



**Universidade Estadual do Ceará**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas**

**Kerly Shamyra da Silva Alves**

**Estudo das alterações eletrofisiológicas  
produzidas pelo estragol sobre os axônios do  
nervo ciático e os neurossomas do gânglio da  
raiz dorsal de ratos.**

**Fortaleza – Ceará**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**KERLY SHAMYRA DA SILVA ALVES**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS  
PRODUZIDAS PELO ESTRAGOL SOBRE OS AXÔNIOS DO  
NERVO CIÁTICO E OS NEUROSSOMAS DO GÂNGLIO DA RAIZ  
DORSAL DE RATOS.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em ciências fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

**Fortaleza-Ceará**

**2009**

A474e

Alves, Kerly Shamyra da Silva

Estudo das alterações eletrofisiológicas produzidas pelo estragol sobre os axônios do nervo ciático e os neurosomas do gânglio da raiz dorsal de ratos. / Kerly Shamyra da Silva Alves.— Fortaleza, 2009.

69p. ; il.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.) — Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

1. Estragol. 2. Potencial de ação. 3. Gânglio da raiz dorsal. 4. Nervo ciático. I. Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde

CDD: 599.3233

**Kerly Shamyra da Silva Alves**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS  
PRODUZIDAS PELO ESTRAGOL SOBRE OS AXÔNIOS DO NERVO  
CIÁTICO E OS NEUROSSOMAS DO GÂGLIO DA RAIZ DORSAL DE  
RATOS.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado acadêmico em ciências fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso (Orientador)

Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Gondim

Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Saad Lahlou

Universidade Estadual do Ceará

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida, força e amparo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Francisco José e Maria José, pela minha educação, cuidados, carinhos, conselhos, apoio, enfim por todo amor incondicional que eles me dedicam.

Aos meus irmãos Karla Shangela e Luiz Neto, pela amizade, companheirismo e por me incentivarem sempre a seguir em frente.

Ao meu orientador José Henrique Leal Cardoso, exemplo de pessoa e pesquisador, que por toda a atenção dedicada a minha orientação e por todas as oportunidades que me foram oferecidas para que eu pudesse chegar cada vez mais longe, considero-o meu pai científico.

A amiga Kátia Virgínia por ter me iniciado na carreira científica e pelo exemplo de determinação e empenho ao trabalho.

Ao meu amigo e namorado Walber, por sua contribuição intelectual, pelo companheirismo, conselho e paciência despendidas durante a escrita da dissertação e por ter tornado essa caminhada mais doce.

A minha amiga e eterna bolsista Joana, pela contribuição e dedicação ao trabalho.

Aos amigos Roseli Barbosa, Luiz Júnior, Emmanuely Diogo, Tiago Nascimento, Matheus Lemos, Humberto Joca, Flávio Macedo e Daniel Lobo, pela amizade, contribuição científica, pelos momentos de reflexão tão proveitosos e momentos de descontração.

A todos os demais amigos do laboratório de eletrofisiologia que durante todos esses anos fizeram parte da minha rotina, tornando-se minha segunda família.

Aos professores do curso de mestrado, por suas contribuições na minha formação intelectual e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos colegas do mestrado, em especial a Aline Vitor e o Edson Ponte, pela amizade, incentivo nos momentos de desânimo e pelos momentos de descontração.

Aos amigos Pedro Militão e Franck que me acolheram no laboratório nos primeiros momentos e fundamental colaboração para este trabalho.

A todos que, de certa forma, fizeram-se presentes e contribuíram para a concretização de mais um passo neste longo trajeto.

“O degrau da escada não foi inventado para repousar, mas apenas para sustentar o pé o tempo necessário para que o homem coloque o outro pé um pouco mais alto.”

Aldous Huxley

## RESUMO

Estragol (EST) é usado como aromatizante na indústria de alimentos e cosméticos. Este é um constituinte natural de vários óleos essenciais de muitas plantas do Nordeste do Brasil. Ele apresenta muitas ações biológicas como: anestésica, hipotérmica, antimicrobiana, miorelaxante e antiespasmódica. Neste estudo, nós verificamos o efeito do estragol sobre os parâmetros eletrofisiológicos nos axônios do Nervo Ciático (NC) e nos neurossomas do Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) de ratos. Foram utilizados *Rattus norvegicus* (Wistar) de ambos os sexos com massa entre 200-250g de onde foram dissecados os NC e GRD, mantidos a uma temperatura entre 18°C a 24°C numa solução nutritora tipo Locke com pH=7,4. No NC realizamos o registro do potencial de ação composto (PAC) evocado por pulso de onda quadrada, com amplitude de 40V, duração de 100µs a 0,2Hz. O PAC dois picos positivos de ondas que denominamos de 1º e 2º componentes. 4mM de EST reduziu a amplitude positiva do primeiro e segundo componente, respectivamente, para 46,1±4,9 e 61,4±10,1 % (N=8) do controle [controle = 4,5±0,4 mV (N=24) e 1,2±0,2 mV (N=24)]. À 6mM, EST reduziu a amplitude do 1º e 2º component para 13,3±2,3 e 13,5±4,9% (N=8) do controle, respectivamente. A técnica do microeletrodo intracelular (Current Clamp) foi utilizada para registrar a atividade elétrica no GRD. Os parâmetros de análise foram: resistência de entrada ( $R_{in}$ ), potencial de repouso (PR), amplitude, duração, inclinações ascendentes máximas  $(dV/dt)_{asc}$  e inclinação descendente  $(dV/dt)_{desc}$ . Em 31 neurônios do GRD com características nociceptoras, EST bloqueou o potencial de ação (PA) de maneira concentração dependente: 1, 2, 4 e 6mM bloqueou o PA em 0.0±0.0%, 28.6±18.4%, 50.0±16.7% e 75.0±25.0% das células. Em 83 neurônios do GRD que não mostraram características nociceptoras, o percentual de bloqueio foi 0.0±0.0%, 19.2±7.9%, 52.9±8.7% e 78.6±11.4% para as mesmas concentrações de EST descritas acima. As concentrações de EST utilizadas não modificaram estatisticamente  $R_{in}$  e o PR em nenhuma das populações de neurônios estudadas. O estragol bloqueia o PA nos neurônios do GRD de maneira concentração-dependente. Neurônios nociceptores e outros fenótipos neuronais são igualmente afetados pelo monoterpenóide. Há

ausência de alterações significativas no PR e  $R_{in}$  sugere que o estragol pode agir em canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem.

PALAVRAS CHAVES: estragol, potencial de ação composto, parâmetros eletrofisiológicos do potencial de ação, gânglio da raiz dorsal, nervo ciático.

## ABSTRACT

Estragole (EST), a low molecular weight phenylpropene, is widely utilized in food industry and is found in essential oil of many plants. This is a study of the effects of EST on the action potentials of peripheral nerves and neurons. We have recorded extracellular compound action potentials (CAP) in rat sciatic nerve (CN) and intracellular action potentials on rat dorsal root ganglion (DRG) neurons. Wistar rats (200-250g) were killed by cervical dislocation. CN and DRG were removed and kept in ice-cold Locke solution, pH  $\approx$  7.40. Action potentials were elicited in CAP by electrical stimulation, and the nerve action potential was recorded by extracellular electrodes. The waves had two positive peaks, called here as 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> components. Averaged values of these components in control conditions were  $4.5 \pm 0.4$  mV (N=24) and  $1.2 \pm 0.2$  mV (N=24). EST at 4 mM reduced the amplitude of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> component to  $46.1 \pm 4.9$  and  $61.4 \pm 10.1$  % (N=8) of control, respectively. At 6mM, EST reduced the amplitude of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> component to  $13.3 \pm 2.3$  and  $13.5 \pm 4.9$ % (N=8) of control, respectively. In DRG the action potentials were recorded from neurons through intracellular microelectrodes. Resting membrane potential ( $E_m$ ), input resistances ( $R_{in}$ ) and other action potential parameters, like amplitude, duration and the maximum rate of potential rising ( $(dV/dt)_{max}$ ) were calculated. In 24 DRG neurons with nociceptor characteristics, EST blocked the action potential in a dose related manner: 1, 2, 4 and 6mM blocked the AP waveform in  $0.0 \pm 0.0\%$ ,  $28.6 \pm 18.4\%$ ,  $50.0 \pm 16.7\%$  and,  $75.0 \pm 25.0\%$  of cells. In 83 DRG cells which did not show nociceptor characteristics, the blockades were  $0.0 \pm 0.0\%$ ,  $19.2 \pm 7.9\%$ ,  $52.9 \pm 8.7\%$ ,  $78.6 \pm 11.4\%$  with the same EST concentrations above. In the range of EST concentration used, there were no changes in  $R_{in}$  and  $E_m$  in both neuronal populations. EST inhibits AP in CAP in neurones of DRG, in a dose-dependent . Nociceptors and other cell phenotypes are equally affected by the terpenoid. The absence of effects on  $E_m$  and  $R_{in}$  points to an inhibitory effect of estragole on voltage-gated  $Na^+$  channels.

KEY WORDS: Estragole, Compound action potential, action potential parameters, dorsal root ganglion, Sciatic nerve.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura molecular do estragol.....	16
<b>Figura 2</b> - Alterações na permeabilidade da membrana originam o potencial de ação. ....	23
<b>Figura 3</b> – Registro do potencial de ação composto do nervo ciático de rato...25	
<b>Figura 4</b> - Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do PAC. .34	
<b>Figura 5</b> - Esquema ilustrativo do "set up" para registro intracelular do potencial de ação dos neurônios do GRD. ....	37
<b>Figura 6</b> - Parâmetros mensurados no PAC.....	38
<b>Figura 7</b> – Parâmetros mensurados no PA dos neurônios do GRD.. ....	40
<b>Figura 8</b> - Traçado representativos do potencial de ação composto, no controle, aos 180 minutos de exposição à solução $0\text{Na}^+$ e $20\text{ mM}$ de $\text{K}^+$ extracelular e após 180 minutos de lavagem. ....	42
<b>Figura 9</b> - Traçados representativos do potencial de ação composto, no controle, aos 180 minutos de exposição a 2, 4 e 6 mM de estragol e após 180 minutos de lavagem. ....	43
<b>Figura 10</b> - Efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC. ....	44
<b>Figura 11</b> - Recuperação do efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC. ....	45
<b>Figura 12</b> - Efeito do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC. . ....	47

<b>Figura 13</b> - Recuperação do efeito do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC. ....	48
<b>Figura 14</b> - Tempo de curso dos efeitos do estragol, por 180 minutos, nas concentrações de 2, 4 e 6 mM, na amplitude positiva dos componentes do PAC, em nervo ciático de rato. ....	50
<b>Figura 15</b> - Ajuste das curvas do efeito do estragol sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC. ....	52
<b>Figura 16</b> - Traçados representativos do potencial de ação (PA), no controle, após exposição ao estragol nos neurônios $N_{inf}$ e nos neurônios $N_0$ e recuperação. ....	54
<b>Figura 17</b> – Percentual de neurônios $N_0$ e $N_{inf}$ bloqueados pelo estragol.....	55
<b>Figura 18</b> – Recuperação dos parâmetros eletrofisiológicos do PA dos neurônios que foram bloqueados.....	56
<b>Figura 19</b> - Efeito do estragol sobre o potencial de repouso dos neurônios $N_0$ e $N_{inf}$ do GRD.. ....	57
<b>Figura 20</b> - Efeito do estragol sobre a resistência de entrada dos neurônios $N_0$ e $N_{inf}$ do GRD.. ....	58
<b>Figura 21</b> - Efeito do estragol sobre a duração do PA dos neurônios que não foram bloqueados.....	59
<b>Figura 22</b> - Efeito do estragol sobre amplitude do potencial de ação dos neurônios não bloqueados. ....	60
<b>Figura 23</b> - Efeito do estragol sobre a inclinação máxima ascendente dos neurônios não bloqueados. ....	61
<b>Figura 24</b> - Efeito do estragol sobre a inclinação máxima descendente dos neurônios não bloqueados. ....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação das fibras nervosas de mamíferos.....	26
<b>Tabela 2</b> – Efeito da solução de $K^+$ extracelular e solução $0Na^+$ sobre os parâmetros velocidade de condução e amplitude positiva dos componentes do PAC.....	42
<b>Tabela 3</b> – Efeito e recuperação do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC.....	46
<b>Tabela 4</b> – Efeito e recuperação do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.....	48
<b>Tabela 5</b> – Tempo onde ocorre 50% do bloqueio da amplitude positiva dos componentes do PAC.....	52
<b>Tabela 6</b> – Valores controle dos parâmetros eletrofisiológicos mensurados nos neurônios $N_0$ e $N_{inf}$ .....	53
<b>Tabela 7</b> – Efeito do estragol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios não bloqueados do GRD.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A/D** – Analógico digital.

**ANOVA** – Análise de variância.

**CGRP** – Gene relacionado à calcitonina.

**COBEA** – Colégio brasileiro de experimentação animal.

**DNA** – ácido desoxirribonucléico.

**$dV/dt_{asc}$**  – Inclinação máxima do ramo ascendente do potencial de ação.

**$dV/dt_{desc}$**  – Inclinação máxima do ramo descendente do potencial de ação.

**EC<sub>50</sub>** – Concentração efetiva correspondente a metade do efeito máximo.

**E<sub>K+</sub>** - Potencial eletroquímico do potássio.

**GRD** – Gânglio da raiz dorsal.

**ISCB** – Instituto Superior de Ciências Biomédicas.

**N<sub>0</sub>** – Neurônios sem inflexão na fase de repolarização do potencial de ação.

**Na<sub>v</sub>** – Canal para sódio dependente de voltagem.

**NC** – Nervo ciático.

**NMDG** – N-metil -D-glicosamida.

**N<sub>inf</sub>** – Neurônios com inflexão na fase de repolarização do potencial de ação.

**OECz** – Óleo essencial do *Cróton zehntneri*.

**PA** – Potencial de ação.

**PAC** – Potencial de ação composto.

**R<sub>in</sub>** – Resistência de entrada.

**RNA** – Ácido ribonucléico.

**SNC** – Sistema nervoso central.

**T<sub>50%</sub>** - Tempo onde ocorre 50% do efeito.

**TRIS** – Tris-hidroximetil-aminometano

**TTX-R** – Resistente a tetrodoxina.

**TTX-S** – Sensível a tetrodoxina.

**UECE** – Universidade Estadual do Ceará.

**UFC** – Universidade Federal do Ceará.

**V<sub>m</sub>** – Potencial de membrana.

**v/v** – volume por volume.

## SUMÁRIO

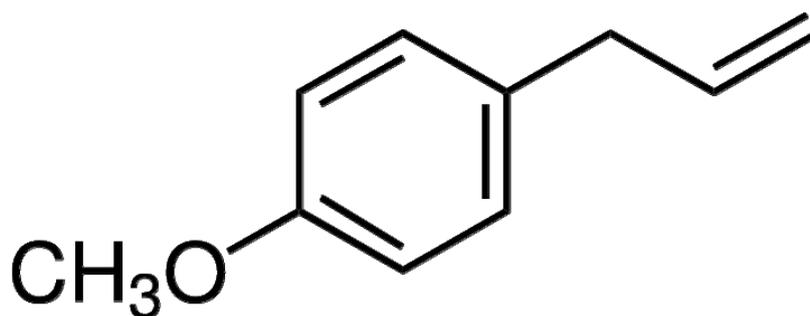
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Estragol .....	16
1.2 Potencial de ação e potencial de ação composto .....	21
1.3 Gânglio da raiz dorsal e nervo ciático .....	26
2.JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO .....	30
3.OBJETIVO.....	31
3.1 Objetivo Geral .....	31
3.2 Objetivos específicos .....	31
4.METODOLOGIA.....	32
4.1 Animais.....	32
4.2 Soluções.....	32
4.3 Eletrofisiologia .....	33
4.3.1 Registro Extracelular .....	33
4.3.2 Registro Intracelular .....	35
4.4 Análise dos dados .....	38
4.5 Análise estatística .....	40
5.RESULTADOS .....	41

5.1 Registro extracelular .....	41
5.1.1 Caracterização da preparação .....	41
5.1.2 Efeito do estragol sobre os componentes do potencial de ação composto .....	43
5.1.3 Efeito do estragol sobre amplitude positiva dos componentes do PAC. .	43
5.1.4 Efeito do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.....	46
5.1.5 Curso temporal do efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC. ....	49
5.2 Registro intracelular .....	53
5.2.1 Caracterização e amostragem celular.....	53
5.2.2 Efeito do estragol sobre o PA intracelular .....	54
5.2.3 Efeito do estragol sobre o potencial de repouso e resistência de entrada .....	57
5.2.4 Efeito do estragol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios que não foram bloqueados.....	58
6.DISSCUSSÃO .....	64
6.1.Efeito do estragol sobre os neurônios .....	64
6.2.Comparação entre os dois tipos de registros .....	68
6.3. Provável mecanismo de ação .....	70
6.4.Potencialidade de utilização terapêutica .....	71
7.CONCLUSÕES .....	73
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRAGOL

O estragol ( $C_{10}H_{12}O$ ) caracteriza-se por ser um éter monoterpênico, designado 4-2-(propenil)metoxibenzeno. Possui alguns sinônimos como: metilchavicol, p-alilanol, chavicol metiléter, 4-metoxialilbenzeno (Vinzenci *et al.*, 2000) (Figura 1). Considerando suas propriedades físico-químicas, é uma substância que se apresenta líquida a temperatura ambiente, de aspecto oleoso, incolor ou levemente amarelado. Não é muito estável principalmente quando exposto ao ar, umidade, luz, calor e metal (Simões *et al.*, 1999).



**Figura 1 - Estrutura molecular do estragol.** Sua estrutura química consiste em um anel benzeno substituído com um grupo metoxi e um grupo propenil. Imagem obtida do site: [upload.wikimedia.org/Wikipédia/commons/thumb/...](https://upload.wikimedia.org/Wikipédia/commons/thumb/...)

Ocorre naturalmente como constituinte de óleos essenciais de plantas aromáticas que estão localizadas, principalmente, em regiões quentes como o Mediterrâneo ou países tropicais. Os óleos essenciais são líquidos voláteis, possuem um forte odor e são formados pelo metabolismo secundário das plantas. Podem ser sintetizados por todas as partes das plantas (folhas, flores, caule, frutos ou raízes) e armazenados em células secretórias, células epidérmicas ou no tricoma glandular (Bakkali *et al.*, 2008). A sua extração pode

ser realizada facilmente através da técnica de destilação por arraste a vapor d'água.

Os óleos essenciais representam uma mistura complexa que pode conter entre 20 e 60 constituintes em diferentes concentrações. Os constituintes em maior concentração, que em geral são dois ou três, caracterizam o óleo essencial e frequentemente determinam as suas propriedades biológicas e efeitos farmacológicos. Estes constituintes são classificados como principais quando comparados aos demais componentes presentes em menores quantidades (Bakkali *et al.*, 2008). Por exemplo, estragol (59%) e anetol (27%) são os principais constituintes do óleo essencial do *Cróton zehntneri* (Craveiro *et al.*, 1977; 1978).

O *Cróton zehntneri* Pax et Hoffm é um arbusto da família *Euphorbiaceae*, abundante na caatinga brasileira. Popularmente, é conhecido como canela de cunhã e utilizado na forma de chás e infusões para tratar distúrbios digestivos e de ansiedade. Por apresentar um forte e agradável odor de anis, o extrato de seus galhos e folhas é utilizado como aromatizante e eldudorante de doces e aguardente de cana (Craveiro *et al.*, 1981; Leal-Cardoso e Fonteles, 1999; Matos, 1999).

O óleo essencial do *Cróton zehntneri* (OECz) já demonstrou atividade larvívica (Lima *et al.*, 2006), antifúngica (Singh *et al.*, 2006) e ação antioxidante provavelmente pela ação sinérgica de seus constituintes (Morais *et al.*, 2006). Aproximadamente 2% do peso seco das folhas do *C. zehntneri* corresponde ao seu óleo essencial, que é composto principalmente por terpenos e monoterpenos (Craveiro *et al.*, 1978). Como citado anteriormente, os principais constituintes do OECz são o anetol e estragol, ambos isômeros de cadeia derivados do fenilpropanol (Craveiro *et al.*, 1977; 1978).

Estes constituintes também são análogos químicos do eugenol, designado como 2-metoxi-4-(2-propenil) fenol, que é uma substância que tem sido largamente utilizada, via síntese química, como uma molécula de partida na pesquisa para a produção de novas substâncias e para descobertas de

novos agentes terapêuticos (Dallmeier e Carlini, 1981; Ansher *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1999; Stoof *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999).

