois compartimentos distintos espacialmente e funcionalmente: o espaço subplasmalemal e o espaço citosólico profundo (JANSSEN, 2002).

Janssen (2002) relata que alguns agonistas excitatórios liberam  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol profundo para desencadear a contração, assim como no espaço subplasmalemal para ativar canais para  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Substâncias relaxantes, por outro lado, promovem a recaptação ou extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$ , mas também desencadeiam a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelos receptores de rianodina. Este último efeito possibilita a descarga do RS, aumentando sua capacidade de tamponamento, sem desencadear contração. Isso também pode levar à ativação dos canais para  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e à hiperpolarização da membrana.

Portanto, para haver contração ou relaxamento do MLVA, além da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, deve ser considerado também o compartimento intracelular onde esta liberação ocorre. Pode-se sugerir, portanto, que o OECs 13 atue liberando  $\text{Ca}^{2+}$  do RS em compartimentos intracelulares que facilitem a extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio interno da célula. Assim, em concentrações crescentes e cumulativas de OECs 13, como o que acontece ao longo do protocolo de inibição da contração evocada por ACh em TM, ter-se-ia uma depleção gradativa dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que justificaria o efeito relaxante do OECs 13. Pode-se dizer que o protocolo em questão apresenta caráter cumulativo de concentrações de OECs 13, visto que o tempo de lavagem da preparação ao longo do experimento não é capaz de remover completamente o óleo do tecido.

Já em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  uma única adição de OECs, em alta concentração, poderia gerar extravazamento de  $\text{Ca}^{2+}$  para o compartimento citosólico profundo, o que levaria à contração.

Esta hipótese aventada está em coerência com o mecanismo de ação de algumas substâncias relaxantes. A cafeína, por exemplo, só evoca a contração quando causa maciça e rápida descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (ou seja, quando aplicada instantaneamente em altas concentrações), mas

não quando estas descargas de grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  ocorrem gradualmente (ou seja, introduzindo cafeína mais lentamente através de banho de perfusão),(JANSSEN, 2002).

É importante mencionar que a cascata bioquímica de eventos para promoção de contração do músculo liso é complexa, com muitas etapas onde teoricamente um agente relaxante pode atuar para promover seu efeito. Há, portanto, a possibilidade de um agente atuar em múltiplas etapas. Nesse estudo não objetivamos primariamente elucidar o mecanismo de ação e não podemos excluir a possibilidade de outros mecanismos de ação do OECs como fosforilação e inativação de proteínas envolvidas na cascata de contração ou diminuição da sensibilidade das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  (BILLINGTON & PENN, 2003).

Os resultados aqui apresentados e discutidos

## 6- CONCLUSÕES

O OECs tem eficácia farmacológica como antiespasmódico e também apresenta efeito miorelaxante sobre o tônus basal, efeito este que é influenciado pela presença de epitélio. O efeito antiespasmódico do OECs é mais potente sobre o acoplamento eletromecânico do que sobre o acoplamento farmacomecânico com ACh, o que sugere a possibilidade de OECs atuar como bloqueador de canais para  $Ca^{2+}$  tipo L, efeito que parece não envolver mediação pelo epitélio.

Na mesma concentração em que bloqueou a contração da ACh com a preparação mantida em concentração normal de  $Ca^{2+}$  no meio extracelular, o OECs amplificou a contração induzida por ACh em meio sem  $Ca^{2+}$ . Esse fato sugere que o OECs altera a contração induzida por ACh por interferir com o armazenamento de  $Ca^{2+}$  nos compartimentos intracelulares.

Duas diferentes amostras de OECs apresentaram efeitos farmacológicos. Ambas mostraram efeito antiespasmódico, mas com diferentes potências farmacológicas e uma delas mostrou também efeito contraturante em uma certa faixa de concentração, o que sugere a necessidade do cuidado na escolha do óleo para a obtenção de um dado efeito.

## 7- REFERÊNCIAS

ABDON, A.P.V. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton nepetaefolius***. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

ABDON, A.P.; LEAL CARDOSO, J.H., COELHO DE SOUZA, A.N., MORAIS, S.M.; SANTOS, C.F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p. 1215-1219, 2002.

ALBUQUERQUE, A.A.; SORENSON, A.L.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.41-49. 1995.

ALVES-DE-ALMEIDA, M. **Efeitos do eugenol sobre o músculo liso das vias aéreas de cobaio**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

AMARAL, J.F. **Atividade Antiinflamatória, Antinociceptiva e Gastroprotetora do Óleo Essencial de *Croton sonderianus* Muell.Arg.** 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R.A. Airway smooth muscle: contraction and beyond. **The International Journal of Biochemistry & Biology**, v.35, p.272-276, 2003.

