



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

*Óleo essencial de Croton zehntneri e seus principais  
constituintes químicos anetol e estragol inibem parâmetros  
contráteis do músculo liso traqueal de rato.*

CAMILLE MARIA DE HOLANDA ANGELIM ALVES

FORTALEZA – CE

2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

CAMILLE MARIA DE HOLANDA ANGELIM ALVES

*Óleo essencial de Croton zehntneri e seus principais  
constituintes químicos anetol e estraçol inibem parâmetros  
contráteis do músculo liso traqueal de rato.*

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

Orientadora: Profa. Dra. Crystianne Calado Lima.  
Co-orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

FORTALEZA – CE

2009

*Camille Maria de Holanda Angelim Alves*

*Óleo essencial de Croton zehntneri e seus principais  
constituintes químicos anetol e estragol inibem parâmetros  
contráteis do músculo liso traqueal de rato.*

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

Aprovada em 11/09/2009

Conceito Obtido: Aprovada

Nota final: 10,0

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Crystianne Calado Lima

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Crystianne Calado Lima  
Universidade Estadual do Ceará

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará

*"Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino".*

*(Mahatma Gandhi).*

Aos meus avós, Ermano e Alaíde, Gentil e Rosália, *in memoriam*, pelos ensinamentos únicos e por ainda hoje permanecerem tão manifestos em minha vida, dedico com altivez.

## *A*gradecimentos

A **Deus**, que me concede muito mais do que eu preciso.

À **minha família**, que é para onde me volto todas as vezes.

A **Carlos Eduardo Nogueira**, o homem que escolhi para compartilhar a vida, pela tolerância, pela compreensão e acolhimento únicos; por me ensinar, dia após dia, valores essenciais e necessários a mim, sem nem mesmo saber que o faz.

À **Marli e Gilcleide**, que me cederam sua casa tantas vezes, proporcionando-me um “favor” indispensável na composição deste trabalho.

À minha orientadora e amiga **Crystianne Calado Lima**, que para mim tem um significado particular e indecifrável, por ter feito da minha conquista a sua conquista, não medindo esforços para que me acontecesse o melhor.

Ao meu co-orientador **José Henrique Leal Cardoso**, por ter sempre me proporcionado momentos grandiosos e especiais de ensinamento e alegria.

À professora **Andrelina Noronha Coelho de Souza**, por “chegar junto” e prestar-me valorosa ajuda ao dividir comigo seu precioso conhecimento científico.

A **Eder Evangelista e Emanuel Kennedy**, pela imensa ajuda, companhia e principalmente amizade imensuráveis. Por terem “abraçado a minha causa” e dado a ela um sabor bem maior ao que teria sido se eu tivesse conseguido por méritos só meus.

A **João Luis Carvalho de Souza**, que deveras atenuou o processo de realização deste trabalho e de forma tão hábil e cortês.

A **Felipe Crescêncio**, pela gentileza e prontidão sempre que precisei.

A **Aldair Neto**, pela paciência e por me transmitir calma quando careceu começar do zero.

A **Pedro Militão**, por se dispor em situações indispensáveis.

A **todos** os que tornaram possível a concretização dessa jornada, ainda que com um amparo simbólico ou uma torcida sincera.



## RESUMO

---

O óleo essencial de *Croton zehntneri* e seus principais constituintes químicos anetol e estragol têm demonstrado atividade em vários tipos de tecidos excitáveis, incluindo músculos lisos. Devido à falta de estudos desses agentes no músculo liso das vias aéreas, os efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Croton zehntneri*, anetol e estragol sobre o músculo liso traqueal de rato foram investigados. Anéis traqueais de ratos Wistar machos (150-300 g) sob 1g de tensão foram colocados para equilibrar em banho de órgão isolado com solução de Tyrode modificado (TM) (pH 7,4; 37 ° C) e aeração constante. Alterações na tensão foram medidas por um transdutor de força conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado. A viabilidade do tecido foi determinada pela resposta contrátil a 60 mM de potássio (K60). Os resultados foram expressos sempre nesta ordem: OECz, anetol e estragol. Todos os três agentes examinados (AE, em  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram efeito inibitório sobre as contrações induzidas por K60, 10  $\mu\text{M}$  de acetilcolina (ACh) e 10  $\mu\text{M}$  de serotonina (5-HT). Em contrações induzidas por  $\text{K}^+$  e ACh, à maior concentração utilizada, os AE foram capazes de induzir inibição completa, o que não foi o caso da 5-HT. Em contrações induzidas por  $\text{K}^+$  as  $\text{IC}_{50}$  foram  $151,24 \pm 11,36$ , N=5;  $359,11 \pm 32,13$ , N=10 e  $181,01 \pm 27,41$ , N=12. Em contrações induzidas por ACh as  $\text{IC}_{50}$  foram  $601,81 \pm 135,54$ , N=10;  $208,61 \pm 58,81$ , N=8 e  $279,99 \pm 45,69$ , N=9. Em contrações induzidas por 5-HT, OECz, anetol e estragol (1000  $\mu\text{g/ml}$ ) reduziram as contrações para (% do controle)  $28,98\% \pm 8,43$ , N=8;  $38,79\% \pm 12,71$ , N=7 e  $12,52\% \pm 4,13$ , N=7. Em TM sem  $\text{Ca}^{2+}$  e contendo 0,2 mM EGTA, AE inibiram (% do controle) as contrações produzidas pela ACh, em concentrações de 3000  $\mu\text{g/mL}$ , para  $46,90 \pm 13,49$ , N=6;  $29,23 \pm 9,96$ , N=7 e  $36,17 \pm 6,25$ , N=4 e 5000  $\mu\text{g/mL}$  para  $35,34 \pm 14,16$ , N=4;  $14,21 \pm 6,40$ , N=7 e  $15,82 \pm 12,11$ , N=4. AE (1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ) também inibiram contrações causadas pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  em preparações pré-tratadas com solução 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ] na presença e na ausência de nifedipina 10  $\mu\text{M}$  (NIF). Da mesma forma, AE (2000  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram contrações causadas pela adição de  $\text{Ba}^{2+}$  em preparações pré-tratadas e mantidas com 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]; no entanto, em concentrações de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , somente anetol e estragol inibiram contrações induzidas por  $\text{Ba}^{2+}$ . AE (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram completamente contrações causadas pelo aumento cumulativo da [ $\text{Ca}^{2+}$ ] na ausência de NIF em preparações pré-tratadas com 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ]. Na presença de NIF os valores de  $\text{IC}_{50}$  (mM) foram:  $4,56 \pm 1,30$ , N=4;  $1,66 \pm 0,39$ , N=6 e  $5,35 \pm 0,51$ , N=8 para a concentração 1000  $\mu\text{g/mL}$  e  $4,55 \pm 0,07$ , N=5;  $4,54 \pm 0,41$ , N=4 para a concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  (neste caso, com OECz, foi obtida inibição total). Para as contrações induzidas por  $\text{Ba}^{2+}$  os valores de  $\text{IC}_{50}$  (mM) foram:  $1,07 \pm 0,06$ , N=5;  $4,83 \pm 0,86$ , N=13 e  $2,42 \pm 1,75$ , N=5 para a concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  e  $8,74 \pm 1,47$ , N=4;  $6,47 \pm 1,46$ , N=7 para a concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  (os valores de  $\text{IC}_{50}$  para o estragol não foram calculados). AE (em uma única concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram as contrações de preparações pré-contraídas e mantidas na presença de: **1**) 12, 13 dibutirato forbol (1  $\mu\text{M}$ ) (DBP), para (em % do controle)  $4,46\% \pm 4,46$ , N=5;  $1,76\% \pm 1,13$ , N=4 e  $18,7\% \pm 2,61$ , N=5 e **2**) 80 mM de potássio (K80), caso em que AE aboliram as contrações. AE relaxaram o tecido traqueal previamente relaxado pela adrenalina. Não houve efeito sobre o tônus basal. Os resultados mostraram que OECz, anetol e estragol possuem efeito antiespasmodico no músculo traquealis de rato.

Palavras-chave: OECz, anetol, estragol, músculo liso, traquéia.

## ABSTRACT

---

The essential oil of *Croton zehntneri* and its main chemical constituents anethole and estragole have demonstrated activity on various types of excitable tissues, including smooth muscles. Due to the lack of studies of these agents on airway smooth muscle, the pharmacological effects on tracheal smooth muscle of rat of essential oil of *Croton zehntneri*, anethole and estragole were investigated. Tracheal rings of male Wistar rats (150-300 g) underwringing 1g tension were placed to equilibrate in isolated organ bath with modified Tyrode solution (TM) (pH 7,4; 37 °C) and constant aeration. Changes in tension were measured isometrically by a force transducer connected to a system of computerized data acquisition. The viability of tissue was determined by the contractile response to 60 mM of potassium (K60). The results were expressed always in this order: OECz, anethole and estragole. All three agents examined (AE, in  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) had inhibitory effect on contractions induced by K60, 10  $\mu\text{M}$  of acetylcholine (ACh) and 10  $\mu\text{M}$  of serotonin (5-HT). On  $\text{K}^+$ - and ACh-induced contractions, at the greatest concentration used, the AE were able to induce full inhibition; this was not the case with 5-HT. On  $\text{K}^+$ -induced contractions the  $\text{IC}_{50}$  were  $151,24 \pm 11,36$ , N=5;  $359,11 \pm 32,13$ , N=10 and  $181,01 \pm 27,41$ ; N=12. On contractions induced by ACh the  $\text{IC}_{50}$  were  $601,81 \pm 135,54$ , N=10;  $208,61 \pm 58,81$ , N=8 and  $279,99 \pm 45,69$ , N=9. On 5-HT-induced contractions, OECz, anethole and estragole (at 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduced the contraction to (to % of control)  $28,98\% \pm 8,43$ , N=8;  $38,79\% \pm 12,71$ , N=7 and  $12,52\% \pm 4,13$ , N=7. In TM calcium-free and containing 0,2 mM EGTA, AE inhibited (to % of control) the contraction produced by ACh at concentrations of 3000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to  $46,90 \pm 13,49$ , N=6;  $29,23 \pm 9,96$ , N=7 and  $36,17 \pm 6,25$ , N=4 and 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to  $35,34 \pm 14,16$ , N=4;  $14,21 \pm 6,40$ , N=7 and  $15,82 \pm 12,11$ , N=4. AE (1000 and 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) also inhibited contractions caused by addition of  $\text{Ca}^{2+}$  to preparations pre-treated with 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ] solution in the presence and absence of nifedipine 10  $\mu\text{M}$  (NIF). Likewise, AE (2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inhibited contractions caused by addition of  $\text{Ba}^{2+}$  to preparation pre-treated with and maintained in 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ] solution; however, at concentrations of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , only anethole and estragole inhibited  $\text{Ba}^{2+}$ -induced contractions. AE (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) completely inhibited the contractions caused by cumulatively increasing [ $\text{Ca}^{2+}$ ] in absence of NIF in preparation pre-treated with 0 [ $\text{Ca}^{2+}$ ] solution. In the presence of NIF  $\text{IC}_{50}$  values (mM) were:  $4,56 \pm 1,30$ , N=4;  $1,66 \pm 0,39$ , N=6 and  $5,35 \pm 0,51$ , N=8 for the concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $4,55 \pm 0,07$ , N=5;  $4,54 \pm 0,41$ , N=4 for the concentration of 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (in this case with OECz it was obtained total inhibition). For the contractions induced by  $\text{Ba}^{2+}$  the  $\text{IC}_{50}$  values (mM) were:  $1,07 \pm 0,06$ , N=5;  $4,83 \pm 0,86$ , N=13 and  $2,42 \pm 1,75$ , N=5 for the concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and  $8,74 \pm 1,47$ , N=4;  $6,47 \pm 1,46$ , N=7 for the concentration of 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (the  $\text{IC}_{50}$  values for estragole were not calculated). AE (at a single concentration 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduced preparations pre-contracted and maintained in the presence of: **1**) 12, 13 dibutyrate phorbol (1  $\mu\text{M}$ ) (DBP), to (in % of control)  $4,46\% \pm 4,46$ , N=5;  $1,76\% \pm 1,13$ , N=4 and  $18,7\% \pm 2,61$ , N=5 and **2**) 80 mM potassium (K80), in which case AE abolished the contractions. AE relaxed the tracheal tissue previously relaxed by adrenaline. There was no effect on basal tone. The results showed that the OECz, anethole and estragole possess antispasmodic effect on *traquealis* muscle of rat.

Key-words: OECz, anethole, estragole, smooth muscle, trachea.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
ADPR <sub>c</sub>	ADP-ribose cíclico
ADR	Adrenalina
AE	Agente em estudo
AMP <sub>c</sub>	Adenosina Monofosfato cíclico
5-HT	Serotonina ou 5-hidroxitriptamina
GKI	Quinases dependentes de GMP <sub>c</sub>
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração de Ca <sup>2+</sup> intracelular
Ca <sup>2+</sup> -Mg-ATPases	Bombas para Ca <sup>2+</sup>
BaCl <sub>2</sub>	Cloreto de bário
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
C <sub>CaL</sub>	Canais para Ca <sup>2+</sup> de longa condutância dependentes de voltagem (TipoL)
Cl <sub>Ca</sub>	Canal para cloro dependente de cálcio
CaM	Calmodulina
CaM-4Ca <sup>2+</sup>	Complexo cálcio-calmodulina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAG	Diacilglicerol
DBP	12, 13 Dibutyrate Phorbol (Éster de forbol)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ácido β-amino- etil-éter-N,N,N',N'-tetracético ou etileno-bis
E <sub>m</sub>	Potencial transmembrana
GMP <sub>c</sub>	Guanosina Monofosfato Cíclico
HTRP	TRP de humanos
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptor de IP <sub>3</sub>
IRAG	Proteínas associadas ao IP <sub>3</sub>
ISO	International Standard Organization
K <sub>ATP</sub>	Canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao ATP

K <sub>Ca</sub>	Canais para K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>
KCl	Cloreto de potássio
MBS	Subunidade ligante de miosina
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
MLVA	Músculo liso das vias aéreas
MYPT1	Subunidade alvo da fosfatase de miosina regulatória
NANC	Fibra nervosa não adrenérgica e não colinérgica
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Bomba de sódio e potássio
NE	Norepinefrina (noradrenalina)
OECz	Óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i>
0Ca <sup>2+</sup>	Solução Tyrode sem adição de cloreto de cálcio
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
Ras-ERK	Ras-quinase regulada pelo sinal extracelular
Rho	Pequena proteína G transdutora de sinais intracelulares
RhoGEF	Fator de troca guanina-nucleotídeo da família Rho
MLC <sub>r</sub>	Cadeia leve de miosina regulatória
ROCCs	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por receptor
RyR	Receptor de rianodina
SERCAs	Ca <sup>2+</sup> -Mg-ATPases do Retículo Sarcoplasmático
SOCCs	Canais para Ca <sup>2+</sup> operados por estoques
STIM	Molécula de interação do estroma
STOCs	Correntes externas transientes espontâneas
TEA	Tetraetilamônio
TNF	Fator de necrose tumoral

TM

Tyrode modificado

TRP

Receptor de potencial transiente

VOCCs

Canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Croton zehntneri Pax et Hoffm vel aff.</i> .....	22
<b>Figura 2</b> Estrutura química dos principais constituintes do OECz utilizado nesse estudo: anetol e estragol (isômeros de posição).....	25
<b>Figura 3</b> Interações das células do músculo liso das vias aéreas com sua matriz tecidual. Implicações para a contração .....	33
<b>Figura 4</b> Figura ilustrativa da traquéia e outras estruturas do músculo liso da via aérea. ....	42
<b>Figura 5</b> Mecanismo contração-relaxamento do músculo liso das vias aéreas .....	50
<b>Figura 6</b> Sistema de aquisição das respostas musculares mecânicas .....	57
<b>Figura 7</b> Esquema ilustrativo da série 1. ....	59
<b>Figura 8</b> Esquema ilustrativo da série 2. ....	59
<b>Figura 9</b> Esquema ilustrativo da série 3. ....	60
<b>Figura 10</b> Esquema ilustrativo da série 4. ....	60
<b>Figura 11</b> Esquema ilustrativo da série 5. ....	61
<b>Figura 12</b> Esquema ilustrativo da série 6. ....	62
<b>Figura 13</b> Esquema ilustrativo da série 7. ....	63
<b>Figura 14</b> Esquema ilustrativo da série 8. ....	64
<b>Figura 15</b> Esquema ilustrativo da série 9. ....	65
<b>Figura 16</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o tônus basal do músculo liso traqueal. ....	68
<b>Figura 17</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 60 mM de KCl em anéis de traquéia.....	70
<b>Figura 18</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 10 $\mu$ M de ACh em anéis de traquéia. ....	71

<b>Figura 19</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de KCl. ....	73
<b>Figura 20</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato na inibição da contração de 10 µM de serotonina (5-HT).....	75
<b>Figura 21</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato diante da saturação dos canais receptores adrenérgicos. ....	77
<b>Figura 22</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol no componente contrátil da ACh que independe do Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	79
<b>Figura 23</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre a curva de reposição do Ca <sup>2+</sup> ou do Ba <sup>2+</sup> em meio 0Ca <sup>2+</sup> com alta concentração de potássio e 0,2 mM de EGTA. ....	83
<b>Figura 24</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre os ROCCs.. ....	86
<b>Figura 25</b> Efeito da nifedipina (10 µM) no platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do éster de forbol (DBP) (1 µM). ....	88
<b>Figura 26</b> Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do DBP (1µM). ....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição percentual do óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i> .....	54
<b>Tabela 2</b>	Valores de IC <sub>50</sub> para a inibição da curva do BaCl <sub>2</sub> . .....	81
<b>Tabela 3</b>	Valores de IC <sub>50</sub> para a inibição da curva do CaCl <sub>2</sub> na presença de nifedipina (10 μM) (ROCCs).....	85
<b>Tabela 4</b>	Valores gerais de IC <sub>50</sub> .....	91



# Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1 Produtos naturais	18
1.2 Óleos essenciais	19
1.2.1 A pesquisa com óleos essenciais no Ceará	20
1.2.2 Óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i>	21
1.2.2.1 Aspectos gerais	21
1.2.2.2 Estudos anteriores	23
1.2.3 Anetol	25
1.2.4 Estragol	28
1.3 Músculo liso	30
1.3.1 O mecanismo contrátil	32
1.3.1.1 Contração $Ca^{2+}$ - dependente	36
1.3.1.2 Mecanismo de sensibilização ao $Ca^{2+}$	37
1.3.2 Relaxamento	39
1.3.3 Regulação contrátil anormal	40
1.4 Músculo Liso das Vias Aéreas	41
1.4.1 Músculo liso traqueal	42
1.4.1.1 Mecanismos de contração e relaxamento	43
1.4.1.2 Dinâmica da regulação da $[Ca^{2+}]_i$	45
1.4.1.3 Oscilações da $[Ca^{2+}]_i$	47
<b>2 IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>51</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
Objetivo geral	53
Objetivos específicos	53
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>54</b>
4.1 Óleo essencial	54
4.2 Soluções e drogas	55
4.3 Animais e preparação dos tecidos	56
4.4 Protocolos experimentais	58
4.5 Análise estatística	66
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>67</b>
5.1 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato (Série 1)	67
5.2 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 60 mM de KCl ou 10 $\mu$ M de acetilcolina em anéis de traquéia (Série 2)	69
5.3 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de KCl (Série 3)	72
5.4 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato na inibição da contração de 10 $\mu$ M de serotonina (5-HT) (Série 4)	74
5.5 Participação adrenérgica no efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato (Série 5)	76

5.6 O efeito do OECz, anetol ou estragol no componente contrátil da ACh que independe do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular ( $0\text{Ca}^{2+}$ + EGTA 0,2 mM) (Série 6).....	78
5.7 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre a curva de reposição do $\text{Ca}^{2+}$ ou do $\text{Ba}^{2+}$ em meio $0\text{Ca}^{2+}$ com alta concentração de potássio e 0,2 mM de EGTA (Série 7).....	80
5.8 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre ROCCs (Série 8) .....	84
5.9 O efeito da nifedipina (10 $\mu\text{M}$ ) no platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do éster de forbol (DBP) (1 $\mu\text{M}$ ) (Série 9).....	87
5.10 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do DBP (1 $\mu\text{M}$ ) (Série 10).....	89
<b>6 DISCUSSÃO E HIPÓTESES COMPARATIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>99</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

# 1 **INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 **Produtos naturais**

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, traduzido pela primeira vez em 1890. Durante o período da civilização grega, anterior à era cristã, vários filósofos tiveram destaque por suas obras sobre história natural (PINTO *et al.*, 2002). A China antiga, os indianos e os norte-africanos são provas do engenho do homem na utilização das plantas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (PHILLIPSON, 2001) e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram em muitos grupos étnicos as únicas fontes de recursos terapêuticos (RATES, 2001; MORAIS *et al.*, 2006a e b).

A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química Brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, agrega o maior número de pesquisadores, muito embora a validação experimental seja essencial para estabelecer a confiabilidade desses produtos. Trabalhos de pesquisa com plantas medicinais originam novos medicamentos em menor tempo e custo muitas vezes inferior aos medicamentos sintéticos (MARTINS *et al.*, 1998).

A utilização de plantas medicinais pela população mundial tem se mostrado expressiva nos últimos anos, com aproximadamente 80% dela fazendo uso de algum tipo de erva para o alívio de manifestações patológicas (VAVASSOUR, 1999). Entre os anos de 1981 a 2002, entraram no mercado internacional 877 novos fármacos, sendo 1% deles originados ou baseados em produtos naturais (NEWMAN, CRAGG e SNADER, 2003). Porém, os estudos com plantas medicinais ainda não receberam, no Brasil, a atenção que o tema merece das agências financiadoras (PINTO *et al.*, 2002). O país exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais e, por outro lado, importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural,

verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (FERNANDES e ANTUNES, 2000).

Dentre a variedade de produtos estudados pelos centros de pesquisa para tratamentos de doenças respiratórias estão as substâncias obtidas de plantas. Tais produtos têm chamado a atenção de cientistas de todo o mundo para o estudo de seus extratos, óleos essenciais e principalmente de seus constituintes isolados, sob aspectos químico, farmacológico e terapêutico (PINTO *et al.*, 2002).

## 1.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, farmacologicamente ativas, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, também chamados óleos voláteis ou etéreos, a maioria possuindo sabor agradável e intenso (SIMÕES, 2000).

O Nordeste do Brasil, incluindo o Ceará e suas regiões semi-áridas, é rico em plantas aromáticas que são amplamente usadas na medicina popular (LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999; ABDON *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2006a e b). Muitas dessas plantas frequentemente apresentam um teor relativamente alto de óleos essenciais (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

A produção de óleo essencial tem grande variação entre espécies diferentes, podendo representar 0,05% a 10% do peso da planta (TRENTINI e TESKE, 2001). Condições ambientais, estágio de desenvolvimento, parte da planta de onde é extraído, grau de hidratação do terreno onde cresce a planta, bem como a presença de micronutrientes no solo, podem influenciar a composição dos óleos, ocorrendo modificações na quantidade e/ou na qualidade dos mesmos, extraídos de uma mesma espécie (TEIXEIRA e TEUSCHER, 1990). Segundo a International Standard Organization (ISO), os óleos essenciais são obtidos de partes de plantas, mais comumente através de destilação por arraste com vapor d'água (CRAVEIRO, MATOS e ALENCAR, 1976).

De maneira geral os óleos essenciais são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais (MATOS e FERNANDES, 1978; SIMÕES *et al.*, 1999). Quimicamente, a maioria é constituída de derivados dos fenilpropanóides e terpenos, sendo estes últimos preponderantes (SIMÕES, 2000).

A complexidade química permite que os óleos essenciais tenham uma vasta variedade de efeitos biológicos, tais como: anti-hemorroidário (PRUDENTE *et al.*, 1993), antimalárico (KLAYMAN, 1985), antiparasitário, antimicrobiano, diurético, hipotensor (MENDONÇA *et al.*, 1991; BEZERRA, 1994; LAHLOU *et al.*, 1999) sedativo, antidiarréico (TAKUWA, TAKUWA, e RASMUSSEN, 1987), gastroprotetor (PAIVA *et al.*, 1998), anti-inflamatório (MENEZES *et al.*, 1990; ABDON *et al.*, 2002), anticonvulsivante (SANTOS, RAO e SILVEIRA, 1997), miorelaxante e antiespasmódico (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; LAHLOU *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001), anestésico local (MOREIRA *et al.*, 2001; LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004; LIMA-ACCYOLY *et al.*, 2006) e analgésico (BIGHETTI *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ABDON *et al.*, 2002; DE ARAUJO *et al.*, 2005).

### **1.2.1 A pesquisa com óleos essenciais no Ceará**

A Universidade Federal do Ceará (UFC) tem investido muito no estudo dos óleos essenciais, preferencialmente das plantas aromáticas do Nordeste do Brasil e com largo uso na medicina popular. Esse estudo é realizado de maneira integrada por grupos de professores pesquisadores das áreas de Química, Farmacognosia, Agronomia, Botânica e Farmacologia.

Um grupo de químicos da UFC, o qual envolve o Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, o Laboratório de Produtos Naturais e o Parque de Desenvolvimento Tecnológico - incubadora de Empresas (PADETEC) têm analisado a composição dos óleos essenciais dessas plantas, inclusive fazendo o mapeamento dos locais de procedência das mesmas. Mais de duas mil amostras de aproximadamente duzentas espécies de plantas já foram analisadas e constituem um rico banco de dados.

Os grupos de botânica e farmacognosia têm contribuído de forma bastante significativa quanto à identificação botânica rigorosa e precisa das plantas estudadas. Do núcleo de Estudos Agrônômicos com Plantas Medicinais e Aromáticas do Centro de Ciências Agrárias da UFC, alguns professores têm se dedicado ao estudo das plantas incluídas no projeto Farmácias Vivas dentre outras. Esses estudos agrônômicos incluem a fenologia, a propagação, a época de plantio e colheita, as pragas e as doenças, o beneficiamento e o armazenamento, além de subsidiarem o planejamento do uso racional das plantas dentro de um enfoque de desenvolvimento auto-sustentável.

Mais recentemente, pesquisadores da Universidade Estadual do Ceará (UECE), coordenados pelo professor Dr. José Henrique Leal Cardoso, têm se dedicado à implantação desses estudos nessa universidade, principalmente no que concerne ao estudo das propriedades farmacológicas dos óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil.

Em relação a esse estudo, o nosso grupo de pesquisa (Produtos Naturais de Origem Vegetal) vem ocupando posição relevante. Foram produzidos vários trabalhos nacionais e internacionais e várias teses e dissertações que já foram defendidas ou estão em andamento, como mostram algumas de nossas publicações (ALBUQUERQUE *et al.*, 1981; ALBUQUERQUE *et al.*, 1984; LEAL-CARDOSO *et al.*, 1994; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE e LEAL-CARDOSO, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 1998; LAHLOU *et al.*, 1999; LAHLOU, LEAL-CARDOSO e MAGALHÃES, 2000; LIMA *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2001; LIMA-ACCIOLY *et al.*, 2006; SIQUEIRA *et al.*, 2006 a e b; EVANGELISTA *et al.*, 2007).

## **1.2.2 Óleo essencial de *Croton zehntneri***

### **1.2.2.1 Aspectos gerais**

Conhecido popularmente como “canela de cunhã”, “canelinha” ou “canela-brava”, o *Croton zehntneri* é uma planta subarborescente e caducifolia, nativa do Nordeste brasileiro (CRAVEIRO *et al.*, 1977 e 1978) (Figura 1). Pertence à

família das Euforbiáceas e ao gênero *Croton* (segundo maior gênero da família Euphorbiaceae) (PALMEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2006), o qual é muito importante na flora nordestina pela larga ocorrência e dispersão nos cerrados e matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, principalmente, na caatinga do Nordeste. Suas folhas e talos são dotados de um aroma forte e agradável que lembra uma mistura de erva-doce ou anis (*Illicium verum*) e cravo-da-Índia (*Eugenia cariophyllata*) (FERNANDES, ALENCAR e MATOS, 1971) que é exalado por toda a planta. Uma quantidade razoável de óleo essencial com rendimento de 1,5 - 3% do peso de suas folhas é produzida (CRAVEIRO *et al.*, 1980).