Ao contrário do eugenol, o principal uso comercial do estragol é como aromatizante nas indústrias alimentícias e por esta razão os estudos concernentes à genotoxicidade desta substância são abundantes na literatura científica.

Ao entrar no organismo, o estragol poderá ser metabolizado por quatro vias diferentes, duas das quais leva a formação de metabólitos genotóxicos. A via pela qual o estragol irá seguir, parece ser dose dependente; em doses baixas, o estragol tende a seguir pelas vias de desintoxicação, enquanto em doses elevadas há uma tendência de seguir o metabolismo da hidroxilação, aumentando o risco carcinogênico desta substância (Anthony *et al.*, 1987).

A primeira via genotóxica tem início com a hidroxilação do estragol pela enzima citocromo P450 formando 1-hidroxiestragol. Este composto poderá sofrer ação de sulfotransferases e ser convertido a 1-sulfoxiestragol, que é instável, degrada em meio aquoso e reage com carbocátion, o qual é capaz de se ligar covalentemente a moléculas nucleofílicas como glutathione, RNA e DNA, originando adutos de DNA (Phillips *et al.*, 1981; 1984; Randerath *et al.*, 1984; Wiseman *et al.*, 1985). O 1-hidroxiestragol, por outro lado, poderá se conjugar ao ácido glicurônico, formando um composto estável que é excretado na urina. Esta constitui uma importante rota de desintoxicação (Solheim e Scheline, 1973; Anthony *et al.*, 1987). Outra via genotóxica consiste na epoxidação do estragol formando estragol-2',3'-óxido, que se mostrou capaz de formar adutos de DNA *in vitro*, mas ainda não foram encontrados *in vivo* (Luo *et al.*, 1992; Guenther e Luo, 2001).

As outras vias metabólicas definidas para o estragol consistem na O-demetilação, formando o composto 4-alilfenol que será excretado pela urina como sulfo- ou -glicuronosil (Solheim e Scheline, 1973; Anthony *et al.*, 1987), e na formação do 3-hidroxianetol. Contudo ainda não há informações se este metabólito é formado pela isomerização do 1-hidroxiestragol ou pela conversão do estragol. O 3-hidroxianetol pode ser oxidado a ácido 4-metoxicinâmico que,

por sua vez, será oxidado ao ácido 4-metoxibenzóico (Solheim e Scheline, 1973; Anthony *et al.*, 1987).

A literatura também descreve algumas atividades biológicas para o OECz e estragol. Contudo, ainda há poucos estudos relacionados a este tema (ou mesmo não há em algumas áreas), quando comparados aos concernentes a genotoxicidade do estragol. OECz e estragol apresentaram excelente atividade antimicrobiana contra algumas bactérias patógenas, fungos e helmintos, enquanto mostrou-se relativamente inofensivo para vegetais e seres humanos (Shin e Kang, 2003; Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2007; Fontenelle *et al.*, 2008;).

O OECz inibiu, *in vitro*, o desenvolvimento de ovos e larvas do nematelminto *Haemonchus contortus*, e mostrou-se eficaz, *in vivo*, contra *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetráptera*, que são nematelmintos comumente encontrados no trato gastrointestinal de animais de laboratório (Camurça-Vasconcelos *et al.*, 2007).

Fontenelle e colaboradores (2008) demonstraram que o OECz possui, *in vitro*, propriedades antifúngicas contra *Microsporum canis* e *Candida* spp. sem toxicidade aguda. Esta atividade do OECz pode ser atribuída a seus principais constituintes, estragol e anetol, que se mostraram eficazes contra *Aspergillus parasiticus* (Kapinar 1990, Singh *et al.*, 2006). O potencial antifúngico do estragol isolado (Shin e Kang, 2003) ou em combinação com cetonozol (Shin e Pyun, 2004) já foi descrita contra espécies de cândida.

O Estragol possui atividade bactericida, pois reduziu em mais de 50% as unidades formadoras de colônias das seguintes espécies de bactérias: *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* (Friedman *et al.*, 2002).

Já se observou, também, que o estragol apresenta atividade farmacológica variada e relevante em diferentes tipos de músculos e nervos. Na musculatura esquelética, OECz e seus principais constituintes, anetol e estragol, atuaram em dois locais distintos: no retículo sarcoplasmático

liberando  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular e promovendo a contração muscular; e na membrana pós-juncional bloqueando a transmissão neuromuscular (Albuquerque *et al.*, 1995).

Sobre o sistema cardiovascular, o OECz, anetol e estragol produziram mudanças ditas bifásicas. Siqueira e colaboradores (2006) observaram que, na mesma dose e no intervalo de 4 a 8 segundos, estas substâncias alteraram a frequência cardíaca e a pressão cardiovascular em duas fases. Na primeira fase, causaram hipotensão e bradicardia, provavelmente associada a mecanismos colinérgicos. Em um momento posterior (segunda fase) causaram um aumento na pressão sanguínea, provavelmente por causar uma vasoconstrição através da inibição da produção de óxido nítrico endotelial. Resultados semelhantes foram encontrados por Soares e colaboradores (2007), cujos relatos indicam que em baixas concentrações, anetol e estragol, contraíram a musculatura lisa vascular de ratos e em concentrações elevadas, ambos relaxaram o tecido. Eles sugerem que o efeito contraturante do anetol deva-se a uma ação direta ou indireta na abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem.

O estragol apresenta ainda efeito antiespasmódico, de maneira dose-dependente, nas contrações musculares lisa ileal induzidas por acetilcolina, histamina e 50 mM de  $\text{K}^+$  e nas contrações induzidas por  $\text{Ca}^{2+}$  na presença de 50 mM de  $\text{K}^+$ , além de causar relaxamento dos íleos pré-contraídos por 60 mM de  $\text{K}^+$  (Coelho-de-Souza *et al.*, 1997).

O OECz apresentou um efeito depressor no Sistema Nervoso Central (SNC), mas não relacionado a mecanismo dopaminérgico, o que corrobora o uso da planta na medicina popular para tratar os distúrbios nervosos como irritabilidade, ansiedade e convulsões (Batatinha *et al.*, 1995; Lazarini *et al.*, 2000). O OECz possui ainda atividade antinociceptiva, pois em doses de 300 mg/kg, administrada via oral, reduziu o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina e aumentou a latência no teste da placa quente (Oliveira *et al.*, 2001). O Estragol induziu alterações comportamentais relacionadas à ansiedade ao reduzir o tempo total de interação social entre os ratos (Cosentino *et al.*, 2004).

Leal-Cardoso e colaboradores (2004) demonstraram que o estragol bloqueia, de maneira dose-dependente, a excitabilidade nervosa ao reduzir os seguintes parâmetros do potencial de ação composto: cronaxia, reobase, amplitude pico-a-pico e velocidade de condução.

## **1.2 POTENCIAL DE AÇÃO E POTENCIAL DE AÇÃO COMPOSTO**

As células nervosas, no repouso, apresentam uma diferença de potencial elétrico entre os lados interno e externo da membrana da ordem de -60 mV. Isso ocorre devido, principalmente, ao fluxo de íons através da membrana a favor de seus gradientes eletroquímicos (Berne *et al.*, 2004). Na presença de um estímulo elétrico que atinja o limiar de excitabilidade, uma alteração rápida e abrupta da diferença de potencial existente entre as faces da membrana é observada e se propaga por toda a fibra nervosa. Essa alteração é denominada Potencial de Ação (PA).

O PA é uma resposta celular produzida quando se atinge um potencial limiar de excitação da membrana. Esta resposta é dita ser do tipo tudo-ou-nada porque, ao ser atingido o limiar de membrana, o PA é deflagrado e propagado por toda a célula com a mesma forma e amplitude, independente de ser aplicado um estímulo superior ao estímulo limiar (Berne *et al.*, 2004).

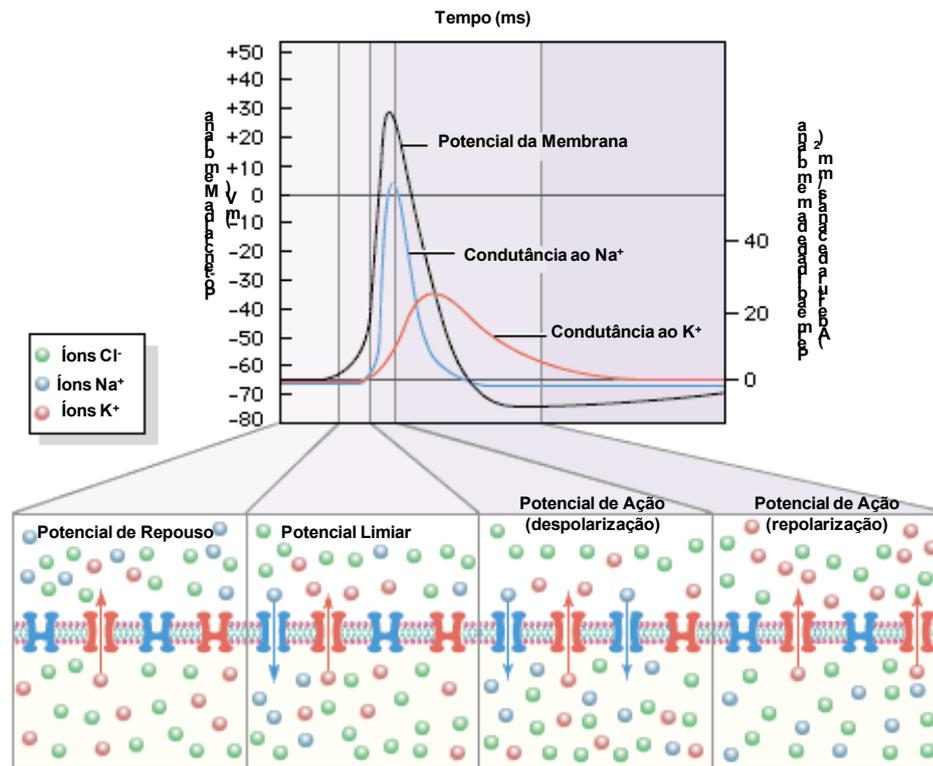
O PA típico dura cerca de 4 ms e é caracterizado pela existência de três fases. Na primeira fase, conhecida como despolarização, a polaridade do interior da membrana é revertida de negativo para positivo. Logo em seguida, essa alteração retorna ao valor inicial (potencial de repouso) caracterizando a fase de repolarização. Na terceira fase, denominada pós-potencial hiperpolarizante, ocorre uma hiperpolarização transiente, ou seja, o interior da célula fica mais negativo do que no potencial de repouso (Berne *et al.*, 2004).

Como pode ser observada na figura 2, a gênese do potencial de ação envolve mecanismos iônicos e alteração da permeabilidade da membrana aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Em repouso, a membrana celular é mais permeável aos íons  $\text{K}^+$ , onde os valores de potencial de membrana se aproximam do valor do potencial

eletroquímico deste íon. Uma vez excitada, há uma alteração da permeabilidade seletiva da membrana, observando-se uma inversão em sua polaridade e aumento da condutância aos íons  $\text{Na}^+$ . Este último estado faz com que os valores de potencial de membrana aproximem-se do valor do potencial eletroquímico do  $\text{Na}^+$ . No entanto, a condutância aumentada aos íons  $\text{Na}^+$  logo cessa e a condutância da membrana aos íons  $\text{K}^+$  é aumentada, fazendo com que o potencial de membrana retorne ao seu estado original de negatividade através do efluxo de  $\text{K}^+$  e, principalmente, através de um processo chamado “inativação do canal para  $\text{Na}^+$ ” (Hodgkin e Huxley, 1939; Hodgkin e Katz, 1949).

Em experimentos para investigar as propriedades elétricas do PA, aplica-se um pulso de corrente despolarizante cuja intensidade atinge o potencial limiar da membrana e dispara o PA. Observa-se que no início do pulso a condutância ao  $\text{Na}^+$  aumenta e, à medida que a inativação se desenvolve, torna-se menor. Já o aumento da condutância ao  $\text{K}^+$  é mais tardio e persiste durante todo o pulso despolarizante. Ou seja, o influxo de  $\text{Na}^+$  é um processo transitório e autolimitado, visto haver um processo de inativação que impede mais influxo de  $\text{Na}^+$ , mesmo persistindo o pulso despolarizante (Kandel *et al.*, 2000; Hille, 2001).

Devido ao caráter lipofílico da membrana celular, o fluxo desses íons ocorre de maneira seletiva através de canais iônicos que são proteínas integrais da membrana. Os canais iônicos podem sofrer alterações conformacionais e permitir a passagem dos íons. Essa permeabilidade é determinada por três tipos distintos de estímulos: químicos, mecânicos e elétricos. Durante o PA, apenas canais iônicos dependentes de voltagem participam. Em geral, estes canais são específicos para determinado íon e formados por  $\alpha$ -hélices, das quais uma delas corresponde a um sensor de voltagem que detecta a alteração e permite a abertura ou o fechamento do canal (Hille, 2001).



**Figura 2 - Alterações na permeabilidade da membrana originam o potencial de ação.** À esquerda, potencial da membrana graduado em milivolts e à direita, a permeabilidade da membrana graduada em abertura de canais por milímetro quadrado. No potencial de repouso, o potencial de membrana está próximo ao potencial eletroquímico do  $\text{K}^+$  ( $E_{\text{K}^+}$ ). No potencial limiar de excitação da membrana, ocorre a abertura de canais para  $\text{Na}^+$  e influxo deste íon, originando o potencial de ação. O potencial de repouso é restabelecido pelo efluxo de  $\text{K}^+$  (repolarização). Figura modificada da Encyclopedia Britannica, Inc. 2002<sup>©</sup>

A geração e transmissão do PA em uma fibra nervosa ocorrem por meio de dois processos que se complementam: a excitação e a condução. A excitação se refere aos eventos, citados anteriormente, que levam a geração de um PA e a condução se refere à propagação dessa resposta ao longo da fibra nervosa (Best e Taylor, 1990). Curtis e Cole (1938) observaram que para um impulso gerado se propagar ao longo de um nervo, além da despolarização, ocorria aumento da permeabilidade da membrana a íons na região despolarizante.

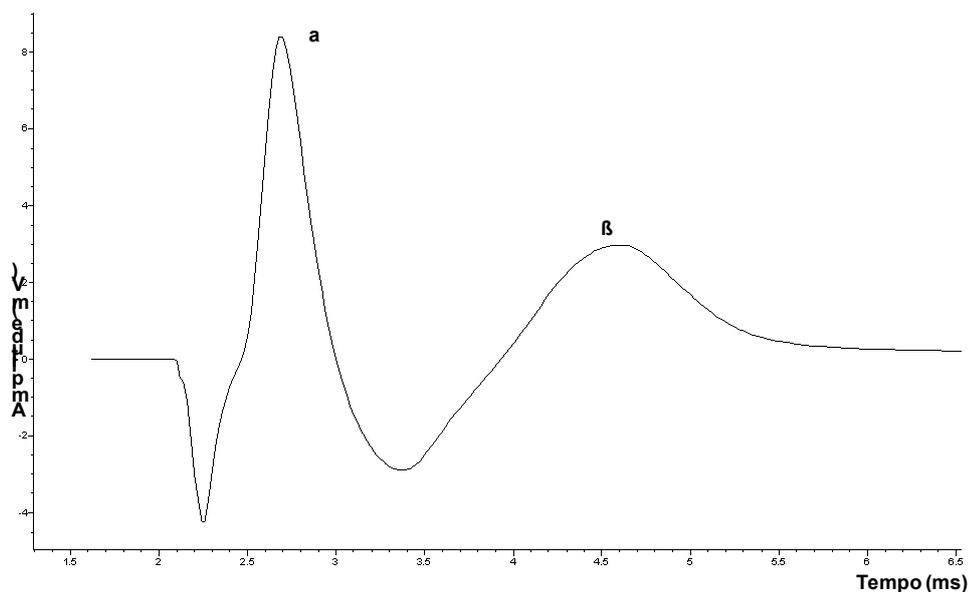
O potencial de ação é dito composto quando registrado em um tronco nervoso e reflete o somatório de vários PAs de células individuais que dispararam quase que simultaneamente. O potencial de ação composto (PAC) difere em vários aspectos do PA do tipo tudo-ou-nada registrado em uma única célula (Junge, 1977).

Ao contrário do PA, o PAC é graduado, ou seja, sua resposta varia com a amplitude do estímulo. Isso ocorre devido os nervos serem formados por fibras de diferentes diâmetros distribuídas aleatoriamente. As fibras mais próximas à superfície respondem com estímulos mais baixos enquanto fibras mais distantes necessitam de estímulos maiores. O diâmetro destas fibras relaciona-se inversamente com o limiar de excitabilidade. Assim, com pequeno estímulo apenas as fibras de diâmetros maiores e mais próximas à superfície do nervo serão excitadas, e à medida que aumentarmos o estímulo estaremos recrutando fibras menores e mais afastadas da superfície. Em certo estímulo, denominado estímulo maximal, todas as fibras terão sido estimuladas e qualquer aumento no estímulo não mais aumentará a resposta (Hursh, 1939; Junge, 1977).

O PAC possui natureza bifásica, que é um resultado do registro feito com um par de eletrodos diferencial. À medida que o PAC se propaga pelo nervo, cada eletrodo registra a alteração de voltagem em relação ao outro eletrodo ocasionando as fases ascendentes e descendentes do PAC (Junge, 1977).

Quando registrado em um nervo de longo comprimento e com estímulo maximal, o PAC mostra várias ondas denominadas de componentes (Figura 3). Estes componentes ocorrem porque a longa distância de condução permite que os PAs das variadas fibras atinjam os eletrodos de registro em tempos diferentes. Como a velocidade de condução de um axônio é uma função de seu diâmetro, então o componente mais rápido do PAC é formado por fibras rápidas e com diâmetro maior, enquanto os componentes mais lentos são formados por fibras lentas e com diâmetros menores.

Além da velocidade de condução, as fibras contribuem para a amplitude do PAC em proporção ao quadrado de seus diâmetros. O resultado é que fibras maiores, embora em menor quantidade no nervo, são responsáveis pelos maiores componentes do PAC. Essas fibras foram denominadas como grupos A, B e C e suas propriedades estão sumarizadas na tabela 1.



**Figura 3 – Registro do potencial de ação composto do nervo ciático de rato.** Os picos, denominados pelas letras gregas  $\alpha$  e  $\beta$ , representam o primeiro e segundo componente do PAC, respectivamente. A forma das ondas dos componentes é determinada pela quantidade, diâmetro e velocidade de condução das fibras presentes no nervo.

**TABELA 1 - Classificação das fibras nervosas de mamíferos.** A classificação do grupo I a IV aplica-se somente a fibras sensoriais.

Tipo	Grupo	Diâmetro (µm)	Velocidade de Condução (m/s)	Função
A $\alpha$		15-20	50-120	Fibras motoras para músculo esquelético
A $\alpha$	Ia	15-20	70-120	Terminações primárias no fuso muscular
A $\alpha$	Ib	12-20	70-120	Aferentes no órgão tendinoso de Golgi
A $\beta$	II	5-10	30-70	Terminações secundárias nos fusos musculares, tato, pressão
A $\gamma$		3-6	15-30	Inervação motora dos fusos musculares
A $\delta$	III	2-5	5-25	Receptores de pressão, dor rápida e aguda e temperatura
B		3	3-15	Pré-ganglionares autonômicas
C		0.5-1	0.5-2	Pós-ganglionares autonômicas (não-mielinizadas)
C	IV	0.5-1	0.5-2	Dor lenta e difusa e temperatura (não-mielinizadas)

Fonte: AIDLEY, 1998 - Capítulo 4, página 53.

### 1.3 GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL E NERVO CIÁTICO

O Gânglio da Raiz Dorsal (GRD) é um aglomerado de corpos celulares de fibras sensoriais que está localizado junto às raízes dorsais de cada nervo espinhal. Os neurônios do GRD são do tipo pseudo-unipolar e conduzem

informações sensoriais de receptores localizados na pele, músculos ou articulações para o SNC. Devido à estrutura característica desses neurônios, as sinapses são ausentes (Lieberman, 1976) e a comunicação entre as células ocorre via despolarização cruzada, originada quando os neurônios vizinhos são estimulados freqüentemente (Devor e Wall, 1990).