ARAÚJO, I. **A medicina popular**. 3.ed. Natal: EDUFRRN, 1999.

BAI, T.R. *et al.* On the terminology for describing the length-force relationship and its changes in airway smooth muscle. **J Appl Physiol**, v.97, p.2029-2034, 2004.

BAZÁN-PERKINS, B. *et al.* Involvement of different Ca<sup>2+</sup> pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca<sup>2+</sup> free medium: lack of effect of PKC inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archive of Pharmacology**. v. 358, p. 567-573, 1998.

BERNE, R.M.;LEVY,M.N. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996

BEST,C.; TAYLOR, N. **Physiological basis of medical practice**. 12.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1990

BILLINGTON, C.K.; PENN, R.B. Signaling and regulation of G-protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respir Res**, v. 4, p.1-23, 2003.

BINNAZ, A.Y. *et al.* Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> influx in airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.290, p. 278-283, 2006.

BIZERRIL, J.F. **O efeito do 2,2'-azobis-(2-aminopropano)-dihidroclorídrico em músculo liso de traquéia de rato e a sua interação com o eugenol.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

BOSKABADY, M.H.; TEYMOORY, S. The influence of epithelium on the reonsiveness of guinea-pig trachea to  $\beta$ -adrenergic agonist and antagonist. **Medical Science Monitor**, v.9, n.9, p.336-342, 2003.

BOURREAU, J.P. Cross talk between plasma membrane and sarcoplasmic reticulum in canine airway smooth muscle. **Biol Signals**, v.2, p. 272-283, 1993.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará.** Mossoró: ESAM, 1976.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants: essential oils.** 2.ed. New York: Lavoisier, 1999.

CALIXTO, J.B. Efficaccy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.

CÂMARA, C.C. *et al.* Antispasmodic effect of essential oil of *Pletranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Medica**. v.69, p.1080-1085, 2003.

CAMPOS, A.R. **Estudos neurofarmacológicos do Guaraná – *Paullinia cupana* H.B.K.** 2002. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CARNEIRO-LOUREIRO, A.C. **Efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell.Arg.** 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

CARVALHO, F.C. **Flutuações dos níveis dos carboidratos de reserva disponíveis nas raízes e no caule do marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell.Arg), ao longo dos diferentes estádios fenológicos.** 1994. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; LUCIANO, J.H.S.; MORAIS, S.M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia**, v.4, p.23-29, 2002.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, 1998.

COELHO-DE-SOUZA, A.N. **Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso**. 1997. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v.12, p. 189-194, 1998.

COLQUHOUM, D. **Lectures of Biostatistics**. Oxford: Clarendon Press, 1971.

CORMACK, D. H. **Ham's Histology**. J. B. Lippincott Company, 1979.

CONOVER, W.J. **Practical Nonparametrics Statistics**. New York: John Wiley & Sons, 1971.

COSTA, A.F.E.; MORAES, M.E.; FROTA, F.A.; MORAES, M.O. Plantas medicinais usadas pelos pacientes atendidos nos ambulatórios do hospital Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará. **Pesq. Med.**, p.20-25, 1997.

CRAVEIRO, A.A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: edições UFC, 1981.

CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W. Kovat's índices as preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **J.Nat.Prod.**, v.47, p.890-892, 1984.

DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

DOURADO, R.C.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Croton sonderianus* - Euphobiaceae**. 2003. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, n.75, p.141-164, 2001.

ENAM, E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. **Comparative Biochemistry and Physiology**. p.325-337, 2001.

ETHIER, M.F.; YAMAGUCHI, H.; MADISON, J.M. Effects of cyclopiazonic acid on cytosolic calcium in bovine airway smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.281, p.126-133, 2001.

FAÇANHA, M.C.; PINHEIRO, A.C. Distribution of acute respiratory diseases in Brazil from 1996 to 2001. **Rev. Saúde Pública**, Jun; v.38, n.3, 2004.

FARLEY, J.M.; MILES, P.R. The sources of calcium for acetylcholine-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 207, p. 340-346, 1978.

FEDAN, J.S., *et al.* Hiperosmolar solution effects in guinea pig airways.III. Studies on the identity of epithelium-deriver relaxing factor in isolated perfused trachea using pharmacological agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v.308, n.1, p.30-36, 2004.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends Pharmacol Sci**. Aug; v.19, n.8, p. 334-41, 1998.

FORTES, J.C.; LOURENÇO, C.B.; GUEDES, M.I.F. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg.** In: VIII Semana Universitária, UECE, Fortaleza, 2003.