Entretanto, o aroma mostra-se variável entre exemplares desta planta coletados em diferentes localidades do Nordeste. Isto se deve à variação na concentração dos constituintes químicos mais abundantes nos seus óleos essenciais. Assim, distinguem-se para essa espécie, quatro tipos químicos: anetol – para os exemplares coletados em Fortaleza (CE) e Viçosa do Ceará (CE); eugenol - para os coletados em Areia Branca (RN) e Quixadá (CE); metil-eugenol - para os coletados em Ipu (CE) e Oeiras (PI) e estragol - para os exemplares coletados em Tianguá (CE) e Granja (CE) (MORAIS *et al.*, 2006b). O presente trabalho terá a variedade anetol como objeto de estudo.



**Figura 1.** *Croton zehntneri*.

FONTE: Arquivo pessoal de Bruno Edson Chaves.

### 1.2.2.2 Estudos anteriores

Pesquisas com o óleo essencial de *Croton zehntneri* (OECz) demonstraram atividade larvicida contra *Aedes aegypti* (LIMA *et al.*, 2006; MORAIS *et al.*, 2006a), antifúngica e potencialidade fitoterápica para dermatofitoses (FONTENELLE *et al.*, 2008).

Estudos com OECz mostraram efeitos diferentes, tanto no âmbito qualitativo quanto no quantitativo, entre várias preparações de músculo liso. Induziu contrações oscilatórias (0,1-100 µg/mL) e relaxou o músculo liso intestinal contraído por exposição a soluções nutrientes com 60 mM de cloreto de potássio (KCl) (100% de contração revertida). Em outras preparações, esse relaxamento variou de parcial, na veia porta, a mínimo ou nulo na aorta e bexiga (1,0-400 µg/mL). No músculo esquelético de batráquios induziu contrações (500-4000 µg/mL) (ALBUQUERQUE *et al.*, 1984; ALBUQUERQUE, SORENSON e LEAL-CARDOSO, 1995).

Dados preliminares mostraram que o OECz apresenta relativa especificidade de ação miorelaxante e antiespasmódica de acordo com o tipo de músculo liso, sendo mais específico para músculo liso das vias aéreas (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997). No trato respiratório (dados preliminares não publicados), mas não nos músculos lisos vascular e vesical, o OECz (0,1 – 300 µg/mL) reverteu totalmente as contrações mantidas por altas concentrações de K<sup>+</sup> extracelular e o efeito miorelaxante sobre o tônus espontâneo foi conspícuo (COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE e LEAL-CARDOSO, 1998).

O OECz demonstrou ser um agente mais promissor ainda no que concerne ao efeito anti-inflamatório e à toxicidade aguda. Administrado por via oral, ele mostrou, no modelo do edema de pata induzido pela carragenina, atividade anti-inflamatória. Tal atividade exhibe uma potência e um índice terapêutico bem maiores do que o comumente descrito na literatura para óleos essenciais (FRANCHOMME e PENOEL, 1995).



OECz já foi estudado em nervo isolado (ALBUQUERQUE *et al.*, 1981 e 1984), no músculo esquelético (ALBUQUERQUE *et al.*, 1984) simultaneamente ao anetol e ao estragol, no músculo liso intestinal de cobaia (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE e LEAL-CARDOSO, 1998) e sobre alguns parâmetros cardiovasculares (SIQUEIRA *et al.*, 2006 a e b), sendo os dois últimos concomitantemente ao seu constituinte estragol.

Também foi demonstrada uma baixa toxicidade aguda e subaguda (OLIVEIRA *et al.*, 2004); atividade depressora sobre o sistema nervoso central, bem como ações antioxidante e anti-helmíntica (BATATINHA, SOUZA-SPINOZA e BERNADI, 1995; MORAIS *et al.*, 2006b; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007).

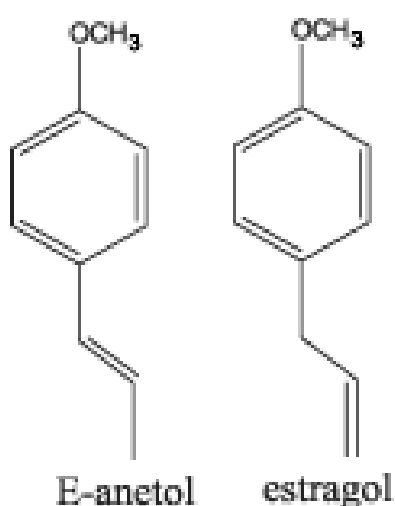
O *C. zehntneri* é usado na medicina popular principalmente como sedativo, estimulante de apetite, estomáquico, antiespasmódico, antianorexígeno, analgésico, ansiolítico e para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (CRAVEIRO *et al.*, 1977), sendo comprovados os efeitos antinociceptivos do seu óleo essencial (OLIVEIRA, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Chás feitos de caules e folhas de *C. zehntneri* são usados para tratar “distúrbios nervosos”, como irritabilidade e ansiedade (SIQUEIRA, 2006b) e demonstraram propriedades estimulantes em ratos quando preparados na água aquecida (BERNARDI *et al.*, 1991).

Estudos recentes de nosso laboratório relataram que o OECz e seus principais constituintes: estragol e anetol, foram capazes de exercer efeito antiespasmódico em íleo isolado de cobaio, justificando o uso da planta na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Anetol

O anetol (trans-1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno) ou trans-anetol é uma substância flavonóide, oxidante aromático natural, presente numa variedade de extratos de plantas medicinais (POLZIN *et al.*, 2007). Comumente é usado como aromatizante na indústria de bebidas, alimentos, cosmética (batons e sabonetes) e líquidos medicinais (SAINO e KANERVA, 1995), bem como na fabricação de creme dental, doces, goma de mascar, sorvete e bebida alcoólica (YEA *et al.*, 2006). Em adição a essas aplicações comerciais, o anetol é o principal constituinte de muitos óleos essenciais derivados de plantas medicinais, como *C. zehntneri*, *Pimpinella anisum* L. (com odor semelhante), *Illicium verum* Hook. F. (anis-estrela), *Foeniculum vulgare* (fennel) (POON e FREEMAN, 2006; COSGE, KIRALAN e GÜRBÜZ, 2008) e *Artemísia dracuncululus* (tarragon) (DUKE, 1992).

À temperatura ambiente tem a forma de cristais brancos, ponto de fusão de 21 °C e ponto de ebulição de 81 °C. Sua fórmula química é C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O (SOUZA, 2008) e tem como isômero de posição o estragol: um composto que ocorre naturalmente em um grande número de umbelíferas, entre as quais a salsa, e de labiadas, como o manjeriço e a sálvia (Figura 2).



**Figura 2.** Estrutura química dos principais constituintes do OECz utilizado nesse estudo: anetol e estragol (isômeros de posição).  
FONTE: MORAIS *et al.*, 2006b.

O anetol é percebido pelo paladar humano como sendo adocicado, sendo estimado que o seu poder edulcorante seja 13 vezes superior ao da sacarose, o comum açúcar de mesa. O cheiro e sabor são considerados agradáveis pela maioria das pessoas, mesmo em elevadas concentrações. Aparenta ser ligeiramente tóxico, tendo efeito irritante para as mucosas em grandes concentrações.

Devido ao seu amplo uso, a toxicidade do anetol tem sido estudada *in vivo* e *in vitro*. Fundamentado em muitos estudos, o anetol é considerado não genotóxico e não carcinogênico; é geralmente conhecido como seguro (GRAS - Generally Recognized as Safe) baseado no reconhecimento de detoxificação metabólica em humanos a baixos níveis de exposição (1mg/kg de peso corporal/dia) e seu uso como substância aromatizante a baixas concentrações (54 µg/kg de peso corporal/dia) (NEWBERNE *et al.*, 1999; VAVASOUR, 1999).

O anetol é rapidamente absorvido e distribuído em ratos (LE BOURHIS, 1973; FRITSCH, 1975). Numa pesquisa com cinco cobaias humanos, uma dose de 500 mg foi metabolizada em 24 horas (LE BOURHIS, 1973). O metabolismo em coelhos parece similar (AXELROD, 1956; LE BOURHIS, 1970).

Sua concentração na *Foeniculum vulgare* e na *Pimpinella anisum L.* deve estimar 90% do componente volátil do óleo dessas espécies, porém ocorre em baixas concentrações no componente volátil do bálsamo do limão (6,1%), coentro (0,5%) e basílico doce (0,08%) (NEWBERNE *et al.*, 1999).

Cremes dentais com flavonóides, que são misturas de fragrâncias contendo geralmente óleos de hortelã e anetol, representam as alergias mais comuns no uso de produtos de higiene pessoal (ANDERSEN, 1978). Como os flavonóides não são individualmente listados, é difícil identificar se o anetol está presente num produto particular, mas é uma causa incomum de alergia por dermatites de contato (GARCIA-BRAVO *et al.*, 1997). Apesar disso, foi registrado um caso com o anetol em cremes dentais (FRANKS, 1998).

Propriedades hepatotóxicas e carcinogênicas em animais e propriedades mutagênicas em bactérias já foram relatadas para o anetol. No entanto, estudos realizados em laboratório apontaram que o anetol pode estimular a regeneração hepática em ratos e nesses mamíferos apresentou atividade espasmolítica quando em altas doses (CALDWELL *et al.*, 1990).

Apesar da hipótese da ingestão de baixas concentrações causar poucos danos, a probabilidade de ameaça à saúde associada à exposição ao anetol não é conhecida. Mais pesquisas são urgentemente necessárias para relacionar os riscos ligados à inalação do anetol com taxas de concentrações similares às daquelas de alguns tipos de cigarros, uma vez que ele tem sido encontrado nesse produto. O anetol é um precursor metabólico da para-metoxi-anfetamina (PMA), um composto traficado com a designação de *Ecstasy*, cujo consumo já resultou em múltiplos casos fatais (POLZIN *et al.*, 2007).

Os efeitos farmacológicos do trans-anetol, mais frequentemente apontaram redução na atividade motora, redução da temperatura corporal e efeitos hipnóticos (BOISSIER, SIMON e LE BOURHIS, 1967; SETO, 1969; GRUEBNER, 1972; LE BOURHIS e SOENE, 1973).

Estudos anteriores apontam que o anetol inibe de forma reversível a formação de glicogênio (COTÉ e OLENSON, 1951); apresenta ação estrogênica em ratos (ZONDEK e BERGMANN, 1938); ação depressora do sistema nervoso central (BOISSIER, SIMON e LE BOURHIS, 1967); propriedades psicolépticas fulgazes, em altas doses, em camundongos (LE BOURHIS e SOENEN, 1973; BOISSIER, SIMON e LE BOURHIS, 1967); efeito analgésico, anticonvulsivante e hipnótico (MARCUS e LICHTENSTEIN, 1979), além de propriedades inseticida, antimicrobiana (CAPEK, 1956) e antifúngica, convertendo o dodecanol a um agente fungicida e agindo sinergicamente com muitos outros agentes que possuem essa propriedade (FUJITA, FUJITA e KUBO, 2007).

Apesar de sua grande ocorrência e uso comercial, existem poucas informações referentes aos efeitos desse composto na vasculatura. As ações do anetol na contratilidade de aorta isolada de ratos são comparadas com as ações

do eugenol e suas respectivas formas isoméricas: estragol e isoeugenol. O anetol induz contração via abertura de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (VOCCs) com concentrações micromolares, um efeito também comum ao seu isômero estragol, embora em menor escala. Em concentrações mais altas, o anetol causa relaxamento (SOARES *et al.*, 2007).

Recentemente, relatou-se que o anetol tem atividades anti-oxidante (FREIRE *et al.* 2005; ABRAHAM, 2001; CHAINY *et al.*, 2000; DUVOIX *et al.*, 2004), anti-inflamatória (CHAINY *et al.*, 2000), gastroprotetora (FREIRE *et al.*, 2005), antitrombótica (TOGNOLINI *et al.*, 2007), antielmíntica (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007), anestésica (GHELARDINI, GALEOTTI e MAZZANTI, 2001), anti-genotóxica e anti-carcinogênica (ABRAHAM, 2001; CHAINY *et al.*, 2000; DUVOIX *et al.*, 2004). Aumenta os níveis intracelulares de glutatina e glutatona-S-transferase e inibe respostas celulares induzidas por TNF bem como peroxidação lipídica (CHAINY *et al.*, 2000; DUVOIX *et al.*, 2004). Adicionalmente, inibiu bombas para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ -Mg-ATPase) do retículo sarcoplasmático (RS) de músculo esquelético de porco (SÁRKÖZI *et al.*, 2007).

O amplo uso do anetol como um aditivo comercial e como um componente majoritário de extratos de plantas medicinais ressalta a importância de entender sua complexa farmacologia.

#### 1.2.4 Estragol

Estragol, um metil-chavicol e éter terpenóide relativamente atóxico e volátil, é um importante constituinte de muitos óleos essenciais, como *Ravensara anisata* (Ravensara), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Ocimum forskolei* Benth, *Foeniculum vulgare* (fennel) (COSGE, KIRALAN e GÜRBÜZ, 2008), *Artemisia dracuncululus* (tarragon), *Pimpinella anisum* L. (anis), *Illicium verum* Hook. f. (anis-estrela) (LEUNG e FOSTER, 1996) e *C. zehntneri* com amplas aplicações na medicina popular e aromaterapia (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004). A significância da presença de estragol em óleos voláteis de plantas adicionadas aos alimentos, cujas fragrâncias são tradicionalmente inaladas, é discutida (FATOPE, 2008).

O estragol é o principal componente volátil emitido por frutos de *Cycas revoluta*, apesar de ocorrer raramente como componente majoritário (KNUDSEN, TOLLSTEN e BERGSTRÖM, 1993). Está presente em grande quantidade na resina oleosa de várias espécies de pinheiro (LEUNG e FOSTER, 1996) inibindo agregações de cascalhos dessa planta (HAYES e STROM, 1994; HAYES *et al.*, 1994; RAPPAPORT *et al.*, 2000; JOSEPH *et al.*, 2001).

Também conhecido como o fenilpropanóide 4-alilanol, o estragol é um antifúngico para algumas espécies de parasitas de pinheiros (EMERICK *et al.*, 2008). Por outro lado, reporta-se que o estragol atrai larvas enraizadas em sementes (LAMPMAN, METCALF e ANDERSEN, 1987; LAMPMAN e METCALF 1988; METCALF AND LAMPMAN 1989; LANCE 1990; LANCE e ELLIOTT 1991).

Apesar de sua função biológica na polinização ou reprodução de *C. revoluta* ainda não ser clara, sugere-se que o estragol poderia ser um dissuasor para alguns insetos predadores e atrair diferentes insetos que fazem a polinização (AZUMA e KONO, 2006).

Os componentes ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Enterolobium contortisiliquum* (Leguminosae) são achados no estragol (SHAHAT *et al.*, 2008).

O estragol é encontrado em numerosas plantas, temperos (principalmente) e aditivos alimentícios para comidas e bebidas e é considerado uma substância flavonóide (SMITH *et al.*, 2002). Esse composto é toxicologicamente significativo porque ele ou os produtos de sua biotransformação, sabidamente, são genotóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (DE VICENZI *et al.*, 2000). Apesar disso, foi considerado seguro (GRAS - Generally Recognized As Safe) pela FEMA (Flavor and Extract Manufacturer's Association, 1965).

Muitas ações biológicas de éteres terpenóides têm sido estudadas e mostra-se que esses compostos têm propriedades neurotrópicas, antimicrobianas, antiespasmódicas e imunoestimulantes. Por suas propriedades

neurotrópicas (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004), junto com seu isômero anetol, tem documentado atividades sedativas e anticonvulsivantes. No músculo liso, os efeitos predominantemente antiespasmódicos do OECz são atribuídos, pelo menos parcialmente, ao estragol (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997).

Possui ação depressora fugaz sobre o sistema nervoso central (SNC), com alterações de alguns reflexos comportamentais (LE BOURHIS e SOENEN, 1973; CONSENTINO, NORTE e LAZARINI, 2004); discreta potencialização do “sleeping time” do pentobarbital (SETO e KEUP, 1969); efeito anestésico e miorelaxante (DALLMEIER e CARLINI, 1981; ALBUQUERQUE *et al.*, 1981), bloqueia a excitabilidade do nervo ciático de rato (LEAL-CARDOSO *et al.*, 2004) e aumenta a temperatura e a aminotransferase sanguínea em camundongos (KALEDIN *et al.*, 2007). Estudos farmacológicos prévios têm examinado seus efeitos eletrofisiológicos em nervo periférico e confirmado efeito clareador da pele (MOTOKI *et al.*, 2003).

### 1.3 Músculo liso

O músculo liso deriva seu nome do fato de ser desprovido de estriações as quais podemos encontrar em músculo cardíaco e esquelético. Camadas de células de músculo liso formam as paredes de vários órgãos e tubos no corpo, mantendo a dimensão dos mesmos; inclui vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, vias aéreas, útero e sinos cavernosos do clitóris e pênis (WEBB, 2003).

Sua função contrátil não é de controle voluntário. Daí é também nomeado de músculo visceral, involuntário ou das vísceras ocas. Não apresenta sarcômero como o músculo estriado e possui aparência homogênea ao microscópio (“liso”). Seus filamentos contráteis estão unidos em série pelos corpos densos equivalentes às linhas Z do músculo estriado (DOUGLAS, 2000; JOHNSON, 2000). As junções célula-célula são muito frequentes. A capacidade do tecido para se contrair baseia-se na existência dessas junções (junções gap) que permitem a excitação tanto oriunda de nervos como de células marca-passo e espalham-se por todas as células (SOMLYO, 1985; MOSS e HOFMANN, 1992).

As células do músculo liso dos vasos e das vias aéreas têm um aspecto fusiforme e dimensões que variam aproximadamente de 40 a 600  $\mu\text{m}$  de comprimento (ótimo para geração de força) e de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A contração tanto de vasos quanto das vias aéreas produz aumento de resistência ao acesso de sangue e do ar, respectivamente, mas com pouca influência no comprimento do órgão (BERNE *et al.*, 2004).

Apesar de, juntamente com o músculo cardíaco, corresponder a somente 5% da massa muscular total de humanos (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004), a ubiquidade de distribuição do músculo liso no corpo torna-o bastante importante do ponto de vista funcional e patológico. A dimensão física, organização, resposta a estímulo, inervação e função diferem em cada órgão (GUYTON e HALL, 2006).

Na parede de órgãos ocos, tem função de manter suas dimensões contra cargas impostas (contração tônica) e sua contração permite encurtamento e geração de força (contração fásica) (BÁRANY, 1996). O músculo liso tônico apresenta tônus intrínseco e responde a estímulos com mudança graduada no potencial de membrana, como os músculos das vias aéreas e dos vasos de grande e médio porte. Correspondem, assim, à categoria multiunitária. O músculo liso fásico tem atividade de onda lenta e gera potenciais de ação que levam à contração, como o músculo liso do trato gastrointestinal, útero, veia porta e bexiga (GUYTON e HALL, 2006) e correspondem à categoria unitária.

A inervação do músculo liso pode ser de três tipos: multiunitário, unitário e intermediário. Os multiunitários possuem uma densa inervação que supre as células capacitando-as a contrair de forma independente via despolarização gradual do potencial de membrana (músculo liso ciliar dos olhos, brônquios, músculo piloerector, etc). Os unitários possuem inervação modulatória, predominando a resposta miogênica em seu controle contrátil. O potencial de membrana é menos polarizado (ondas lentas) do que o tipo multiunitário e estes tecidos mostram contrações rítmicas e espontâneas. Suas fibras musculares são capazes de desencadear trens de potenciais de ação (BURNSTOCK, 1970), em geral, apresentando-se aderidas por suas membranas celulares com múltiplos



pontos de adesão transmitindo força célula a célula. O acoplamento com junções abertas permite que íons e outras substâncias sejam deslocadas livremente por fibras adjacentes, funcionando como um sincício (CRIMI *et al.*, 2001; MOURA, 2005). Como exemplo temos os ureteres, artérias de resistência, arteríolas, músculo uterino e trato gastrintestinal (KNOT, ZIMMERMANN e NELSON, 1996). O tipo intermediário mantém características de permeio entre unitários e multiunitários (Exemplo: músculo liso traqueal).

O controle neural do músculo liso é feito, predominantemente, pelo sistema nervoso autônomo e, diferentemente dos músculos esqueléticos, as vias de ativação e a regulação do estado contrátil podem envolver outros mecanismos de sinalização, tais como: hormonal, agentes autócrinos e parácrinos, estiramento e outros sinais químicos locais (NIXON, MIGNERY e SOMLYO, 1994; WEBB, 2003).

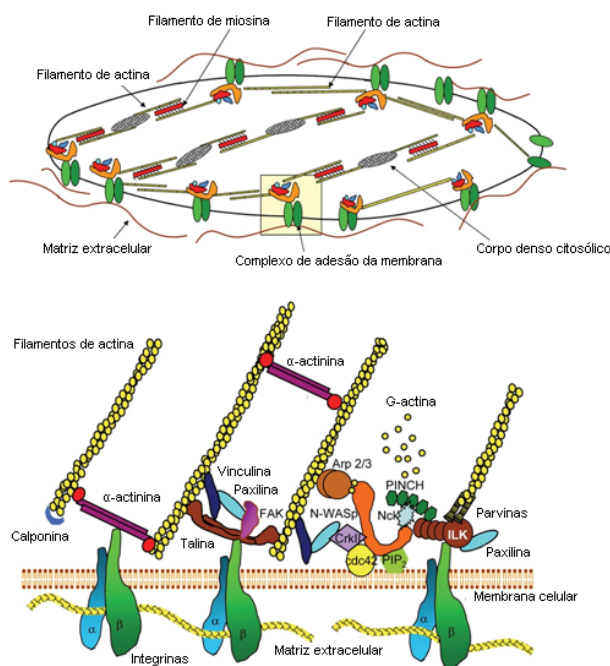
### **1.3.1 O mecanismo contrátil**

Assim como ocorre com o músculo esquelético, a organização do músculo liso é dada por filamentos contráteis, formados por actina e miosina (principal componente do filamento grosso) e filamentos não contráteis. No músculo liso encontramos a miosina-II que possui duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, com atividade ATPase lenta. A actina forma os filamentos finos e está associada à tropomiosina, à caldesmon (CaD) e à calponina (CaP). A tropomiosina se localiza entre duas hélices de actina, tendo função de modificar a atividade ATPase da junção actomiosina. A caldesmon é uma proteína que direciona e estabiliza o acoplamento actomiosina, funcionando também, quando ligada à actina, como inibidora da atividade ATPase da actomiosina, impedindo o movimento do filamento de actina. A calponina possui função similar à caldesmon, diferindo no sítio de ligação (CaD – domínios terminais; CaP – domínio central) (HOROWITZ *et al.*, 1996), contudo, pode ser fosforilada pela Proteína quinase C (PKC) levando à perda dessa função.

A calmodulina (CaM) é uma proteína que contém quatro sítios de ligação para o  $Ca^{2+}$ , atuando como receptor intracelular e tem várias funções no músculo

liso, principalmente a ativação dos ciclos de pontes cruzadas (MANI e KAY, 1996).

Os feixes de filamentos contráteis têm duas extremidades: uma fixada em corpos densos presos ao sarcolema e a outra ligada aos feixes intermediários, não-contráteis, através de corpos densos dispersos no citoplasma, formando um entrelaçado ao redor do núcleo, que está localizado centralmente (SILVERTHORN, 2003) (Figura 3). Devido à disposição oblíqua, em relação ao eixo mais longo da fibra, a contração provoca uma grande redução do comprimento da célula e, assim, permite um grau maior de encurtamento que o músculo esquelético (WIDDICOMBE, 1986).



**Figura 3.** Interações das células do músculo liso das vias aéreas com sua matriz tecidual. Implicações para a contração.  
Fonte: ZHANG e GUNST, 2008.

Uma mudança no potencial de membrana após descargas de potenciais de ação ou por ativação de canais iônicos dependentes de estiramento pode iniciar o processo de contração (WEBB, 2003). A atividade elétrica nos músculos lisos pode ser modificada pela ação de neurotransmissores e hormônios. Os potenciais de ação nesses músculos são lentos, com duração variável entre os diversos órgãos (entre 7 e 20 ms). Os canais para cálcio e sódio parecem ser os principais responsáveis pela geração de corrente de influxo durante o potencial de ação do músculo liso (AIDLEY, 1998).

Em resposta a estímulos específicos, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) aumenta e ele se combina com uma proteína ácida regulatória citosólica: a CaM. O complexo cálcio-calmodulina ( $\text{CaM-4Ca}^{2+}$ ), então, ativa uma quinase de cadeia leve de miosina (MLCK) que catalisa a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) (WIDDICOMBE, 1986).

Os mecanismos envolvidos no aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular são muitos e podem ser agrupados em acoplamento eletromecânico (dependente de despolarização da membrana) e acoplamento farmacomecânico (independente de despolarização).

A despolarização da sarcolema ativa VOCCs causando um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular e conseqüentemente aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levando à contração da célula (acoplamento eletromecânico). A elevação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em resposta à ligação de um agonista ao seu receptor (acoplamento farmacomecânico) pode ocorrer pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais operados por receptor (ROCCs) ou pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, apesar de mudanças no potencial transmembrana também poderem ocorrer nesse tipo de acoplamento. A contração, portanto, pode ser regulada por uma combinação desses dois processos (AKATA, 2007).

Um dos mecanismos contráteis mais estudados em músculo liso envolve agonistas como a serotonina (5-HT) e a norepinefrina (NE). Esses agonistas, ao se acoplarem a um receptor específico, estimulam a atividade da fosfolipase C (PLC) via proteína G heterotrimérica. A PLC é uma enzima específica para o

lipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), catalisando-o nos segundos mensageiros inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) (FUKATA, MUTSUKI e KAIBUCHI, 2001) e diacilglicerol (DAG) (WEBB, 2003). A ligação do IP<sub>3</sub> a receptores específicos no RS (IP<sub>3</sub>R) resulta na liberação de Ca<sup>2+</sup> para o citosol. O DAG permanece na membrana e juntamente com o Ca<sup>2+</sup> ativa a PKC que fosforila proteínas-alvo específicas e a via da Ras-quinase regulada pelo sinal extracelular (Ras-ERK) (WEBB, 2003). Conforme referido acima, esse mecanismo é denominado acoplamento farmacomecânico.

Existem muitas isozimas PKC no músculo liso e cada uma tem um papel em um tecido específico (vascular, uterino, intestinal, etc). Em muitos casos, a PKC tem efeito de promoção da contração através da fosforilação dos canais para Ca<sup>2+</sup> voltagem dependentes do tipo L (longa duração) ou outras proteínas que regulam o ciclo das pontes cruzadas. Ésteres de forbol, um grupo de compostos sintéticos conhecidos por ativar a PKC, têm ação similar ao DAG e causam contração do músculo liso. Canais para Ca<sup>2+</sup> tipo L na membrana também se abrem em resposta à despolarização induzida por estiramento das células do músculo liso (WEBB, 2003).

A fosforilação da MLC permite a interação molecular da miosina com a actina. A energia liberada da hidrólise do ATP pela atividade ATPase da miosina resulta no ciclo das pontes cruzadas actina-miosina. Dessa forma, a atividade contrátil no músculo liso é determinada primariamente pelo estado de fosforilação da MLC – um processo altamente regulado (NIIRO e IKEBE, 2001). Em algumas células de músculo liso, a fosforilação da MLC é mantida a baixos níveis na ausência de estímulos externos (i.e., sem receptor ou ativação mecânica). Isso resulta no que chamamos de tônus do músculo liso e sua intensidade pode variar (WEBB, 2003).

### 1.3.1.1 Contração $\text{Ca}^{2+}$ - dependente

A habilidade de alterar a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico é uma característica das células eucarióticas. Amplitude, duração, frequência e localização dessa concentração são determinantes importantes na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$ . Há uma combinação de atividades específicas celulares, expressão genética e metabolismo para controlar as respostas (McCARRON *et al.*, 2004). A contração do músculo liso é iniciada por mudanças mediadas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  nos filamentos grossos, enquanto que no músculo estriado, o  $\text{Ca}^{2+}$  medeia contração por mudanças nos filamentos finos (WIDDICOMBE, 1986).

Existem duas origens independentes para o aumento da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  livre citosólico: o fluido extracelular e os estoques intracelulares do RS (McCARRON *et al.*, 2004).