Originalmente, e com base em seu diâmetro celular e coloração sobre o microscópio óptico e eletrônico, os neurônios do GRD foram classificados em dois tipos histológicos básicos, denominados “large light” e “small dark” (Lieberman, 1976). Os neurônios “large light” apresentam coloração citoplasmática desigual, com áreas densas de corpúsculos de Nissl intercalada com uma grande região levemente colorida devido à grande quantidade de neurofilamentos. Os neurônios “small dark” possuem, em geral, uma coloração mais uniforme e citoplasma intensamente basófilo com pouco ou nenhum neurofilamento (Lawson *et al.*, 1974, Duce e Keen, 1977).

Considerando suas propriedades imunocitoquímicas, os menores neurônios do GRD expressam substância P e gene relacionado à calcitonina (CGRP), dois peptídios que podem estar ligados a função nociceptiva (McCarthy e Lawson, 1997). O principal marcador de neurônios “large light” é o anticorpo monoclonal RT97, que se liga a neurofilamentos de 200 kDa (Lawson *et al.*, 1984).

A velocidade de condução das fibras do GRD se correlaciona com a morfologia celular. As células maiores conduzem rapidamente o PA e são classificadas como fibras A $\alpha$  (30-55 m/s) ou A $\beta$  (14-30 m/s); as células de tamanho intermediário são classificadas como A $\delta$  (2,2-8 m/s); as fibras do tipo C de condução lenta (<1,4 m/s) relacionam-se às menores células do GRD (Harper e Lawson, 1985a).

Outra distinção entre as células é denotada pela forma de seus potenciais de ação evocados. As células do tipo A $\alpha$  e A $\beta$  disparam PA de curta duração contrastando com os neurônios do tipo C, e alguns do tipo A $\delta$ , que apresentam PA mais largo e com uma inflexão na sua fase de repolarização (Harper e Lawson, 1985b; Djourhi *et al.*, 1998).

As propriedades elétricas dos PAs dependem dos diferentes canais iônicos expressos na membrana celular. Dessa forma, as células do GRD com suas diferentes formas de PAs expressam diferentes subtipos de canais iônicos. Células com PA de longa duração expressam canais para  $\text{Na}^+$  sensíveis a tetrodoxina (TTX-S), as isoformas  $\text{Na}_v1.8$  e  $\text{Na}_v1.9$  dos canais para  $\text{Na}^+$  resistentes a tetrodoxina (TTX-R) e canais para  $\text{K}^+$  com ativação lenta. Células que expressam canais para  $\text{Na}^+$  TTX-S e canais para  $\text{K}^+$  com ativação lenta apresentam PA de duração intermediária e as células com PA de curta duração expressam as isoformas  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.6$  e  $\text{Na}_v1.7$  dos canais para  $\text{Na}^+$  TTX-S, o  $\text{Na}_v1.8$  (TTX-R) e canais para  $\text{K}^+$  com ativação rápida (Campbell, 1992; Black *et al.*, 1996; Sangameswaran *et al.*, 1997; Toledo-Aral *et al.*, 1997; Amaya *et al.*, 2000; Fjell *et al.*, 2000).

O Nervo Ciático (NC) de ratos representa um clássico modelo para o estudo de mecanismo de regeneração das fibras nervosas, desenvolvimento e morte celular induzida e neuropatias.

O NC origina-se dos segmentos espinhais L4 a L6 e inerva toda a região dos membros inferiores. Na sua porção mais central, ele se ramifica em vários fascículos dando origem, mais distalmente, aos nervos tibial, peroneal e sural (Schmalbruch, 1986; Swett *et al.*, 1986). O NC possui fibras motoras (eferentes) e sensitivas (aférentes) e, devido à existência destes dois tipos de fibras, é considerado um nervo misto.

As fibras eferentes são mielinizadas e de dois tipos:  $\text{A}\alpha$  com velocidade de condução de 50–120 m/s e inervam fibras musculares esqueléticas;  $\text{A}\gamma$  responsável pela manutenção do tônus muscular e inervação do fuso muscular, com velocidade de condução de 15-30 m/s (Best e Taylor, 1990; Nokes *et al.*, 1991; Cattarral e Mackie apud Goodmaan e Gilman, 1996; Aidley, 1998).

As fibras aférentes são do tipo  $\text{A}\alpha$ , subtipos (Ib) via aférente do órgão tendinoso de Golgi e (Ia) terminações primárias no fuso muscular, possuem um diâmetro médio de 15  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução de 70 a 120 m/s;  $\text{A}\beta$  - função principal de aferência na propriocepção, tato e pressão nos músculos e

articulações, diâmetro médio de 8  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução média de 50 m/s; A $\delta$  - fibras sensitivas para temperatura e dor, diâmetro de 1 a 4  $\mu\text{m}$  e velocidade de condução de 5 a 25 m/s. Possui ainda fibras sensitivas não mielinizadas do tipo C que conduzem informação referente à dor em uma velocidade média compreendida entre 0,5 e 2 m/s (Best e Taylor, 1990; Nokes et al., 1991; Catterral e Mackie apud Goodman e Gilman, 1996; Aidley, 1998).

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O estragol é um constituinte natural de óleos essenciais de algumas plantas do gênero *Cróton* que é abundante na caatinga brasileira. Estas plantas são utilizadas para o preparo de chás e infusões na medicina popular com o propósito de tratar as mais variadas formas de distúrbios. Os estudos com substâncias naturais agregam valor à biodiversidade da caatinga, que representa um bioma único no mundo e pouco estudado.

Os óleos essenciais, presentes em diversas partes das plantas e produzidos através de seu metabolismo, vêm apresentando alto potencial farmacológico, além de serem de extração fácil e economicamente viável. As atividades biológicas desses óleos se devem à ação isolada e/ou conjunta de seus constituintes químicos. Para o estragol já foram descritas atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante dentre outras, o que confere a esse constituinte uma possível utilização como fármaco. Acrescenta-se a esta importância, a similaridade da molécula de estragol à molécula de eugenol, que vem sendo utilizado como molécula de partida para a síntese de novos fármacos.

Embora o estragol apresente bom potencial para utilização terapêutica, ainda há poucos estudos na literatura científica que relacionem a ação deste constituinte sobre preparações do sistema nervoso e, até o momento, não foram encontrados trabalhos que relatem a utilização da técnica do microeletrodo intracelular na investigação do efeito deste constituinte em tecidos biológicos. Os trabalhos encontrados visam apenas avaliar parâmetros comportamentais que compreendam o funcionalismo do sistema nervoso. Portanto, é com o intuito de disponibilizar mais dados da ação do estragol sobre neurônios periféricos que resolvemos investigar a ação deste composto em preparações intactas dos neurônios do GRD e do NC de ratos.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Estudar as alterações eletrofisiológicas produzidas pelo estragol em diferentes neurônios periféricos de ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Diferenciar os tipos de fibras presentes no registro do PAC (através da velocidade de condução) e os neurônios sensoriais do GRD (através da forma do PA).

2. Caracterizar o efeito do estragol sobre as fibras do NC de ratos registradas no PAC quantificando os seguintes parâmetros de análise: amplitude positiva dos componentes e velocidade de condução dos componentes.

3. Caracterizar o efeito do estragol sobre o PA dos neurosomas do GRD de rato quantificando os seguintes parâmetros de análise: amplitude do PA, duração desse potencial e inclinações máximas nos ramos ascendentes e descendentes.

4. Comparar o efeito do estragol nas fibras do NC e nos neurosomas do GRD.

5. Determinar as alterações dos parâmetros resistência de entrada da membrana celular e potencial de repouso dos neurônios do GRD.

6. Elucidar os possíveis mecanismos de ação desse constituinte sobre a excitabilidade elétrica em neurônios periféricos de ratos.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 ANIMAIS**

Para realização deste trabalho utilizamos ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) de ambos os sexos com massa corpórea compreendida entre 250-350 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos, com livre acesso a água e ração, no Biotério de manutenção do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

O manuseio e utilização dos animais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais de experimentação da UECE e obedeceram os critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.2 SOLUÇÕES**

Os tecidos foram nutridos por solução de Locke modificada na seguinte composição (em mM):

- NaCl: 140, KCl: 5,6, MgCl<sub>2</sub>: 1,2, CaCl<sub>2</sub>: 2,2, Tris-Hidroximetil-Aminometano (TRIS): 10, Glicose: 10.

A solução de locke teve o pH ajustado para  $7,4 \pm 0,01$  utilizando NaOH ou HCl à temperatura ambiente.

Utilizamos solução 0 Na<sup>+</sup> que foi preparada pela substituição do NaCl por N-metil-D-glicosamida (NMDG) da solução de Locke, a fim de manter a osmolaridade da solução. Para os experimentos com alta concentração de K<sup>+</sup> extracelular, utilizamos Locke com KCl a 20 ou 40 mM, mantendo as mesmas concentrações dos outros sais.

O estragol, por ter característica oleosa, foi primeiramente solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluído em solução de Locke para a obtenção das concentrações de trabalho desejadas. Neste estudo, utilizamos o estragol nas concentrações de 1, 2, 4 e 6 mM, uma vez que Leal-Cardoso e colaboradores (2004) constataram que nessa faixa de concentração está o efeito depressor da excitabilidade nervosa.

No intuito de prevenir a ocorrência de um possível efeito da solução solubilizadora sobre a preparação, optamos por não utilizar concentrações maiores que 0,2 % (v/v) de DMSO neste estudo, uma vez que, em concentrações de 0,3 a 1 %, o mesmo foi capaz de potencializar o efeito da lidocaína sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina (Somei *et al.*, 1995).

O estragol, os sais utilizados para o preparo das soluções e o solubilizante, foram adquiridos juntos a Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA).

### **4.3 ELETROFISIOLOGIA**

#### **4.3.1 Registro Extracelular**

Para registro extracelular do PAC (Figura 4), os NC dos ratos foram cuidadosamente dissecados e imediatamente acondicionados em solução de Locke até o momento de sua utilização.

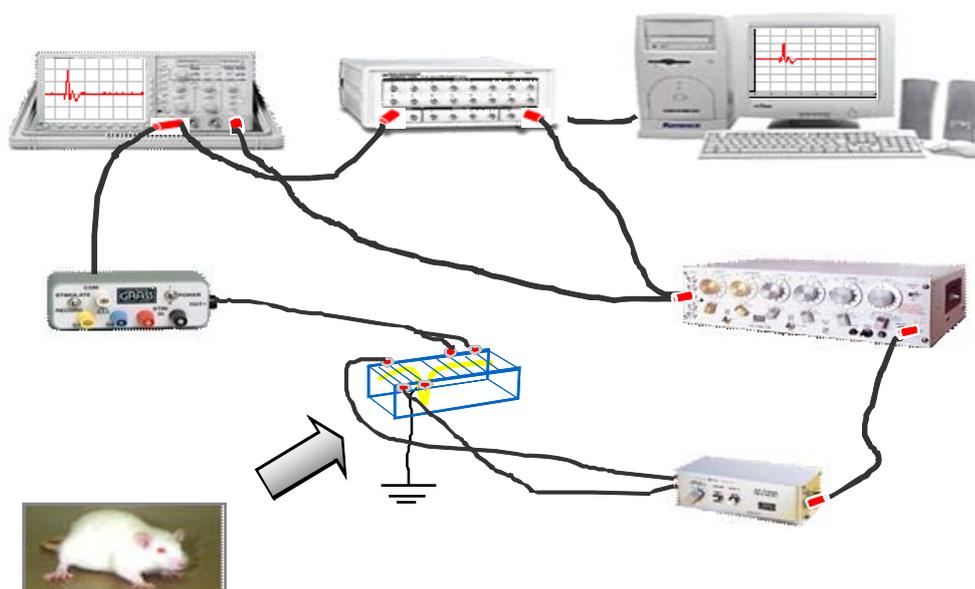
Em seguida, a câmara de registro (camãra de Havard) foi preenchida com 8 ml de solução de Locke e o nervo foi disposto horizontalmente sobre os eletrodos de platina desta câmara. Uma alça de aproximadamente 20 mm do nervo ficou submersa na solução a fim de que, por capilaridade, tanto a solução quanto o estragol fossem administrados ao tecido. A câmara foi, então, hermeticamente fechada para evitar a desidratação da preparação.

Uma das extremidades do nervo foi eletricamente estimulada por pares de eletrodos acoplados a um estimulador Grass, modelo S-48 (Grass Instrument Co., Quincy, MA, USA), através de uma unidade isoladora de

estímulos Grass, modelo SIU 4678 (Grass Instrument Co.). O pulso gerado pelo estimulador foi do tipo onda quadrada, com amplitude de 40 V, duração de 100  $\mu$ s e aplicados a uma frequência de 0,2 Hz.

O PAC evocado foi coletado por eletrodos de registro na outra extremidade do nervo. O sinal foi aumentado em 1000X por um amplificador (AM 01/UECE) de alta impedância de entrada e visualizado em osciloscópio (KENWOOD, modelo CS4125).

Uma placa de interface analógico-digital (A/D) (DIGIDATA 1200 A/B) transformou o sinal para tornar possível a sua leitura e armazenagem em um computador por meio do software Axoclamp (AxonScope, da Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA).



**Figura 4- Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do PAC.**

O protocolo experimental consistiu nas seguintes etapas:

1) Período de estabilização (120 min): tempo geralmente superior ao necessário para que ocorra e se comprove a estabilização (ausência de alterações na amplitude pico-a-pico) do PAC.

2) Período experimental (administração da droga em estudo - 180 min): foram utilizadas as concentrações de 2, 4 e 6 mM de estragol visando uma melhor caracterização do respectivo efeito sobre o nervo.

3) Período de lavagem (180 min): tempo no qual foi observada a recuperação dos parâmetros alterados pela droga.

#### **4.3.2 Registro Intracelular**

O registro do PA intracelular foi realizado como descrito por Jafri e Weinreich (1998). O GRD a nível dos segmentos lombares L4 e L5 foram dissecados, imediatamente acondicionados em solução de Locke e fixados sobre uma câmara de acrílico com fundo Silgard®. A câmara de registro foi montada sob uma lupa (modelo COLLEGE STEREO, MLW Intermed, Schöneiche, Alemanha), com aumento de 20×, para auxiliar a fixação do GRD e observação dos procedimentos de impalamento.

A nutrição e a administração da droga ao tecido ocorreram através de perfusão por meio de fluxo por gravidade (1–1,5 ml/min). Para minimizar os efeitos de capacitância do eletrodo, o nível de líquido da câmara foi controlado na menor altura possível acima da superfície do gânglio. Para a retirada de líquido da câmara foi utilizada uma bomba de infusão, com uma de suas extremidades conectada a um estreito tubo (para agir como um sugador de líquido) e a outra a um depósito de descarte de solução. Essa montagem foi instalada fora do local onde estava a câmara, para evitar a adição de vibração ao sistema. Por fim, a solução que fica na câmara, considerada como meio extracelular, foi aterrada e, portanto, atribuído valor do potencial igual a zero.

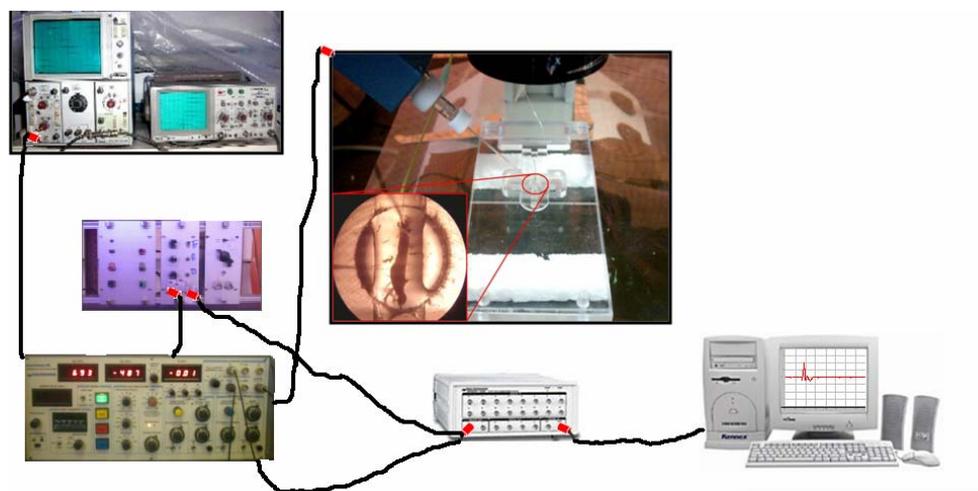
Os neurônios do GRD foram impalados com microeletrodos de borossilicato (diâmetro externo de 1,0 mm e interno de 0,5 mm), que foram confeccionados por um puxador de micropipetas (modelo P-97, Sutter Instrument, Novato, CA, EUA) e preenchidos com solução de KCl 3 M a fim de se obter resistência entre 40 e 90 M $\Omega$ . Em seguida, o microeletrodo foi montado em um pré-amplificador, que estava conectado a um eletrômetro (modelo AXOCLAMP 2B, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA). A movimentação do microeletrodo, bem como o impalamento das células, foi realizada com um micromanipulador hidráulico (modelo MWO-3, Narishige International Inc., Long Island, NY, EUA).

Para o impalamento dos neurônios, utilizamos pulsos retangulares de corrente cuja duração foi de 100 ms e amplitude de 0,1 nA. Após o impalamento, esperamos que o neurônio se equilibrasse com a nova condição, o que geralmente tomou de 5 a 30 min, e foi avaliado pela estabilização do potencial de repouso e da resistência de entrada da membrana. Um neurônio foi considerado aceitável para o estudo quando exibiu um potencial de repouso mais negativo que  $-45$  mV e uma resistência de entrada superior a 20 M $\Omega$ .

Para o registro do PA e das propriedades elétricas da membrana, utilizamos um protocolo que consistia na injeção de dois pulsos retangulares de corrente. O primeiro pulso teve duração de 100 ms e amplitude variável (faixa de 0,1, à 4,0 nA). O segundo pulso teve duração de 300 ms, amplitude fixa de -0,1 nA e foi utilizado para medir a resistência de entrada.

As propriedades elétricas da membrana foram registradas no modo de clampeamento de corrente (current-clamp), no qual há a fixação do valor da corrente a ser injetada, de forma a medir as variações de potencial advindo do sistema. Para monitoramento do sinal, utilizamos dois osciloscópios: um para o monitoramento do potencial de membrana ( $V_m$ ) e da corrente injetada (modelo 5111A, TEKTRONIX, Beaverton, OR, EUA) e o outro, para monitoramento da carga e descarga do microeletrodo (modelo HM303-6, HAMEG Instruments, Mainhausen, Alemanha). Ambos os osciloscópios, bem como uma placa de interface A/D (modelo DIGIDATA 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, EUA) estavam conectados às saídas do eletrômetro. A aquisição dos registros

eletrofisiológicos foi feita através de um software (CLAMPEX, versão 6,0) e os dados armazenados em computador para posterior análise. O esquema do “set up” experimental está ilustrado na figura 5.



**Figura 5 - Esquema ilustrativo do "set up" para registro intracelular do potencial de ação dos neurônios do GRD.**

O protocolo experimental consistiu nas seguintes etapas:

1) Período de estabilização (5–30 min): tempo necessário para que a célula se acomodasse a condição de impalamento imposta e fosse atingido o estado estacionário para o potencial de repouso e a resistência de entrada.

2) Determinação do limiar de geração do PA: injeção de pulsos despolarizantes crescentes até a deflagração do PA. Os experimentos foram realizados com valores de pulso 20% superior ao pulso limiar.

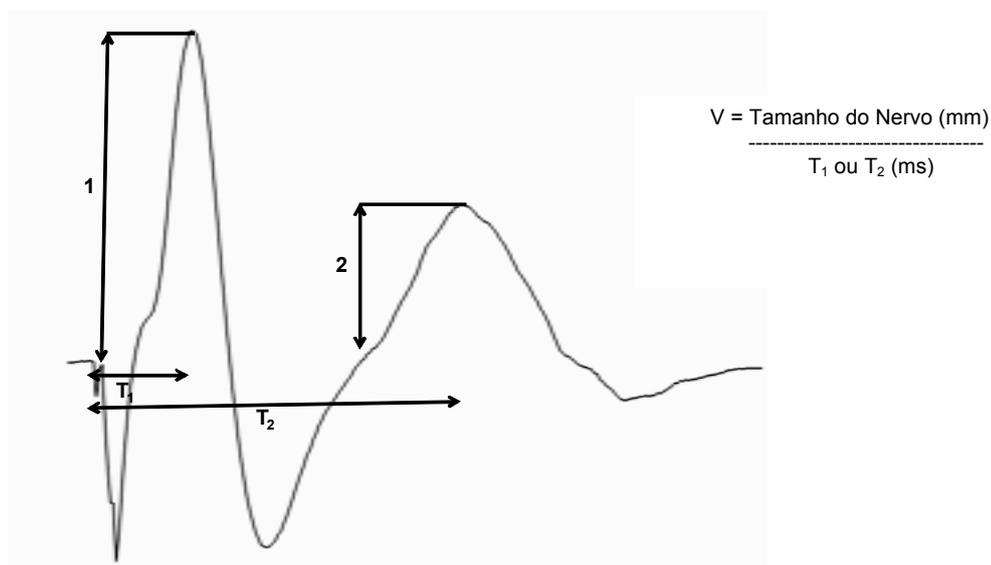
3) Período experimental (2,5-5 min): foram utilizadas as concentrações de 1, 2, 4 e 6 mM de estragol visando uma melhor caracterização do respectivo efeito sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurossomas do GRD.