GERTHOFFER, W.T. *et al.* Myosin phosphorylation and calcium in tonic and fasic contractions of colonic smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 260 (Gastrointest. Liver Physiol. (Lond.) v.305, p.235-248, 1991.

GODOY, D.V.; ZOTTO, C.D.; BELLICANTA, J.; WESCHENFELDER, F.; NACIF, S.B. Doenças respiratórias como causa de internações hospitalares de pacientes do Sistema Único de Saúde num serviço terciário de clínica médica na região nordeste do Rio Grande do Sul. **Pneumologia**, v.27, p.193-8, 2001.

GÓMEZ-VIQUEZ, L. *et al.* SERCA pump optimizes Ca<sup>2+</sup> release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. **Biophysical Journal**, v.85, p.370-380, 2003.

GUNST, S.J.; TANG D.D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. **Eur Respir J**, v.15, p.600-616, 2000.

HATZIEFTHIMIOU, A.A. *et al.* Resting tension effect on airway smooth muscle: the involvement of epithelium. **Respir Physiol Neurobiol.**v.145, p.201-208, 2005.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes.** Sauderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1992.

HOLROYDE, M.C. The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.87, p.501-507, 1986.

ISIK, A.C.; YARDIMCI, S.; GUVEN, C.; AVUNDUK, M.C.; CIVELEK, S. Morphologic alteration induced by short-term smoke exposure in rats. **J Otorhinolaryngol Relat Spec.** v.69, p. 13-17, 2006.

JANSSEN, L.J. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.282, p. 1161-1178, 2002.

JANSSEN, L.J. *et al.* KCl evokes contractions of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, p. 852-858, 2004.

JANSSEN, L.J. *et al.* Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **J Appl Physiol**, v. 91, p. 1142-1151, 2001.

JANSSEN, L.J. *et al.* NO<sup>+</sup> but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal Ca<sup>2+</sup>. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.278, p. 899-905, 2000.

JANSSEN, L.J. *et al.* Superficial buffer barrier and preferentially directed release of Ca<sup>2+</sup> in canine airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.276, p.744-753, 1999.

JANSSEN, L.J.; NANA, R. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase mediates rhythmic spontaneous relaxations in canine airway smooth muscles. **Respir Physiol**, v. 108, p. 187-194, 1997.

JANSSEN, L.J.; SIMS S. M. Emptying and refilling of Ca<sup>2+</sup> store in tracheal myocytes as indicated by Ach evoked currents and contractions. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 265, p.877-886, 1993.

JANSSEN, L.J.; WATTIE, J. Non-neurogenic electrically evoked relaxation in canine airway smooth muscle involves action of free radical on K<sup>+</sup> channels. **J Pharmacol Exp Ther**, v.279, p. 813-821, 1996.

JOLLY, S.; DESMECHT, D. Functional identification of epithelial and smooth muscle histamine-dependent relaxing mechanisms in the bovine trachea, but not in bronchi. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.134, p.91-100, 2003.

KLOEK, J. *et al.* Differential responsiveness of proximal and distal parts of isolated guinea pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v.442, p.289-294, 2002.

KOBAYASHI, M. *et al.* Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced airway inflammation in rats. **Eur Respir J**.v. 27, p. 726-734, 2006.

KUMMER, W. *et al.* Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. **Respiratory Research**, v.65, p.1-12, 2006.

LAHLOU, S. *et al.* Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: Role of Autonomic Nervous System. **Planta Medica**, v.65, p.553-557, 1999.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; MAGALHÃES, P.J.C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Medica**, v.66, p.138-143, 2000.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, p.435-448, 2004.

LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. In: **An. Acad. Bras. Ci.**, v.71, n.2, 1999.

LEAL-CARDOSO, J.H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta Medica**, v.66, n.5, p.408-411, 2000.

LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; GUIMARÃES, A.M. **Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton nepetaefolius***. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Resumo, p.103, 1992.

LIMA-ACCIOLY, P.M. *et al.* Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, i,8 cineole, block excitability of rat sciatic nerve *in vitro*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 1158-1163, 2006.

LIMA-COSTA, M. F.; PEIXOTO, S. V.; GIATTI, L. Tendências da mortalidade entre idosos brasileiros (1980 - 2000). **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.13, n.4, p.217-228, 2004.

LIMA, J.L.S. **Plantas forrageiras das caatingas – usos e potencialidade.** In: EMBRAPA/PNE/KEW, 1996.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MAGALHÃES, P.J.C. **Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaias.** 1998. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MAGALHÃES, P.J.C. *et al.* Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v.69, n.9, p.874-877, 2003.