Uma das principais maneiras de promover o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  através do meio extracelular são os canais específicos para  $\text{Ca}^{2+}$ , que podem ser VOCCs, ROCCs ou canais catiônicos não seletivos permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Dentre os canais catiônicos não seletivos podemos citar os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoques (SOCCs) (PUTNEY, 1997). O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  também ocorre via canais operados por segundos mensageiros (SANDERSON *et al.*, 2008) (Figura 5).

Os SOCCs são ativados pela depleção de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, possibilitando a recarga desses estoques através da entrada capacitiva do  $\text{Ca}^{2+}$ . Os SOCCs, provavelmente, não têm somente esse papel, mas também participam na promoção da contração sustentada, que pode ocorrer diretamente ou através de estimulação indireta, por despolarização da membrana (abertura dos VOCCs pelos SOCCs) (CLAPHAM *et al.*, 2001).

### 1.3.1.2 Mecanismo de sensibilização ao $\text{Ca}^{2+}$

Mudanças na contração das células de músculo liso podem ocorrer independentemente de mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e isso tem sido referido como sensibilização da maquinaria contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Essa sensibilização pode acontecer por mecanismos que não alteram a fosforilação da cadeia leve de miosina regulatória ( $\text{MLC}_r$ ). Ambas, sinalização e sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  das células do músculo liso, são processos mediados por receptores e, por causa disso, uma alteração no tônus dessas células nas doenças pode ocorrer por um ou ambos os mecanismos em resposta a uma variedade de moléculas de sinalização inflamatória (SANDERSON *et al.*, 2008).

A ativação da proteína Rho (GTPases Rho) e a produção de DAG para ativar Rho-quinase e PKC, respectivamente, são processos mediados por proteína G acoplada ao receptor, mas a despolarização pelo KCl também parece sensibilizar as células do músculo liso ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Dessa forma, a ligação do agonista às células do músculo liso e a despolarização dessas células, ambos os processos, aumentam a atividade da MLCK via aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  e diminuem a atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) via quinases secundárias (WEEB, 2003).

Muitos estudos sugerem que a proteína quinase II dependente de CaM promove relaxamento do músculo liso por diminuição da sensibilidade da MLCK ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Adicionalmente, a atividade da MLCP é estimulada pela proteína teloquina 16-kDa no músculo liso fásico e é inibida por um mediador de DAG/PKC: CPI-17. Modificações na sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  podem ser mediadas também por fosforilação da  $\text{MLC}_r$  por quinases independentes de  $\text{Ca}^{2+}$  ou por alteração na interação das pontes cruzadas de actina-miosina que geram força por proteínas ligantes de actina, como a caldesmon (WEEB, 2003).

GTPases Rho (pequena proteína G transdutora de sinais intracelulares) são responsáveis pela sensibilização das células musculares ao cálcio, induzidas por certos agonistas. A elevação da concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  na célula muscular lisa é transiente e a resposta à contratilidade é mantida por esse mecanismo de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  causando inibição da atividade da MLCP pela Rho-quinase. Isso ocorre ao mesmo tempo em que a fosfolipase C é ativada e envolve a ativação da RhoA (tipo de GTPase Rho). A natureza precisa da ativação da RhoA pela proteína G acoplada ao receptor não é claramente entendida mas envolve um RhoGEF (Fator de troca guanina-nucleotídeo da família Rho) e migração da RhoA para a membrana plasmática. A RhoA ativada aumenta a atividade da RhoA-quinase, levando à inibição da miosina fosfatase. Isso promove o estado de contratilidade, desde que a MLC permaneça fosforilada (PENN e BENOVIC, 2008).

Estudos recentes têm identificado um sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS: molécula de interação do estroma (STIM) 1 que pode se comunicar com proteínas ou canais da membrana. A STIM 1 é uma proteína que parece ter um sítio de ligação de domínio luminal no RS e sob estoques vazios, sua distribuição muda da forma difusa para a forma agrupada adjacente à membrana plasmática e isso vai estimular a entrada do  $\text{Ca}^{2+}$ . A expressão dessa proteína e seu papel como indutor do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  têm sido estudados em culturas de células das vias aéreas de humanos (SANDERSON *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Relaxamento

Um dos grandes propósitos de se estudar músculo liso é entender seu relaxamento para prevenir doenças hiperresponsivas à sua contração, como a asma (HALL, 2000).

O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou por ação direta de uma substância que estimule a inibição do mecanismo contrátil. Além disso, o processo de relaxamento requer uma diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  ou aumento da atividade da MLCP (sensibilização) ou ambos. Durante o relaxamento, canais para  $Ca^{2+}$  operados por receptor e voltagem fecham-se resultando numa redução da entrada do  $Ca^{2+}$  na célula (WEBB, 2003).

Quando a  $[Ca^{2+}]_i$  diminui para valores menores do que  $1 \mu M$ , o complexo  $CaM-4Ca^{2+}$  se desfaz e se separa da MLCK, o que inativa a mesma, que por sua vez deixa de fosforilar a MLC (AKATA, 2007).

A regulação da atividade da MLCP tem sido geralmente considerada independente da  $[Ca^{2+}]_i$ , mas é determinada por interações e atividades complexas de uma variedade de outras quinases e fosfatases (WEBB, 2003).

O músculo liso apresenta mecanismos para diminuir a  $[Ca^{2+}]_i$  e mantê-la em níveis estáveis. Além do núcleo, de proteínas que se ligam ao  $Ca^{2+}$  (calsequestrina e calreticulina) e da mitocôndria, existem proteínas que mobilizam ativamente o  $Ca^{2+}$  para o RS e também para o meio extracelular. Duas dessas proteínas, que estão presentes tanto na membrana do RS (SERCA) como na membrana celular, são  $Ca^{2+}$ -Mg-ATPase que atuam contra um gradiente eletroquímico utilizando energia da hidrólise do ATP. A diferença entre elas é que as da membrana possuem domínio autoinibitório que, quando ligado a CaM é estimulado. O íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ) é necessário para a atividade da enzima e liga-se ao sítio catalítico da ATPase. Outra proteína é o trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que utiliza a grande força eletroquímica do  $Na^+$  para mover o  $Ca^{2+}$  para fora da célula (OLOIZIA e PAUL, 2008).



As bombas de sódio e potássio ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ), cruciais para o restabelecimento do potencial de membrana após um estímulo elétrico, quando inibidas, provocam a permanência de altos níveis de sódio dentro da célula. Esse mecanismo resultaria em uma extrusão mais lenta de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo trocador sódio/cálcio (BERNE *et al.*, 2004).

A ação dos agonistas relaxantes é focada mais nos processos internos de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  que no influxo via canais para  $\text{K}^+$  sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ). Adenosina monofosfato cíclico ( $\text{AMP}_c$ ) inibe a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo  $\text{IP}_3\text{R}$  em ratos. O óxido nítrico atenua fortemente as oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  e relaxa as vias aéreas e arteríolas de ratos agindo via guanilil ciclase, elevando guanosina monofosfato cíclico ( $\text{GMP}_c$ ) e ativando quinases dependentes de  $\text{GMP}_c$  tipo 1 ( $\text{GK1}_c$ ). Esse relaxamento parece ser mediado por diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ao inibir o  $\text{IP}_3\text{R}$  por fosforilação de proteínas associadas ao  $\text{IP}_3$  (IRAG). Esse mecanismo de ação parece ser similar ao do  $\text{AMP}_c$  (SANDERSON *et al.*, 2008).

### 1.3.3 Regulação contrátil anormal

Alterações nos processos regulatórios de manutenção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e fosforilação da MLC têm sido propostas como possíveis contribuintes para eventos de contração anormal nas células de músculo liso de vários órgãos e tecidos. Por exemplo, mudanças na afinidade, número ou subtipo de receptores adrenérgicos que levam à vasoconstrição têm sido caracterizadas em artérias em alguns tipos de hipertensão. Aumento na atividade da RhoA/Rho-quinase levam ao aumento da resposta contrátil que pode contribuir para disfunção erétil no pênis e clitóris e para o comportamento espástico das células musculares lisas na asma ou arteriosclerose (WEBB, 2003).

Anormalidades podem ocorrer como resultado da mudança na ação direta de uma substância que estimule a inibição do mecanismo contrátil. Ex: Resposta diminuída ao relaxamento pode ser devida à redução na via de sinalização dependente de nucleotídeo com diminuição da ativação do receptor (receptores  $\beta$ -adrenérgicos e  $\text{AMP}_c$ ) ou biodisponibilidade de agonistas (disfunção endotelial, óxido nítrico e  $\text{GMP}_c$  reduzidos). Essa complexidade e redundância fornecem um

potencial terapêutico para disfunções (HALL, 2000).

#### 1.4 Músculo Liso das Vias Aéreas

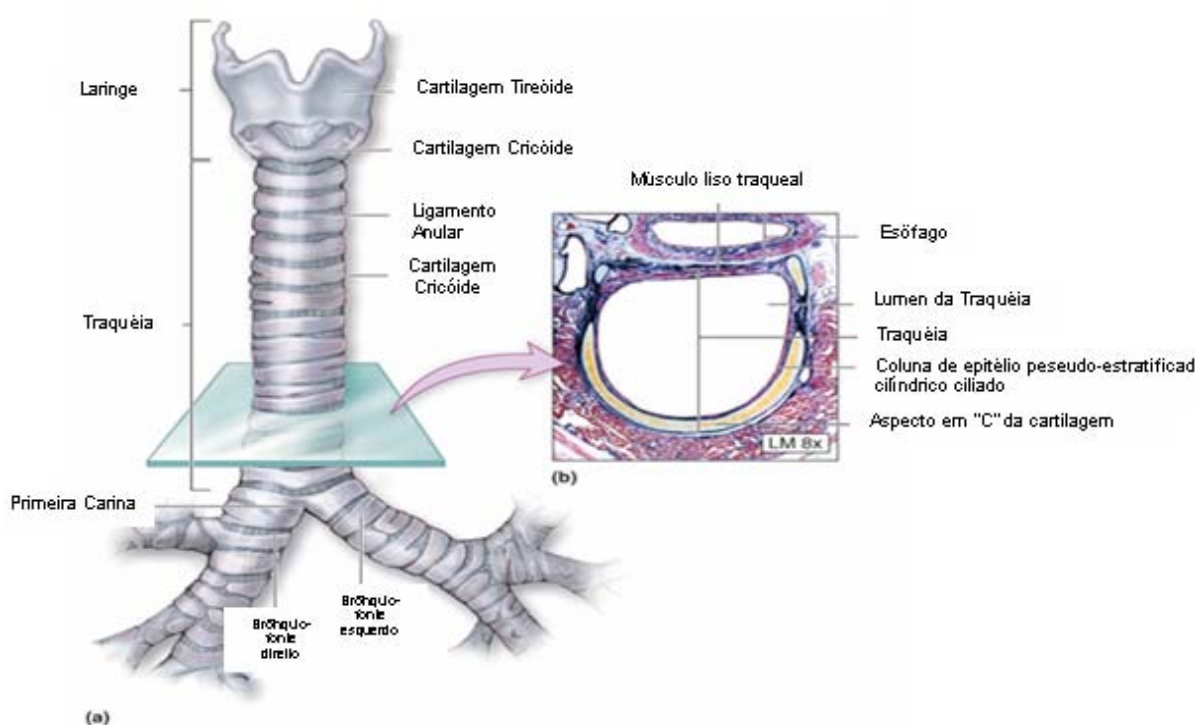
O músculo liso das vias aéreas (MLVA) é o principal efetor no controle do calibre das mesmas e está sujeito a amplas mudanças na sua forma e volume durante respostas sob condições *in vivo* (ZHANG e GUNST, 2008). O estado contrátil dessas células é predominantemente influenciado pelo balanço do estímulo constrictor e de relaxamento (HALL, 2000; PENN e BENOVIC, 2008). Sua habilidade de alterar o estado contrátil em resposta a oscilações mecânicas e estresse é criticamente importante para a regulação da responsividade normal da via aérea durante a respiração (ZHANG e GUNST, 2008).

Qualitativamente, as propriedades mecânicas, estruturais e bioquímicas do MLVA se assemelham às de todos os outros tipos de músculo liso (STEPHENS *et al.*, 1998). Está distribuído desde a traquéia até os ductos alveolares e circunda o lúmen dos brônquios e bronquíolos sendo, este último, o local de maior proporção de músculo liso na parede em relação ao diâmetro da luz. Corresponde a 25% nas vias aéreas superiores e encontra-se na região posterior da traquéia, unindo e fixando os anéis cartilagosos. Nas vias aéreas inferiores, esse número está em 4-5% da massa celular, orientando-se dentro de um padrão de hélice-anti-hélice e sugerindo uma arquitetura altamente eficiente que aumenta grandemente a habilidade de sustentação do músculo (AMRANI e PANETTIERI, 2003). Embora o MLVA pareça microscopicamente semelhante em relação à sua parte superior e inferior, existe provável heterogeneidade no que diz respeito às células que o compõem. O MLVA tem, comprovadamente, distribuição diferencial da expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos nas regiões superior e inferior (GUNST e TANG, 2000).

### 1.4.1 Músculo liso traqueal

A traquéia se localiza comumente na região cervical (pescoço) e no tórax, tendo a laringe como seu portal, prevenindo a entrada de alimento e água na via respiratória.

É a principal via aérea condutora, um tubo que permite a passagem de ar para os pulmões, formado por anéis cartilagosos (do tipo hialina), em forma de C, sobrepostos e ligados pela membrana cricotraqueal. Na extremidade posterior, próxima ao esôfago, não existe anel e é de consistência não firme, possuindo tecido muscular composto por uma camada de feixes de fibras lisas com ramificações mínimas e orientação transversal, estando separados por espaços interfasciculares de dimensões variadas que contém colágeno, elastina, fibroblastos, axônios, vasos sanguíneos e mastócitos. Entre os anéis cartilagosos também podemos encontrar musculatura lisa (STEPHENS, 1988) (Figura 4).



**Figura 4.** Figura ilustrativa da traquéia e outras estruturas do músculo liso da via aérea. **a** Visão anterior. **b** Corte transversal entre dois anéis cartilagosos (Adaptado de McKINLEY e O'LOUGHLIN, 2006).

O músculo liso traqueal tensiona as bordas de cartilagem e não deixa que elas se abram, permitindo que a porção posterior possua certa mobilidade. A membrana cricotraqueal reveste externamente todo o órgão até a bifurcação onde a traquéia se divide, ponto este denominado primeira carina. Diz-se “primeira” porque a partir desta, todas as outras são “carinas” (segunda, terceira, etc). O suprimento vascular é oriundo da artéria brônquica (STEPHENS, 1988).

Embora esteja claro que existem diferenças quanto à fonte principal de resistência e o local de maior pressão (vias aéreas mais centrais) muitos estudos de contração ao nível celular e bioquímico do MLVA empregam o músculo liso traqueal de várias espécies como um sistema modelo. A resposta a agonistas, o desenvolvimento de tensão máxima e a organização mecânica de cartilagens e células do músculo diferem. Todavia, a traquéia é uma fonte conveniente de músculo liso para estudos bioquímicos e biofísicos dos elementos contráteis (GERTHOFFER *et al.*, 1991).

#### **1.4.1.1 Mecanismos de contração e relaxamento**

No músculo liso traqueal, liberações de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto intracelular quanto extracelular são importantes no desenvolvimento de tensão muscular. O  $\text{Ca}^{2+}$  entra na célula através de, no mínimo, duas vias de sinalização: VOCCs (Tipo L, principalmente) e ROCCs (YAMAKAGE *et al.*, 2001) (Figura 5).

Os canais do tipo L ou canais sensíveis a DHP estão presentes nos músculos esqueléticos e lisos, sendo um dos principais responsáveis pela contração de ambos os tipos musculares. São canais ativados por um potencial de membrana mais positivo quando ocorre uma forte despolarização (CATTERALL, 1988). No músculo liso, os canais do tipo L podem ser ativados indiretamente pela ação de diversos outros canais que causam a despolarização da sarcolema, como 1) canais para cloro ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Cl}_{\text{Ca}}$ ) liberado do RS via proteína  $\text{G}/\text{IP}_3\text{R}$ , causando um efluxo de cloreto e conseqüentemente a despolarização, 2) canais catiônicos não seletivos e 3) possivelmente SOCCs (SANDERS, 2008).

Os ROCCs englobam os canais operados por ligante, no qual o mais comum é o receptor  $P_{2x}$  ligado ao ATP, e os canais ativados por receptores acoplados a proteína G, dentre eles os sensíveis ao  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) e à rianodina (RyR) (McCARRON *et al.*,2004). Os canais sensíveis ao  $IP_3$  são abertos através do aumento da concentração de  $IP_3$  intracelular ou da atividade da tirosina quinase acoplada ao receptor ativado por um agonista na sarcolema (FOSKETT *et al.*,2007).

Os RyR são ativados por correntes de  $Ca^{2+}$  oriundas tanto dos VOCCs quanto dos  $IP_3R$  (WRAY, BURDYGA e NOBLE, 2005), portanto, são canais onde correntes de  $Ca^{2+}$  ativam a liberação deste íon, contribuindo para o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em alguns tipos de músculo liso (WELLMAN e NELSON, 2003).

Além da ativação dependente de  $Ca^{2+}$  da MLCK, o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina também é regulado pela MLCP, que remove o fosfato de alta energia da MLC para promover o relaxamento (PAVLOVA, SAHACH e SOLOVIOV, 2003).

A respeito do mecanismo de relaxamento, existe a evidência de duas principais vias que levam à diminuição da atividade da MLCP nas vias aéreas: Rho quinases (serina/treonina quinases) fosforilam e inibem a subunidade alvo da fosfatase de miosina regulatória (MYPT1) da MLCP. Por outro lado, a PKC fosforila a CPI-17, uma fosfatase de proteína do tipo 1, inibidora específica da MLCP (NIIRO e IKEBE, 2001).

Segundo Sanderson *et al.* (2008), para explicar o relaxamento induzido por  $Ca^{2+}$  nas vias aéreas, há a hipótese de que a MLCP possa ser lentamente ativada por  $Ca^{2+}$ . Assim, em resposta ao aumento desse íon há uma rápida resposta da MLCK (via ativação  $CaM-4Ca^{2+}$ ) para inicialmente induzir a fosforilação da  $MLC_r$  e induzir contração. De qualquer forma, a vagarosa, porém forte ativação da MLCP por  $Ca^{2+}$  causará desfosforilação da  $MLC_r$  para se opor aos efeitos da MLCK e induzir relaxamento. A subsequente adição do agonista serve para inativar MLCP pelo processo da Rho quinase ou ativação da PKC. Desse modo, a atividade da MLCP é uma relação entre a inativação da MLCP via

Rho quinase/PKC e ativação via  $\text{Ca}^{2+}$  (NIIRO e IKEBE, 2001) (Figura 5).

A via mais comumente usada para o relaxamento do músculo liso na asma é o aumento do  $\text{AMP}_c$  após ativação da adenil ciclase por agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos. Este segundo mensageiro ativa a proteína quinase A (PKA) que pode fosforilar várias proteínas intracelulares, alguns receptores acoplados à proteína  $G_q$  e a PLC. Dessa forma, a PKA: 1) inibe a reação de hidrólise do  $\text{PIP}_2$  e, por consequência, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) promove a fosforilação do  $\text{IP}_3\text{R}$  reduzindo a afinidade desse receptor pelo  $\text{IP}_3$  e limitando a mobilização de mais  $\text{Ca}^{2+}$ ; 3) fosforila a MLCK diminuindo sua afinidade pelo  $\text{CaM-4Ca}^{2+}$ , o que reduz a atividade e a fosforilação da MLC e 4) fosforila  $\text{K}_{\text{Ca}}$  promovendo hiperpolarização por aumentar a probabilidade de seu estado aberto e portanto o efluxo dos íons potássio (BILLINGTON e PENN, 2003).

Existem diferentes receptores acoplados à diferentes tipos de proteína G que participam da sinalização da maquinaria contrátil da via aérea. Alguns ativam a adenil ciclase ( $G_s$  e  $G_{\text{of}}$ ), outros a inibem ( $G_{i/o}$ ); outros ativam a PLC ( $G_{q/11}$ ), o RhoGEF ( $G_{12/13}$ ) e trocadores  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  (PENN e BENOVIC, 2008).

Em músculo liso das vias aéreas, as isoformas mais importantes de fosfodiesterases parecem ser membros das famílias do tipo III e tipo IV. O controle fisiológico do  $\text{AMP}_c$  celular parece ser predominantemente devido à isoforma do tipo IV com uma variável contribuição do tipo III, que, além de ser estimuladas pelo  $\text{AMP}_c$ , são também pelo  $\text{GMP}_c$  (HALL, 2000).

#### 1.4.1.2 Dinâmica da regulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Durante a estimulação celular com agonista, um aumento rápido na  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ocorre por 10-15s e rapidamente decai. Esse mecanismo é dependente da liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques intracelulares mediada por produção de  $\text{IP}_3$  pelo agonista e subsequente estimulação de  $\text{IP}_3\text{R}$  no RS (JUDE *et al.*, 2008). O mecanismo preciso pelo qual caem os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  não é claro, embora a explicação mais provável seja sua recaptção para os estoques intracelulares através das bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ . No entanto, em continuada presença do agonista,

os níveis desse íon não caem completamente e aparece um platô, usualmente observado, contribuindo de maneira importante para manter a resposta contrátil. Naturalmente, a origem dessa fase de platô é o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoques extracelulares. Se a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  diminuir para níveis submicromoleculares, a fase de platô é perdida (HALL, 2000; JUDE *et al.*, 2008).

A sustentação da entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre através de mecanismos de canais pobremente caracterizados. Dois mecanismos têm sido observados: 1) Entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por esvaziamento de estoques. 2) Dependente de ativação de canais específicos. A identidade molecular da via de entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo liso da via aérea ainda é obscura apesar de dados recentes terem sugerido que genes da família do receptor de potencial transiente (TRP) de *Drosophila* podem ser candidatos importantes (JUDE *et al.*, 2008).

TRP são canais, membros de uma superfamília de canais para cátions não-seletivos, responsivos a agonistas, bem como a estímulos físicos e outros. Estudos recentes têm mostrado que esses canais são responsivos à via da PLC (JUDE *et al.*, 2008) e estão envolvidos com canais do tipo SOCCs (CLAPHAM, RUNNELS e STRÜBING, 2001). Existem 7 membros conhecidos em humanos de TRP (HTRP), dos quais HTRP1, 3, 4 e 6 são da via de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . HTRP3 pode ser estimulado por DAG e fornece um mecanismo de sustentação do  $\text{Ca}^{2+}$  em células não excitáveis. HTRP4 exhibe características mais ligadas a fatores eletrofisiológicos (HALL, 2000).

Alguns canais não específicos para os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja, canais que permitem a passagem, não só desse íon, como também de outros cátions, podem ser ativados tanto por agonista como por estímulo mecânico (mecano-sensitivos ou operados por estiramento). Quando ativados podem contribuir com o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  por permitir a passagem de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de  $\text{Na}^+$ , causando despolarização da membrana e ativação dos canais do tipo L (GUIBERT, DUCRET e SAVINEAU, 2008).

Um bom entendimento dos mecanismos que controlam essas vias levará à identificação de alvos terapêuticos que conduzirão novos agentes para o tratamento de doenças como a asma.

#### 1.4.1.3 Oscilações da $[Ca^{2+}]_i$

A liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares ocorre via  $IP_3R$  e RyR que propagam ondas de  $Ca^{2+}$ . A ativação de  $IP_3R$  resulta num efluxo de  $Ca^{2+}$  do RS e aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  que aumenta ainda mais a probabilidade de abertura desses canais receptores enquanto houver  $IP_3$ , num ciclo de liberação de  $Ca^{2+}$  (liberação de  $Ca^{2+}$  induzida por  $Ca^{2+}$ ). Esse evento inicia a propagação das ondas de  $Ca^{2+}$  por estímulo de  $IP_3$  vizinhos. No entanto, a ligação adicional do  $Ca^{2+}$  a um segundo sítio no  $IP_3R$ , diminui a probabilidade de abertura e isso, junto com a diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  no RS, leva à finalização da liberação deste íon.

Embora o  $IP_3$  seja requerido para iniciar as oscilações do  $Ca^{2+}$ , a manutenção delas parece requerer RyR em músculo liso das vias aéreas (SANDERSON *et al.*, 2008). Baseado nisso, prevê-se que o RyR deve ser sensibilizado com o segundo mensageiro ADP-ribose cíclico ( $ADPR_c$ ) para facilitar as oscilações de  $Ca^{2+}$  via ativação da proteína G. O  $ADPR_c$  é um ligante endógeno para os canais RyR em células de MLVA (JUDE *et al.*, 2008).

A liberação de  $Ca^{2+}$  pelo  $IP_3R$  não é independente do RyR. Sugere-se que a liberação pelo  $IP_3R$  reduz a liberação pelo RyR porque usa um estoque comum para os dois e contribui para efeitos excitatórios de agonistas do  $IP_3R$  por diminuir o feedback negativo que age para limitar o influxo de  $Ca^{2+}$ . No músculo liso, o número de  $IP_3R$  excede o de RyR. Sendo assim, os agonistas que geram  $IP_3$  são, talvez, mais comuns para evocar as ondas de  $Ca^{2+}$ . Os RyR apresentam 3 isoformas em células de MLVA, sendo predominantes as isoformas tipo 2 e tipo 3 (McCARRON *et al.*, 2004).

Apesar de o RS não mudar a ocorrência do aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  durante o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular, ele contribui para a diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  quando esse influxo termina. Esse papel é realizado pelas SERCAs e a atividade destas

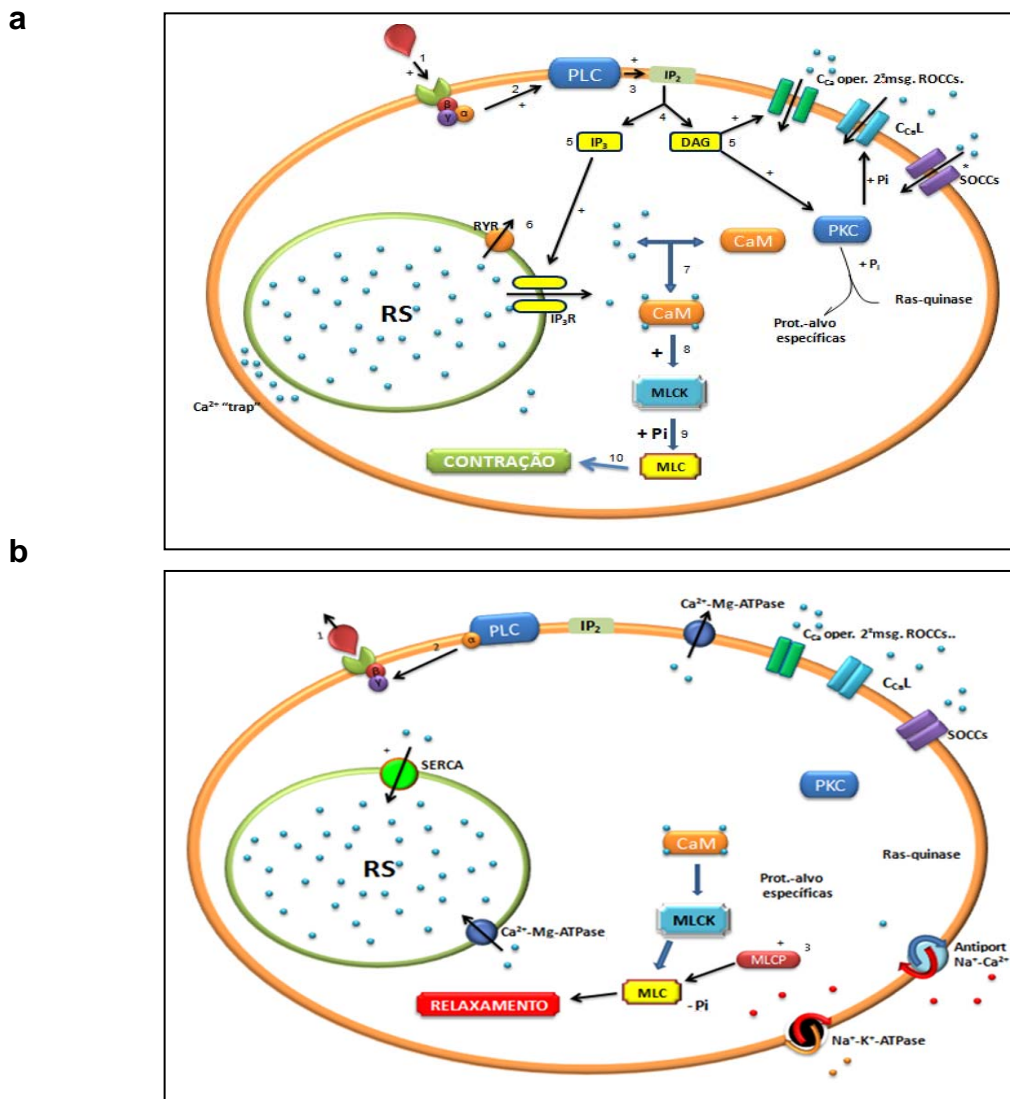


não limita o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , o próprio RS restringe esse aumento retendo passivamente o  $Ca^{2+}$ , ou seja, formando uma barreira física com o sarcolema para, passivamente, limitar o acesso do  $Ca^{2+}$  que entrou na célula (“ $Ca^{2+}$  trap”). Possíveis funções do “ $Ca^{2+}$  trap” pode ser ativar canais iônicos, manter o conteúdo do RS, gerar e manter elevada a  $[Ca^{2+}]_i$  para recarregar os estoques. O influxo de  $Ca^{2+}$  é essencial para manter os estoques sensíveis a  $IP_3$  (WEBB, 2003) (Figura 5).