4) Período de lavagem (5-30 min): tempo no qual foi observada a reversão das alterações induzidas pela droga.

#### 4.4 ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados foram analisados por meio do software Clampfit® (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA).

Considerando o registro extracelular do PAC, analisamos o efeito do estragol sobre a amplitude positiva e a velocidade de condução dos componentes. A amplitude dos componentes foi estabelecida através da amplitude máxima positiva de cada componente. A velocidade de condução dos componentes foi calculada dividindo a distância percorrida pelo PAC pelo intervalo de tempo compreendido entre o artefato de estímulo e o pico de cada componente. Esta foi utilizada para classificar os tipos de fibras nervosas presentes nos componentes do PAC (Figura 6).

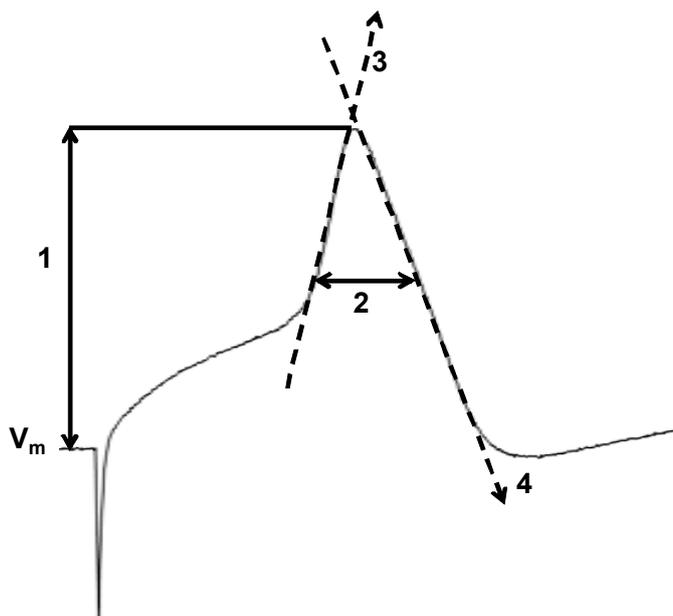


**Figura 6- Parâmetros mensurados no PAC.** A medida da amplitude dos componentes está representada pelos números 1 e 2.  $T_1$  e  $T_2$  representam o tempo utilizado para o cálculo da velocidade de condução do primeiro e segundo componente, respectivamente.

Determinamos, também, o tempo que o estragol levou para desenvolver 50% do seu efeito ( $t_{50\%}$ ) sobre a amplitude positiva dos componentes. Este foi calculado projetando o ponto correspondente no eixo das abscissas da curva do curso temporal do estragol.

Para o registro intracelular do PA, as células foram consideradas como significativas quando apresentaram potencial de repouso mais negativo que -45 mV e resistência de entrada da membrana superior a 20 M $\Omega$ . Para caracterizar o efeito do estragol sobre o PA intracelular, foram analisados os seguintes parâmetros eletrofisiológicos: potencial de repouso, resistência de entrada ( $R_{in}$ ), a amplitude do PA, a duração desse potencial e as inclinações máximas dos ramos ascendente  $(dV/dt)_{asc}$  e descendente  $(dV/dt)_{desc}$ .

O potencial de repouso foi determinado por uma deflexão estável do  $V_m$  após o período de estabilização da célula. A  $R_{in}$  foi calculada de acordo com a lei de Ohm,  $V=R \cdot i$ , na qual  $V$  representa a diferença de potencial entre o valor máximo alcançado do potencial transmembrana devido à injeção de uma corrente hiperpolarizante e o potencial de repouso. A amplitude do potencial foi estabelecida pela diferença entre o valor de pico e o potencial de repouso. As inclinações máximas dos ramos ascendente e descendente foram determinadas pela razão entre a variação do potencial de dois pontos próximos e o intervalo de tempo entre esses dois pontos. Por fim, a duração do PA foi determinada como o intervalo de tempo entre os pontos em que o potencial de ação, no ramo ascendente e descendente, alcança 50% do valor de sua amplitude (Figura 7).



**Figura 7 – Parâmetros mensurados no PA dos neurônios do GRD.** A amplitude do potencial (1), a duração do potencial (2) e as inclinações máximas no ramo ascendente (3) e no ramo descendente (4).

#### **4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística, bem como a construção dos gráficos, foi feita com o auxílio do software Sigmaplot® (versão 9.01, Systat Software). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média e o número total de experimentos está representado pela letra n.

Duas amostras foram comparadas através do teste t-student, enquanto comparações múltiplas foram realizadas com o teste paramétrico ANOVA, ou com a Kruskal-Wallis ANOVA (não paramétrico, no caso em que os dados não apresentaram homocedasticidade ou normalidade da distribuição). As médias foram consideradas diferindo significativamente entre si quando o valor de p para a ocorrência da hipótese nula foi menor ou igual a 0,05.

## 5. RESULTADOS

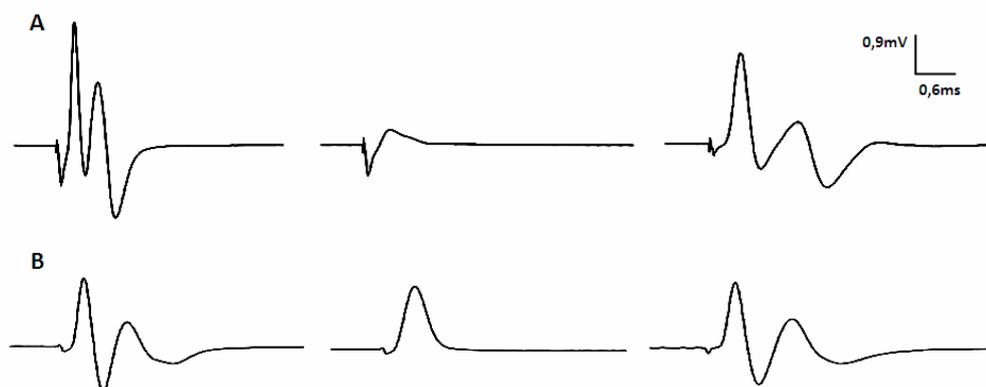
### 5.1 REGISTRO EXTRACELULAR

#### 5.1.1 Caracterização da Preparação

A forma do potencial de ação composto (PAC) nos experimentos controle apresentou dois ou, em alguns casos, três componentes de onda. O terceiro componente esteve presente no começo do período de estabilização em aproximadamente 40% dos registros, porém, em muitos casos, ao final desse período tornou-se indistinguível da linha base. Por este motivo, optamos por não estudar o efeito do estragol sobre o terceiro componente do PAC (Figura 8).

Em nervos ciáticos estimulados a 0,2Hz, os valores controles para a amplitude positiva do primeiro e segundo componente do PAC foram, respectivamente,  $4,52 \pm 0,38$  mV (n=37) e  $1,20 \pm 0,24$  mV (n=37), e para velocidade de condução foram  $93,14 \pm 5,6$ m/s (n=37) e  $31,59 \pm 1,55$  m/s (n=37), respectivamente.

Para verificar se os componentes do PAC são influenciados pela voltagem transmembrana e pelo gradiente de concentração do  $\text{Na}^+$ , como esperado por um sinal que resulta de potências de ação axonal, o efeito da alta concentração de  $\text{K}^+$  extracelular e da retirada do  $\text{Na}^+$  da solução nutritiva (Locke) foram determinados. A remoção do  $\text{Na}^+$  da solução de Locke reduziu a amplitude positiva de ambos os componentes do PAC para  $0,0 \pm 0,0\%$  (n=3) do controle, enquanto o  $\text{K}^+$  extracelular nas concentrações de 20 e 40 mM reduziu significativamente a amplitude positiva do primeiro componente, respectivamente, para  $63,3 \pm 6,4\%$  (n=5) e  $14,5 \pm 2,4\%$  (n=5) do controle. A amplitude positiva do segundo componente foi reduzida significativamente para  $4,1 \pm 1,2\%$  (n=5) e  $0,0 \pm 0,0\%$  (n=5) do valor controle, respectivamente para as concentrações de 20 e 40 mM de  $\text{K}^+$  extracelular (Figura 8 e Tabela 2).



**Figura 8 -** Traçado representativos do potencial de ação composto (PAC), no controle (coluna da esquerda), aos 180 minutos de exposição (coluna central) à solução  $0\text{Na}^+$  (A) e  $20\text{ mM}$  de  $\text{K}^+$  extracelular (B) e após 180 minutos de lavagem (coluna da direita).

**Tabela 2 -** Efeito da solução de  $\text{K}^+$  extracelular e solução  $0\text{Na}^+$  sobre os parâmetros velocidade de condução e amplitude positiva dos componentes do PAC. Os resultados, expressos em percentual do controle, estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média com a variável n indicando o número de experimentos.

	Amplitude Positiva		Velocidade de Condução	
	(% do Controle)		(% do Controle)	
	1° Componente	2° Componente	1° Componente	2° Componente
$[\text{K}^+]$ 20 mM	$63,3 \pm 6,4^*$ (n=5)	$4,1 \pm 1,2^*$ (n=5)	$76,7 \pm 1,1^*$ (n=5)	--
$[\text{K}^+]$ 40 mM	$14,5 \pm 2,4^*$ (n=5)	$0,0 \pm 0,0^*$ (n=5)	$83,7 \pm 2,7^*$ (n=5)	--
$0\text{ Na}^+$	$0,0 \pm 0,0^*$ (n=3)	$0,0 \pm 0,0^*$ (n=3)	--	--

(--) A grande redução da amplitude não permitiu resolução para mensurar a velocidade de condução.

\*- Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 5.1.2 Efeito do Estragol sobre os Componentes do Potencial de Ação Composto.

Estragol apresentou efeito depressor concentração dependente sobre a amplitude positiva e velocidade de condução dos componentes do PAC, sendo estatisticamente significativa em relação ao controle a partir da concentração de 4mM de estragol (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Os efeitos sobre os parâmetros do PAC avaliados foram reversíveis após lavagem (Figura 9).



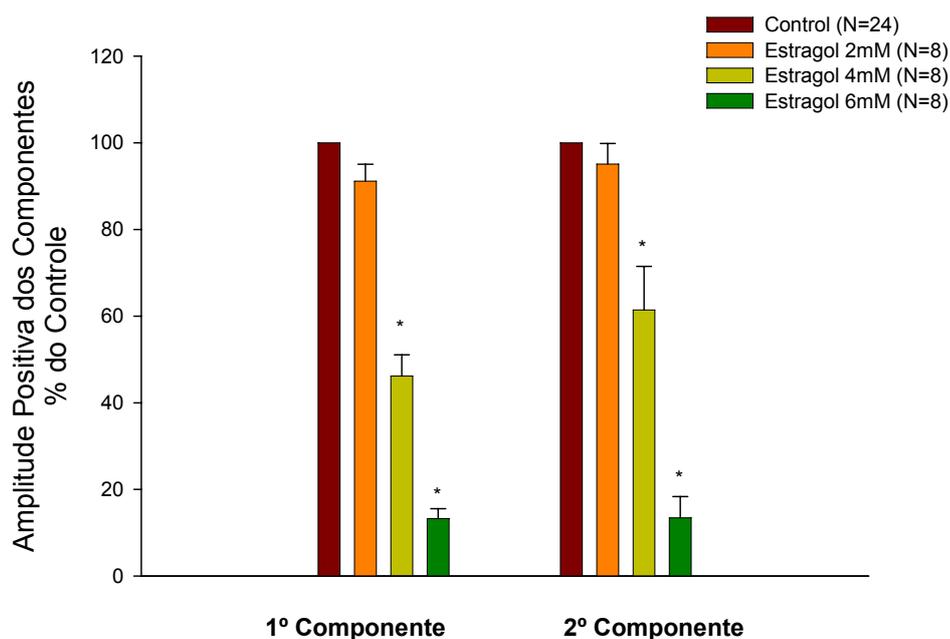
Figura 9- Traçados representativos do potencial de ação composto (PAC), no controle (coluna da esquerda), aos 180 minutos de exposição (coluna central) a 2mM (A), 4mM (B) e 6mM (C) de estragol e após 180 minutos de lavagem (coluna da direita).

### 5.1.3 Efeito do Estragol sobre a Amplitude Positiva dos Componentes do PAC.

Ao final de 180 minutos de exposição do nervo ao estragol na concentração de 2 mM ( $n=8$ ), não houve alteração significativa da amplitude positiva de ambos componentes do PAC. Enquanto a 4 mM ( $n=8$ ), a amplitude

positiva do primeiro e segundo componente foram reduzidas, respectivamente, para  $46,13 \pm 4,93\%$  e  $61,41 \pm 10,07\%$  do valor controle. Para a concentração de 6 mM (n=8), a amplitude positiva do primeiro componente foi reduzida para  $13,27 \pm 2,30\%$  e a do segundo componente para  $13,45 \pm 4,89\%$  dos seus valores controle.

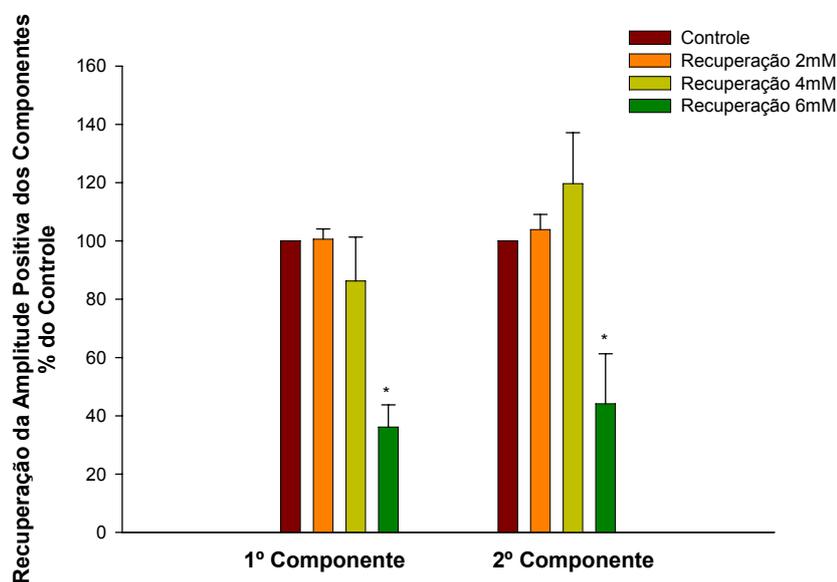
As alterações observadas para as concentrações de 4 e 6 mM foram estatisticamente diferentes do controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ), enquanto não houve diferença estatística entre os percentuais de bloqueio do primeiro e segundo componentes após exposição do nervo as concentrações de estragol estudadas (Figura 10).



**Figura 10 - Efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC.** Os dados, expressos em percentuais do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média com n indicando o número de experimentos. \*P  $< 0,05$  comparado ao controle (ANOVA).

Após a lavagem do estragol em um tempo de observação de 180 min, houve recuperação progressiva da amplitude positiva dos componentes do PAC. Após esse período, o efeito depressor do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes foi totalmente reversível para a concentração de 4 mM (ANOVA,  $p < 0,05$ ). À 6 mM de estragol, a recuperação foi parcial, uma vez que o valor ao final da recuperação é significativamente diferente do valor aos 180 min em presença de estragol e é também diferente do controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 11).

Os valores da amplitude positiva do primeiro componente foram, na recuperação, para  $86,30 \pm 15,03$  ( $n=8$ ) e  $36,14 \pm 7,62$  ( $n=8$ ) e os valores do segundo componente foram para  $119,69 \pm 17,50$  ( $n=8$ ) e  $44,15 \pm 17,13$  ( $n=8$ ) do valor controle, respectivamente, nas concentrações de 4 e 6 mM. O efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC está resumido na tabela 3.



**Figura 11 - Recuperação do efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC.** Os dados estão em valores percentuais em relação ao controle, após 180 min de lavagem da preparação. Dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \*P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA).

**Tabela 3 – Efeito e recuperação do estragol sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC.** Os valores, expressos em percentuais do controle, estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média com n indicando o número de experimentos.

Concentração de estragol	Amplitude positiva do primeiro componente		Amplitude positiva do segundo componente	
	(% do Controle)		(% do Controle)	
	Estragol	Recuperação	Estragol	Recuperação
2 mM	91,15 $\pm$ 3,92 (n=8)	100,58 $\pm$ 3,53 (n=8)	95,09 $\pm$ 4,73 (n=8)	103,89 $\pm$ 5,23 (n=8)
4 mM	46,13 $\pm$ 4,93* (n=8)	86,30 $\pm$ 15,03 (n=8)	61,42 $\pm$ 10,07* (n=8)	119,68 $\pm$ 17,50 (n=8)
6 mM	13,27 $\pm$ 2,30* (n=8)	36,14 $\pm$ 7,62** (n=8)	13,45 $\pm$ 3,53* (n=8)	44,15 $\pm$ 4,89** (n=8)

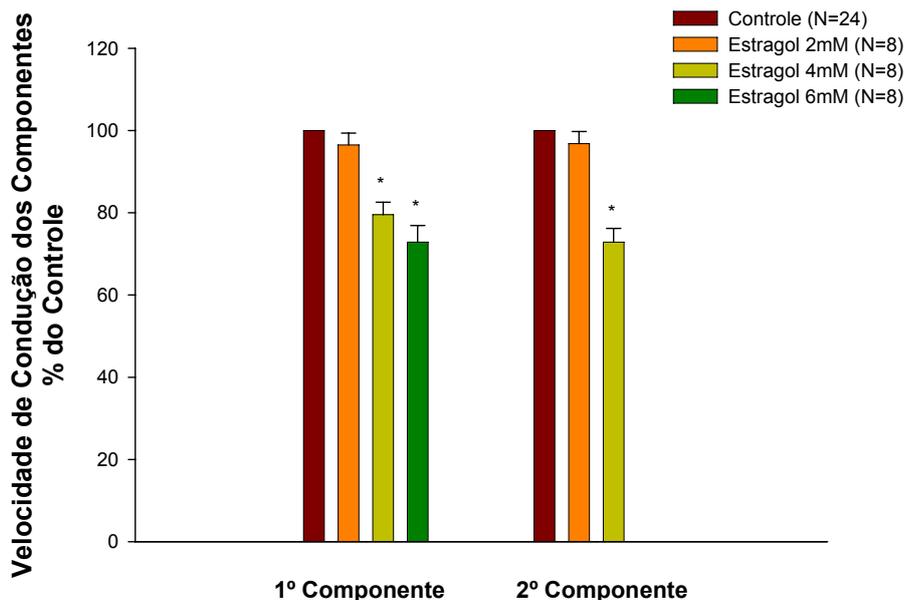
\*- Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

\*\*- Diferença estatisticamente significativa em relação ao valor do final da exposição ao estragol (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#### 5.1.4 Efeito do Estragol sobre a Velocidade de Condução dos Componentes do PAC.