MAGALHÃES, P.J.C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.18, n.5, 2004.

MARQUES-CANUTO, K. **Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MARTHAN, R. Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 286, p. 907-908, 2004.

MATOS, J.M.D; MATOS, M.E.O. **Farmacognosia: curso teórico-prático.** Fortaleza: EDUFC, 1989.

MATOS, F.J.A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego da medicina caseira, de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 2.ed. Fortaleza: EDUFC, 1997.

\_\_\_\_\_. **Farmácias Vivas – sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 3.ed. Fortaleza: edições UFC, 1998.

\_\_\_\_\_. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas.** Fortaleza: EDUFC, 1999

MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.M. **Guia fitoterápico.** Ceará: Governo do estado do Ceará, 2001.

McCHESNEY, J.D., CLARK, A.M., SILVEIRA, E.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* II. ent-Beyer-15-EM-18-oic-acid. **Pharmacology Research**, v.8, p.1243-1247, 1991.

MIWA, M.; MATSUNAGA, M.; NAKAJIMA, N.; YAMAGUCHI, S.; WATANABE, K. Hypertonic saline alters electrical barrier of the airway epithelium. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 136, p.62-66, 2007.

MOFFATT, J.D.; COCKS, T.M.; PAGE, C.P. Role of epithelium and acetylcholine in mediating the contraction to 5-hydroxytryptamine in the mouse isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**, v.141, p.1159-1166, 2004.

MORAIS, S.M.; CATUNDA JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS NETO, J.S. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n.5, p. 907-910, 2006.

NETTESHEIM, P.; BADER, T. Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates arachidonic acid metabolism and mucus production in rat tracheal epithelial cells cultures. **Toxicology Letters**, v.88, p. 35-37, 1996.

OLIVEIRA, A.C. *et al.* **Atividade analgésica e antiedematogênica do óleo essencial do *Croton zehntneri***. In: VI Encontro de Iniciação Científica e I Encontro de Pesquisadores – UECE, 1999.

OLIVEIRA, A.C.; LEAL-CARDOSO, J.H. ; SANTOS, C.F.; COELHO-DE-SOUZA, A.N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.11, p.1471-1474, 2001.

OLIVEIRA, F. **Fundamentos de farmacobotânica**. 2.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1997.

QUINTINO-FARIAS, M.S. **Efeitos do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. e do  $\beta$ -cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de ratos**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; DIMECH, G.S.; WNDERLEY, A.G. Avaliação preliminar da atividade farmacológica (antiespasmódica e antiulceratogênica) do extrato aquoso bruto de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm (Euphorbiaceae). **Revista Lecta**, v.21, n.1, p. 61-68, 2002.

REMBOLD, C. Eletromechanical and Pharmacological coupling. In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York. p.227-239, 1996.

ROUX, E.; MARHL, M. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in  $Ca^{2+}$  removal in airway myocytes. **Biophysical Journal**. v. 86, p. 2583-2595, 2004.

~~REPOSITÓRIO DE ARQUIVOS DIGITAIS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNICAMP~~

SANTO, A.H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, n.1, 2006

SANTOS, F.A. *et al.*

TOLLOCZKO B. *et al.* Tyrosine kinase-dependent calcium signaling in airway smooth muscle cells. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v.278, p.1138-1145, 2000.

# APÊNDICE

## APÊNDICE I

Protocolo	OECs 21	OECs 13
Reversão da contração induzida por K <sup>+</sup>	174,31 ± 25,25 <sup>1, 2</sup>	45,51 ± 7,58 <sup>2</sup>
Bloqueio da contração induzida por ACh	825,56 ± 158,79	404,29 ± 99,93

**Tabela 3: Valores comparativos de IC<sub>50</sub> para o OECs 21 e OECs 13**

<sup>1</sup> Diferença estatisticamente significativa em relação ao valor correspondente de OECs 13

<sup>2</sup> Diferença estatisticamente significativa da mesma amostra de óleo em relação à IC<sub>50</sub> do protocolo de bloqueio da contração de ACh

Protocolo	OECs 13 com epitélio	OECs 13 sem epitélio
Reversão da contração induzida por K <sup>+</sup>	45,51 ± 7,58 <sup>3</sup>	26,03 ± 1,82
Bloqueio da contração induzida por ACh	404,29 ± 99,93	284,86 ± 117,15

**Tabela 4: Valores comparativos de IC<sub>50</sub> para o OECs 13 na presença e na ausência de epitélio.**

<sup>3</sup> Diferença estatisticamente significante da mesma amostra de óleo em relação à IC<sub>50</sub> do protocolo de bloqueio da contração de ACh

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)