O RS também tem papel na geração dos sinais de  $Ca^{2+}$  que aumentam a resposta biológica. Esses sinais aparecem como “puffs” e “sparks” de  $Ca^{2+}$ , que são pequenos grupos de receptores mediados por RyR ou  $IP_3R$ , respectivamente, restritos a pequenas áreas do miócito e podem ativar canais iônicos do sarcolema como os  $K_{Ca}$  gerando correntes externas transientes espontâneas (STOCs). Essas oscilações podem gerar o que chamamos “ondas de  $Ca^{2+}$ ”. Certamente, a remoção do  $Ca^{2+}$  extracelular inibe essas oscilações. O  $Ca^{2+}$  extracelular também serve de abastecimento dos estoques do RS. Cada oscilação diminui o conteúdo do RS. Assim, o tempo requerido para encher os estoques de  $Ca^{2+}$  pode limitar a frequência de oscilação (McCARRON *et al.*, 2004; SANDERSON *et al.*, 2008; JUDE *et al.*, 2008).

“ $Ca^{2+}$  sparks” foram inicialmente observados em células cardíacas e frequentemente parecem ocorrer espontaneamente ou em resposta a diminuição da concentração de cafeína. Associados às vias aéreas, só foram observados em cobaias, porcos, cavalos e ratos. “ $Ca^{2+}$  puffs” têm sido bem documentados em oócitos e são usualmente evocados por diminuição da concentração do agonista ou  $IP_3$  citosólico. A correlação de “Ca sparks” com correntes espontâneas transientes para fora mediadas por  $K_{Ca}$  tem levado a idéia, principalmente no sistema vascular, que “Ca sparks” relaxa o músculo liso por hiperpolarização da membrana celular ou na presença de bloqueadores de canais para  $Ca^{2+}$ , como o níquel ( $Ni^{2+}$ ). Assim, conclui-se que a contração do músculo liso da via aérea conta, principalmente, com a liberação do  $Ca^{2+}$  intracelular, mais do que com o influxo mediado por despolarização. Os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem devem reabastecer os estoques intracelulares (SANDERSON *et al.*, 2008).

Nas vias aéreas e em células de músculo liso vascular, os agonistas iniciam, mas não mantêm a contração em condições livres de  $\text{Ca}^{2+}$ . As oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  são mediadas por liberações repetidas de estoques internos que requerem abastecimento por influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  é repetidamente liberado parecem variar entre células de músculo liso de diferentes espécies ou de diferentes locais das vias aéreas. No entanto, para entender e relacionar essas variações, a importância das mudanças nessa forma de sinalização pode ser estudada e avaliada nas doenças (SANDERSON *et al.*, 2008).



**Figura 5.** Mecanismo contração-relaxamento do músculo liso das vias aéreas. **a** Esquema representativo da contração em músculo liso das vias aéreas. **1.** Ligação do agonista ao receptor de membrana. **2.** Estimulação da fosfolipase C pela subunidade  $\alpha$  do receptor. **3.** Estimulação do lipídio de membrana  $IP_2$  pela enzima PLC. **4.** Catálise do  $IP_2$  em  $IP_3$  e DAG. **5.** Ligação do  $IP_3$  a receptores específicos no RS ( $IP_3R$ ) resultando na liberação de  $Ca^{2+}$  para o citosol. O DAG permanece na membrana, ativa canais para  $Ca^{2+}$  operados por segundos mensageiros (ROCCs) e junto com o  $Ca^{2+}$  também ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC fosforila proteínas-alvo específicas, canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem ( $C_{CaL}$ ) e a via da Ras-quinase regulada pelo sinal extracelular (Ras-ERK). ROCCs,  $C_{CaL}$  e  $IP_3R$  deixam vaziar o  $Ca^{2+}$  para o citosol aumentando a concentração desse íon. **6.** O aumento do  $Ca^{2+}$  citosólico estimula a abertura dos canais receptores de rianodina (RyR). **7.**  $Ca^{2+}$  ligando-se à CaM. **8.** Complexo CaM- $4Ca^{2+}$  ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). **9.** MLCK fosforila a cadeia leve de miosina (MLC). **10.** A fosforilação da MLC acarreta a atividade ATPase da cabeça da miosina e promove o deslizamento dos filamentos finos (actina) sobre os filamentos grossos (miosina) – CONTRAÇÃO. Canais para  $Ca^{2+}$  operados por estoques (SOCCs) que se abrem ao detectarem uma diminuição do  $Ca^{2+}$  intracelular levando ao influxo do mesmo para o citosol. **b** Esquema representativo do relaxamento em músculo liso das vias aéreas (sensibilização). **1.** Dissociação do agonista do receptor de membrana. **2.** Retorno da subunidade  $\alpha$ . Os canais para membrana fecham-se em resposta à diminuição dos estímulos contráteis. Antiportador  $Na^+-Ca^{2+}$ , bombas de  $Ca^{2+}$  da membrana celular e do retículo sarcoplasmático retiram o  $Ca^{2+}$  do citosol.  $Na^+-K^+-ATPase$  restabelece o potencial de membrana. Os estoques intracelulares do  $Ca^{2+}$  são repostos. **3.** Fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila a MLC – RELAXAMENTO. FONTE: Camille Maria de Holanda Angelim Alves e Emanuel Kennedy Feitosa, 2009.

## **2 IMPORTÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

A espécie humana usufrui de uma fração muito pequena das plantas com as quais sempre conviveu e que a antecede no planeta Terra. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a ser desvendados. A humanidade, ao longo do tempo, selecionou apenas cerca de 300 plantas para alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores (PINTO, 2002).

No Nordeste brasileiro, em especial, o uso de plantas medicinais assume relevante importância no tratamento de patologias que afetam principalmente a população de baixa renda, em virtude da deficiência da assistência médica, da influência da transmissão dos hábitos culturais e, também, da disponibilidade da flora (MATOS e MATOS, 1989).

O OECz apresenta eficácia farmacológica relevante, excelente índice terapêutico e o *Croton zehntneri* manifesta alto rendimento de óleo essencial cuja extração é fácil (pois é feita por arraste de vapor de água) e barata (o óleo essencial já é coletado puro por esse processo de arraste) (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997). Este fato constitui alternativas mais adequadas, uma vez que encontraremos maior eficácia, menor toxicidade e baixo custo financeiro.

Um aspecto importante nos estudos para o desenvolvimento de novos fármacos é a determinação da especificidade de ação farmacológica e do mecanismo de ação, pois a descoberta de fármacos que, em resposta a uma dada dose tenham um único efeito, e de mecanismos originais, representa uma maior potencialidade de utilização terapêutica. Contrariamente, fármacos que em resposta a uma dada dose atuem com múltiplos efeitos tendem a desenvolver efeitos colaterais que dificultam ou contra-indicam o seu uso.

O OECz já rendeu diversas descobertas relativas ao músculo liso vascular (DE SIQUEIRA *et al.*, 2006) e gastrintestinal (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997), porém, não é rica a literatura em achados desse óleo essencial em musculatura lisa respiratória (COELHO-DE-SOUZA, 1998).

A asma é uma doença caracterizada por constrição no músculo liso das vias aéreas. Novas substâncias têm sido usadas com sucesso, porém não universalmente eficientes, e pacientes continuam a sofrer com exacerbações da doença. Durante muitas décadas, muito tem sido gasto em desenvolver terapias para tratar inflamações nas vias aéreas, mas não há avanços substanciais nas terapias da asma (JANSSEN, LUCKE e KILLIAN, 2006). Sendo assim, torna-se de grande necessidade a descoberta de novas substâncias ativas e mais seletivas nesse músculo para uma possível utilização como agentes terapêuticos. O óleo essencial de *C. zehntneri* apresenta, no que concerne a músculo liso, maior especificidade para músculo liso respiratório (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998).

O conhecimento científico dos extratos das plantas, inclusive do óleo essencial e seus constituintes químicos, permitirá que o uso de uma planta, considerada medicinal pelo povo, seja corretamente orientado.

O conhecimento científico farmacológico e toxicológico dos óleos essenciais das plantas do Brasil poderá ensejar o uso deles na aromaterapia, que hoje é o ramo da medicina alternativa que mais cresce na Europa e nos EUA (TISSERAND e BALACS, 1995).

### **3 OBJETIVOS**

---

#### **Objetivo geral**

Caracterizar os efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Croton zehntneri* (OECz) e de seus principais constituintes (anetol e estragol) em músculo liso traqueal de rato.

#### **Objetivos específicos**

Avaliar o efeito do OECz, do anetol e do estragol no tônus basal do músculo liso traqueal de rato.

Caracterizar o efeito do OECz, do anetol e do estragol sobre os parâmetros contráteis do músculo liso traqueal de rato.

Investigar o mecanismo de ação dos referidos agentes em estudo na contratilidade da traquéia.

## 4 METODOLOGIA

---

### 4.1 Óleo essencial

Nossos estudos foram realizados com óleo essencial extraído das folhas de *Croton zehntneri* das proximidades da cidade de Viçosa do Ceará, no Ceará, Brasil.

Usou-se uma amostra coletada na data 16 de maio de 2004, às 13 horas, cuja composição percentual está relatada na tabela abaixo:

**TABELA 1.** Composição percentual do óleo essencial de *Croton zehntneri*

CONSTITUINTES	Concentração no óleo (%)
Alloaromadendreno	0,23
Alfa-Felandreno	0,24
Globulol	0,26
Beta-Elemento	0,36
Espatuleno	0,74
Mirceno	0,91
1,8 cineol	0,91
Trans-cariofileno	1,15
Germacreno D	1,43
Não identificados	1,80
Biclogermacreno	5,60
Estragol	7,63
Anetol	78,74

FONTE: Dados do laboratório de eletrofisiologia (UECE), 2009.

A classificação botânica da planta foi confirmada pelo Dr. Afrânio Fernandes, que colabora conosco nos estudos sobre plantas medicinais. Uma excicata nº 27477 foi depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC).

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi feita por GC/MS (Gas Cromatography/Mass Spectrometry) nas condições a seguir: coluna capilar de sílica fundida a uma camada de Dimetilpolisiloxano DB-1 (30m x 0,25mm de comprimento); gás carreador: He (1mL/min.); temperatura do injetor: 250 °C; detector de temperatura: 200 °C; temperatura da coluna: 35-180 °C; impacto eletrônico 70eV e por pesquisa literária, índice de retenção e interpretação visual do espectro de massa (ADAMS, 2001).

## 4.2 Soluções e drogas

Os sais e drogas utilizados foram de pureza analítica, adquiridos de empresas como Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Merck Chemical (Darmstadt, Alemanha).

Como solução nutritiva foi utilizada Tyrode modificada (TM) (TYRODE, 1910) contendo (em mM): NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl<sub>2</sub> 0,98; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 e glicose 5,5 com pH ajustado para 7,4.

Soluções sem Ca<sup>2+</sup> foram preparadas de acordo com os protocolos descritos por CUTHBERT *et al.* (1994) mediante omissão de CaCl<sub>2</sub> e adição de 0,2 mM de ácido etileno-bis (β-amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético) (EGTA), um clássico quelante de Ca<sup>2+</sup>. As soluções de acetilcolina (ACh), adrenalina (ADR), serotonina (5-HT), éster de forbol (DBP – 12, 13 dibutirato de forbol) e outras foram preparadas pela diluição da substância pura em água destilada. Preparou-se a solução de nifedipina pela diluição da substância pura em etanol. Substâncias fotossensíveis foram protegidas da luz.

Soluções com BaCl<sub>2</sub> foram feitas pela substituição do CaCl<sub>2</sub> por uma quantidade isomolar de BaCl<sub>2</sub> e naquelas com alto teor de K<sup>+</sup> (80 mM) substituiu-se o NaCl por quantidade isomolar de KCl para preservar a osmolaridade e a força iônica da solução.

As soluções de OECz, anetol e estragol, os quais, daqui para frente, chamaremos “agente(s) em estudo” (AE) foram preparadas imediatamente antes



de seu uso no experimento por adição destas substâncias ao dimetilsulfóxido (DMSO) e depois ao Tyrode seguida de agitação vigorosa em agitador Vortex. As soluções de DMSO, as quais chamamos de soluções-controle, foram feitas somente com este veículo (solvente) adicionado ao Tyrode de modo que sua concentração final dentro da câmara de superfusão não ultrapassou 0,1% em nenhum grupo experimental.

Preparou-se uma solução estoque (“solução-mãe”) de 50 mg/mL de cada AE para dela retirarmos o volume necessário para ser pipetado diretamente à câmara de superfusão (Ver índice 4.3). Quando preciso, essas soluções-mãe foram diluídas, a fim de obtermos um volume adequado para não alterar o volume final contido na câmara. As soluções-controle foram feitas com a mesma faixa de concentração de DMSO utilizada pra dissolver os AE.

### **4.3 Animais e preparação dos tecidos**

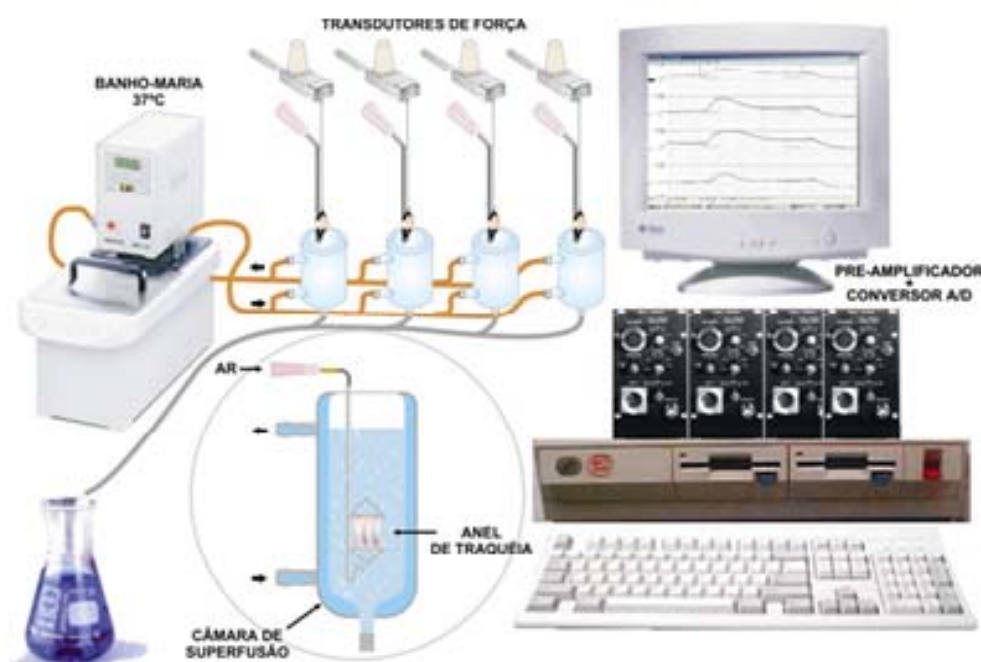
Utilizaram-se ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, pesando entre 150 e 350g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da UECE alojados em caixas de polipropileno forradas com maravalha de pinho, com água e ração *ad libitum* e aclimatados com ciclos naturais dia/noite.

Os protocolos foram aprovados no Comitê de Ética de Pesquisa com Animais da UECE e a manipulação dos animais, antes e durante os experimentos, obedeceu às normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pela SBCAL - COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral e, imediatamente após, a traquéia foi exposta cirurgicamente para a dissecação. Uma vez excisada, foi prontamente transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritiva de TM, com composição já descrita anteriormente (Ver item 4.2), refrigerada por período de tempo nunca superior a 24 h.

A traquéia teve seus tecidos anexos delicadamente divulsionados e foi cortada transversalmente em quatro segmentos contendo quatro ou cinco anéis de cartilagem cada. Esses segmentos foram fixados através de peças triangulares manufaturadas com aço inoxidável e postos a equilibrar por 1 - 2 h em câmara de superfusão para órgão isolado contendo 5 mL de TM (TYRODE, 1910) ( $[K^+] = 5 \text{ mM}$ ), mantida com arejamento constante, em pH 7,4 e a 37 °C.

As peças triangulares contendo os segmentos traqueais tiveram uma extremidade atada com fios de algodão a um ponto fixo dentro da câmara e a outra extremidade a um transdutor de força (Grass, modelo FT03, Quincy, Mass., EUA) para registro isométrico das contrações. Os sinais gerados pelo transdutor de força foram condicionados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (DI-200, DATAQ Instruments, Inc., EUA) (PERCY, 1996). Os dados foram convertidos em pontos e armazenados na forma de traçados em arquivos pelo software WINDAQ versão 1,65 (DATAQ Instruments, Inc. EUA) (Figura 6).



**Figura 6.** Sistema de aquisição das respostas musculares mecânicas. As preparações do músculo liso traqueal eram montadas em um “set-up” composto por 4 transdutores de força (GRASS, modelo FT03), pré-amplificador (DATAQ, modelo PM1000), computador Pentium com placa conversora analógico-digital, banho-maria e 4 câmaras de banho de superfusão para órgão isolado.  
 FONTE: ALVES-DE-ALMEIDA, 2004.

#### 4.4 Protocolos experimentais

Para avaliar o efeito dos AE sobre um dado parâmetro, registrou-se, sempre que possível, o valor do parâmetro: 1) No controle; 2) Em presença do AE; 3) Após a lavagem deste agente (a intervalos regulares, até demonstrar-se a recuperação) ou por um tempo total de três horas (caso não houvesse recuperação).

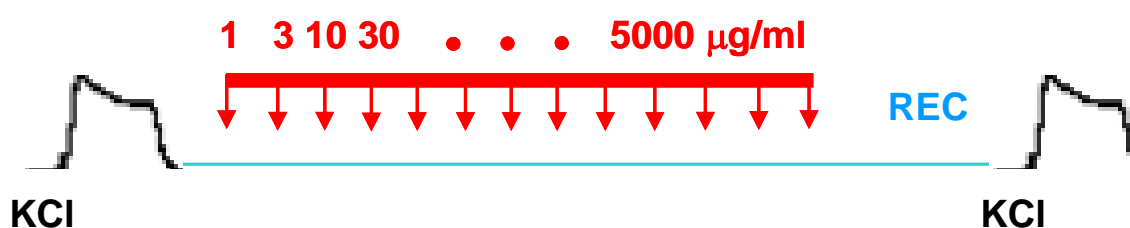
Sob aspectos gerais, todos os protocolos experimentais foram iniciados após o entorno de 1 hora de estabilização da preparação numa tensão de repouso de 1 grama (g) para adequação às novas condições (Ver índice 4.3, parágrafo 4).

Em seguida, a fim de observar a integridade biológica do ensaio (viabilidade do tecido), foram evocadas contrações com 60 mM de KCl (K60) e somente tecidos com contrações padrões e reproduzíveis foram utilizados. Esse procedimento inicial seguiu-se em todos os protocolos experimentais de contratilidade do músculo liso traqueal. Todos os protocolos desse estudo foram realizados separadamente em grupos diferentes de animais e a maioria dos resultados foi expressa em percentual da contração inicial aferida como controle.

Seguindo essa convenção, foram investigadas as séries experimentais abaixo discriminadas que mencionaremos doravante como itens da investigação em músculo liso. Todas as séries objetivaram determinar as ações farmacológicas do OECz, do anetol e do estragol, bem como estudar o mecanismo de ação das respostas observadas no músculo liso traqueal.

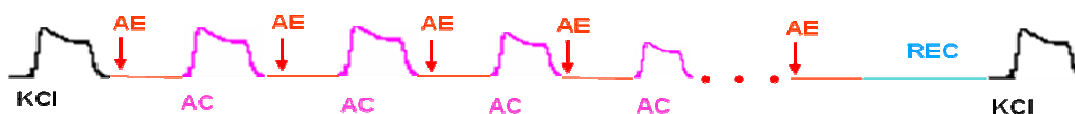
**Série 1:** Para avaliar os efeitos do OECz, anetol ou estragol sobre o tônus basal do músculo liso traqueal, utilizaram-se concentrações crescentes e cumulativas (1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 2000, 3000 e 5000 µg/mL) adicionadas diretamente ao banho, incubadas por 5 minutos. Antes do início da primeira aplicação dos AE registrou-se a linha de base durante 5 minutos. Alterações para cima da linha de base foram consideradas como contração e alterações para baixo foram consideradas como relaxamento. Para mostrar que as possíveis alterações

existentes seriam induzidas pelos AE, controles pareados sem exposição aos referidos agentes foram feitos a fim de mensurar a contração ou o relaxamento espontâneo do tônus muscular. Seus traçados foram registrados no mesmo intervalo de tempo do tecido tratado. A fim de demonstrar a integridade fisiológica do tecido muscular após aplicação da última concentração do AE, a preparação foi lavada com solução fisiológica de TM por 1 hora, em intervalos de 10 minutos, onde se avaliou a resposta da preparação a 60 mM de KCl.



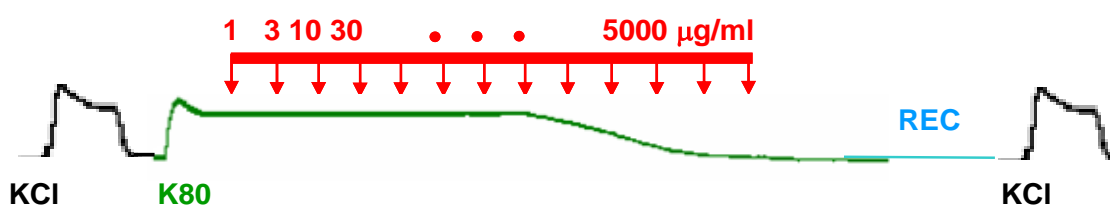
**Figura 7.** Esquema ilustrativo da série 1. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio; REC: Recuperação (TM). A barra indica o tempo de exposição ao AE (OECz, Anetol ou Estragol); As setas indicam a adição dos AE.

**Série 2:** Para investigar os efeitos do OECz e de seus principais constituintes sobre parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico e farmacomecânico, o músculo liso traqueal foi submetido às seguintes condições experimentais: após uma contração inicial com o agente contraturante (AC), o AE foi adicionado em concentrações crescentes e não cumulativas (1 - 5000 µg/ml) previamente ao banho por um período de 5 minutos e em seguida foram evocadas contrações subsequentes com K60 ou 10 µM de ACh. Após cada concentração com o AC e estabelecido um platô, fez-se uma lavagem com solução TM por 5 minutos. A remoção dos AE da preparação foi feita com lavagens sucessivas com TM, por 1 hora. Segmentos de traquéia pareados foram utilizados para avaliar os efeitos do veículo na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver os AE.



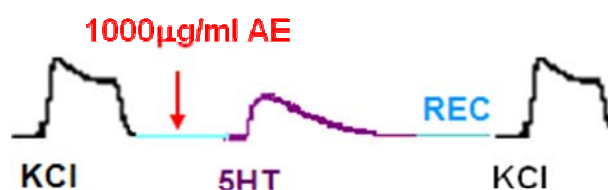
**Figura 8.** Esquema ilustrativo da série 2. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio; AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol); AC: Agente contraturante (ACh ou KCl). REC: Recuperação (TM). As setas indicam a adição do AE (OECz, anetol ou estragol).

**Série 3:** Para avaliar o efeito do OECz, anetol ou estragol no músculo liso traqueal com a contratura potássica estabelecida em estado estacionário (músculo mantido despolarizado por concentrações extracelulares de 80 mM de KCl (K80) os AE foram adicionados em concentrações crescentes e de modo cumulativo (1 - 5000  $\mu\text{g/mL}$ ). Logo que houve relaxamento total, as concentrações subsequentes não foram colocadas, cessando, assim, o experimento. A remoção do óleo ou dos seus constituintes da preparação, com solução fisiológica de TM, foi realizada com sucessivas lavagens, por 1 hora. Segmentos de traquéia pareados foram utilizados para avaliar os efeitos do veículo na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver os AE.



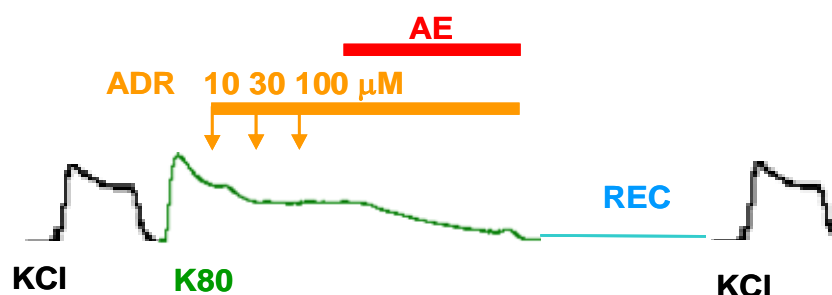
**Figura 9.** Esquema ilustrativo da série 3. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio; K80: Adição de 80 mM de cloreto de potássio; AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). REC: Recuperação (TM). A barra indica o tempo de exposição ao AE; As setas indicam a adição do AE.

**Série 4:** Para avaliar o efeito do OECz, anetol ou estragol na inibição da contração de 10  $\mu\text{M}$  de serotonina (5-HT) sobre o músculo liso traqueal, OECz, anetol ou estragol foram adicionados no tônus basal (TM) numa concentração única de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 5 minutos antes da adição da 5-HT ao banho. A recuperação estabeleceu-se após 1 hora de lavagem com TM. Segmentos de traquéia pareados foram utilizados para avaliar os efeitos do veículo na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver os AE.



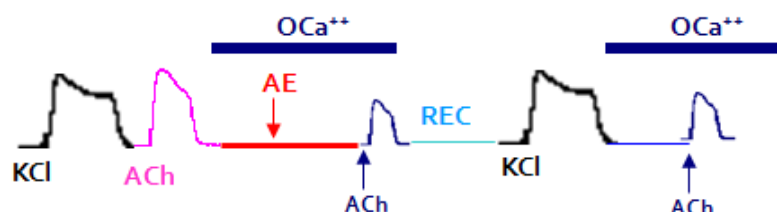
**Figura 10.** Esquema ilustrativo da série 4. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio; AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). 5HT: Adição de serotonina; REC: Recuperação (TM). A seta indica a adição do AE.

**Série 5:** Para investigar a participação adrenérgica no efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal, realizou-se um protocolo experimental utilizando adrenalina (ADR), um relaxante das vias aéreas cuja ação é primariamente por  $\beta$ 2-adrenoceptores (TANAKA *et al.*, 2005). No platô da contração induzida por K80 foi adicionada ADR em concentrações crescentes e cumulativas (10 , 30 e 100  $\mu$ M). Após o estabelecimento de um novo platô, foram administrados os AE na concentração única de 1000  $\mu$ g/mL para promover dessensibilização dos receptores adrenérgicos.