Estragol reduziu de maneira concentração dependente a velocidade de condução dos componentes do PAC. Na concentração de 2mM (n=8), não houve diferença estatística entre o controle e o experimental em ambos os componentes. Enquanto para a concentração de 4 mM (n=8), estragol reduziu significativamente a velocidade de condução do primeiro e segundo componente, respectivamente, para 79,54  $\pm$  3,00% e 72,84  $\pm$  3,36% do valor controle. Em 6 mM (n=8), estragol reduziu significativamente a velocidade de condução do primeiro componente para 72,88  $\pm$  4,01% do valor controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Devido a grande redução da amplitude positiva do segundo

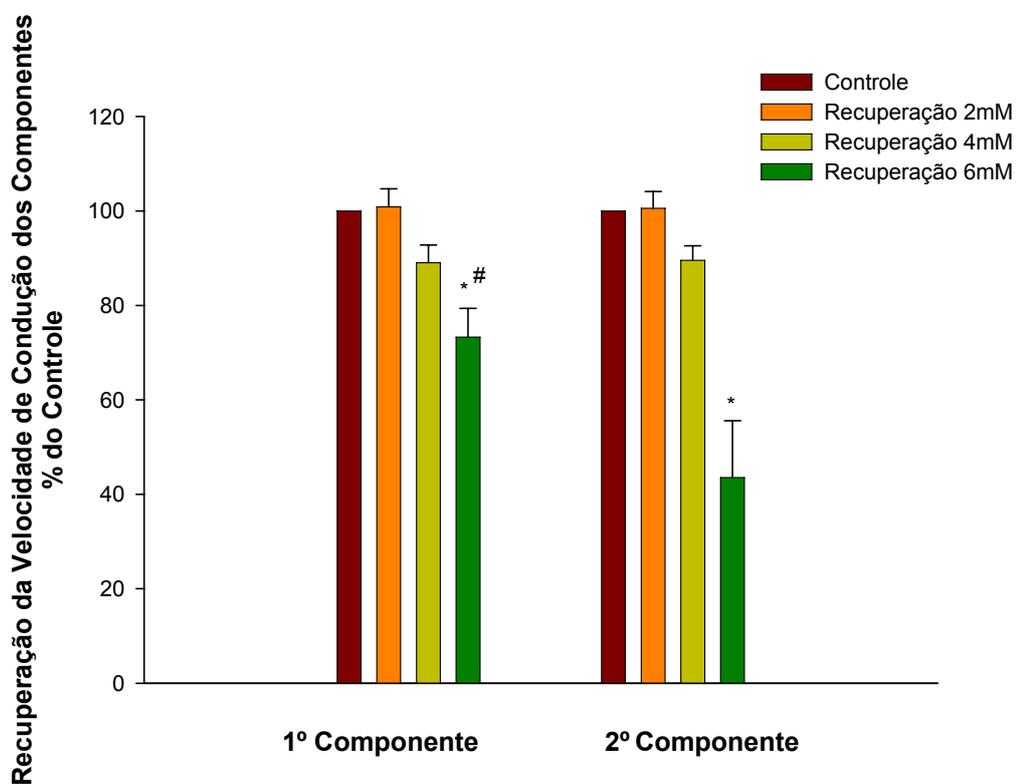
componente pelo estragol à 6mM, não houve resolução para medir a velocidade de condução deste componente. Em nenhuma concentração de estragol utilizada houve diferença estatística entre os bloqueios da velocidade de condução do primeiro e segundo componentes do PAC (Figura 12).



**Figura 12 - Efeito do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.** Os resultados, expressos em percentuais do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média com a variável n indicando o número de experimentos. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (ANOVA).

Ao final de 180 min de lavagem, a velocidade de condução do primeiro componente foi recuperada para  $89,01 \pm 3,77\%$  e  $73,28 \pm 6,09\%$  do valor controle, após bloqueio pelas concentrações de 4 e 6 mM de estragol, respectivamente. A velocidade de condução do segundo componente foi recuperada para  $89,52 \pm 3,10\%$  e  $43,54 \pm 12,02\%$  do valor controle, respectivamente para 4 e 6 mM (Figura 13). Os dados do efeito do estragol

sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC estão sumarizados na tabela 4.



**Figura 13 - Recuperação do efeito do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.** Os dados estão em valores percentuais em relação ao controle, após 180 min de lavagem da preparação. Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (ANOVA) e # $P < 0,05$  comparado ao segundo componente (ANOVA).

**Tabela 4 - Efeito e recuperação do estragol sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.** Os resultados expressos em percentual do controle estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média com a variável n indicando o número de experimentos.

Estragol	Velocidade de condução do primeiro componente (% do Controle)		Velocidade de Condução do segundo componente (% do Controle)	
	Estragol	Recuperação	Estragol	Recuperação
2 mM	96,48 ± 2,86 (n=8)	100,88 ± 3,78 (n=8)	96,81 ± 2,94 (n=8)	100,58 ± 3,53 (n=8)
4 mM	79,54 ± 3,00* (n=8)	89,01 ± 3,77 (n=8)	72,84 ± 3,36* (n=8)	89,52 ± 3,10 (n=8)
6 mM	72,88 ± 4,01* (n=8)	73,28 ± 6,09 (n=8)	--	43,54 ± 12,02 (n=8)

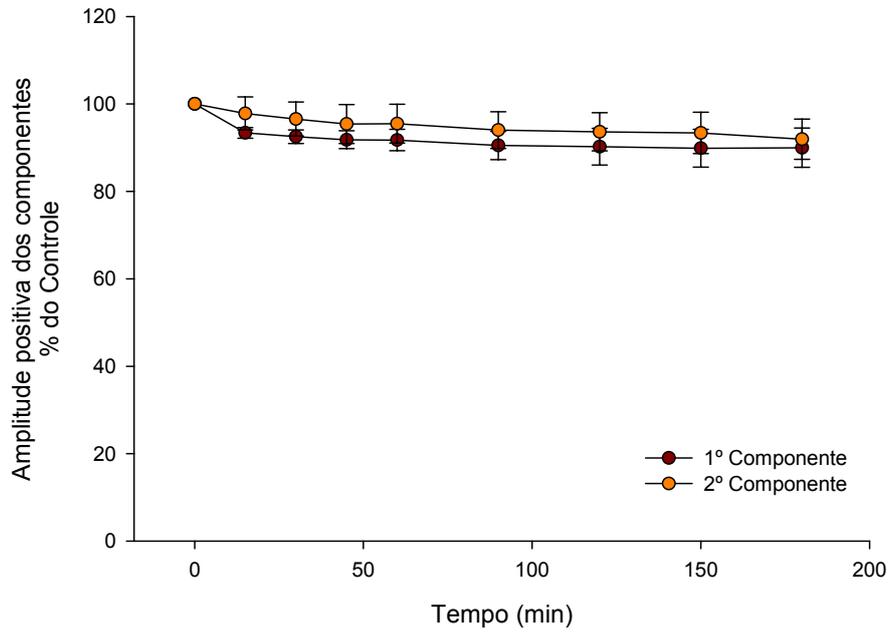
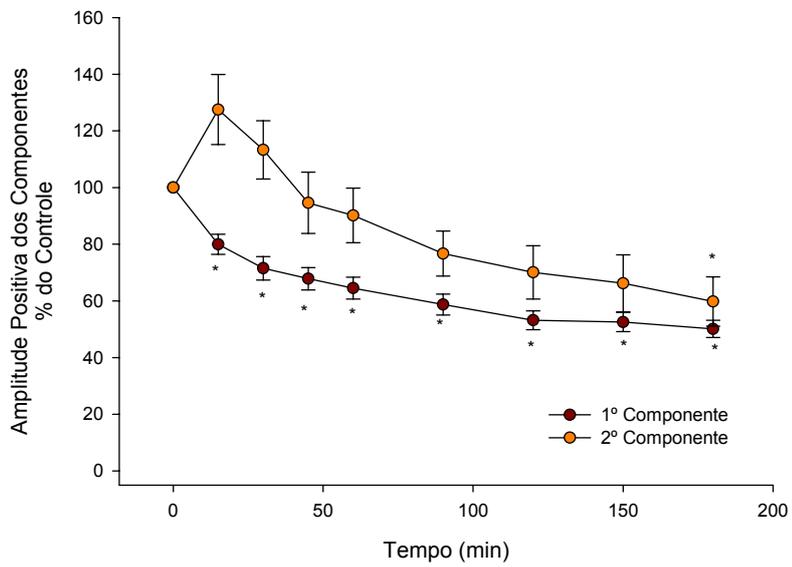
(--) A grande redução da amplitude não permitiu resolução para mensurar a velocidade de condução.

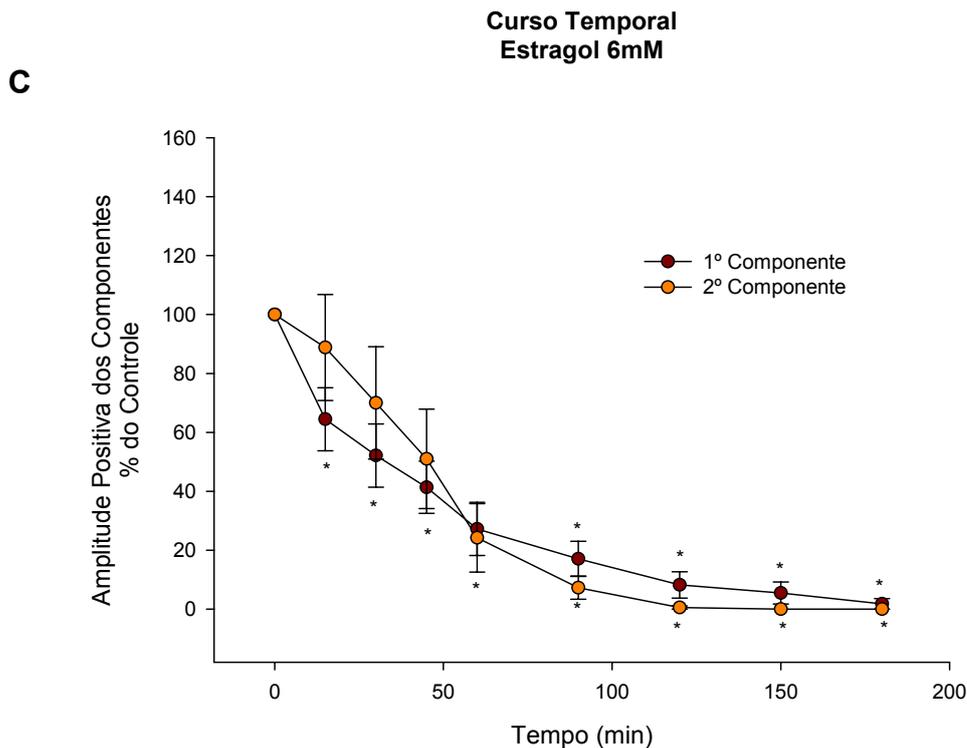
\*- Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#- Diferença estatisticamente significativa em relação ao segundo componente (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 5.1.5 Curso Temporal do Efeito do Estragol sobre a Amplitude Positiva dos Componentes do PAC.

Como citado anteriormente, a concentração de 2 mM não inibiu significativamente a amplitude positiva de nenhum componente do PAC. Já com 4 e 6 mM de estragol a inibição do primeiro componente foi significativa a partir de 15 minutos de exposição à droga. Com relação à amplitude positiva do segundo componente, a inibição foi significativa somente ao final da exposição à droga (180 min) para a concentração de 4 mM e a partir de 90 minutos para 6 mM de estragol (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Para o primeiro componente, a resposta atingiu o estado estacionário aos 120 min para 4 e 6 mM de estragol. Já para o segundo componente, o estado estacionário foi atingido aos 150 e 120 min, respectivamente para as concentrações de 4 e 6 mM (Figura 14).

**Curso Temporal  
Estragol 2mM****A****Curso Temporal  
Estragol 4mM****B**

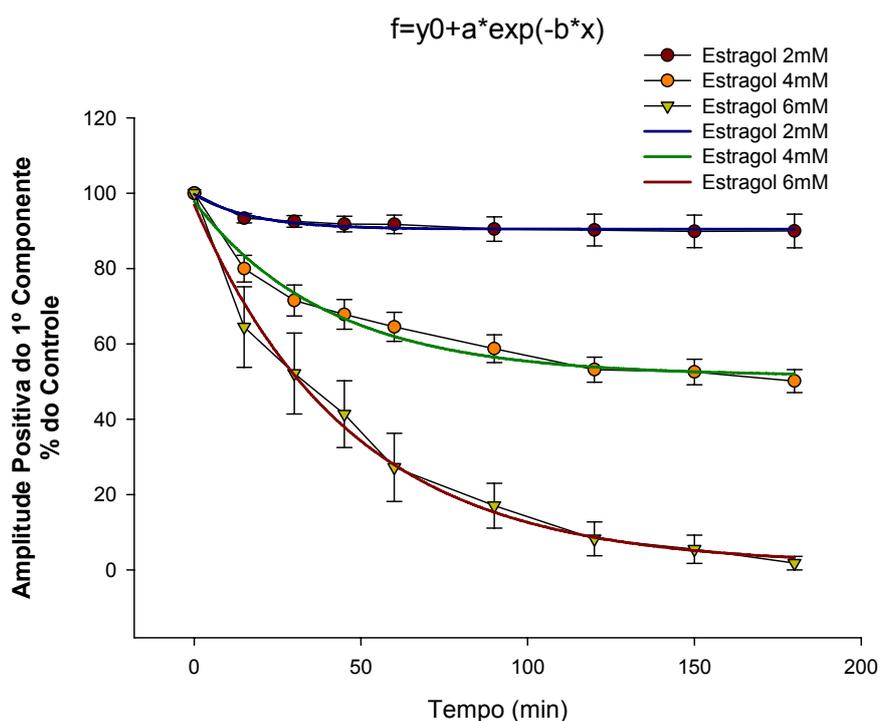


**Figura 14 - Tempo de curso dos efeitos do estragol, por 180 minutos, nas concentrações de 2 (painel A), 4 (painel B) e 6 mM (painel C), na amplitude positiva dos componentes do PAC, em nervo ciático de rato. Os dados, expressos em % do controle estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média para 8 experimentos. \*P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA).**

Para o primeiro componente, o tempo necessário para que se desenvolvesse 50% do efeito do estragol nas concentrações de 2, 4 e 6 mM foi de 10,50 min, 23,10 min e 34,20 min, respectivamente. Já para o segundo componente do PAC, este tempo foi de 33,60 min, 84,00 min e 45,50min, respectivamente, para as concentrações de 2, 4 e 6 mM (Tabela 5).

O nervo ciático de rato ficou exposto ao estragol, nas diferentes concentrações, durante 180 minutos. Neste intervalo, o efeito do estragol sobre a amplitude positiva do primeiro componente se ajustou a uma curva exponencial descrita pela equação:  $f=y_0+a*\exp^{-b*x}$  com intervalo de confiança superior a 95% (Figura 15). O efeito do estragol sobre a amplitude positiva do segundo componente não se ajustou a nenhuma curva com função conhecida.

Utilizando a equação para o cálculo do tempo de 50% do efeito do estragol sobre o primeiro componente, obtivemos tempos similares aos calculados pela projeção do ponto no eixo das abscissas. Este tempo foi de 11,47 min, 25,85 min e 31,51 min respectivamente para as concentrações de 2, 4 e 6 mM.



**Figura 15 - Ajuste das curvas do efeito do estragol sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC.**

**Tabela 5 - Tempo onde ocorre 50% do bloqueio da amplitude positiva dos componentes do PAC.** Os dados correspondem à projeção do ponto correspondente no eixo das abscissas.

Estragol	1º Componente	2º Componente
2mM	10,5 min	33,6 min
4mM	23,1 min	84,0 min
6mM	34,2 min	45,5 min

## 5.2 REGISTRO INTRACELULAR

### 5.2.1 Caracterização e Amostragem Celular

Este estudo foi baseado nos dados de 114 neurônios do GRD, dos quais 31 apresentaram uma inflexão na fase de repolarização do PA ( $N_{inf}$ ) e 83 que não apresentaram a inflexão ( $N_0$ ) (Figura 16). Os neurônios  $N_{inf}$  apresentaram duração, amplitude do PA e resistência de entrada maiores do que os neurônios  $N_0$ , os quais apresentaram maiores  $dV/dt$  ascendente e descendente. Os valores controles para estes parâmetros estão sumarizados na tabela 6.

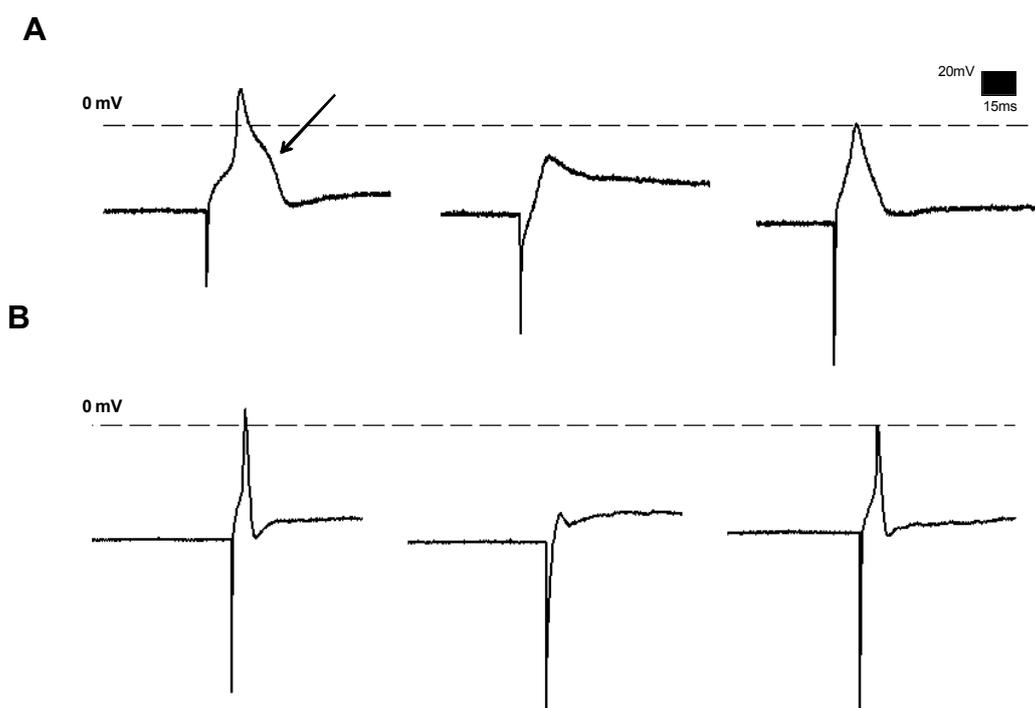
**Tabela 6 – Valores controle dos parâmetros eletrofisiológicos mensurados nos neurônios  $N_0$  e  $N_{inf}$ .** Os resultados, expressos em valores absolutos, estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média com a variável  $n$  indicando o número de experimentos.

Parâmetros Eletrofisiológicos	Neurônios $N_0$	Neurônios $N_{inf}$
Duração do PA	$1,19 \pm 0,08$	$3,84 \pm 0,35 \#$
(ms)	(n=83)	(n=31)
Amplitude do PA	$77,31 \pm 1,43$	$84,51 \pm 2,38 \#$
(mV)	(n=83)	(n=31)
$dV/dt_{asc}$	$178,56 \pm 8,41$	$95,60 \pm 7,42 \#$
(V/s)	(n=83)	(n=31)
$dV/dt_{desc}$	$-104,99 \pm 5,03$	$-53,76 \pm 4,50 \#$
(V/s)	(n=83)	(n=31)
$E_m$	$-60,12 \pm 1,44$	$-59,09 \pm 3,10$
(mV)	(n=83)	(n=31)
$R_{in}$	$28,36 \pm 2,90$	$49,50 \pm 6,41 \#$
(M $\Omega$ )	(n=70)	(n=21)

# - Diferença estatisticamente significativa comparado aos neurônios  $N_0$  (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

### 5.2.2 Efeito do Estragol sobre o PA Intracelular

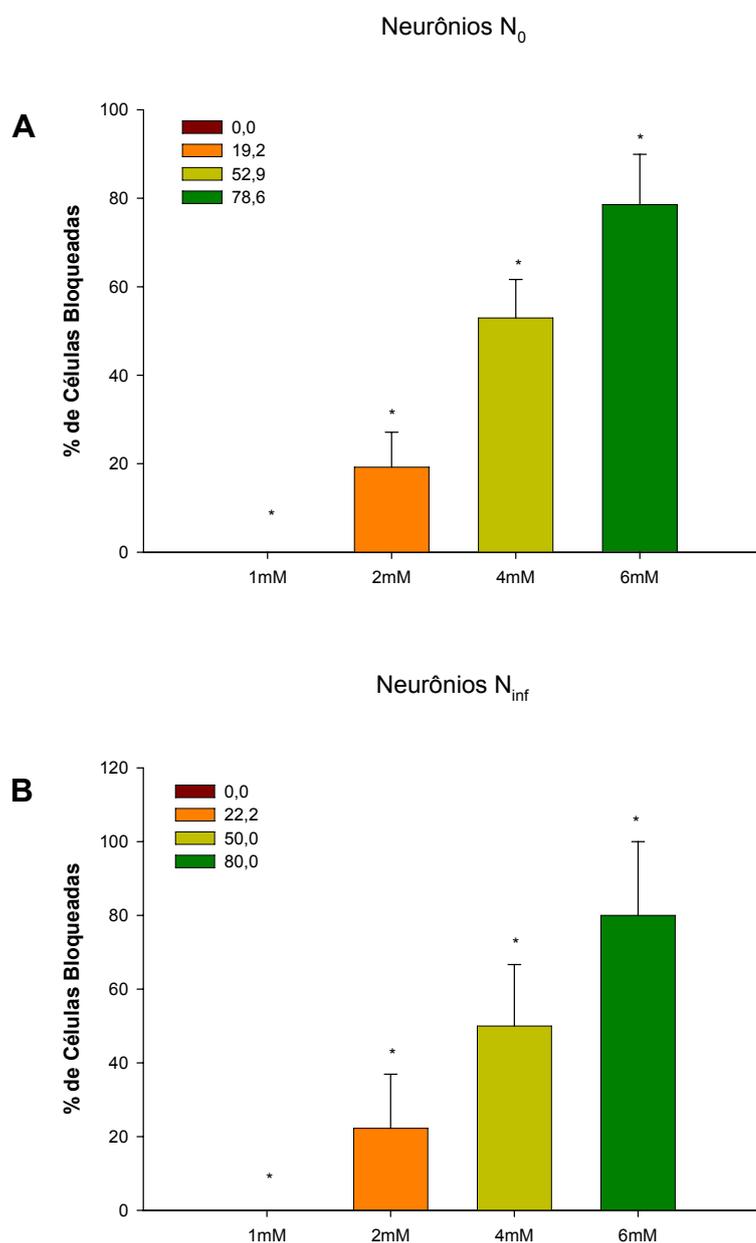
Estragol bloqueou de maneira concentração dependente o PA dos neurônios do GRD. Este bloqueio ocorreu em um intervalo máximo de 150 segundos e foi reversível após lavagem (Figura 16).



**Figura 16 - Traçados representativos do potencial de ação (PA), no controle (coluna da esquerda), após exposição ao estragol (coluna central) nos neurônios  $N_{inf}$  (A) e nos neurônios  $N_0$  (B) e recuperação (coluna da direita). A seta indica a inflexão presente na fase de repolarização dos neurônios  $N_{inf}$ .**

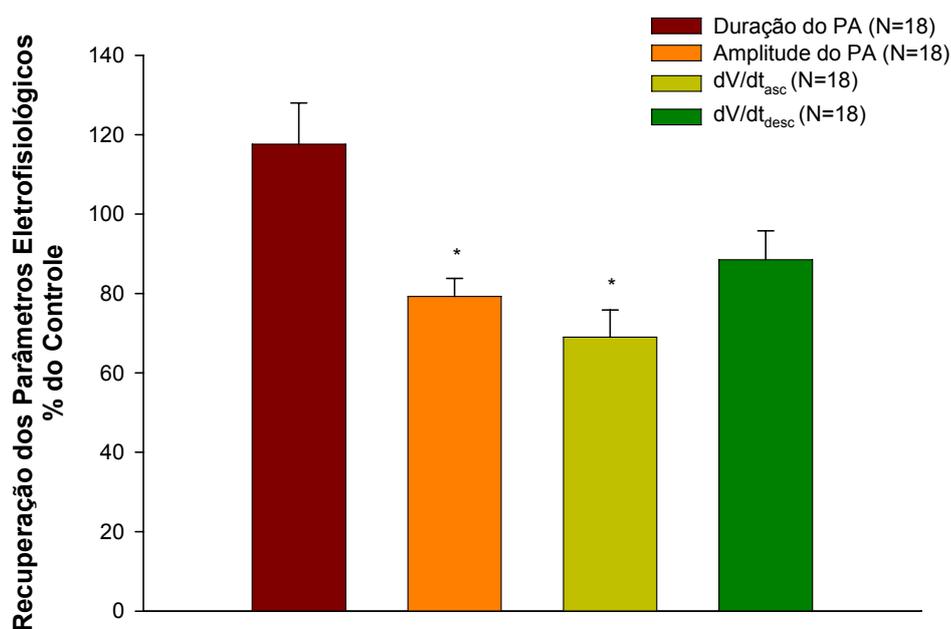
Na concentração de 1mM, estragol não bloqueou nenhuma célula do GRD, enquanto nas concentrações de 2, 4 e 6mM, ele bloqueou, respectivamente,  $19,23 \pm 7,88\%$  (N=26),  $52,94 \pm 8,69\%$  (N=34) e  $78,57 \pm 11,38\%$  (N=14) dos neurônios  $N_0$  do GRD. Enquanto os percentuais de bloqueio para os neurônios  $N_{inf}$  foram  $22,22 \pm 14,70\%$  (N=9),  $50,0 \pm 16,67\%$

(N=10) e  $80,0 \pm 20,0\%$  (N=5), respectivamente, para as concentrações de 2, 4 e 6mM. Essas proporções foram relacionadas significativamente com as diferentes concentrações de estragol estudadas (qui-quadrado,  $p \leq 0,02$ ). Não houve diferença estatística entre os percentuais de bloqueio dos dois grupos de neurônios estudados (Figura 17).



**Figura 17 – Percentual de neurônios  $N_0$  (A) e  $N_{inf}$  (B) bloqueados pelo estragol.** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. Para ambos os grupos de neurônios, a concentração de estragol utilizada está relacionada com o percentual de células bloqueadas (\* $P \leq 0,02$ , teste do qui-quadrado).

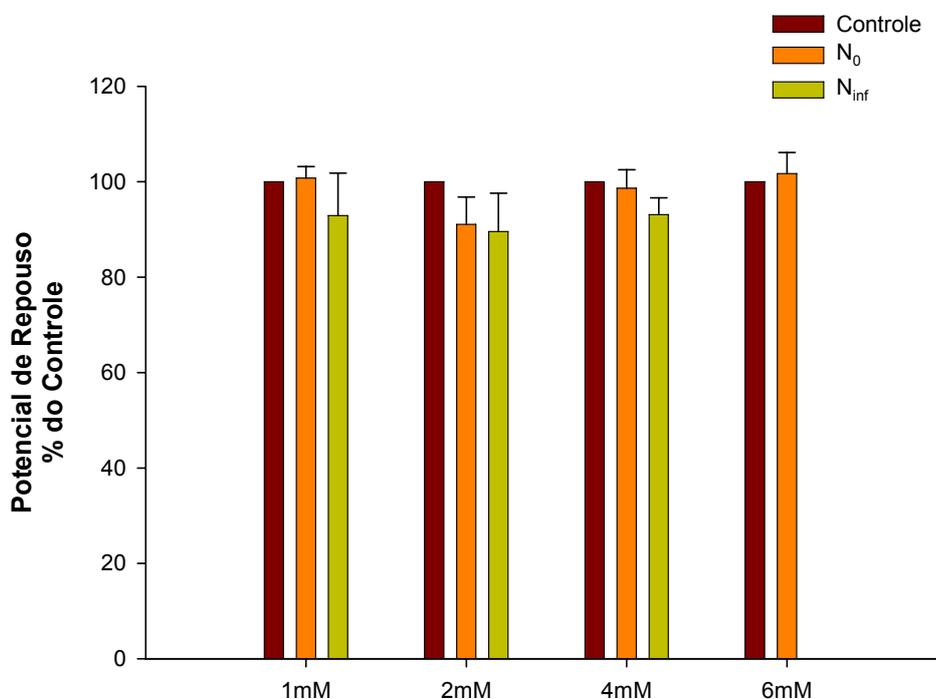
A recuperação do PA ocorreu lentamente para ambos os grupos de neurônios estudados, de forma que foi possível observar a recuperação do PA apenas para aqueles neurônios que mantiveram um impalamento estável por um longo período. Dentre os 44 neurônios que tiveram o PA completamente bloqueado por qualquer concentração de estragol, em 40,9% foi possível manter o impalamento por um período de tempo suficientemente longo para demonstrar a recuperação. Nestes neurônios (n=18) a duração, amplitude,  $(dV/dt)_{asc}$  e  $(dV/dt)_{desc}$  do PA recuperaram, respectivamente, para  $117,63 \pm 10,37\%$ ,  $79,24 \pm 4,53\%$ ,  $69,0 \pm 6,84\%$  e  $88,47 \pm 7,34\%$  dos valores controle (Figura 18).



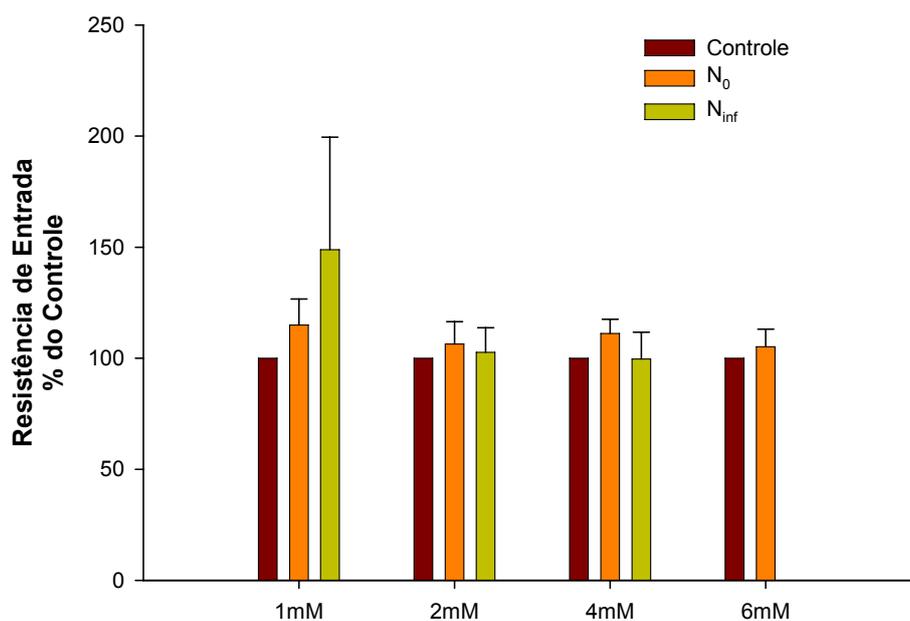
**Figura 18 – Recuperação dos parâmetros eletrofisiológicos do PA dos neurônios que foram bloqueados.** Os dados, expressos em percentual do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média com n indicando o número de experimentos. \* $P < 0,05$  comparado ao controle (ANOVA).

### 5.2.3 Efeito do Estragol sobre o Potencial de Repouso e Resistência de Entrada.

Após a exposição dos neurônios  $N_0$  e  $N_{inf}$  a qualquer uma das concentrações de estragol utilizadas, nenhum efeito sobre o potencial de repouso e resistência de entrada foi demonstrado, pois os valores representativos das médias dos experimentos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle (ANOVA,  $p > 0,05$ ) (Figuras 19 e 20).



**Figura 19 - Efeito do estragol sobre o potencial de repouso dos neurônios  $N_0$  e  $N_{inf}$  do GRD.** Os dados expressos em percentual do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

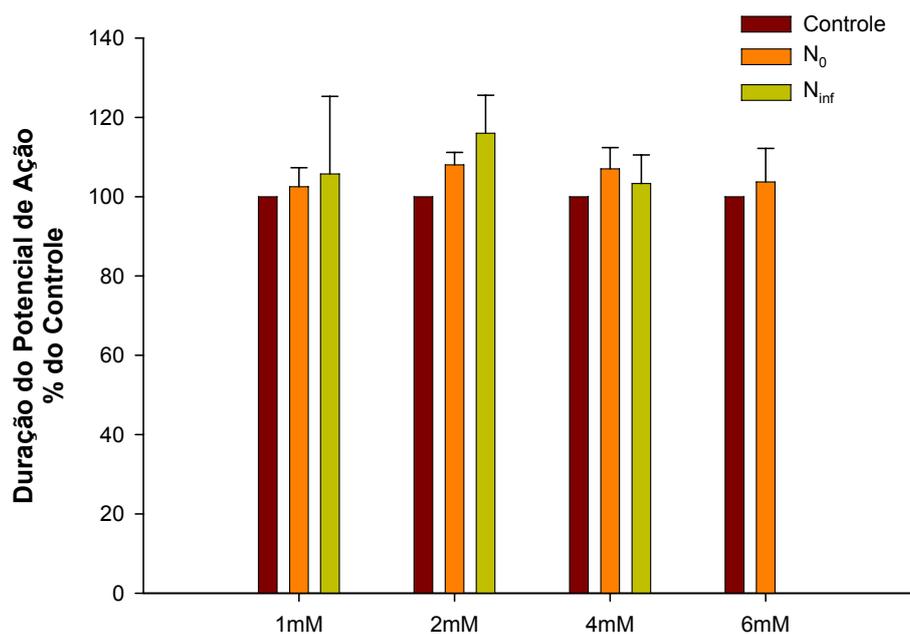


**Figura 20 - Efeito do estragol sobre a resistência de entrada dos neurônios  $N_0$  e  $N_{inf}$  do GRD.** Os dados expressos em percentual do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 5.2.4 Efeito do Estragol sobre os Parâmetros Eletrofisiológicos dos Neurônios que não Foram Bloqueados.

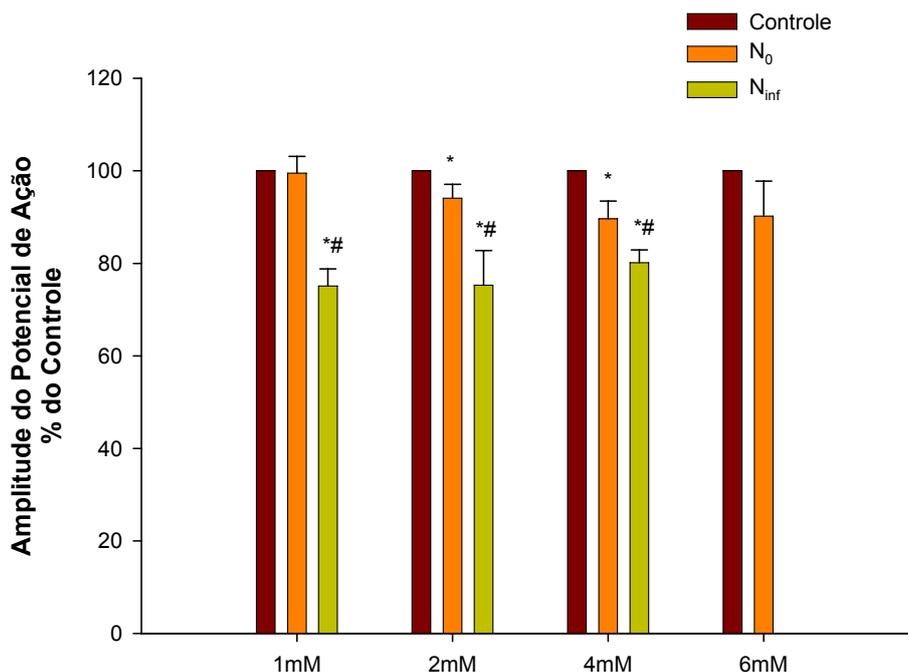
Nos neurônios que foram bloqueados, os parâmetros: duração do PA, amplitude do PA,  $(dV/dt)_{asc}$  e  $(dV/dt)_{desc}$  foram reduzidos a zero. Para se obter uma análise mais fidedigna do efeito do estragol sobre os parâmetros acima citados, resolvemos observar o efeito do estragol sobre os neurônios que não foram bloqueados, mas que foram expostos ao estragol durante 300 segundos. Devido ao pequeno número de amostras coletadas de neurônios  $N_{inf}$  não bloqueados a 6mM ( $n=1$ ), ele não foi comparado estatisticamente com outros neurônios expostos a outras concentrações de estragol.

A administração de estragol em qualquer concentração estudada não alterou, significativamente, a duração do PA nos neurônios  $N_0$  e nem nos neurônios  $N_{inf}$  (Figura 21).



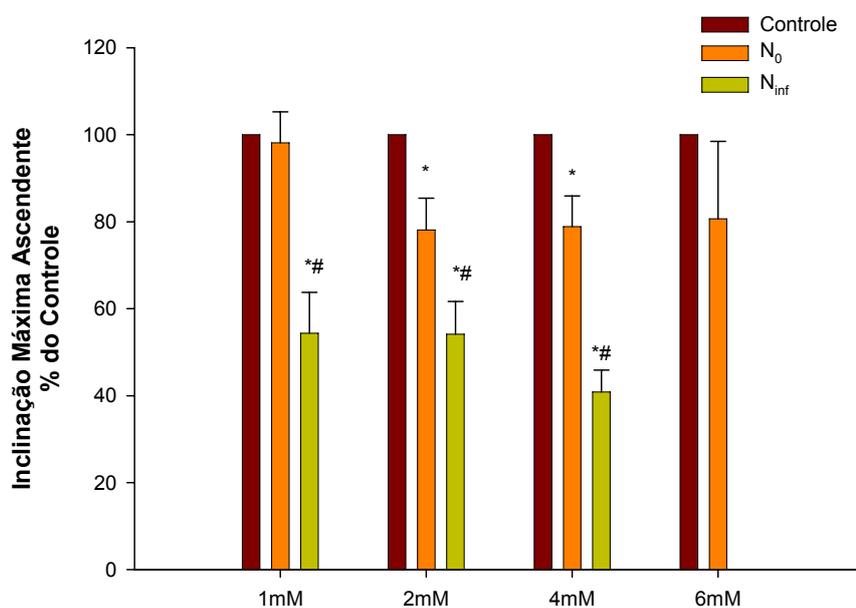
**Figura 21-** Efeito do estragol sobre a duração do PA dos neurônios que não foram bloqueados. Os resultados, expressos em percentual do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Estragol à 1mM (N=9) não alterou a amplitude positiva dos neurônios N<sub>0</sub>, contudo nas concentrações de 2, 4 e 6 mM, a amplitude foi reduzida significativamente e respectivamente para  $94,08 \pm 3,02\%$  (N=21),  $89,63 \pm 3,83\%$  (N=16) e  $90,22 \pm 7,53\%$  (N=3) do valor controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Sobre os neurônios N<sub>inf</sub>, estragol reduziu significativamente a amplitude positiva para  $75,10 \pm 3,70\%$  (N=7),  $75,28 \pm 7,48\%$  (N=7) e  $80,16 \pm 2,71\%$  (N=5) dos valores controle, respectivamente para as concentrações de 1, 2 e 4 mM (ANOVA,  $p < 0,05$ ). O efeito do estragol sobre a amplitude positiva dos neurônios N<sub>0</sub> foi estatisticamente diferente dos neurônios N<sub>inf</sub> (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 22).



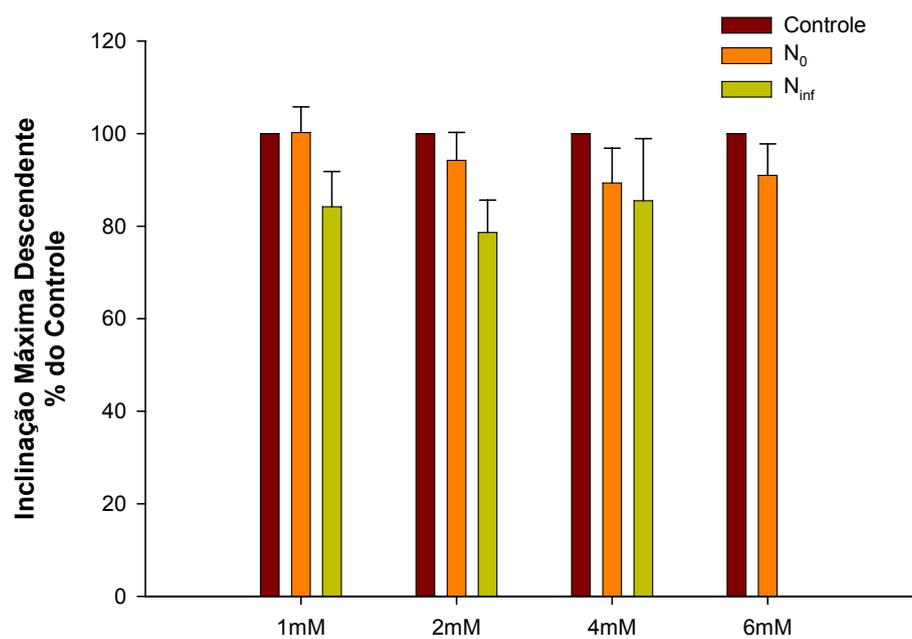
**Figura 22 - Efeito do estragol sobre amplitude do potencial de ação dos neurônios não bloqueados.** Os resultados, expressos em percentuais do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA) e # $P < 0,05$  em relação aos neurônios N<sub>0</sub> (ANOVA).