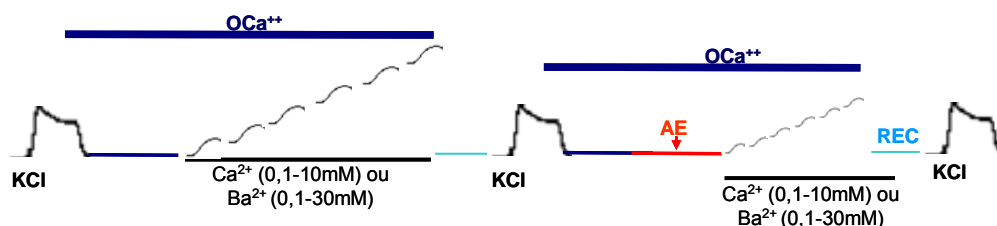
**Figura 11.** Esquema ilustrativo da série 5. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio. K80: Adição de 80 mM de cloreto de potássio. ADR: Adrenalina. AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). REC: Recuperação (TM). As barras superior e inferior indicam o tempo de exposição ao AE ou à ADR, respectivamente; As setas indicam a adição de adrenalina em suas respectivas concentrações.

**Série 6:** Para averiguar o efeito do OECz e seus principais constituintes no componente contrátil da ACh que independe do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, foram realizados experimentos eliminando o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Inicialmente, em condições normais de  $\text{Ca}^{2+}$ , foram induzidas contrações com K60 e 10  $\mu\text{M}$  de ACh (as quais foram tratadas como controle em relação às contrações deste agonista em meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Em seguida, a preparação foi lavada duas vezes com uma solução Tyrode sem adição de cloreto de cálcio ( $0\text{Ca}^{2+}$ ) contendo 0,2 mM de EGTA. Nestas condições, adicionaram-se os AE (3000 ou 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou veículo (na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver os AE) por 5 minutos, seguindo-se de adição de ACh. A amplitude do pico da contração induzida pela ACh na presença e na ausência dos AE foi mensurada. A recuperação da resposta contrátil ao KCl e à ACh realizou-se após 1 hora em condições fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 12.** Esquema ilustrativo da série 6. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio. ACh: Adição de 10  $\mu\text{M}$  de ACh.  $0\text{Ca}^{2+}$ : Meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). REC: Recuperação (TM). A barra indica o tempo de exposição ao  $0\text{Ca}^{2+}$ . A seta para baixo indica a adição do AE enquanto a seta para cima representa a adição de ACh em meio  $0\text{Ca}^{2+}$ .

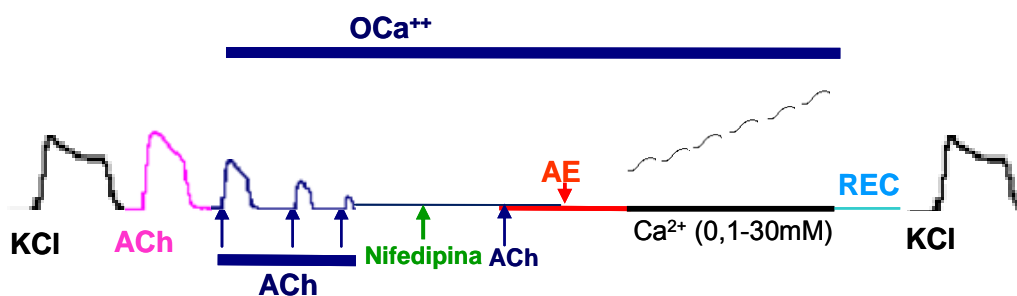
**Série 7:** Essa série teve a finalidade de avaliar os efeitos dos AE nas contrações induzidas pela adição de  $\text{CaCl}_2$  ou de  $\text{BaCl}_2$ , íons com passagem através dos VOCCs. Particularmente, o  $\text{Ba}^{2+}$  foi utilizado uma vez que o influxo desse íon nas células do MLVA dá-se por VOCCs e não por ROCCs (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991). Após ser verificada a responsividade do tecido pela indução de uma contração com K60, a solução TM foi substituída por  $0\text{Ca}^{2+}$  com EGTA (0,2 mM) e K60 (potássio alto) (CUTHBERT *et al.*, 1994). Nesta situação, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (0,1-10 mM) ou  $\text{BaCl}_2$  (0,1-30 mM). Após esta, a preparação foi lavada com TM e evocada uma contração com K60 seguida de nova lavagem com  $0\text{Ca}^{2+}$  + EGTA (0,2 mM) e K60. Antes da formação de uma nova curva de  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Ba}^{2+}$ , adicionou-se à preparação o AE (1000 ou 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 5 minutos. O tecido foi recuperado por 1 hora de lavagens sucessivas com TM. A curva inicialmente formada na ausência do AE foi considerada controle em relação à curva formada na presença do AE.



**Figura 13.** Esquema ilustrativo da série 7. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio.  $0\text{Ca}^{2+}$ : Meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). REC: Recuperação (TM). A seta para baixo indica a adição do AE na respectiva concentração. A barra indica o tempo de exposição ao  $0\text{Ca}^{2+}$ . As curvas crescentes representam a resposta à adição do cloreto de cálcio ou cloreto de bário nas respectivas concentrações.

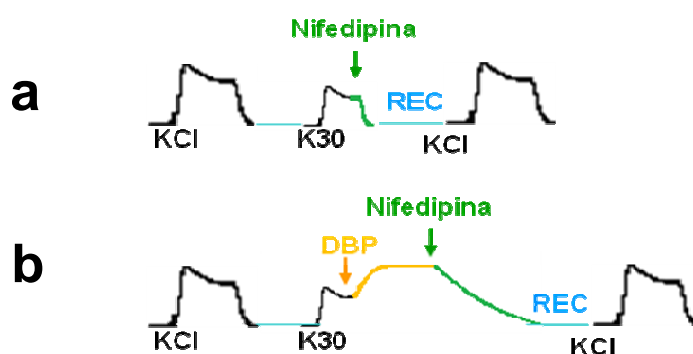


**Série 8:** Para investigar o efeito do OECz, anetol ou estragol sobre ROCCs, a nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), um clássico bloqueador de VOCCs, foi utilizada para garantir a não participação dos mesmos nos eventos contráteis. Após ser testada a viabilidade do tecido com K60 e ACh (10  $\mu\text{M}$ ) a preparação foi lavada com  $0\text{Ca}^{2+}$  contendo EGTA (0,2 mM). Em seguida, foram depletados os estoques do RS com sucessivas contrações induzidas por ACh (10  $\mu\text{M}$ ). Nessas condições, adicionou-se nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), seguida de ACh (10  $\mu\text{M}$ ) e do AE numa única concentração (1000 ou 3000  $\mu\text{g/mL}$ ), num intervalo de 5 minutos entre cada substância. Após os 5 minutos foi realizada uma curva concentração-efeito pela adições crescentes e cumulativas de  $\text{CaCl}_2$  (0,1-10 mM). Efetivou-se a recuperação com lavagens sucessivas (TM) por 1 hora. As contrações obtidas na presença do AE foram quantificadas e comparadas ao controle (curva de  $\text{Ca}^{2+}$  formada após adição do veículo ao invés do AE, na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver esse agente).



**Figura 14.** Esquema ilustrativo da série 8. KCl: Adição de 60 mM de cloreto de potássio. ACh: Adição de 10  $\mu\text{M}$  de acetilcolina.  $0\text{Ca}^{2+}$ : Meio isento de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. AE: Agente em estudo (OECz, Anetol ou Estragol). REC: Recuperação (TM). As setas para cima indicam a adição de ACh ou nifedipina. A barra superior indica o tempo de exposição ao  $0\text{Ca}^{2+}$ . A barra inferior indica adições sucessivas de ACh. A curva crescente representa a resposta à adição do cloreto de cálcio na respectiva concentração.

**Série 9:** Para avaliar o efeito da nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) no platô da contração estimulada pelo KCl (30 mM) e amplificada pela adição do éster de forbol (DBP) (1  $\mu\text{M}$ ), em meio nutritivo normal (TM), adicionou-se a nifedipina (bloqueador de VOCCs) (YAGI, KUWAHARA e TSUBONE, 2002) em duas situações: 1) No platô da contração evocada pelo KCl em baixas concentrações (30 mM) (para observar o efeito em VOCCs) e 2) Na contração evocada pelo K30 e amplificada pela adição do DBP (para acrescentar o efeito contrátil pela ativação da PKC). Uma vez verificada a viabilidade do tecido com K60, adicionou-se KCl (30 mM) e no platô da contração foi adicionada a nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ). Num outro experimento, somamos ao tecido pré-contraído por K30 o DBP (1  $\mu\text{M}$ ). Ocorreu um aumento significativo da contração e foi estabelecido um novo platô. Sobre este, foi posta a nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ). Após o equilíbrio estabelecido (reversão completa da contração), fez-se a recuperação por 1 hora.



**Figura 15.** Esquema ilustrativo da série 9. **a** Reversão da contração evocada pelo K30. **b** Reversão da contração evocada pelo K30 e amplificada pelo DBP. KCl: Cloreto de potássio 60 mM; K30: Cloreto de potássio 30 mM. REC: Recuperação (TM).

**Série 10:** Para averiguar o efeito do OECz, anetol ou estragol (200  $\mu\text{g/mL}$  ou 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre o platô da contração evocada pelo KCl (30mM) e amplificada pela adição do DBP (1 $\mu\text{M}$ ) em meio nutritivo normal (TM), foram realizados experimentos de forma semelhante à série anterior (Série 9; Figura b), acrescentando-se, porém, no lugar da nifedipina, o AE nas concentrações de 200  $\mu\text{g/mL}$  ou 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Após o equilíbrio estabelecido (reversão completa ou da contração ou obtenção de um platô), fez-se a recuperação por 1 hora.

#### 4.5 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.), onde n representa o número de experimentos, sempre igual ou superior a quatro.

Consideraram-se estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ( $p < 0.05$ ). Os testes de normalidade e homocedasticidade das variâncias foram calculados automaticamente pelo programa Sigma Plot/Sigma Stat 10. As curvas de regressão logística foram feitas por meio da equação de Hill que calculou 4 parâmetros (máximo, mínimo,  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ) e hillslope).

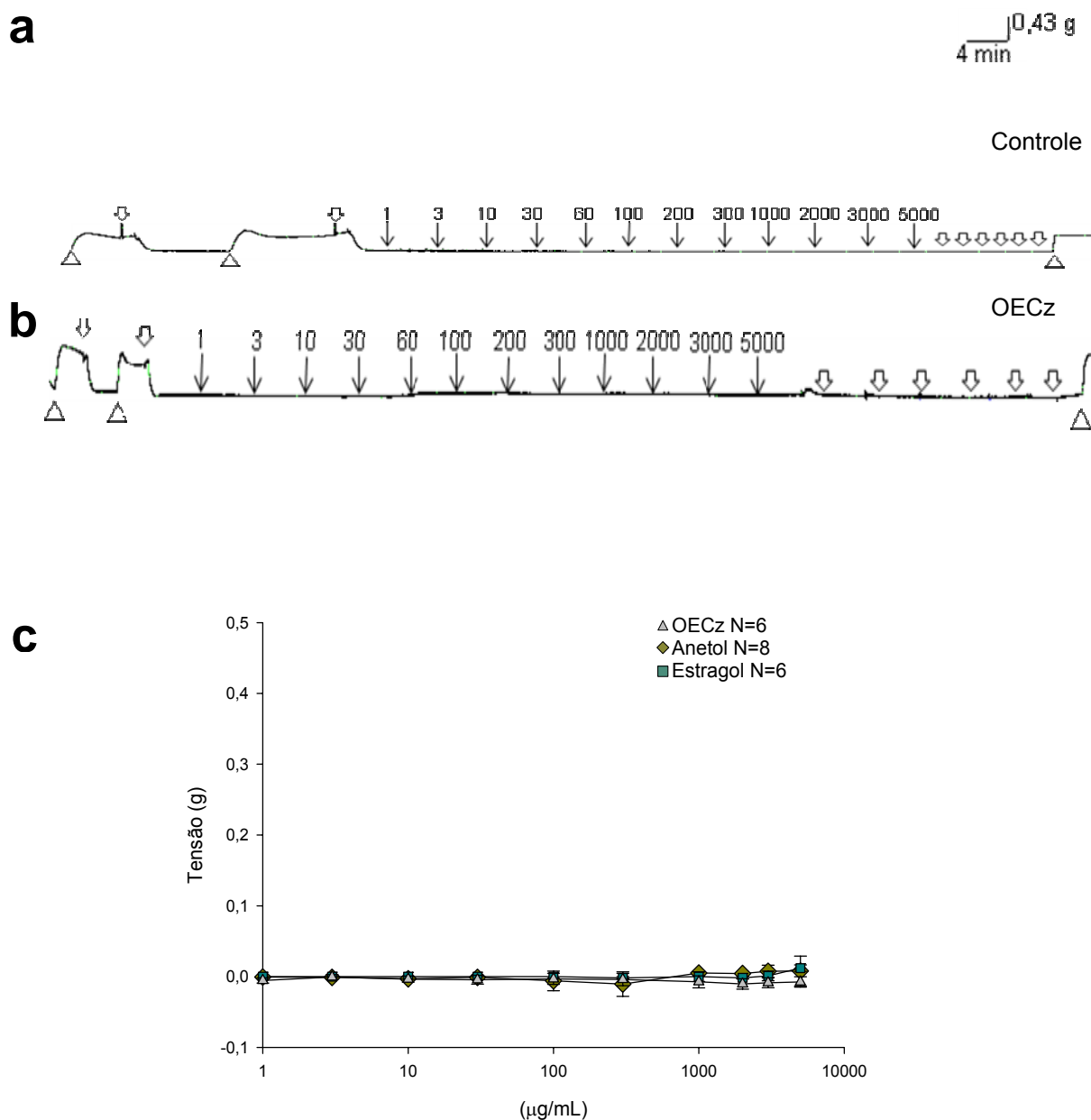
Utilizou-se o teste ANOVA (análise de variância) seguido de um teste de múltipla comparação ou do teste t de Student, conforme apropriado, ou/e técnicas não paramétricas se os pré-requisitos para ANOVA (normalidade e homocedasticidade dos dados) não tivessem ocorrido. A resposta da concentração dos AE na qual observou-se o efeito máximo foi utilizada para avaliar a eficácia farmacológica. A  $EC_{50}$  ( $IC_{50}$ ), concentração da substância capaz de produzir 50% do seu efeito máximo, foi empregada para avaliar a potência farmacológica.

## **5 RESULTADOS**

---

### **5.1 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato (Série 1)**

Sob aspectos gerais, a ação dos três AE sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato não obteve resposta relaxante ou contraturante, mesmo variando de 1 a 5000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 16). A comparação foi feita em relação ao grupo controle e de acordo com o tônus intrínseco inicial observado. Assim sendo, não houve efeito intrínseco sobre o tônus basal considerado pela atuação do OECz, anetol ou estragol.



**Figura 16.** Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o tônus basal do músculo liso traqueal. **a e b** Traçados originais mostrando a ausência de efeito do veículo (**a**) ou dos AE (OECz, anetol ou estragol) (**b**) no tônus basal do músculo liso traqueal de rato.  $\Downarrow$  TM;  $\Delta$  K60. As setas para baixo indicam adição do AE ou do veículo. **c** Gráfico representativo das alterações no tônus basal induzidas pelo OECz, anetol e estragol. Controles não mostrados.

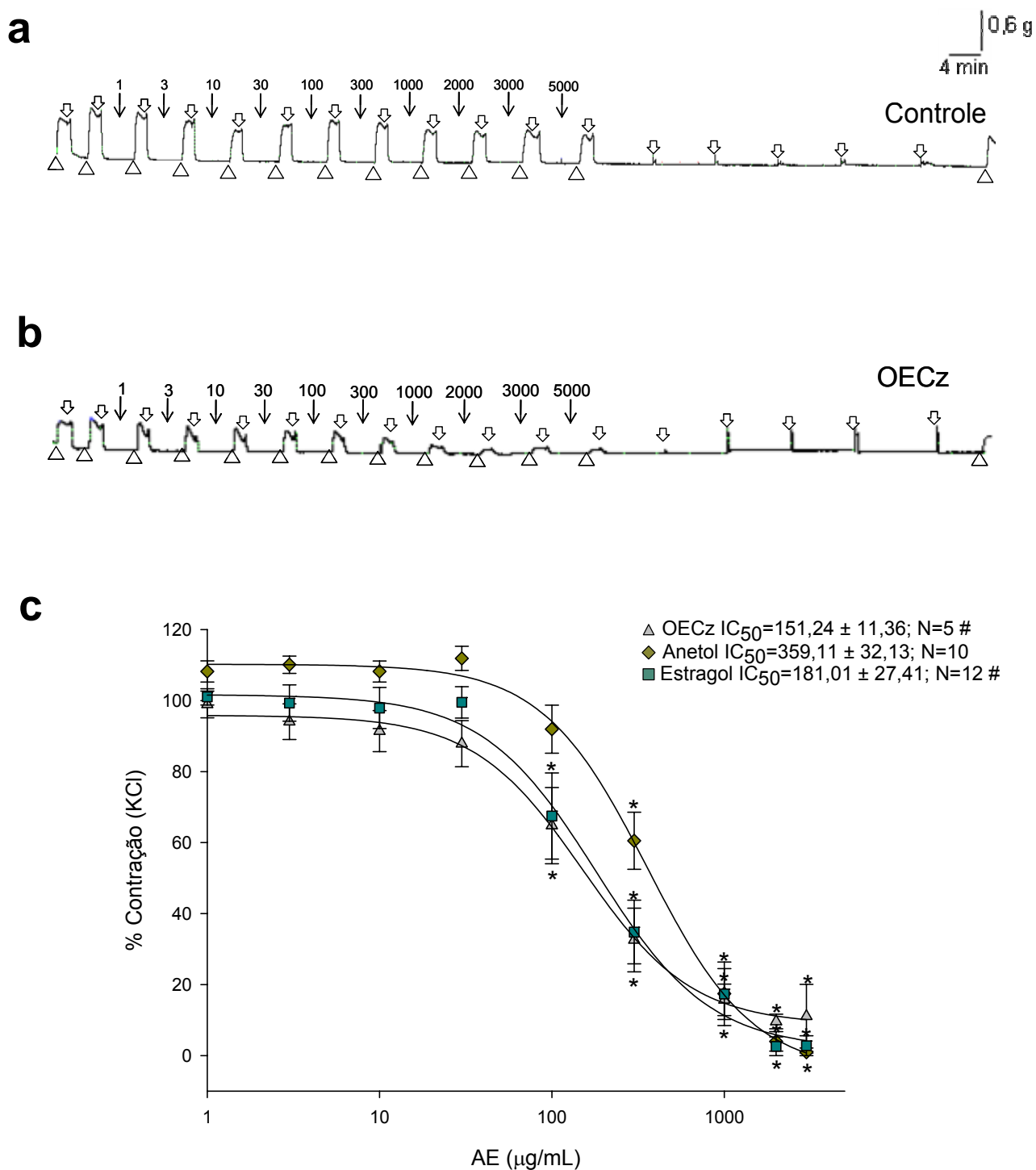
## 5.2 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 60 mM de KCl ou 10 $\mu$ M de acetilcolina em anéis de traquéia (Série 2)

Em síntese, todos os AE, encubados por 5 minutos nas preparações de músculo liso traqueal de rato, inibiram de forma concentração-dependente as contrações induzidas por K60 (Figura 17b e c) e ACh (10  $\mu$ M) (Figura 18e e f). A ação inibitória dos AE foi aferida apenas no componente fásico dessa contração, porém, nos traçados originais pode ser vista a inibição dos dois componentes (fásico e tônico) (Figuras 17b e 18e). Os valores das  $IC_{50}$  (em  $\mu$ g/mL) e do número de experimentos (N) estão mostrados em cada gráfico.

Ao usarmos o KCl como agente contraturante, o OECz e o estragol inibiram de forma significativa as contrações a partir da concentração de 100  $\mu$ g/mL. O anetol apresentou significância a partir da concentração de 300  $\mu$ g/mL (Figura 17c) ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak). O valor da  $IC_{50}$  referente à inibição do K60 pelo anetol foi significativamente maior ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak).

No protocolo onde se utilizou a ACh como agente contraturante, OECz e estragol promoveram inibição significativa em relação ao controle e à contração inicial de ACh (na ausência dos AE) a partir da concentração de 300  $\mu$ g/mL. O anetol significativamente inibiu a contração pela ACh a partir de 100  $\mu$ g/mL (Figura 18f) ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Houve diferença estatística entre as  $IC_{50}$  referentes à inibição da ACh, sendo o valor da  $IC_{50}$  para o OECz significativamente maior ( $p < 0,05$ , ANOVA).

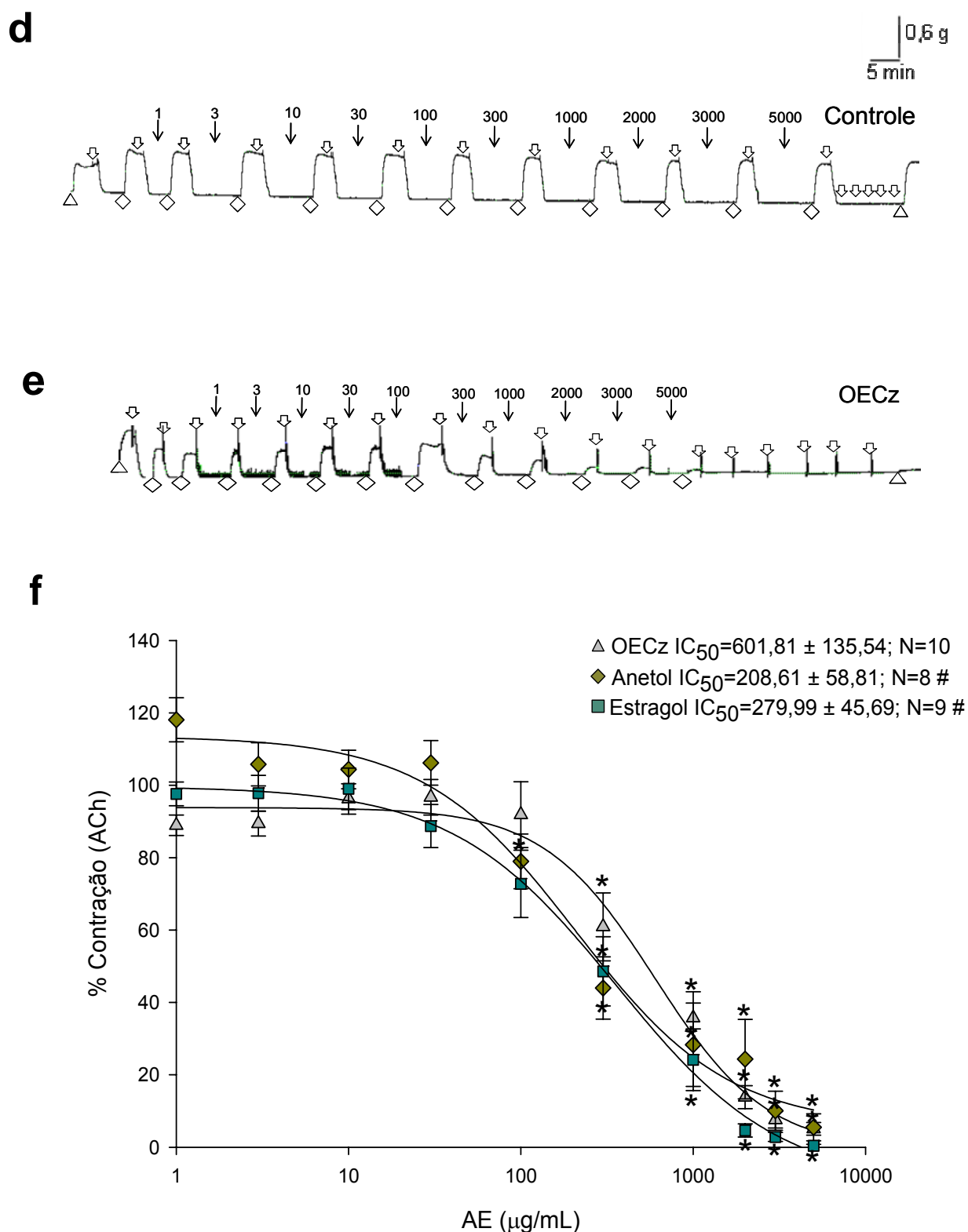
Comparando-se as  $IC_{50}$  da inibição das contrações induzidas por K60 e ACh, encontramos diferença estatística com valores significativamente menores para o OECz e o anetol, respectivamente ( $p < 0,05$ , t-test) (Ver Tabela 4).



**Figura 17. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 60 mM de KCl em anéis de traquéia. a e b** Traçados originais mostrando a inibição da contração do K60 (b) por concentrações crescentes e não cumulativas dos AE (b), bem como o grupo-controle (a).

$\triangle$  K60;  $\downarrow$  TM. As setas para baixo indicam adição do AE ou do veículo. **c** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais das contrações induzidas por KCl em presença de concentrações crescentes e não cumulativas dos AE. Controles não mostrados.

\* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta inicial do AC.



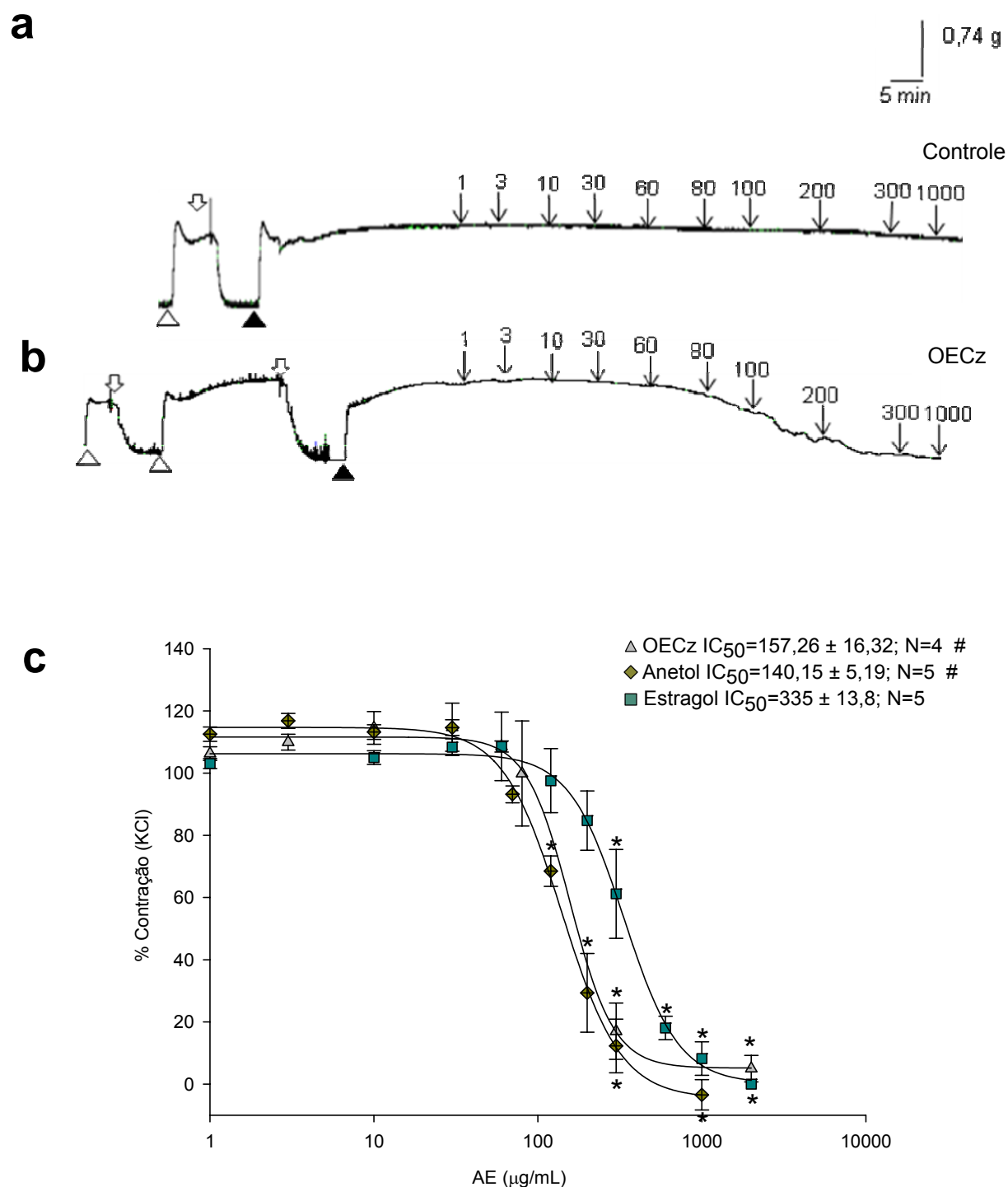
**Figura 18. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre as contrações induzidas por 10  $\mu$ M de ACh em anéis de traquéia. d e e** Traçados originais mostrando a inibição da contração da ACh (e) por concentrações crescentes e não cumulativas dos AE, bem como o grupo-controle (d).  $\triangle$  K60;  $\diamond$  ACh;  $\Downarrow$  TM. As setas para baixo indicam adição do AE ou do veículo. **f** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais das contrações induzidas por ACh em presença de concentrações crescentes e não cumulativas dos AE. Controles não mostrados.

\* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta inicial do AC.



### **5.3 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de KCl (Série 3)**

Sob aspectos gerais, o OECz e seus principais constituintes (anetol e estragol), em concentrações crescentes e cumulativas, foram capazes de reverter o platô da contração induzida por K80 de modo dependente de concentração. Foi possível observar esse efeito induzido por OECz e estragol de forma estatisticamente significativa a partir da concentração de 300  $\mu\text{g/mL}$ . Para o anetol, essa resposta apresentou-se significativa a partir da concentração de 120  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 19c) ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Os valores das  $\text{IC}_{50}$  (em  $\mu\text{g/mL}$ ) e o número de experimentos estão mencionados em cada gráfico. O valor da  $\text{IC}_{50}$  referente ao estragol foi significativamente maior que os valores das  $\text{IC}_{50}$  referentes aos outros dois AE ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Os gráficos dos grupos-controle não foram mostrados.

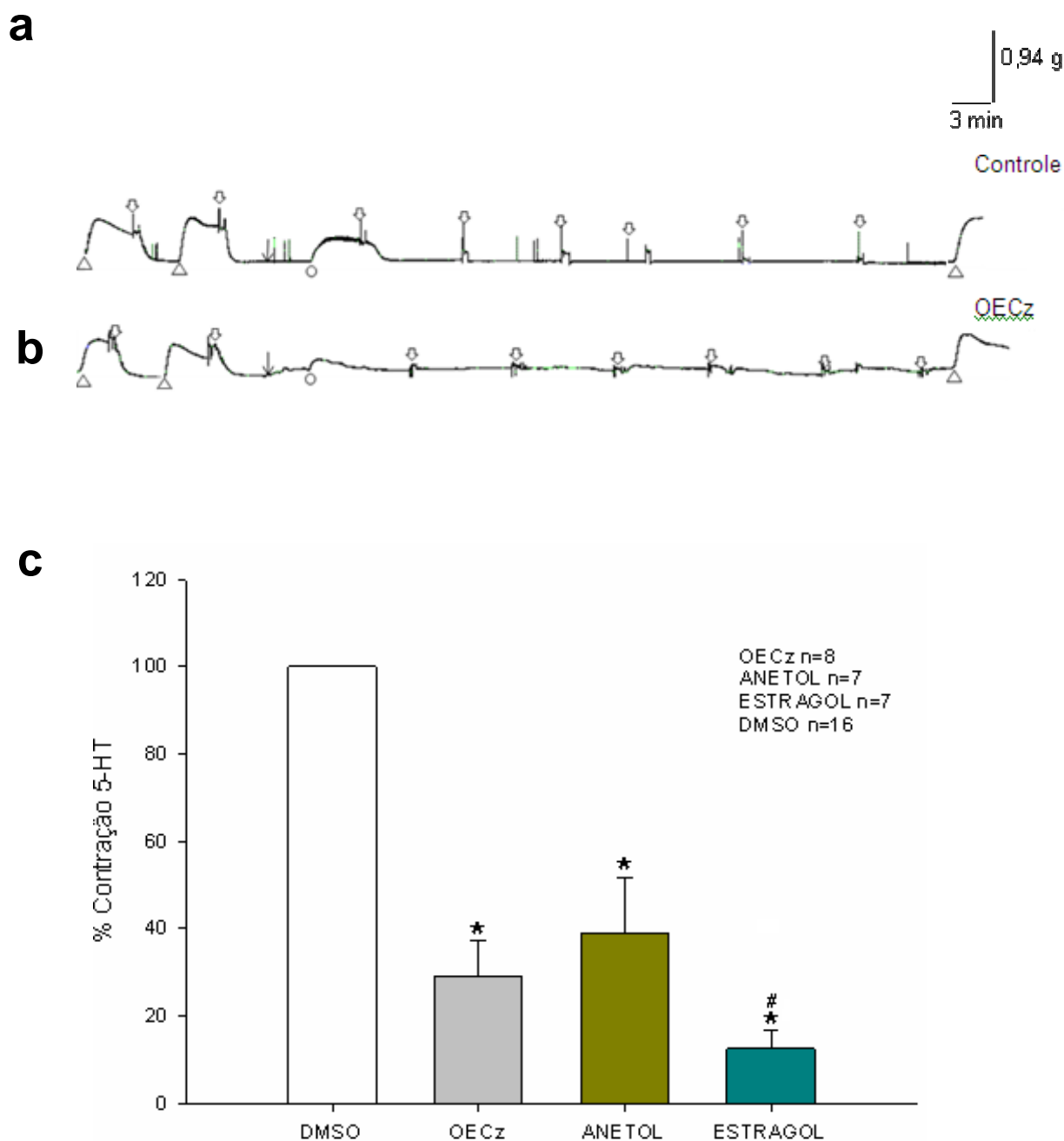


**Figura 19. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal pré-contraído pela presença mantida de K80. a e b** Traçados originais mostrando a reversão da contração do K80 por concentrações crescentes e cumulativas dos AE (**b**). No traçado controle foi representada apenas uma contração inicial com K60 (**a**). △ K60; ▲ K80; ▭ TM. As setas para baixo indicam adição do AE. **c** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais das contrações induzidas por K80 em presença de concentrações crescentes e cumulativas dos AE. Controles não mostrados. \* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle inicial. # Indica diferença significativa das  $IC_{50}$  do OECz e do anetol em relação ao estragol.

#### **5.4 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato na inibição da contração de 10 $\mu$ M de serotonina (5-HT) (Série 4)**

Através desse protocolo pode-se evidenciar a ação do OECz, anetol e estragol como agentes inibidores da ação serotoninérgica como verificado no traçado original (Figura 20b).

A média percentual da contração induzida por 5-HT na presença dos AE foi estatisticamente diferente do controle. Os valores das médias percentuais para a inibição da contração induzida por 10  $\mu$ M de 5-HT para o OECz, anetol e estragol em relação ao controle foram de 28,98%  $\pm$  8,43, 38,79%  $\pm$  12,71 e 12,52%  $\pm$  4,13 respectivamente (Figura 20c) ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Dunn's).



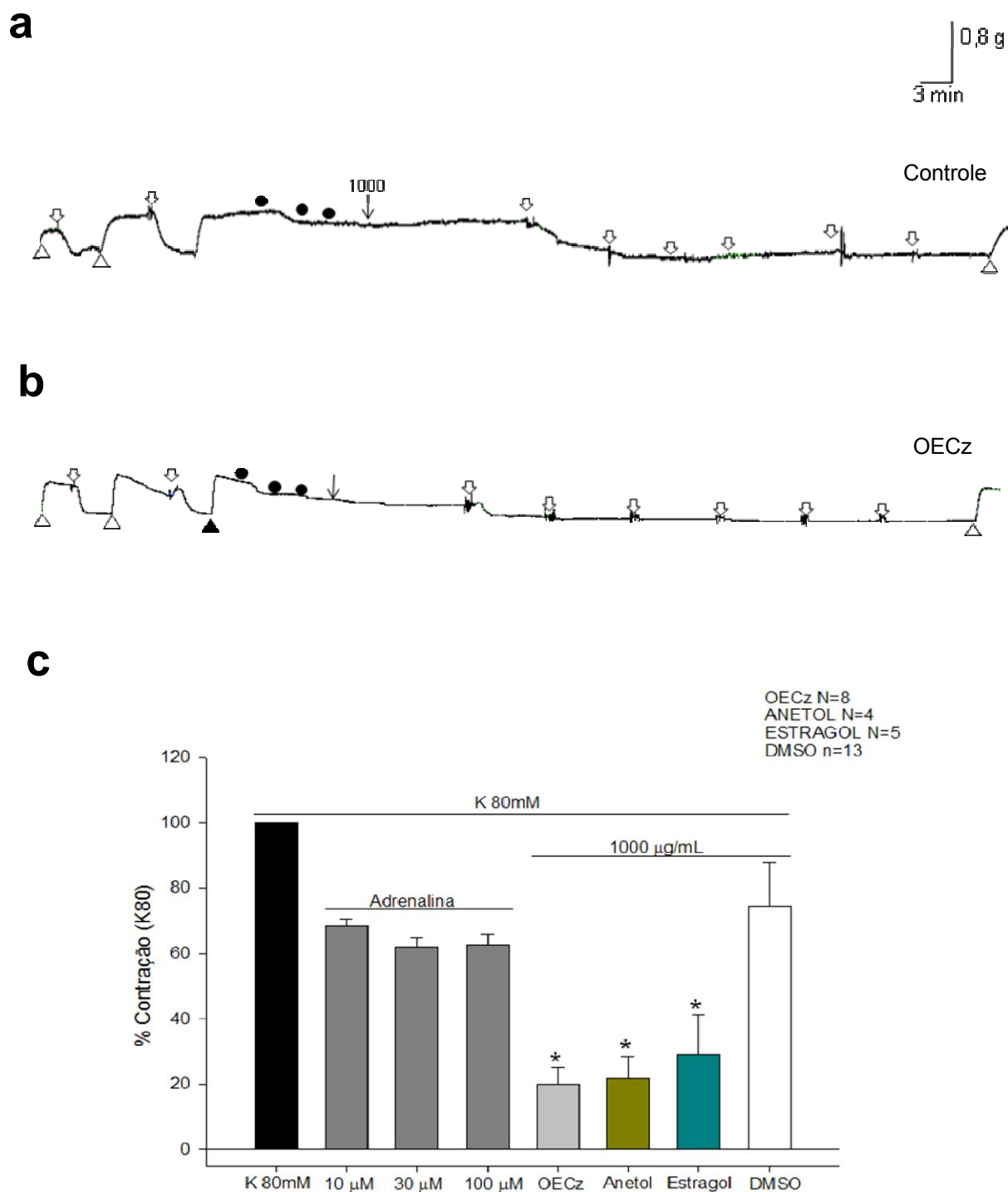
**Figura 20. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato na inibição da contração de 10  $\mu$ M de serotonina (5-HT). a e b** Traçados originais mostrando a inibição da contração do 5-HT por uma concentração única de 1000  $\mu$ g/mL (**b**). No controle (**a**), antes da contração com K60 final, foi atribuída ao banho a 5-HT.  $\Delta$  K60;  $\Downarrow$  TM;  $\circ$  5-HT. As setas para baixo indicam adição do AE ou do veículo. **c** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais das contrações induzidas por 5-HT em presença da concentração única de 1000  $\mu$ g/mL dos AE.

\* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle (DMSO). # Indica diferença significativa do estragol em relação ao anetol.

### **5.5 Participação adrenérgica no efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato (Série 5)**

Após adição de concentrações crescentes e cumulativas de adrenalina (10, 30 e 100  $\mu\text{M}$ ) na fase tônica da contração por K80, visando dessensibilizar os receptores adrenérgicos (Figura 21a e b), verifica-se que o OECz, o anetol e o estragol promoveram relaxamento em médias percentuais de 79,98%, 78,37% e 71,06%, respectivamente ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 21c).

O relaxamento máximo induzido por 100  $\mu\text{M}$  de adrenalina não ultrapassou 38% do valor de estado estacionário da contração potássica. Os AE, porém, induziram relaxamento adicional de 42% (OECz), 41% (anetol) e 33% (estragol).



**Figura 21. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o músculo liso traqueal de rato diante da saturação dos canais receptores adrenérgicos. a e b** Traçados originais mostrando a reversão do platô da contração do K80 após saturação dos canais adrenérgicos. Foi colocado sobre o platô o veículo (**a**) ou o AE (**b**) numa concentração única (1000 µg/mL).  $\Delta$  K60;  $\Downarrow$  TM;  $\blacktriangle$  K80;  $\bullet$  Adrenalina. As setas para baixo indicam adição do AE ou do veículo. **c** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da reversão do K80 em presença da concentração única de 1000 µg/mL dos AE ou do veículo. \* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle (DMSO).

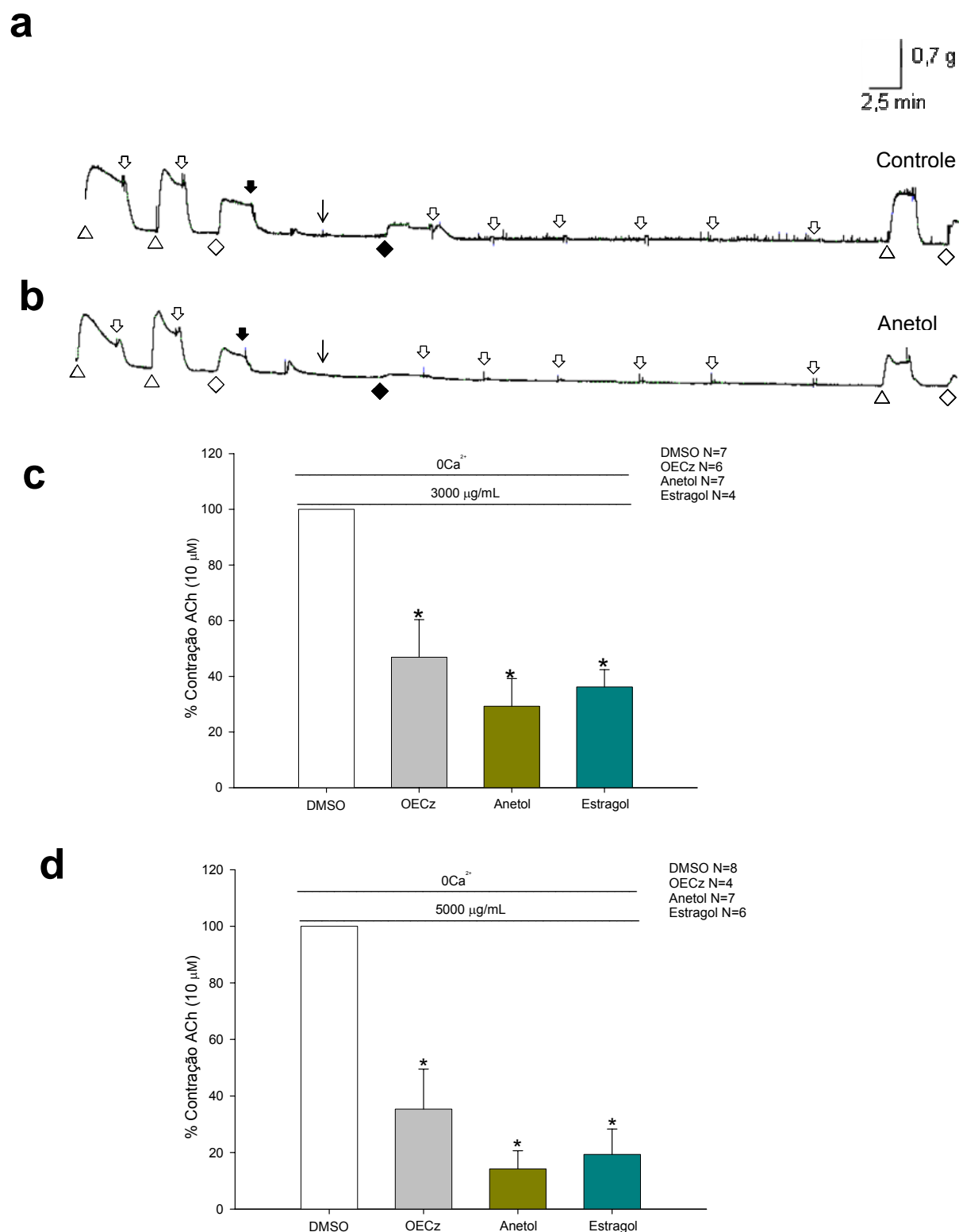
## 5.6 O efeito do OECz, anetol ou estragol no componente contrátil da ACh que independe do $\text{Ca}^{2+}$ extracelular ( $0\text{Ca}^{2+}$ + EGTA 0,2 mM) (Série 6)

Contrações evocadas através do acoplamento farmacomecânico oriundas de estimulações com ACh em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  são comumente reduzidas em relação àquelas obtidas em meio TM, uma vez que o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol mostra-se diminuído ou abolido (Figura 22b).

As médias percentuais da concentração de ACh em  $0\text{Ca}^{2+}$  foram, para OECz, anetol e estragol, respectivamente e em relação ao controle (DMSO), de  $46,90 \pm 13,49\%$ ;  $29,23 \pm 9,96\%$  e  $36,17 \pm 6,25\%$  para a concentração de  $3000 \mu\text{g/mL}$  (Figura 22c) ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak).

Em relação à concentração de  $5000 \mu\text{g/mL}$ , as médias percentuais foram de  $35,34 \pm 14,16\%$  (OECz);  $14,21 \pm 6,40\%$  (anetol) e  $15,82 \pm 12,11\%$  (estragol) ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 22d).

Isso significa uma redução de aproximadamente 53%, 71% e 64% na concentração de  $3000 \mu\text{g/mL}$  e de 65%, 86% e 84% na concentração de  $5000 \mu\text{g/mL}$  para OECz, anetol e estragol, respectivamente em ambos os casos.



**Figura 22. Efeito do OECz, anetol ou estragol no componente contrátil da ACh que independe do Ca<sup>2+</sup> extracelular.** **a e b** Traçados originais mostrando a inibição da contração da ACh em meio 0Ca<sup>2+</sup> na presença do veículo (**a**) ou de 3000 ou 5000 μg/mL (concentração única) do AE (**b**).  $\Delta$  K60;  $\square$  TM;  $\diamond$  ACh em TM;  $\blacktriangledown$  0Ca<sup>2+</sup>;  $\blacklozenge$  ACh em 0Ca<sup>2+</sup>. As setas indicam adição do veículo ou do AE. **c e d** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da inibição do pico da contração da ACh (10 μM) em presença de uma concentração única dos AE (3000 (**c**) ou 5000 (**d**) μg/mL). \* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle (ACh máx). Recuperação não mostrada.



### **5.7 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre a curva de reposição do $\text{Ca}^{2+}$ ou do $\text{Ba}^{2+}$ em meio $0\text{Ca}^{2+}$ com alta concentração de potássio e 0,2 mM de EGTA (Série 7)**

Através desse protocolo, foi possível observar que na presença dos AE (2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a resposta contrátil induzida pela adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio extracelular foi inibir significativamente em relação à curva controle a partir da concentração de 0,3 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , não havendo, no entanto, diferença significativa entre eles ( $p < 0,005$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 23b).

Em relação à curva do  $\text{Ba}^{2+}$ , todos os AE, na concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , inibiram significativamente a resposta contrátil a partir da adição de 1 mM de  $\text{Ba}^{2+}$ . No entanto, na presença do estragol ( $\text{BaCl}_2$  30 mM), essa inibição não apresentou diferença estatística (Figura 23c<sub>3</sub>). O OECz, na concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diferiu tanto do controle quanto da concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com exceção dos pontos da curva onde a adição do  $\text{Ba}^{2+}$  foi de 0,1 e 0,3 mM (Figura 23c<sub>1</sub>). A concentração de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do OECz não promoveu resposta significativa em relação à curva controle.

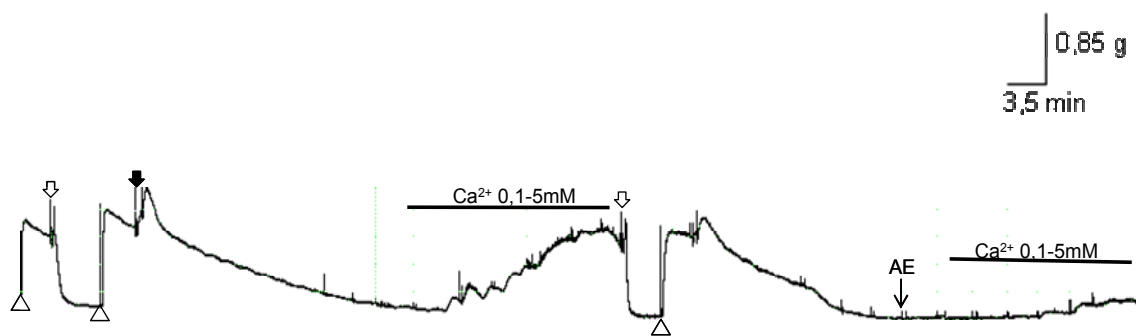
O anetol e o estragol também inibiram significativamente a curva do  $\text{Ba}^{2+}$  nas concentrações de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  desses AE. O anetol, sem diferença estatística entre elas, e o estragol com diferença estatística (1-10 mM) (Figura 23c<sub>2</sub> e c<sub>3</sub>).

A tabela 2 mostra os valores de  $\text{IC}_{50}$  para os AE, com exceção da  $\text{IC}_{50}$  do estragol na concentração de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , a qual não foi possível calcular devido à homocedasticidade não ter sido obedecida.

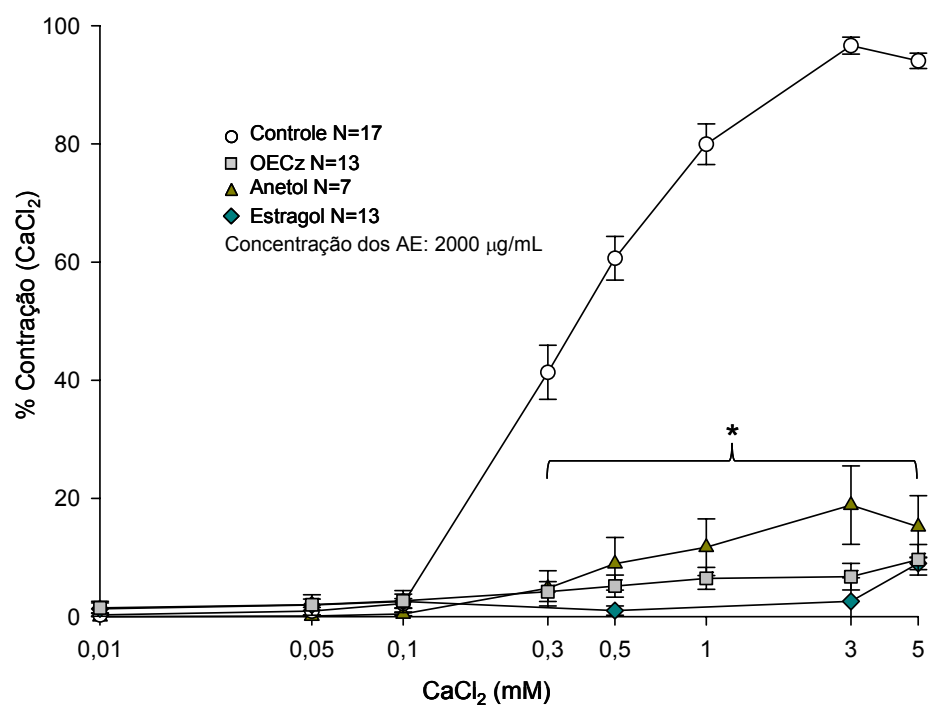
**Tabela 2.** Valores de IC<sub>50</sub> para a inibição da curva do BaCl<sub>2</sub>  
Ver Figura 23c.

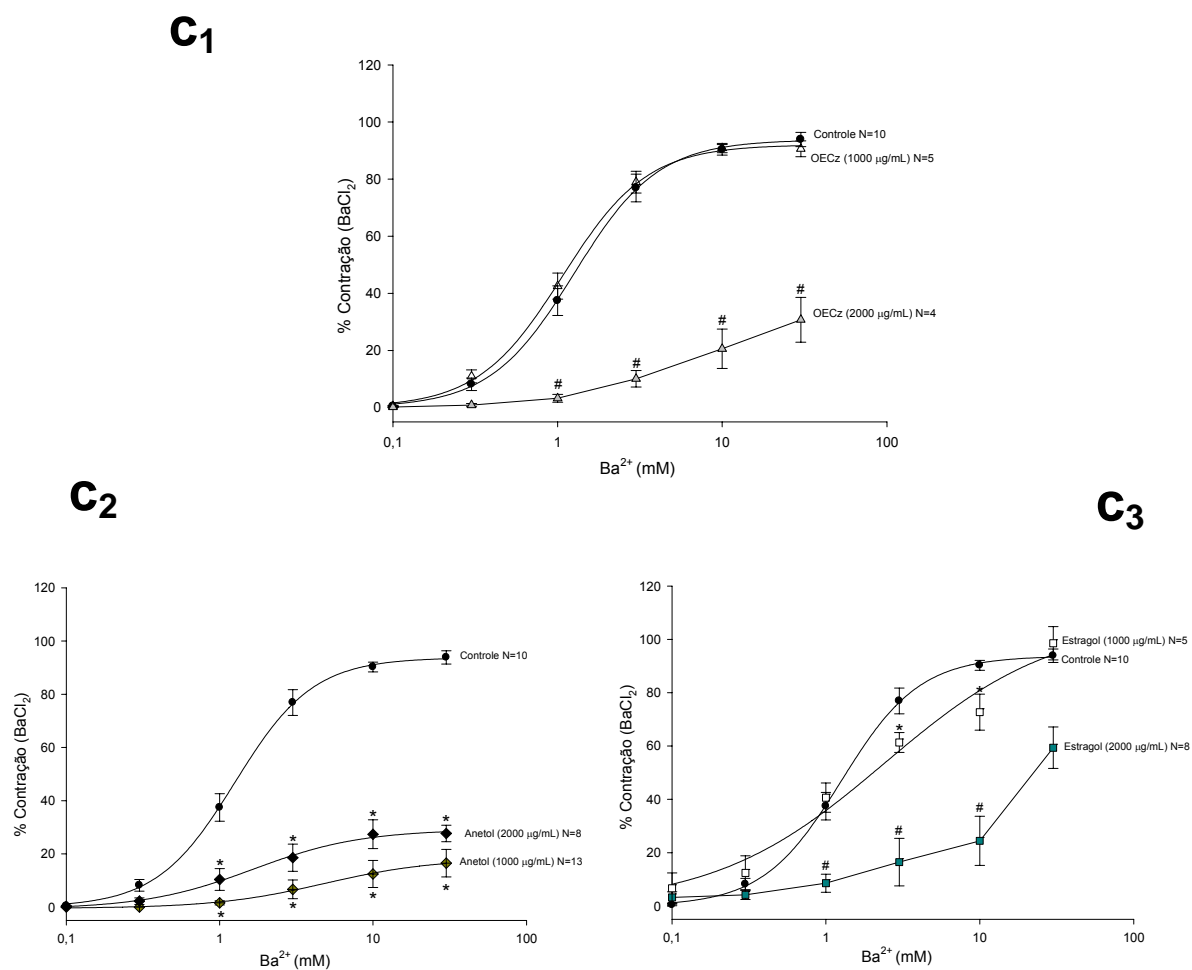
Grupo	Valores de IC <sub>50</sub> (mM de BaCl <sub>2</sub> ) para cada concentração do AE
	1000 µg/mL
OECz	1,07
Anetol	4,82
Estragol	2,42
	2000 µg/mL
OECz	8,74
Anetol	1,65
Estragol	-
DMSO	1,26

a



b





**Figura 23. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre a curva de reposição do  $\text{Ca}^{2+}$  ou do  $\text{Ba}^{2+}$  em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  com alta concentração de potássio e  $0,2\text{ mM}$  de EGTA. a** Traçado original mostrando um exemplo do protocolo da inibição da curva de contração do  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Ba}^{2+}$  em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  na presença do AE.  $\Delta$  K60;  $\nabla$  TM;  $\blacktriangledown$   $0\text{Ca}^{2+}$ . A barra representa adição de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,1-5\text{ mM}$ ). A seta para baixo representa a adição do AE. **b** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da inibição da curva de contração do  $\text{Ca}^{2+}$  na presença do AE ou do veículo. **c<sub>1</sub>, c<sub>2</sub> e c<sub>3</sub>** Gráficos mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da inibição da curva de contração do  $\text{Ba}^{2+}$  em diferentes concentrações dos AE ou veículo. \* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle (curva do  $\text{Ca}^{2+}$  ou do  $\text{Ba}^{2+}$  sem a presença do AE nem de DMSO). # Indica diferença significativa do efeito do AE em relação às duas concentrações testadas ( $1000$  e  $2000\text{ }\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.8 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre ROCCs (Série 8)

Os AE inibiram a contração induzida pela adição de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 – 30 mM), na presença da nifedipina (inibição dos VOCCs) e da ACh (ativação de ROCCs) nas concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 24).