Quanto a  $(dV/dt)_{asc}$  nos neurônios N<sub>0</sub>, esta não foi alterada significativamente do valor controle para a concentração de 1mM (n=9). Estragol a 2, 4 e 6 mM reduziu a  $(dV/dt)_{asc}$  dos neurônios N<sub>0</sub>, respectivamente, para  $78,09 \pm 7,32\%$  (n=21),  $78,85 \pm 7,07\%$  (n=16) e  $80,65 \pm 17,83\%$  (n=3), do valor controle. Estas alterações foram estatisticamente diferentes do controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ). Sobre os neurônios N<sub>inf</sub>, estragol nas concentrações de 1, 2 e 4 mM reduziu significativamente a  $(dV/dt)_{asc}$  para  $54,33 \pm 9,42\%$  (n=7),  $54,15 \pm 7,50\%$  (n=7) e  $40,87 \pm 5,01\%$  (n=5), respectivamente, do valor controle. Houve diferença estatística entre o percentual de redução dos neurônios N<sub>inf</sub> quando comparados ao percentual dos neurônios N<sub>0</sub> (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 23).



**Figura 23 - Efeito do estragol sobre a inclinação máxima ascendente dos neurônios não bloqueados.** Os resultados, expressos em percentuais do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA) e # $P < 0,05$  em relação aos neurônios N<sub>0</sub> (ANOVA).

A inclinação máxima descendente não foi alterada em relação ao valor controle em nenhuma concentração de estragol e em nenhum grupo de neurônios estudados. Embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas significantes entre os efeitos do estragol nos neurônios N<sub>0</sub> e nos neurônios N<sub>inf</sub>, observou-se uma tendência de bloqueio maior sobre os neurônios N<sub>inf</sub> (Figura 24). Os efeitos do estragol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios em que os PAs não foram totalmente bloqueados encontram-se sumarizados na tabela 7.



**Figura 24 - Efeito do estragol sobre a inclinação máxima descendente dos neurônios não bloqueados.** Os resultados, expressos em percentuais do controle, estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

**Tabela 7 – Efeito do estragol sobre os parâmetros eletrofisiológicos dos neurônios não bloqueados do GRD.** Os resultados, expressos em percentual do controle, estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média com a variável n indicando o número de experimentos.

	$N_0$				$N_{inf}$			
	(% do Controle)				(% do Controle)			
	1mM	2mM	4mM	6mM	1mM	2mM	4mM	6mM
<b>Duração</b>	102,52 $\pm$ 4,77 (n=9)	108,01 $\pm$ 3,18 (n=21)	107,03 $\pm$ 5,33 (n=16)	103,71 $\pm$ 8,45 (n=3)	105,71 $\pm$ 19,58 (n=7)	115,99 $\pm$ 9,59 (n=7)	103,31 $\pm$ 7,19 (n=5)	(n=1)
<b>Amplitude</b>	99,51 $\pm$ 3,59 (n=9)	94,08 $\pm$ 3,02* (n=21)	89,63 $\pm$ 3,83* (n=16)	90,23 $\pm$ 7,53* (n=3)	75,10 $\pm$ 3,70*# (n=7)	75,28 $\pm$ 7,48*# (n=7)	80,16 $\pm$ 2,71*# (n=5)	(n=1)
<b>dV/dT<sub>asc</sub></b>	98,14 $\pm$ 7,10* (n=9)	78,10 $\pm$ 7,32* (n=21)	78,85 $\pm$ 7,07* (n=16)	80,65 $\pm$ 17,83 (n=3)	54,33 $\pm$ 9,42*# (n=7)	54,15 $\pm$ 7,51*# (n=7)	40,87 $\pm$ 5,01*# (n=5)	(n=1)
<b>dV/dtd<sub>esc</sub></b>	100,25 $\pm$ 5,54 (n=9)	94,21 $\pm$ 6,07 (n=21)	89,33 $\pm$ 7,52 (n=16)	91,00 $\pm$ 6,75 (n=3)	84,19 $\pm$ 7,62 (n=7)	78,63 $\pm$ 7,00 (n=7)	85,50 $\pm$ 13,40 (n=5)	(n=1)

\*- Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

#- Diferença estatisticamente significativa em relação aos neurônios  $N_0$  (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

## **6. DISCUSSÃO**

A principal descoberta deste estudo foi que o estragol bloqueia a excitabilidade dos neurossomas do GRD e que esse bloqueio se realiza na ausência de alterações do potencial de repouso e da resistência de entrada. O trabalho também confirma os achados de Leal-Cardoso e colaboradores (2004) em nervo ciático e adiciona a informação de que o estragol atua com igual potência em fibras mielinizadas sensoriais e motoras. Dentro do melhor do nosso conhecimento, essas demonstrações são originais, uma vez que não foram descritas na literatura científica internacional.

### **6.1 EFEITO DO ESTRAGOL SOBRE OS NEURÔNIOS**

O nervo ciático é constituído em sua maior parte por fibras do tipo A, segundo a classificação de Erlanger e Gasser, apresentando os subtipos A $\alpha$ , A $\beta$ , A $\gamma$  e A $\delta$ , e fibras do tipo C. Estas fibras apresentam diâmetros, velocidades, limiar de excitabilidade e possivelmente populações de canais para Na<sup>+</sup> diferentes (Nokes et al., 1991; Catteral e Mackie, 1996; Junge, 1976).

Devido ao longo comprimento do nervo utilizado foi possível distinguir nos nossos registros do PAC duas componentes, cada uma delas representando um grupo de fibras que conduzem o potencial de ação a uma dada velocidade. Calculando a velocidade de condução para cada componente, podemos classificar os tipos de fibras que estão ali presentes. O primeiro componente apresentou velocidade de condução média de 93m/s que representa a velocidade das fibras motoras subtipo A $\alpha$ , enquanto o segundo componente com velocidade média de 31m/s seria formado por fibras sensoriais mielinizadas do tipo A $\beta$  e motoras do tipo A $\gamma$ .

Os componentes do PAC se mostraram uma resposta real e não um artefato advindo do sistema, pois foram completamente bloqueados pela retirada do Na<sup>+</sup> da solução nutritora e revertidos após lavagem. Como evidência adicional, os componentes também foram bloqueados por soluções

com altas concentrações de  $K^+$ . O aumento da concentração de  $K^+$  no meio extracelular despolariza a membrana podendo causar a inativação de canais para  $Na^+$  induzindo o bloqueio do PA (Berne et al., 2004). O bloqueio seletivo do segundo componente por 20 mM de  $K^+$  sugere que os diferentes componentes do PAC são originários de PAs com diferentes dependências para ativação e/ou inativação dos canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem.

Diversos estudos demonstram que os anestésicos locais apresentam ação diversificada sobre os diferentes tipos de fibras. Staiman e Seeman (1977) concluíram que as fibras mielinizadas de pequeno diâmetro são mais sensíveis aos anestésicos locais clássicos (benzil álcool, lidocaína e tetrodoxina). Já Gokin e colaboradores (2001), utilizando anestesia percutânea em nervo ciático de rato, concluíram que a susceptibilidade das fibras à lidocaína não segue o princípio do tamanho (que fibras menores são sempre bloqueadas primeiro), mas sim que as fibras motoras e proprioceptivas são bloqueadas preferencialmente em relação as nociceptoras. Nos nossos experimentos e para cada concentração utilizada, estragol bloqueou na mesma proporção ambos os componentes do PAC, não demonstrando preferência por nenhum tipo de fibras. Esta observação está similar aos dados obtidos por Matthews e Rushworth (1957), os quais realizando registros *in vivo* de PAC de nervos musculares periféricos de gatos com procaína a 0,2%, não observaram diferenças significantes entre fibras motoras e sensoriais de grande diâmetro, ambas foram bloqueadas aproximadamente na mesma proporção.

Demonstramos, também, que o estragol reduz a velocidade de condução das fibras do nervo ciático de maneira proporcionalmente similar. A velocidade de condução pode ser diminuída por redução da corrente de  $Na^+$  e, conseqüentemente, redução da corrente de circuito local, levando a uma menor excitação das regiões adjacentes. Sugerimos portanto, que este deve ser o mecanismo pelo qual o estragol alterou a velocidade de condução dos componentes do PAC. A velocidade pode ser reduzida também por alteração primária das propriedades passivas do axônio, como aumento da capacitância da membrana por unidade de área, aumento da resistência do axoplasma, diminuição da resistência de membrana. Um mecanismo envolvendo essas

propriedades passivas é pouco provável para o estragol, já que essa substância não alterou a resistência de entrada dos neurossomas.

Embora, ao final de 180 minutos, o percentual de bloqueio tenha sido similar para as fibras motoras (primeiro componente) e sensoriais mielinizadas (segundo componente), o estragol bloqueia primeiramente as fibras motoras como demonstrado pelo cálculo do tempo de 50% do efeito. Isto ocorre, provavelmente, devido a uma diferença primária de velocidade de atuação nas fibras do primeiro e segundo componente do PAC e não decorrente de fatores farmacocinéticos relacionados à distribuição mais periférica de um tipo de fibra dentro do nervo, como poderia ocorrer se as fibras motoras fossem localizadas próximas a margem exterior do nervo e, portanto, expostas a concentrações maiores de estragol no início do bloqueio. Uma hipótese atraente é que antes de bloquear, o estragol reduziu a velocidade de condução das fibras do primeiro componente que passaram, provavelmente, a conduzir o PA com a velocidade das fibras do segundo componente, portanto incrementando e retardando o bloqueio deste componente. Esta hipótese está coerente com características do curso temporal do bloqueio do PAC pelo estragol. Nas concentrações com efeitos significantes, a curva do segundo componente apresenta uma concavidade voltada para baixo no seu início. Ou seja, ocorre uma diminuição na velocidade de redução da amplitude positiva do segundo componente em relação ao primeiro componente, seguido por um aumento dessa velocidade de bloqueio (concavidade voltada para cima). Mudanças na distribuição das velocidades de condução, também, foram observadas no bloqueio do PAC pelo tramadol (Dalkilic et al., 2009), no efeito da suplementação de melatonina no exercício induzido (Ayaz e Okudan, 2009) e na neuropatia diabética (Kiziltan et al., 2007).

Nos registros do PAC, nós não conseguimos visualizar as fibras sensoriais amielínicas do tipo C provavelmente devido aos parâmetros de estímulo que utilizamos e/ou ao seu pequeno diâmetro (e, portanto, pouca contribuição para o registro do PAC) (Junge, 1977). Portanto, para o estudo do estragol sobre este tipo de célula, nós utilizamos o registro intracelular do PA dos neurossomas do GRD. Este é formado por neurônios sensoriais cuja

velocidade de condução está relacionada às propriedades elétricas do PA (Harper e Lawson, 1985a,b).

A forma do PA está relacionada com a modalidade sensorial conduzida pelo neurônio. McCarthy e Lawson (1997) mostraram que os neurônios do GRD que expressam substância P e gene relacionado à calcitonina (dois peptídeos ligados a nocicepção) estão associados com os PAs que apresentam uma inflexão na fase de repolarização. Estes neurônios, por sua vez, estão relacionados com as células de menor diâmetro que conduzem lentamente o PA, sendo representados predominantemente por neurônios sensoriais do tipo A $\delta$  e C. Os PAs sem inflexão caracterizam neurônios de grande diâmetros do tipo A $\alpha$ / $\beta$  muitos dos quais são mecanorreceptores (McCarthy e Lawson, 1997; Djouhri et al., 1998; Rush et al., 2007). Com base na informação contida na literatura científica, nós classificamos os neurônios N<sub>inf</sub> como nociceptores e os neurônios N<sub>0</sub> como mecanorreceptores.

Estudos anteriores demonstraram que os neurônios nociceptivos apresentam duração e amplitude maiores do que os neurônios mecanorreceptivos. Estas observações estão de acordo com os valores de controle obtidos por nós neste estudo, o que sugere uma classificação fidedigna dos nossos neurônios (Harper e Lawson, 1985b; Fang et al., 2005). No presente estudo, o maior percentual de células mecanorreceptoras impaladas deve-se ao fato de ser mais fácil fazer registro intracelular estável de neurosomatas com diâmetro maior.

Para uma melhor caracterização do efeito do estragol sobre os neurônios do GRD, classificamos os bloqueios em total, quando a amplitude do PA foi reduzida apenas a uma resposta local ou resposta passiva da membrana celular, ou parcial, quando o neurônio ainda disparava o PA.

Sobre os neurônios do GRD que tiveram o PA bloqueado, demonstramos que o percentual de células bloqueadas aumenta com o aumento da concentração de estragol utilizada e, que este percentual, é similar para ambos os tipos celulares. Este fato corrobora a hipótese de que o estragol não apresenta preferência por neurosomatas do GRD.

Contudo, se considerarmos os neurônios que não foram bloqueados pelo estragol, observamos que os neurônios nociceptores ( $N_{inf}$ ) apresentaram alterações para valores de amplitude e  $(dV/dt)_{asc}$  menores do que os neurônios mecanoceptores ( $N_0$ ). Esta alteração talvez se deva a diferenças na quantidade e variedade de canais iônicos expressos por estes neurônios.

Já foi descrito que neurônios do GRD de grande diâmetro (mecanoceptores) expressam, predominantemente, canais para sódio sensíveis a TTX (TTX-S), como  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.6$  e  $Na_v1.7$ , bem como expressam a isoforma  $Na_v1.8$ , resistente à TTX (TTX-R) (Black et al., 1996). Já os neurônios de pequeno diâmetro (nociceptores) expressam os mesmos canais TTX-S (Black et al., 1996; Sangameswaran et al., 1997; Toledo-Aral et al., 1997), juntamente com as isoformas  $Na_v1.8$  e  $Na_v1.9$ , que são TTX-R (Amaya et al., 2000; Fjell et al., 2000). Consequentemente, a principal diferença entre os dois grupos de neurônios é a expressão da população da isoforma  $Na_v1.9$  pelos neurônios nociceptores (Fang et al., 2002). Comparado com as outras isoformas de canais para  $Na^+$ , o  $Na_v1.9$  apresenta cinética de ativação e inativação lenta, não contribui para o disparo do PA e está ativo no potencial de repouso (Cummins et al., 1999; Rush et al., 2007). Então se esta população de canais for bloqueada, o PA ainda poderá ocorrer, entretanto provavelmente iremos observar uma redução na  $(dV/dt)_{asc}$ , como mostra os nossos dados com os neurônios nociceptores que não foram bloqueados pelo estragol.

Esta atuação do estragol sobre os neurônios nociceptores corrobora com os resultados obtidos por Oliveira e colaboradores (2001). Estes demonstraram que o óleo essencial do *Crotón zehntineri*, cujos principais constituintes são o anetol e o estragol, apresenta ação antinociceptiva, porém sugere que esta ação esteja associada a mecanismo central. Nós estamos demonstrando que pode estar associada, também, a mecanismos periféricos.

## **6.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS TIPOS DE REGISTROS**

Nós observamos que ao final da exposição do tecido à droga e para todas as concentrações de estragol utilizadas, os percentuais de fibras do NC e

de neurossomas do GRD bloqueadas foram similares, sendo 4 mM a concentração que inibe 50% ( $EC_{50}$ ) para ambas as preparações. Estes dados indicam que o estragol bloqueia com a mesma potência tanto as fibras quanto os neurossomas dos neurônios aqui estudados.

Ainda não foi descrito se os canais para  $Na^+$  presentes ao longo de um axônio são os mesmos que estão presentes no neurossoma que o originou. Sabe-se, porém, que a expressão dos múltiplos subtipos de canais para  $Na^+$ , incluindo canais TTX-R, não se limita ao corpo celular e se estende ao longo das fibras, demonstrando a provável importância destes canais na condutância das fibras (Brock et al., 1998; Strassman e Raymond, 1999; Black et al., 2002a; Black e Waxman, 2002b). Considerando a similaridade na potência de bloqueio sugerimos que o mecanismo de ação do estragol seja o mesmo para as fibras do NC e para os neurossomas do GRD.

A principal diferença entre as duas preparações foi o tempo efetivo tanto para a instalação como para a reversão do efeito do estragol sobre as fibras do NC e os neurossomas do GRD. Para bloquear o impulso nas fibras nervosas, estragol levou um tempo muito maior do que o requerido para inibir o potencial de ação nos neurônios do GRD (180 min para as fibras do NC e 2,5 min para os neurossomas do GRD). Tempo de bloqueio semelhante foram obtidos para o 1,8 Cineol sobre a excitabilidade nervosa. O Bloqueio do PAC de nervo ciático, também, ocorreu de forma lenta e ao longo de 180 min (Lima-Accioly et al., 2006), enquanto o tempo necessário para bloquear o PA dos neurossomas do gânglio cervical superior ocorreu em até 5 min (Ferreira-da-Silva et al., 2009). Estas diferenças são talvez atribuídas as diferentes preparações ou aos vários envoltórios do nervo, o peri-, meso-, e endoneuro (Afifi e Bergman, 2005), que não estão presentes no GRD.

Observado a recuperação dentro de um período de tempo limitado de 180 min, no NC ela se mostrou lenta e parcial. O caráter parcial desta recuperação sugere que a instalação dos efeitos do estragol é mais rápida do que a recuperação. O lento curso temporal da recuperação talvez se deva a alta lipossolubilidade da molécula do estragol que interage fortemente com a membrana lipídica, necessitando de um tempo maior para ser lavada e da presença dos múltiplos envoltórios. Já nos neurossomas do GRD em que

muitas células apresentaram recuperação mais rápida (em minutos), essa velocidade mais rápida talvez se deva a ausência dos envoltórios do NC e o percentual de células recuperadas reflete principalmente a dificuldade de manter o impalamento estável durante muitos minutos.

### **6.3 PROVÁVEL MECANISMO DE AÇÃO**

Nossos dados contêm uma possível explicação para o mecanismo de ação do estragol, contudo são necessárias manipulações farmacológicas utilizando técnicas de clampeamento de voltagens. O PA é deflagrado devido ao aumento da condutância aos íons  $\text{Na}^+$  pela membrana celular e, portanto, o bloqueio do PA deve-se a diversos mecanismos que impeçam o fluxo deste íon através da membrana (Hille, 2001). Ferreira-da-Silva e colaboradores (2009) utilizando, também, a técnica do microeletrodo intracelular demonstraram que o 1,8-Cineol bloqueia o PA dos neurônios do gânglio cervical superior através da despolarização da membrana celular. Sugeriram que a despolarização levaria a uma rápida abertura de populações de canais para  $\text{Na}^+$  que logo entrariam no estado inativado, onde assim permaneceriam até que o potencial transmembrana retornasse ao valor do potencial de repouso original. Outras substâncias, como a lidocaína, agem diretamente sobre o canal para sódio impedindo sua ativação.

O estragol bloqueou o PA dos neurônios do GRD e algumas evidências nos levam a formular a hipótese de que o estragol estaria atuando diretamente no canal para  $\text{Na}^+$ , seja bloqueando, inativando, dificultando ou retardando a abertura deste canal. Primeiro, nos neurônios que não foram bloqueados, estragol reduziu apenas a amplitude e  $(dV/dt)_{asc}$ , não alterando duração nem  $(dV/dt)_{desc}$ . A  $(dV/dt)_{asc}$  está relacionada com a fase de despolarização do PA e, portanto, com a ativação dos canais para  $\text{Na}^+$ . A segunda evidência que favorece nossa hipótese é que o estragol não alterou o potencial de repouso, que se manteve estável tanto no final da exposição ao estragol como na lavagem. Esta informação descarta a possibilidade de um bloqueio por despolarização como citado anteriormente. E, por fim, o fato de

não ter ocorrido alteração, significativa, na  $R_{in}$  indica que o estragol não atua em outras condutâncias que estejam ativas no potencial de repouso.

A literatura sugere que, devido à alta solubilidade em lipídios, os óleos essenciais e seus constituintes podem interagir com a bicamada lipídica da membrana plasmática, inibindo influxo de  $Ca^{2+}$  ou bloqueando a permeabilidade ao  $Na^+$ , e então bloqueando a neurotransmissão (Van Den Brouke e Lemli, 1980). Soares e colaboradores (2007) sugerem que o anetol e seus análogos estruturais induzem, em baixas doses, contrações na musculatura vascular por promover abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem. Demonstrou-se, também, que timol atua sobre os canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem (Haeseler et al., 2002) e que o eugenol, análogo químico do estragol, bloqueia as correntes de  $Na^+$  TTX-R e TTX-S dos neurônios do GRD (Cho et al., 2008).