Ambas as curvas, realizadas na presença das concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$  do OECz, diferiram significativamente entre si e em relação ao controle a partir da adição de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Apenas na curva referente à concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$  a adição de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  obteve diferença relevante em relação ao controle. Analisando diferenças estatísticas dentro desta curva, não houve diferença de 0,1- 30 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,005$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 24c<sub>1</sub>).

No que se refere ao anetol nas duas concentrações utilizadas, as curvas também mostraram diferenças significantes em relação ao controle a partir da adição de 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , embora não se tenha observado resultado semelhante quando comparadas entre si. Analisando diferenças estatísticas dentro das curvas, não houve diferença na faixa de concentração de 0,1- 30 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,005$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 24c<sub>2</sub>).

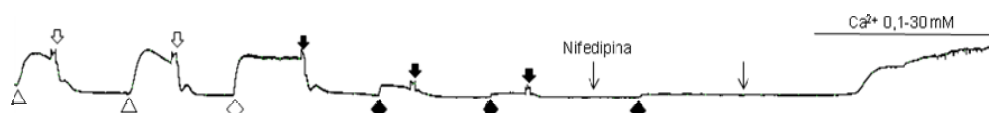
O gráfico correspondente ao estragol mostra que as contrações induzidas nas duas concentrações utilizadas não apresentam diferenças estatísticas entre si, embora isso ocorra em relação à curva controle, a partir da adição de 3 mM de  $\text{CaCl}_2$  (2000  $\mu\text{g/mL}$ ) e 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  (1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Dentro das curvas não houve diferença estatística de 0,1- 30 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,005$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 24c<sub>3</sub>).

**Tabela 3.** Valores de IC<sub>50</sub> para a inibição da curva do CaCl<sub>2</sub> na presença de nifedipina (10 μM) (ROCCs)  
Ver Figura 24c.

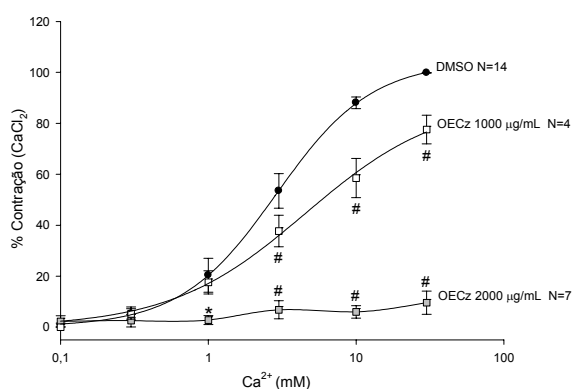
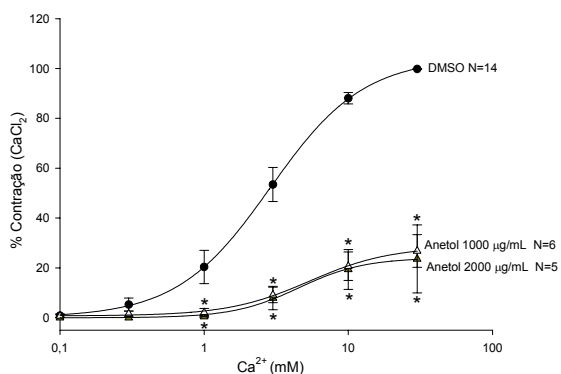
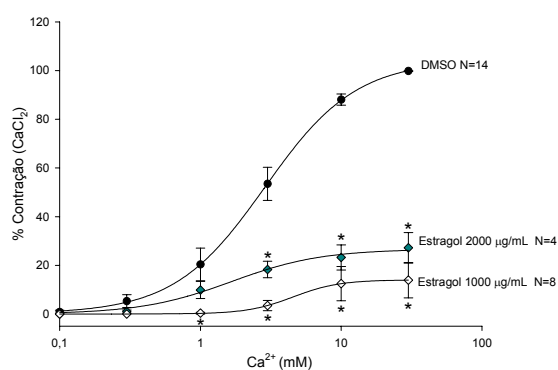
Grupo	Valores de IC <sub>50</sub> para cada concentração do AE
	1000 μg/mL
OECz	4,56
Anetol	1,66
Estragol	5,35
	2000 μg/mL
OECz	-
Anetol	4,55
Estragol	4,54
DMSO	2,88

a

0,55 g  
2,5 min



b

C<sub>1</sub>C<sub>2</sub>C<sub>3</sub>

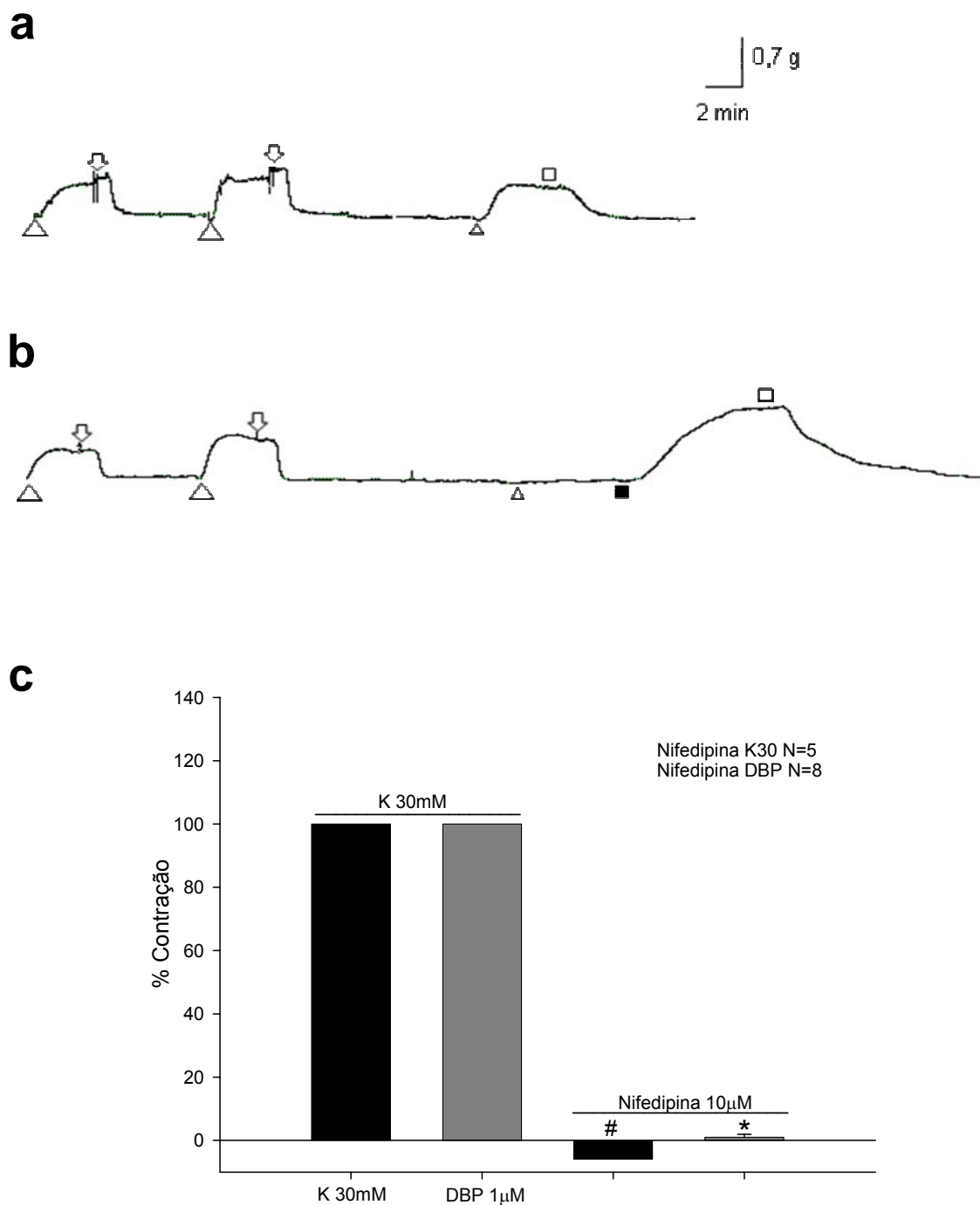
**Figura 24. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre ROCCs.** a e b Traçados originais do protocolo dos ROCCs na presença do veículo (a) e do AE (b).  $\Delta$  K60;  $\nabla$  TM;  $\diamond$  ACh em TM;  $\blacksquare$   $0Ca^{2+}$ ;  $\blacklozenge$  ACh em  $0Ca^{2+}$ . A barra representa adição de  $CaCl_2$  (0,1-5 mM). A seta para baixo posterior à nifedipina indica a adição do AE ou veículo. c Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da inibição da curva de contração do  $Ca^{2+}$  pelas concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$  dos AE.

\* Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle. # Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle e em relação às duas concentrações testadas (1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ).

### **5.9 O efeito da nifedipina (10 $\mu$ M) no platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do éster de forbol (DBP) (1 $\mu$ M) (Série 9)**

Nesse protocolo, a nifedipina, um clássico bloqueador de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes (YAGI, KUWAHARA, e TSUBONE, 2002), foi adicionada ao platô da contração do KCl 30 mM (Figura 25a) e no platô desta contração amplificada pela adição do DBP 1  $\mu$ M (Figura 25b). Os dados mostraram que a nifedipina reverteu ambas as contrações com diferença estatística significativa entre a reversão ocorrida nos dois casos ( $p < 0,001$ , ANOVA, método Holm-Sidak) (Figura 25c).



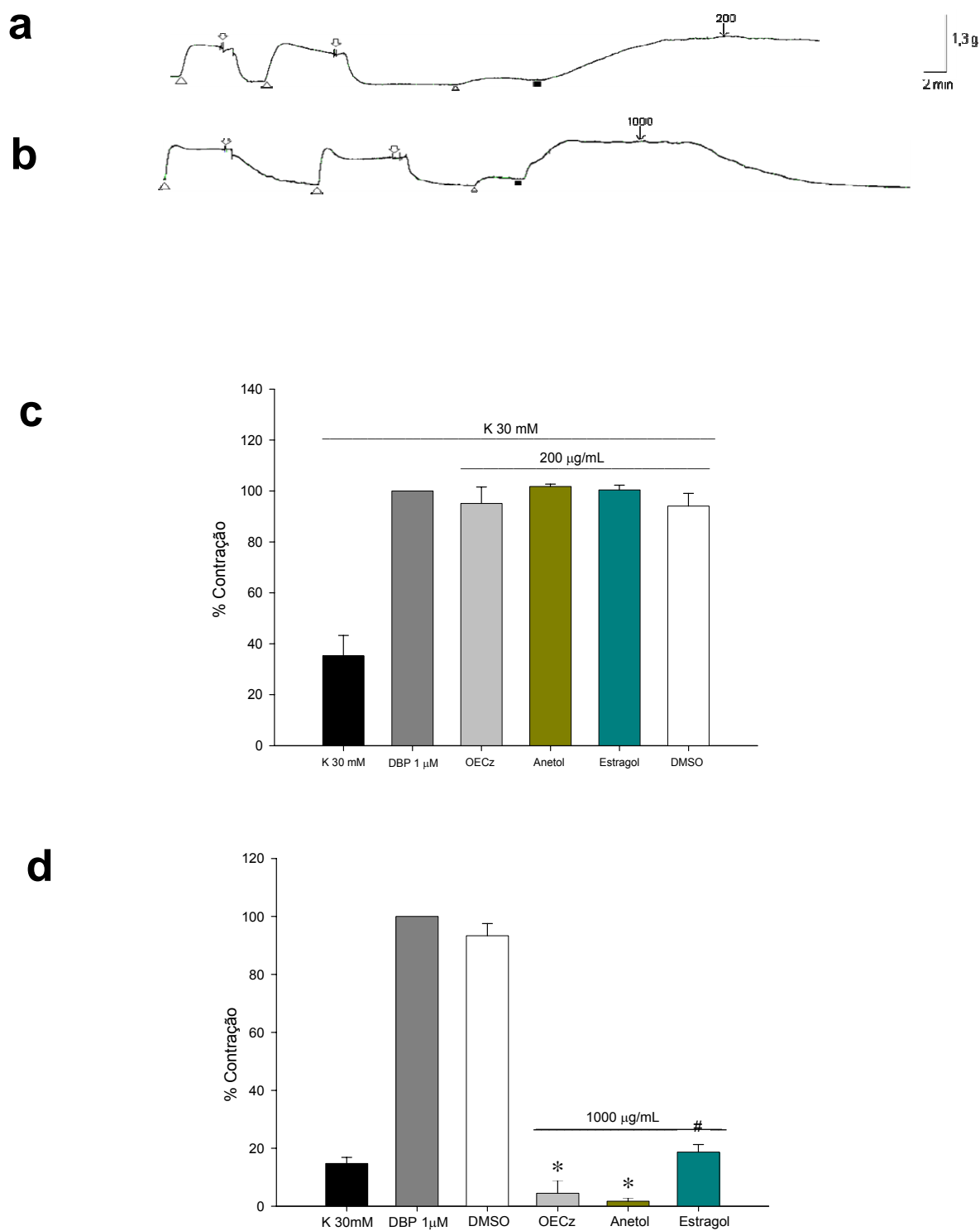


**Figura 25. Efeito da nifedipina (10  $\mu$ M) no platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do éster de forbol (DBP) (1  $\mu$ M).** **a** Traçado original mostrando a reversão da contração do K30 pela nifedipina (10  $\mu$ M). **b** Traçado original mostrando a reversão pela nifedipina da contração do K30 amplificada por DBP.  $\Delta$ K60;  $\Downarrow$ TM;  $\Delta$ K30;  $\square$  Nifedipina (10  $\mu$ M);  $\blacksquare$  DBP (1  $\mu$ M) **c** Gráfico mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da reversão da contração do K<sup>+</sup> por uma concentração única de nifedipina (10  $\mu$ M). \* Indica diferença significativa da nifedipina em relação à amplitude da resposta controle (DPB). # Indica diferença significativa entre a reversão da contração do K30 e a reversão da contração do K30 amplificada por DBP.

### **5.10 O efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do DBP (1 $\mu$ M) (Série 10)**

Os AE foram capazes de reverter o platô da contração causada pelo DBP pré-tratado com K30 numa concentração de 1000  $\mu$ g/mL (Figura 26d), fato que não ocorreu na concentração de 200  $\mu$ g/mL (Figura 26c). Ao se comparar a eficácia dos AE em relação à nifedipina (Figura 26c), apenas o estragol mostrou diferença estatística ( $p < 0,05$ , ANOVA) ao reverter a amplificação induzida pelo DBP em K30.

Estudos demonstraram que a nifedipina reduz apenas parcialmente contrações induzidas por 5-HT em músculo liso da via aérea de rato (TEIXEIRA *et al.*, 2000 e MOURA *et al.*, 2005). Viu-se que os AE, apesar de terem inibido mais de 50% a contração induzida por 5-HT, também não foi de forma completa. O estragol também foi o agente mais potente nessa função com média de  $12,52 \pm 4,13\%$  (Figura 19c).



**Figura 26. Efeito do OECz, anetol ou estragol sobre o platô da contração do KCl (30 mM) amplificada pela adição do DBP (1 µM).** **a e b** Traçado original mostrando a ação nula (**a**) ou eficaz (**b**) do AE sobre a amplificação da resposta pelo DBP em K30.  $\Delta$  K60;  $\nabla$  TM;  $\Delta$  K30;  $\blacksquare$  DBP (1 µM). **c e d** Gráficos mostrando médias  $\pm$  e.p.m dos percentuais da reversão da contração do DBP em K30 por uma concentração única do AE (200 µg/mL (**c**) ou 1000 µg/mL (**d**)). \* Indica diferença significativa dos AE em relação à amplitude das respostas controle (DPB). # Indica diferença significativa do efeito do AE em relação à amplitude da resposta controle e em relação aos demais agentes.

## 6 DISCUSSÃO E HIPÓTESES COMPARATIVAS

**TABELA 4.** Valores gerais de IC<sub>50</sub>

PROTOCOLO	OECz	ANETOL	ESTRAGOL
Inibição K60	151,24 ± 11,36 μg/mL	359,11 ± 32,13 μg/mL	181,01 ± 27,41 μg/mL
Inibição ACh	601,81 ± 135,54 μg/mL	208,61 ± 58,81 μg/mL	279,99 ± 45,69 μg/mL
Reversão K80	157,26 ± 16,32 μg/mL	140,15 ± 5,19 μg/mL	335 ± 13,8 μg/mL
*Inibição curva Ba <sup>2+</sup>	1,07 ± 0,06 mM	4,83 ± 0,86 mM	2,42 ± 1,75 mM
**Inibição curva Ba <sup>2+</sup>	8,74 ± 1,47 mM	1,65 ± 0,28 mM	-
#ROCCs	4,56 ± 1,3 mM	1,66 ± 0,39 mM	5,35 ± 0,51 mM
##ROCCs	Inibição total	4,55 ± 0,07 mM	4,54 ± 0,41 mM

\*Inibição do Ba<sup>2+</sup> 1000 μg/mL / \*\*Inibição do Ba<sup>2+</sup> 2000 μg/mL

# ROCCs 1000 μg/mL / ## ROCCs 2000 μg/mL

Este estudo demonstra que os efeitos do OECz, em relação aos seus constituintes principais anetol e estragol, apresenta semelhanças e diferenças, mostrando que a atividade farmacológica do OECz é apenas parcialmente explicada pelos efeitos desses dois constituintes principais. Porém, de maneira geral, podemos observar que o OECz atua de forma equivalente ao anetol em diversas vias, o que de fato se supunha, uma vez que o anetol é o constituinte majoritário do OECz (Ver Tabela 1).

Estudos realizados mostram propriedades farmacológicas do OECz sobre músculos esqueléticos (ALBUQUERQUE, SORENSON e LEAL-CARDOSO, 1995) e lisos (COELHO-DE-SOUZA, CRIDDLE e LEAL-CARDOSO). Evidenciou-se que esse agente é relativamente específico para íleo e traquéia, apresentando características miorelaxante e antiespasmódica. Entretanto, demonstrou ser um potente relaxante do músculo liso respiratório (COELHO-DE-SOUZA, 1997).

Para realizar análises comparativas, utilizamos parâmetros de potência (IC<sub>50</sub>) e eficácia (efeito máximo) farmacológica.

A avaliação do efeito dos AE sobre as contrações induzidas por 60 mM de KCl e sobre as contrações induzidas por 10  $\mu$ M de ACh, através da comparação das  $IC_{50}$  que foram determinadas, permitiu-nos aquilatar se um efeito antiespasmódico de um dado agente é mais específico para um dado tipo de acoplamento (eletromecânico ou farmacomecânico) bem como da eficácia (efeito máximo) e outros parâmetros importantes do efeito como duração, reversibilidade, etc. Os AE apresentaram efeito antiespasmódico e eficácia tanto para a inibição de efeitos resultantes do acoplamento eletromecânico como do farmacomecânico. No entanto, OECz apontou uma maior especificidade para o acoplamento eletromecânico e anetol para o acoplamento farmacomecânico ao serem comparadas as  $IC_{50}$  da inibição das contrações induzidas por K60 e ACh ( $p < 0,05$ , t-test) (Ver Tabela 4).

O  $Ca^{2+}$  é o estímulo primário para a sensibilização de  $Ca^{2+}$  induzido por KCl e existe uma forte evidência consistente com a hipótese de que a despolarização da membrana, muito mais que o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$ , pode causar essa sensibilização (BOURREAU, 1993; BOURREAU, KWAN e DANIEL, 1993). De um modo geral, a sensibilização de cálcio induzido por KCl inclui múltiplos possíveis mecanismos. No entanto, estudos recentes em músculo liso mostram a ativação dependente de  $Ca^{2+}$  da Rho quinase pela despolarização mantida (SHABIR *et al.*, 2004; RATZ *et al.*, 2005). OECz e anetol são mais potentes que o estragol no que se refere à reversão da contração evocada por altas concentrações de KCl (K80) ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Isso sugere provavelmente uma maior especificidade desses AE em inibir a inativação da MLCP via Rho quinase, se os compararmos com o estragol. Por outro lado, o anetol mostrou-se mais eficaz que o OECz.

Podemos presumir que os AE do presente trabalho atuam tanto de forma a impedir que se estabeleça o acoplamento eletromecânico como de forma a revertê-lo uma vez estabelecido. Ao relaxar o músculo contraído e mantido despolarizado por altas concentrações de  $K^+$ , os potenciais de ação nervosos encontram-se inibidos (HILLE, 1984). Assim, é razoável sugerir o não envolvimento do sistema nervoso no referido efeito antiespasmódico dos AE, ou seja, esse efeito independe de mediação neuronal e, muito provavelmente, é

miogênico. Altas concentrações de  $K^+$  despolarizam a membrana citoplasmática e inativam os canais para  $Na^+$  responsáveis pelo potencial de ação nervoso (GRAFE, MAYER e WOOD, 1980), bloqueando qualquer participação neuronal que envolva a transmissão sináptica e a liberação de neurotransmissores.

Prosseguindo nessa análise, em presença de 80 mM de  $K^+$  extracelular, o potencial de equilíbrio para esse íon se aproxima muito e se mantém junto do potencial transmembrana ( $E_m$ ) (-20 mV) (GRAFE, MAYER e WOOD, 1980). Nessa situação, um ativador de canais para  $K^+$  não induziria relaxamento (QUAST, 1993). Quando um agente relaxa contrações induzidas por 20 e 30 mM de  $K^+$ , sugere-se que o agente possui efeito antiespasmódico agindo como ativador de canais para  $K^+$ , mas se o relaxamento envolve músculo pré-contraído por altas concentrações desse íon ( $\geq 60$  mM), podemos aventar que esse efeito antiespasmódico é independente do  $E_m$  e da ativação de canais para  $K^+$  (repolarização da membrana celular) (KNOT, BRAYDEN e NELSON, 1996). Por essas razões, apresenta-se pouco provável o relaxamento do músculo liso traqueal, induzido por OECz, anetol e estragol, devido a ativação de canais para  $K^+$ .

A 5-HT atua, nas vias aéreas, através de receptores  $M_3$  na membrana plasmática e mobiliza o  $Ca^{2+}$  através de dois componentes: um inicial (fásico), resultante da liberação de  $Ca^{2+}$  do RS através de canais  $IP_3$  (ABDEL-LATIF, 1986; BARON, PRING e COBURN, 1989) e um posterior sustentado (tônico) resultante de um influxo de  $Ca^{2+}$  através dos ROCCs (CUTHBERT *et al.*, 1994). Os agonistas que geram  $IP_3$  são, talvez, a via mais comum para evocar as ondas de  $Ca^{2+}$ . (McCARRON *et al.*, 2004). Em MLVA, embora o  $IP_3$  seja requerido para iniciar as oscilações de  $Ca^{2+}$ , a manutenção parece requerer RyR (SANDERSON *et al.*, 2008). A liberação do  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares induzida por  $IP_3$  tem sido bem documentada e subjacente a este mecanismo, o aumento inicial transitório na  $[Ca^{2+}]_i$  causada por agonistas contráteis em músculo liso das vias aéreas (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991).

A manipulação dessa via de influxo de  $Ca^{2+}$  ativada por receptores pode fornecer meios adicionais de modulação farmacológica do tônus do músculo liso

e pode ter um bom significado para doenças como asma e obstrução crônica das vias aéreas (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991).

Estudos recentes mostram que a contração das células do MLVA é regulamentada pela frequência das oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  (PEREZ-ZOGHBI *et al.*, 2009). Estas oscilações induzidas por 5-HT ocorreram com frequências mais lentas por vias de influxo no músculo liso bronquiolar do que aquelas induzidas por uma concentração igual de ACh, embora a contração em ambos os casos tenha sido similar (PEREZ e SANDERSON, 2005). Da mesma forma, a frequência de oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por 5-HT foi aproximadamente três vezes mais lenta nas células das arteríolas intrapulmonares do que em células do MLVA. Estas diferenças de relações contração-frequência sugerem diferenças na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  no MLVA. No protocolo da 5-HT, um clássico agonista que age na via de receptores para  $\text{IP}_3$  (TAO *et al.*, 2000), o estragol mostrou-se mais eficaz que o anetol, mas não mais eficaz do que o OECz ( $p < 0,05$ , t-test). Esse dado sugere que o estragol parece ter maior especificidade em inibir a ação de agonistas que induzam oscilações de  $\text{Ca}^{2+}$  com frequências mais lentas.

Nossos dados mostram que os AE são mais eficazes que a adrenalina para relaxar preparações de traquéia de rato pré-contraídas por K80 (Figura 20). Assim, é pouco provável que o relaxamento induzido pelos referidos AE seja mediado por liberação de catecolaminas ou por estimulação de receptores adrenérgicos.

A contração induzida pela ACh no músculo liso traqueal é decorrente do aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através da liberação de estoques intracelulares e aumento do influxo a partir do meio externo (BOURREAU, 1993; BOURREAU *et al.*, 1991). Quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é baixa no meio extracelular ( $0\text{Ca}^{2+}$  + EGTA), a resposta contrátil evocada pela aplicação de ACh é dependente da liberação desse íon de estoques intracelulares (BOLTON, 1979; BOURREAU *et al.*, 1991). Diante dos resultados, os AE impedem que o músculo *traquealis* alcance os mesmos níveis de força e conseqüente encurtamento da fibra muscular, alcançados por este agonista na ausência dos

referidos agentes. Em  $0\text{Ca}^{2+}$  a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é reduzida para valores na ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M, invertendo o gradiente de potencial eletroquímico para este íon, que em presença de condições ideais de permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  promoveria um influxo passivo deste íon, independente do tipo de transporte. Dessa forma, a inibição do acoplamento farmacomecânico induzido pelos AE em meio  $0\text{Ca}^{2+}$  e com agente quelante deste íon (EGTA) sugere interferência com mecanismos intracelulares da contração como armazenamento de  $\text{Ca}^{2+}$  por organelas citoplasmáticas, modulação de proteínas contráteis ou sensibilidade dessas proteínas ao  $\text{Ca}^{2+}$  (REMBOLD, 1996).

Em muitos tipos de células de músculo liso, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado por receptor resulta no influxo de outros cátions. No entanto, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado por receptor em músculo liso de vias aéreas em humanos parece não ser por canais inespecíficos (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991). Como os VOCCs em células de MLVA são permeantes ao  $\text{Ba}^{2+}$  (KOTLIKOFF, 1998), foi fundamentado que, se o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por agonista ocorrer através de VOCCs, a via de influxo de  $\text{Ba}^{2+}$  deveria ter características semelhantes (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991). Não podemos excluir a possibilidade do  $\text{Ba}^{2+}$ , que inibe canais para  $\text{K}^+$  (HAGIWARA e BYERLY, 1981), causar despolarização da membrana e uma redução do gradiente eletroquímico para a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991).