### **6.3 POTENCIALIDADE DE UTILIZAÇÃO TERAPÊUTICA**

Anestésicos locais são componentes que bloqueiam a condução nervosa quando aplicados localmente ao tecido nervoso em concentrações apropriadas. Eles bloqueiam os canais de sódio dependentes de voltagem de cada tipo de fibra nervosa, deste modo eliminando seu potencial de ação (McLure e Rubin, 2005).

As atividades anestésicas local de monoterpenos e sesquiterpenos de óleos essenciais já foram previamente descrita na literatura científica. Dentre estes podemos citar: terpineol e trans-anetol (Ghelardini et al., 2001), mentol (Galeotti et al., 1999), linalol e acetato de linalil (Ghelardini et al., 1999),  $\beta$ -cariofileno (Ghelardini et al., 2001) e eugenol (Cho et al., 2008).

Neste estudo, nós demonstramos que o estragol apresenta atividade anestésica local, uma vez que ele bloqueia o PA provavelmente por uma atuação direta nos canais para  $Na^+$  dependentes de voltagem. E esta atividade bloqueadora não mostrou preferência por nenhum tipo de neurônio, que pode representar uma vantagem importante, pois está documentada na literatura

que, na clínica odontológica, em muitos casos, a ação de anestésicos clássicos é ineficaz ou apenas parcial (Hille, 2001).

## 7. CONCLUSÕES

- O estragol bloqueia reversivelmente a excitabilidade nos neurosomas do GRD e axônios do NC.
- O estragol atua com potência similar entre os tipos de fibras mielinizadas presentes no registro do PAC.
- O estragol atua com potência similar entre os neurônios nociceptores e mecanoreceptores do GRD.
- O bloqueio do PA ocorre sem alterações no potencial de repouso e resistência de entrada sugerindo que este bloqueio ocorra por uma atuação direta nos canais para Na<sup>+</sup>.
- Os dados sugerem que os neurônios nociceptores, provavelmente, apresentem populações de canais para Na<sup>+</sup> que sejam mais sensíveis ao estragol.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFIFI, A. K.; BERGMAN, R. Functional Neuroanatomy. 2nd edn. The McGraw Hill Companies, Ch. 1, 2005.

AIDLEY, D.J. The physiology of excitable cells. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 35 – 71, 1998.

ALBUQUERQUE A.A.C.; 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. 49, n. 1, p. 41- 49, 1995.

AMAYA, F.; DECOSTERD, I.; SAMAD, T. A.; PLUMTON, C.; TATE, S.; MANNION, R. J.; COSTIGAN, M.; WOOLF, C. J. Diversity of expression of the sensory neuron-specific TTX-resistant voltage-gated sodium ion channels SNS and SNS2. Mol Cell Neurosci, v. 15, p. 331–342, 2000.

ANSHER, S.S.; DOLAN, P.; BUEDING, E. Biochemical effects of dithiolthiones. Food and Chemical Toxicology, v. 24, p. 405 – 415, 1986.

ANTHONY A.; CALDWELL J.; HUTT A.J.; SMITH R.L. Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. Food and Chemical Toxicology, v. 25, n.11, p. 799-806, 1987.

AYAZ, M.; OKUDAN, N. Effects of melatonin supplementation on exercise-induced changes in conduction velocity distributions. Methods Find Experimental Clinical Pharmacology, v. 31, p. 151 – 156, 2009.

BAKKALI F.; AVERBECK S.; AVERBECK D.; IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, v.46, p. 446-475, 2008.

BATATINHA M.J.; DE SOUZA-SPINOSA H.; BERNARDI M.M. Croton zehntneri: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, n. 1, p. 53-57, 1995.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. *Physiology*. 5th edition. Ed. Mosby, St. Louis, USA, 2004.

BEST, C. e TAYLOR, N. *Physiological basis of medical practice*. 12. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 24 – 46, 1990.

BLACK, J. A.; DIB-HAJJ, S.; McNABOLA, K.; JESTE, S.; RIZZO, M. A.; KOCSIS, J. D.; WAXMAN, S.G. Spinal sensory neurons express multiple sodium channel  $\alpha$ -subunit mRNAs. *Molecular Brain Research*, v. 43, p.117–131, 1996.

BLACK, J. A.; RENGANATHAN, M.; WAXMAN, S. G. Sodium channel Nav1.6 is expressed along nonmyelinated axons and it contributes to conduction. *Molecular Brain Research*, v. 105, p.19–28, 2002a.

BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Molecular identities of two tetrodotoxin-resistant sodium channels in corneal axons. *Exp Eye Res*, v. 75, p. 193–199, 2002b.

BROCK, J. A.; McLACHLAN, E. M.; BELMONTE, C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *Journal of Physiology*, v. 512, p. 211–217, 1998.

CAMPBELL, D.T. Large and small vertebrate sensory neurons express different Na and K channel subtypes. *Neurobiology*, v. 89, p. 9569-9573, 1992.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA C.M.L.; MORAIS S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of Croton zehntneri and Lippia sidoides essential oils. *Veterinary Parasitology*, v.148, p. 288 - 294, 2007.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local Anesthetic. In: GOODMAAN, L. S. e GILMAN, A. The pharmacological basis of therapeutics. 9. ed. USA: Mcgraw-Hill Companies Inc., p. 331 - 347, 1996.

CHO, J. S.; KIM, T. H.; LIM, J. M.; SONG, J. H. Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, v. 1243, p. 53 – 62, 2008.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; BARATA, E.L.; MAGALHÃES, P.J.C.; LIMA, C.C.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of the essential oil of *Croton zenthneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 299 – 304, 1997.

COSENTINO R. M.; NORTE M.C.B.; LAZARINI C.A. Estragole-induced Behavioural Changes in Rats. *Phytotherapy Research*, v.18, p. 921-924, 2004.

CRAVEIRO A.A.; FERNANDES A.G.; ANDRADE C.H.S.; MATOS F.J.A.; ALENCAR J.W. Oleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura*, v. 29, p. 445 (suppl.), 1977.

CRAVEIRO A.A.; ANDRADE C.H.S.; MATOS F.J.A.; ALENCAR J.W. Anise-like flavor of *Croton aff zehntneri* Pax. et Hoffm. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 26, p. 772–773, 1978.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; Machado, M.I.L. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza : UFC, 1981.

CUMMINS, T. R.; DIB-HAJJ, S. D.; BLACK, J. A.; AKOPIAN, A. N.; WOOD, J. N.; WAXMAN, S. G. A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *Journal Neuroscience*, v. 19, p. RC43, 1999.

CURTIS, H. J.; COLE, K. S. Eletricic impedance of “Nitella” during activity. *Journal of Phisiology*, v. 22, p. 37-64, 1938.

DALKILIC, N.; TUNCER, S.; BARISKANER, H.; KIZILTAN, E. The effect of tramadol on the rat sciatic nerve conduction: a numerical analysis and conduction velocity distribution study. *Yakugaku Zasshi*, v. 129, p. 485 – 493, 2009.

DALLMEIER, K. e CARLINI, E.A. Anaesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacology*, v. 22, p. 113 – 127, 1981.

DEVOR, M.; WALL, P.D. Cross-excitation in dorsal root ganglia of nerve-injured and intact rats. *Journal of Neurophysiology*, v. 64, p.1733–1746, 1990.

DJOUHRI, L.; BLEAZARD, L.; LAWSON S. N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurons. *Journal of Physiology*, v.513, p. 857 – 872, 1998.

DUCE, I.R.; KEEN, P. An ultrastructural classification of the neuronal cell bodies of the rat dorsal ganglion using Zinc iodine-osmium impregnation. *Cell and Tissue Research*, v. 185, p. 26-277, 1977.

FANG, X.; DJOUHRI, L.; BLACK, J. A.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G.; LAWSON, S.N. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *Journal Neuroscience*, v. 22, p. 7425 – 7433, 2002.

FANG, X.; McMULLAN, S.; LAWSON, S. N.; DJOUHRI, L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *Journal of Physiology*, v. 565, p. 927 – 943, 2005.

FERREIRA-da-SILVA, F. W.; BARBOSA, R.; MOREIRA-JÚNIOR, L.; SANTOS-NASCIMENTO, T.; OLIVEIRA-MARTINS, M. D.; COELHO-de-SOUZA, A. N.; CAVALCANTE, F. S.; CECCATTO, V. M.; LEMOS, T. L.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of 1,8-cineole on electrophysiological parameters of neurons of rat superior cervical ganglion. *Clinical and Experimental Pharmacological Physiology*, 2009.

FJELL, J.; HJELMSTROM, P.; HORMUZDIAR, W.; MILENKOVIC, M.; AGLIECO, F.; TYRRELL, L.; DIB-HAJJ, S.; WAXMAN, S. G.; BLACK, J. A. Localization of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na<sub>v</sub> in nociceptors. *Neuroreport*, v. 11, p. 199–202, 2000.

.FONTENELLE R.O.S.; MORAIS S.M.; BRITO, E.H.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; NASCIMENTO, N.R.F.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, v. 104, p. 1383-1390, 2008.

FRIEDMAN M.; HENIKA P.R.; MANDRELL R.E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, 2002.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Med.*, v. 65, p. 700 – 703, 1999.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med.*, v. 67, p. 564 – 566, 2001.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; Di CESARE MANNELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. *Farmaco.*, v. 56, p. 387 – 389, 2001.

GOKIN, A. P.; PHILIP, B.; STRICHARTZ, G. R. Preferential block of small myelinated sensory and motor fibers by lidocaine. *Anesthesiology*, v. 95, p. 1441 – 54, 2001.

GUENTHNER, T.M.; LUO, G. Investigation of the role of the 2',3'-epoxidation pathway in the bioactivation and genotoxicity of dietary allylbenzene analogs. *Toxicology*, v.160, p. 47–58, 2001.

HAESLER, G.; MAUE, D.; GROSSKREUTZ, J.; BUFLER, J.; NENTWIG, B.; PIEPENBROCK, S.; DENGLER, R.; LEUWER, M. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *European Journal Anesthesiology*, v. 19, p. 571 – 579, 2002.

HARPER, A.A.; LAWSON, S.N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *Journal of Physiology*, v. 359, p.31-46, 1985a.

HARPER, A.A.; LAWSON, S.N. Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurons with different peripheral nerve conduction velocities. *Journal of Physiology*, v. 359, p.47-63, 1985b.

HILLE, B. *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd edition. Ed. Sinauer, Sanderland, USA. 2001.

HODGKIN, A.L.; HUXLEY, A.F. Action potentials recorded from inside a nerve fiber. *Nature London*, v. 144, p. 710-711, 1939.

HODGKIN, A.L.; KATZ, B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *Journal of Physiology*, v. 108, p. 37-77, 1949.

HUANG, Y.C.; WU, B.N.; LIN, Y.T.; CHEN, S.J.; CHIU, C.C.; CHENG, C.J.; CHEN, I.J. Eugenodilol: A third-generation  $\beta$ -adrenoceptor blocker, derived from eugenol, with  $\alpha$ -adrenoceptor blocking and  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist-associated vasorelaxant activities. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.34, p.10 – 20, 1999.

HURSH, J. B. Conduction velocity and diameter of nerve fibers. *American Journal of physiology*, v.127, p. 131-139, 1939.

JAFRI, M. S.; WEINREICH, D. Substance P regulates Ih via a NK-1 receptor in vagal sensory neurons of the ferret. *Journal of Neurophysiology*, v. 78, p. 769–777, 1998.

JUNGE, D. *Nerve and muscle excitation*. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA, 1977.

KANDEL, E.; SCHUARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Principles of neural science. 4th edition. Ed. McGraw-Hill Companies, New York, USA, 2000.

KAPINAR, M. Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. Food Microbiology, v. 10, p. 193–199, 1990.

KIZILTAN, E.; DALKILIC, N.; GUNEY, F. B.; PEHLIVAN, F. Conduction velocity distribution: early diagnostic tool for peripheral neuropathies. International Journal of Neuroscience, v. 117, p. 203 – 213, 2007.

LAWSON, S.N.; CADDY, K.T.W.; BISCOE, T.J. Development of rat dorsal root ganglion neurones. Studies of cell birthdays and changes in mean cell diameter. Cell and Tissue Research, v. 153, p. 399-413, 1974.

LAWSON, S.N.; HARPER, A.A.; HARPER, E.I., GARSON, J.A.; ANDERTON, B.H. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurons. Journal of Comparative Neurology, v.228, p. 263-272, 1984.

LAZARINI C.A.; UEMA A.H.; BRANDÃO G.M.; GUIMARÃES A.P.; BERNARDI M.M. Croton zehntneri essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. Phytomedicine, v. 7, n. 6, p. 477-481, 2000.

LEAL-CARDOSO, J.H. e FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils plants of the northeast of Brazil. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências. v. 71, n. 2, p. 207 – 213, 1999.

LEAL-CARDOSO, J.H.; MATOS-BRITO, B.G.; LOPES-JUNIOR, J.E.G.; VIANA-CARDOSO, K.V.; SAMPAIO-FREITAS, A.B.; BRASIL, R.O.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; ALBUQUERQUE, A.A.C. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, p. 1193-1198, 2004.

LIEBERMAN A.R. Sensory ganglia. In: CHAPMAN e HALL. The peripheral nerve. Londres: Landon DN,1976. 188–278.

LIMA, M.G.A.; MAIA, I.C.C.; SOUSA, B.D.; MORAIS, S.M.; FREITAS, S.M. Effect of stalk and leaf extracts from Euphorbiaceae species on *Aedes aegypti* (Dipteral, Culicidae) larvae. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 48, n.4, p. 211-214, 2006.

LIMA-ACCIOLY, P. M.; LAVOR-PORTO, P. R.; CAVALCANTE, F. S.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; MORAIS, S. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *Croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. *Clinical and Experimental Pharmacological and Physiology*, v. 33, p. 1158 – 1163, 2006.

LIN, Y.T.; WU, B.N.; HORNG, C.F.; HUANG, Y.C.; HONG, S.J.; LO, Y.C.; CHENG, C.J.; CHEN, I.J. Isoeugenolol: A selective  $\beta$ 1-adrenergic antagonist with tracheal and vascular smooth muscle relaxant properties. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 80, p. 127 – 136, 1999.

LUO, G.; QATO, M.K.; GUENTHNER, T.M. Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases. *Drug Metab. Dispos.*, v. 20, p. 440–445, 1992.

MATOS, F.J.A. Plantas da medicina popular do nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. Fortaleza: UFC. p.51-153, 1999.

MATTHEWS, P. B. S.; RUSHWORTH, G. Relative sensitivity of muscle nerve fibres to procaine. *Journal of Physiology (Lond)*, v. 135, p. 269–269, 1957.

McCARTHY, P.W.; LAWSON, S.N. Differing action potential shapes in rat dorsal root ganglion neurones related to their substance P and calcitonin gene-related peptide immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, v. 388, p. 541—549, 1997.

McLURE, H. A.; RUBIN, A. P. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol*, v. 71, p. 59 – 74, 2005.

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

NOKES, L.D.M.; DANIEL, D.; FLINT, T.; BARASI, S. Investigations into the analysis of the rate of decay of the compound actions potentials recorded from the rat sciatic nerve after death: Significance for the prediction of the post-mortem period. *Forensic science International*, v. 50, n. 1, p. 75 – 85, 1991.

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

PHILLIPS, D.H.; MILLER, J.A.; MILLER, E.C.; ADAMS, B. Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole. *Cancer Research*, v. 41, p.176–186, 1981.

PHILLIPS D.H.; REDDY M.V.; RANDEATH K. 32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice. *Carcinogenesis*, v. 5, n.12, p.1623-1628, 1984.

RANDEATH, K.; HAGLUND, R.E.; PHILLIPS, D.H.; REDDY, M.V. 32P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice. *Carcinogenesis*, v. 5, p. 1613–1622, 1984.

RUSH, A. M.; CUMMINS, T. R.; WAXMAN, S. G. Multiple sodium channels and their roles in electrogenesis within dorsal root ganglion neurons. *Journal of Physiology*, v. 579, p. 1 – 14, 2007.

SANGAMESWARAN, L.; FISH, L. M.; KOCH, B. D.; RABERT, D. K.; DELGADO, S. G.; ILNICKA, M.; JAKEMAN, L. B.; NOVAKOVIC, S.; WONG, K.; SZE, P.; TZOUMAKA, E.; STEWART, G. R.; HERMAN, R. C.; CHAN, H.;

EGLIN, R. M.; HUNTER, J. C. A novel tetrodotoxin-sensitive, voltage-gated sodium channel expressed in rat and human dorsal root ganglia. *Journal of Biological Chemistry* v.272, p.14805–14809, 1997.

SCHMALBRUCH, H. Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anatomy Research*, v. 215, p. 71–81, 1986.

SHIN, S.; KANG, C.A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. *Letters in Applied Microbiology*, v. 36, p. 111–115, 2003.

SHIN, S.; PYUN, M.S. Anti-Candida effects of estragole in combination with ketoconazole or amphotericin B. *Phytotherapy Research*, v.18, p. 827 – 830, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. S.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC, 1999.

SIQUEIRA R.J.; MAGALHÃES P.J.; LEAL-CARDOSO J.H.; DUARTE G.P.; LAHLOU S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sciences*, v. 78, n. 20, p. 2365-2372, 2006.

SINGH, G.; MAURYA, S.; LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, v. 17, p. 745–752, 2006.

SOARES P.M.; LIMA R.F.; DE FREITAS-PIRES A.; SOUZA E.P.; ASSREUY A.M.; CRIDDLE D.N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels. *Life Sciences*, v. 81, n.13, p. 1085-1093, 2007.

SOLHEIM, E.; SCHELINE, R. Metabolism of alkenebenzene derivatives in the rat I. p-Methoxyallylbenzene (estragole) and p-Methoxypropenylbenzene (Anethole). *Xenobiotica*, v. 3, p. 493–510, 1973.

SOMEI, K.; MIZUMA, K.; NARA, K.; MATSUYA, H.; YODA, J.; SASAKI, K.; KASHIMOTO, T. Dimethylsulfoxide potentiates the suppressive effects of lidocaine on synaptic transmission in bullfrog sympathetic ganglion. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, v.17, n. 9, p. 751-756, 1995.

STAIMAN, A.; SEEMAN, P. Conduction-blocking concentrations of anesthetics increase with nerve axon diameter: studies with alcohol, lidocaine and tetrodotoxin on single myelinated fibers. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*, v. 201, p. 340 – 349, 1977.

STOOF, J.A.; WINOGRODZKA, A.; VANMUISWINKEL, F.L.; WOLTERS, E.C.; VOORN, P.; GROENEWEGEN, H.J.; BOOIJ, J.; DRUKARCH, B. Leads for the development of neuroprotective treatments in Parkinson's disease and brain imaging methods for estimating treatment efficacy. *European Journal of Pharmacology*, v. 375, p.75 – 86, 1999.

STRASSMAN, A. M.; RAYMOND, S. A. Electrophysiological evidence for tetrodotoxin-resistant sodium channels in slowly conducting dural sensory fibers. *Journal of Neurophysiology*, v. 81, p. 413–424, 1999.

SWETT, J.E.; WIKHOLM, R.P.; BLANKS, R.H.; SWETT, A.L.; CONLEY, L.C. Motoneurons of the rat sciatic nerve. *Experimental Neurology*, v. 93, p.227–252, 1986.

TOLEDO-ARAL, J. J.; MOSS, B. L.; HE, Z. J.; KOSZOWSKI, A. G.; WHISENAND, T.; LEVINSON, S. R.; WOLF, J. J.; SILOSSANTIAGO, I.; HALEGOUA, S.; MANDEL, G. Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p.1527–1532, 1997.

VAN DEN BROUCKE, C. O.; LEMLI, J. A. Antispasmodic activity of *Origanum compactum*. *Planta Med.*, v. 38, p. 317 – 331, 1980.

VINCENZI M. DE; SILANOB M.; MAIALETTIA F.; SCAZZOCCHIOA B. Constituents of aromatic plants: II Estragole. *Fitoterapia*, v. 71, p. 725-729, 2000.

WISEMAN, R.W.; FENNELL, T.R.; MILLER, J.A.; MILLER, E.C. Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues. *Cancer Research*, v. 45, p. 3096–3105, 1985.

# 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](#)