No protocolo para avaliar os efeitos dos AE nas contrações induzidas pela adição de  $\text{Ba}^{2+}$  em meio  $0\text{Ca}^{2+}$ , o anetol ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ) mostrou-se mais potente que o OECz e mais eficaz que o OECz e o estragol ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak; t-test). Na concentração de  $2000 \mu\text{g/mL}$ , o anetol foi mais potente que o OECz e ambos foram mais eficazes que o estragol ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak; t-test). Dessa forma, pode-se dizer que OECz e seus principais constituintes inibem VOCCs. Apesar do anetol se mostrar mais potente que o óleo em inibir esses canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes, eles mostraram a mesma potência em reverter uma contração induzida por alta concentração de KCl, o que sugere uma via de sinalização intracelular em comum no mecanismo de ação do óleo e seu principal constituinte, além da inibição dos VOCCs. Uma vez que os AE impediram o estabelecimento do



acoplamento eletromecânico (Figura 17) e o  $Ba^{2+}$  é um íon com seletividade em atravessar a membrana pelos VOCCs, permeando muito pouco os ROCCs (MURRAY e KOTLIKOFF, 1991), a habilidade dos AE de inibirem a contração induzida por adição de  $Ca^{2+}$  ou de  $Ba^{2+}$  em preparações mantidas em altas concentrações de  $K^+$  em meio  $0Ca^{2+}$  corrobora a idéia de inativação de VOCCs.

Quanto ao acoplamento farmacomecânico, analisaram-se os efeitos dos AE no influxo de  $Ca^{2+}$  através dos ROCCs. O anetol (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou ser mais potente do que o óleo e o estragol. Por outro lado, anetol e estragol foram mais eficazes que o OECz na referida concentração ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Na concentração de 2000  $\mu\text{g/mL}$ , o OECz tanto foi mais potente quanto mais eficaz que anetol e estragol em inibir ROCCs ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak; t-test). Esses dados induzem a hipótese de que, em concentrações maiores que 1000  $\mu\text{g/mL}$ , outro (s) constituinte (s) que não o anetol, provavelmente em percentual minoritário na constituição do OECz, participe (m) na promoção desse efeito. Pode-se sugerir que a atividade antiespasmódica dos AE pode ser mediada pela diminuição da entrada do  $Ca^{2+}$  através dos ROCCs

Os ésteres de forbol são diterpenos pentacíclicos ativadores da PKC. Em  $0Ca^{2+}$  induzem, no músculo liso vascular, uma contração que independe totalmente do influxo de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular (REMBOLD, RIPER e CHEN, 1995) e sem um aumento detectado na concentração do  $Ca^{2+}$  citosólico (CHATTERJEE e TEJADA, 1986). Baba, Baron e Coburn (1988), concluíram que o efeito primário do DBP, que aumenta a força de acoplamento eletromecânico durante a contração promovida por carbacol (CCh), envolve aumento no influxo do  $Ca^{2+}$  via VOCCs. No entanto, Itoh *et al.* (1988) relataram que, em artéria coronária de porcos, um maior efeito do DBP está em aumentar a sensibilidade do aparato contrátil ao  $Ca^{2+}$ . Se um dado agente relaxa o anel de aorta pré-contraído pelo  $K^+$  e pelo éster de forbol, sugere-se que esse agente inibe a contração por atuação na PKC ou em algum outro ponto da cascata bioquímica de reações da contração muscular lisa distal à etapa da PKC.

Evidências sugerem que a PKC tem um papel importante na regulação da contratilidade do MLVA (HAKONARSON e GRUNSTEIN, 1998). A maior parte dessas evidências deriva do uso de DBP ativos que ligam diretamente à PKC ativando-a (CASTAGNA *et al.*,1982). A iniciação da contração por DBP em MLVA de humanos, que ativa a PKC, parece ser assegurada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  através de VOCCs. A descoberta da contração por DBP em tecido pré-contraído por KCl foi melhor que a observada em tecidos contraídos pela ACh em estudos de Yang e Black (1996). No entanto, a sensibilidade do espasmo induzido pelo DBP a inibidores de VOCCs, não implica que a fonte de ativação da contração é exclusivamente de origem extracelular (SARRIÁ *et al.*, 2000). Bourreau e colaboradores, em 1993, sugeriram que, em MLVA, agentes espasmogênicos que promovem a liberação de  $Ca^{2+}$  de estoques intracelulares são também sensíveis a inibidores de VOCCs devido ao reabastecimento de estoques intracelulares por entrada do  $Ca^{2+}$  extracelular através desses canais.

No protocolo da reversão do platô da contração de KCl 30 mM potencializada por 1  $\mu$ M de DBP, OECz e anetol mostraram eficácia semelhante à nifedipina (clássico bloqueador de canais para  $Ca^{2+}$  voltagem dependentes) e foram mais eficazes que o estragol ( $p < 0,05$ , ANOVA, método Holm-Sidak). Esse dado enfatiza os achados anteriores no que parece ser o OECz, provavelmente devido ao anetol, um inibidor de VOCC sem exclusão de uma rota na cascata de transdução intracelular, mediado pela PKC, para a contração de músculo liso traqueal. Corroborando este achado, Ahmed, Foster e Small (1985), julgaram que em tecido traqueal numa solução normal de Krebs, a nifedipina, em concentrações similares a 0,001-1  $\mu$ mol  $l^{-1}$ , tem marcada atividade anti-espasmogênica contra a resposta ao KCl e ao TEA. No entanto, tem pouca ou nenhuma atividade anti-espasmogênica contra a resposta da ACh ou da histamina.

Todos esses fatos tomados conjuntamente sugerem, como postulado num relato anterior deste trabalho, que os referidos AE inibem o efeito contraturante de vários agonistas espasmogênicos importantes como KCl, ACh, 5-HT e DBP e relaxam o tônus artificialmente aumentado do músculo liso traqueal de rato *in*

*vitro*, com uma amplitude máxima de relaxamento maior que a induzida pela adrenalina, um clássico agente antiespasmódico do músculo liso respiratório.

## 7 CONCLUSÃO

---

- OECz, anetol e estragol apresentam efeito antiespasmódico, mas não possuem efeitos sobre o tônus espontâneo do músculo liso traqueal de rato.
- De acordo com os resultados da inibição das contrações induzidas por K60, da ACh e da 5-HT, bem como da reversão do K80, é consonante propor que o OECz e o anetol, mas não o estragol sejam mais potentes em inibir o acoplamento eletromecânico do que o farmacomecânico.
- A via de ativação dos  $\beta$ -2-adrenoceptores (clássica via para relaxamento do MLVA) parece não participar do efeito do OECz e seus principais constituintes em músculo liso traqueal de rato.
- OECz, anetol e estragol inibem a via de ativação dos VOCCs de forma similar à nifedipina, um clássico antagonista farmacológico desses canais.
- Outros constituintes, que não os seus majoritários, parecem mediar a potência do OECz em inibir ROCCs (em concentrações maiores que 1000  $\mu\text{g/mL}$ ).
- O mecanismo de ação do OECz, do anetol e do estragol provavelmente se deve a uma etapa da cascata de sinalização que envolve a PKC ou anterior a ela desde que seus efeitos, nessa condição, também tiveram eficácia semelhante à nifedipina.
- Uma vez que, tomados em conjunto todos os resultados, e estes, em sua maioria, apresentaram semelhanças entre o efeito do OECz e do anetol, sugere-se que este constituinte, o componente majoritário do óleo, seja o grande responsável pela ação do OECz no músculo liso de traquéia de rato.

## **REFERÊNCIAS**

---

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. **Pharmacology Review**, v. 38, p. 227-272, 1986.

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

ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. **Food Chemical Toxicology**, v. 39, p. 493-498, 2001.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. **Allured**, p. 455, 2001.

AHMED, F.; FOSTER, R. W.; SMALL, R. C. Some effects of nifedipine in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac**, v. 84, p. 861-869, 1985.

AIDLEY, D. J. **The physiology of excitable cells**. 4 ed. Cambridge: University Press, 1998. p.393-399.

AKATA, T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration and the  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of vascular tone. **J Anesth**, n. 21, v. 2, p. 220-231, 2007.

ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, Anethole, and Estragole in skeletal muscle. **J. Ethno Pharmacol**, v. 49, p.41-49, 1995.

ALBUQUERQUE, A. A. C.; XAVIER-NETO, J.; DINIZ-FILHO, J.; VIANA, G. S. B.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil *Croton zehntneri*, Estragole and Anethole, on nerve and skeletal muscle. **Revista de Medicina da Universidade Federal do Ceará**, v. 24, p.19-27, 1984.

ALBUQUERQUE, A. A. C.; VIANA, G. B. S.; SILVA, E. A. T.; MATOS, F. J. A. Efeitos farmacológicos dos princípios ativos do óleo essencial de *Croton zehntneri* em nervo isolado. **Cient. Cult**, v.33, p.722, 1981.

ALVES-DE-ALMEIDA, M.; **Efeitos do Eugenol sobre o músculo liso traqueal de cobaio**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, 2004.

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

ANDERSEN, K. E. Contact allergy to toothpaste flavors. **Contact Dermatitis**. v. 4, p. 195–198, 1978.

AXELROD, J. Enzymic cleavage of aromatic ethers. **Biochem. J.** v. 63, p. 634-639, 1956.

AZUMA, H.; KONO, M. Estragole (4-allylanisole) is the primary compound in volatiles emitted from the male and female cones of *Cycas revolute*. **J Plant Res**. v. 119, p. 671–676, 2006.

BABA, K.; BARON. C. B.; COBURN, R., F.; Phorbol ester effects on coupling mechanisms during cholinergic contraction of swine tracheal smooth muscle. **Journal of Physiology**, v. 412, p. 23-42, 1988.

BÁRANY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction. S.I: **Academic Press**, 1996.

BARON, C. B.; PRING, M.; COBURN, R. F. Inositol lipid turnover and compartmentation in canine trachealis smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 256, p. 375-383, 1989.

BATATINHA, M. J.; SOUZA-SPINOSA, H.; BERNARDI, M. M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 45, p. 53-7, 1995.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Physiology**. Mosby, 2004.

BERNARDI, M. M.; DE SOUZA-SPINOSA, H.; BATATINHA, M. J. M.; GIORGI, R. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 33, 285-288, 1991.

BEZERRA, M. A. C. ***Alpinia speciosa* Shum: estudo das frações fixas e do óleo essencial**. 1994. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1994.

BEZERRA, M. A. C.; FONTELES, M. C.; MORAIS, S. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* sobre a contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico em traquéia de rato. **Revista de Ciências e Tecnologia**, Fortaleza, v. 3, n. 2, p. 13-18, 2001.

BIGHETTI, E., J.; HIRUMA-LIMA, C., A.; GRACIOSO, J., S.; BRITO, A., R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **J Pharm Pharmacol**, v.51, p.1447-1453, 1999.

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

BOISSIER, J. R.; SIMON, P.; LE BOURHIS, B. Experimental psychotropic action of cis and trans isomers of anethol, **Thérapie**, v.22, p. 309-323, 1967.

BOLTON, T. B. Cholinergic mechanisms on smooth muscle. **British Medical Bulletin.**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1979.

BOURREAU, J. P.; ABELA, A. P.; KWAN, C. Y.; DANIEL, E. E. Acetylcholine  $Ca^{2+}$  store refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 30, n. 261, p. C479-C505, 1991.

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

BOURREAU, J. P.; KWAN, C. Y.; DANIEL, E. E. Distinct pathways to refill ACh-sensitive internal  $Ca^{2+}$  stores in canine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 265, p. C28-C35, 1993.

BURNSTOCK, G. Structure of smooth muscle and its innervation. In: BRANDING, A.; JONES, A. F.; TOMITA, T. **Smooth muscle**, p. 1-69, 1970.

CALDWELL, J.; SUTTON, J. D.; HOWES, A. J. Nutritional modulation of xenobiotic metabolism. **J. Nutr. Biochem.** v. 1, p. 396-409, 1990.

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

CAPEK, A. Phytoncides of anise and fennel. **Prumysl. Potravin**, v. 7, p. 260-262, 1956.

CASTAGNA, M.; TAKAI, Y.; KAIBUCHI, K.; SANO, K.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 7847-7851, 1982.



CATTERALL, W. A. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. **Science**, v.242, p. 50-61, 1988.

CHAINY, G. B.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v.19, p. 2943-2950, 2000.

CHATTERJEE, M.; TEJADA, M. Phorbol ester-induced contraction in chemically skinned vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology**, v. 251, p. 356-361, 1986.

CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia humana de Houssay**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

CLAPHAM, DE; RUNNELS, L. W.; STRÜBING, C. The TRP ion channel family. **Nat Ver Neurosci**, v. 2, p. 387-396, 2001.

COBURN, R. F. Eletromecanical coupling in canine trachealis muscle: acetylcholine contractions. **American Journal of Physiology**, v. 236, p. 177-184, 1979.

COBURN, R. F.; YAMAGUCHI, T. Membrane potential-dependent tension in the canine tracheal muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 201, p. 276-284, 1977.

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.

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

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

CONSENTINO, R. M.; NORTE, M.C.; LAZARINI, C. A Estragole-induced behavioural changes in rats, **Phytotherapy research**, v. 18, p. 921-924, 2004.

COSGE, B.; KIRALAN, M.; GÜRBÜZ, B. Characteristics of fatty acids and essential oil from sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. dulce) and bitter fennel fruits (*F. vulgare* Mill. var. vulgare) growing in Turkey. **Nat Prod Res.**, v. 22, n. 12, p. 1011-1016, 2008.

COTÉ, L.; OLENSON, J. J. Antagonism of anethole and adrenal extract on glycogen formation in adrenalectomized rats. **Fed. Proc**, v. 10, p. 175-176, 1951.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extractions. **Journal of Chemical Education**, v. 53, p. 652, 1976.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de croton. **Cienc. Cult.**, v. 30, p. 326-327, 1978.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc. Cult.**, v.29, p. 445, 1977.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; FONTELES, M. C.; VIANA, G. S. B.; FERNANDES, A. G. Projeto integrado de química e farmacologia: relatório de atividades. S.l., s.n., 1980. p. 227. Mimeografado.

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, CE: Edições UFC, 1981.

CRIMI, E.; MILANESE, M.; PINGFANG, S.; BRUSASCO, V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function. **Sci Total Environ**, v. 270, p. 57-61, 2001.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 620-627, 1994.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, Hypothermic, Myorelaxant and Anticonvulsant Effects of Synthetic Eugenol Derivatives and Natural Analogues. **Pharmacology**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DE ARAUJO, P. F.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; FERREIRA, S. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. **Phytomedicine**, v. 12, p. 482-486, 2005.

DE SIQUEIRA, R. J.; MAGALHÃES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; DUARTE, G. P.; LAHLOU. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci**, v. 11, p. 2365-2372, Apr. 2006.

DE VICENZI, M.; SILANO, M.; MAIALETTI, F.; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, v. 71, p.725-729, 2000.

DOUGLAS, C. R.; **Tratado de fisiologia aplicada à ciência da saúde**. 4. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

DUKE, J. A. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. **CRC Press, Boca Raton, FL**, 1992.

DUVOIX, A.; DELHALLE, S.; BLASIUS, R.; SCHNEKENBUGER, M.; MORCEAU, F.; FOUGERE, M.; HENRY, E.; GALTEAU, M. M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Effect of chemopreventive agents on glutathione S-transferase P1-1 gene expression mechanisms via activating protein 1 and nuclear factor kappaB inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1101-1111, 2004.

EMERICK, J.J.; SNYDER, A. I.; BOWER, N. W.; SNYDER, M. A. Mountain pine beetle attack associated with low levels of 4-allylanisole in ponderosa pine. **Environ Entomol**, v. 37, n. 4, p. 871-875, 2008.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A.; DOS SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHAES, P. J. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Epub**, 2006. **J Ethnopharmacol**, v. 12, p. 515-522, 2007.

FATOPE, M. O.; MARWAH, R. G.; AL HADHRAMI, N. M.; ONIFADE, A. K.; WILLIAMS, J. R. Identification of the chemotypes os *Ocimum forskolei* and *Ocimum basilicum* by NMR spectroscopy. **Chem Biodivers**. v. 5, n. 11, p. 2457-2463, 2008.

FERNANDES, L. R.; ANTUNES, A. S.; **Informações estratégicas sobre plantas medicinais obtidas a partir de bases de dados em linha Mimeo**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2000.

FERNANDES, A. G.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A. Canelas silvestres nordestinas: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos. **Cienc. Cult.**, v.32, p. 26-33, 1971.

FONTENELLE, R. O.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J.; ROCHA, M. F. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **J Appl Microbiol**, v. 104, n.5, p. 1383-90, 2008.

FOSKETT, J. K.; WHITE, C.; CHEUNG, K. H.; MAK, D. O. Inositol trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channels. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 593-658, 2007.

FRANCHOMME, P.; PÉNOËL, D. **Láromathérapie extractment**: enciclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Limoges, France: Nouvelles Éditions Roger Jollois, 1995.

FRANKS, A. Contact allergy to anethole in toothpaste associated with loss of taste. **Contact Dermatitis**. v. 38, p. 354–355, 1998.

FREIRE, R. S.; MORAIS, S. M.; CATUNDA-JUNIOR, F. E.; PINHEIRO, D. C. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorg Med Chem**, v.13, n. 13, p. 4353-4358, 2005.

FRITSCH, P.; DE SAINT-BLANQUAT, G.; DERACHE, R. Gastrointestinal absorption, in the rat, of anisole, trans-anethole butylhydroxyanisole, and safrole. **Food Cosmet. Toxicol.** v. 13, n. 3, p. 359-364, 1975.

FUJITA, K.; FUJITA, T.; KUBO, I. Anethole, a potential antimicrobial synergist, converts a fungistatic dodecanol to a fungicidal agent. **Phytotherapy research**, v.21, p. 47-51, 2007.

FUKATA, Y.; MUTSUKI, A.; KAIBUCHI. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and reorganization of no-muscle cells. **Trends Physiol. Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.

GARCIA-BRAVO, B.; BERNAL, A. P.; GARCIA-HERNANDEZ, M. J.; CAMACHO, F. Occupational contact dermatitis from anethole in food handlers. **Contact Dermatitis**. v. 37, p. 38, 1997.

GERTHOFFER, W. T.; MURPHEY, K. A.; MANGINI, J.; BOMAN, S.; LATTANZIO, F.A. Myosin phosphorylation and calcium in tonic and phasic contraction of colonic smooth muscle. **Am. J. Physiol**, v. 260 (Gastrointestinal Liver Physiol. 23), p. 6958-6964, 1991.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. **Planta Medica**, v. 67, n. 6, p. 564-566, 2001.

GRAFE, P.; MAYER, C. J.; WOOD, D. J. Synaptic modulation of calcium-dependent potassium conductance in myenteric neurons on the guinea-pig. **J. Physiol.**, v. 305, p. 235-248, 1980.

GRUEBNER, I.; KLINGER, W.; ANKERMANN, H. Various substances and substance classes with inducer properties. **II. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** v. 196, n. 2, p. 288-297, 1972.

GUIBERT, C.; DUCRET, T.; SAVINEAU, J. P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Prog Biophys Mol Biol.**, v.98, p. 10-23, 2008.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 413-415.

HAGIWARA, S.; BYERLY, L. Calcium channel. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 4, p. 69-125, 1981.

HAKONARSON, H.; GRUNSTEIN, N. M. Regulation of second messengers associated with airway smooth muscle contraction and relaxation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 158, p. S115–S122, 1998.

HALL, I. P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle. **Eur Respir J**, v. 15, p. 1120-1127, 2000.

HAYES, J. L.; STROM, B. L. 4-Allylanisole as an inhibitor of bark beetle (Coleoptera: Scolytidae) aggregation. **J Econ Entomol**, v. 87, p. 1586–1594, 1994.

HAYES, J. L.; STROM, B. L.; ROTON, L. M.; INGRAM, J. R. L. L. Repellent properties of the host compound 4-allylanisole to the southern pine beetle. **J Chem Ecol**, v. 20, p. 1595–1615, 1994.

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1984.

HOROWITZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of Smooth Muscle Contraction. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 967-992, 1996.

ITOH, T.; KUBOTA, Y.; KURIYAMA, H. Effects of phorbol ester on acetylcholine-induced  $Ca^{2+}$  mobilization and contraction in the porcine coronary artery. **Journal of Physiology**, v. 397, p. 401-419, 1988.

JANSSEN, J.; LUCKE; KILLIAN, K. Airway smooth muscle as a target of asthma therapy: history and new directions. **Respiratory Research**, v. 7, p. 123, 2006.

JOHNSON, L. R. **Fundamentos de fisiologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2000. p. 212 – 214.

JOSEPH, G. R.; KELSEY, G.; PECK, R. W.; NIWA, C. G. Response of some scolytids and their predators to ethanol and 4-allylanisole in pine forests of Central Oregon. **J Chem Ecol**, v. 27, p. 697–715, 2001.

JUDE, J. A.; WYLAM, M. E.; WALSETH, T. F.; KANNAN, M. S. Calcium signaling in airway smooth muscle. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, p. 15-22, 2008.

KALEDIN, V. I.; VASIL'EVA, E. D.; IL'NITSKAIA, S. I.; MOROZKOVA, T. S.; AMSTISLAVSKAIA, T. G. Influence of age and sex on hepatotoxic and hypothermic effects of estrogole in mice. **Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova**, v. 93, n. 8, p. 844-851, 2007.

KLAYMAN, D. L. Qinghoosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science**, v.228, p. 1049-1055, 1985.

KNOT, H.; BRAYDEN, J.; NELSON, M. Calcium channels and potassium channels, In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York: Academic Press, p. 203-219, 1996.

KNOT, H. J.; ZIMMERMANN, P. A.; NELSON, M. T. Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. **J Physiol**, v.15, n. 492 (Pt 2), p. 419-30, 1996.

KNUDSEN, J. T.; TOLLSTEN, L.; BERGSTRÖM, L. G. Floral scents—a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry** v. 33, p. 253–280, 1993.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: Role of the Autonomic Nervous System. **Planta Médica**, v. 65, n. 6, p.553-557, 1999.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an act upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Medica**, Alemanha, v. 66, n. 2, p. 138-143, 2000.



LAMPMAN, R. L.; METCALF, R. L.; ANDERSEN, J. F. Semiochemical attractants of *Diabrotica undecimpunctata howardi* barber, southern corn rootworm, and *Diabrotica virgifera virgifera* leconte, the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **J Chem Ecol**, v. 13, p. 959–975, 1987.

LAMPMAN, R. L.; METCALF, R. L. The comparative response of *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) to volatile attractants. **Environ Entomol**, v. 17, p. 644–648, 1988.

LANCE, D. R. Factors affecting capture of corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) at traps baited with nonpheromonal attractants. **Environ Entomol**, v. 19, p. 882–889, 1990.

LANCE, D. R.; ELLIOTT, N. C. Seasonal responses of corn rootworm beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) to non-pheromonal attractants. **J Entomol Sci**, v. 26, p. 188–196, 1991.

LE BOURHIS, B. Identification of a few metabolites of trans anethole in man, the rabbit, and the rat. **Ann. Pharm. Fr.** v. 28, n. 5, p. 355-361, 1970.

LE BOURHIS, B.; SOENEN, A. M. Recherches sur l'action psychotrope de quelques substancias aromatiques utiliseés en alimentation. **Food Cosmet. Toxicol**, v. 11, p. 1-9, 1973.

LE BOURHIS, B. Biological properties of trans-anethole. An attempt to determine an acceptable daily dosage, **Parfums, Cosmet. Savons. Fr.** v. 3, n. 8-9, p. 450-456, 1973.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SOUZA, I. T.; FIGUEIREDO, I. M. B. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Archives internationals de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. 327, p.113-124, 1994.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An Ac Bras Cienc**, v. 71, n. 2, p. 207-13, 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H.; MATOS-BRITO, B. G.; LOPES-JUNIOR, J. E.; VIANA-CARDOSO, K. V.; SAMPAIO-FREITAS, A. B.; BRASIL, R. O.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; ALBUQUERQUE, A. A. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1193-8, 2004.

LEUNG, A. Y., FOSTER, S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics, 2. ed. Wiley, New York, 1996.

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. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 12, p. 1158-1163, 2006.

LIMA, C. C.; CRIDDLE, D. N.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MONTE, F. J. Q.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta Med**, v. 66, n.5, p. 408-411, 2000.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. F. Effect of stalk and leaf extracts from euphorbiaceae species on *aedes aegypti* (diptera, culicidae) larvae. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**. v. 48, n. 4, p.211-14, 2006.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; RAQUEL, A. T.; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius*, and its constituents cineole, methyl-eugenol and therpineol. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 172-177, 1998.

MANI, R. S.; KAY, C. M. **Calcium binding proteins**. In: Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego: Academic Press, 1996.

MARCUS, C.; LICHTENSTEIN, E. P. Biologically active components of anise: Toxicity and interactions with insecticides in insects. **J. Agric. Food Chem**, v. 27, p. 1217-1223, 1979.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1998. p. 24-28.

MATOS, M. J. A.; FERNANDES, A. Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste 1975-1978. Convênio BNB- CNPq-UFC, Mimeografados, 1978.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O. **Farmacologia**: curso teórico-prático. Fortaleza: Edições UFC, 1989.

McCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MACMILLAN, D.; CHALMERS, S.; MUIR, T. C. The sarcoplasmic reticulum,  $Ca^{2+}$  trapping, and wave mechanisms in smooth muscle. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 138-147, 2004.

McKINLEY, M.; O'LOUGHLIN, V. D. **Human Anatomy**, Boston: McGraw-Hill Higher Education, 2006, p.755-756.

MENDONÇA, V. L. M.; OLIVEIRA, C. L. A.; CRAVEIRO, A. A.; RAO, V. S.; FONTENES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p.93-97, 1991.

MENEZES, A. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; RAO, V. S.; MATOS, M. E. O. Antiinflammatory activity of the essential oil of *Vanillosperma arborea*. **Fitoterapia**, v. 3, p. 252-254, 1990.

METCALF, R. L.; LAMPMAN, R. L. Estragole analogues as attractants for corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). **J Econ Entomol**, v. 82, p. 123–129, 1989.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.; BERTINI, L. M.; OLIVEIRA, C. L.; RODRIGUES, J. R.; LEAL-CARDOSO, J. H. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian Croton species against *Aedes aegypti* L. **J Am Mosq Control Assoc**, v. 22, n. 1, p. 161-164, 2006a.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JUNIOR, F. E. A. C.; DA SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, 2006b.

MOREIRA, M. R.; CRUZ, G. M.; LOPES, M. S.; ALBUQUERQUE, A. A.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 10, p.1337-1340, 2001.

MOSS, R.; HOFMANN, P. Cellular and molecular basis of muscle contraction. In: **Fundamentals of medical cell biology**. JAI Press, v. 5b, p. 185-273, 1992.

MOTOKI, Y.; FUJITA, S.; FUJIHARA, Y.; OKADA, Y.; NOMURA, M. skin whitening effects os estragole derivatives. **Journal of Oleo Science**, v. 52, p. 495-498, 2003.

MOURA, C. T. M.; BEZERRA, F. C.; MORAES, I. M.; MAGALHÃES, P. J. C.; CAPAZ, F. R. Increased responsiveness to 5-hydroxytryptamine after antigenic challenge is inhibited by nifedipine and niflumic acid on rat trachea in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 1119-1123, 2005.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cels. **Journal of Physiology**, v. 435, p. 123-144, 1991.

NEWBERNE, P.; SMITH, R. L.; DOULL, J.; GOODMAN, J. L.; MUNRO, I. C.; PORTOGHESE, P. S.; WAGNER, B. M.; WEIL, C. S.; WOODS, L. A.; ADAMS, T. B.; LUCAS, C. D.; FORD, R. A. The FEMA GRAS assessment of trans-anethole used as a flavouring substance. Flavour and extract manufacture's association. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 789-811, 1999.

NEWMAN, J. D.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NIIRO, N.; IKEBE, M. zipper-interacting protein kinase induces  $Ca^{2+}$  free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 29567-29574, 2001.

NIXON, G. F.; MIGNERY, G. A.; SOMLYO, A. V. Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. **J. Muscle Res. Cell. Motil**, v.15, p. 682-700, 1994.

OLIVEIRA, A. C. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiedematogênica do óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. vell aff.** 2001a. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará, 2001.

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

OLIVEIRA, H. D.; HOLANDA, F. R.; PONTE, E. L.; EVANGELISTA, G. L.; CARVALHO, M. A. S.; SANTOS, C. F.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; OLIVEIRA, A. C.; LEALCARDOSO, J. H. Toxicidade aguda e sub-aguda do óleo essencial de *Croton zehntneri* em camundongos. **Ciências e tecnologia**, Fortaleza/CE, v. 6, n. 2, p. 11-21, 2004.

OLOIZIA, B.; PAUL, R. J.  $\text{Ca}^{2+}$  clearance and contractility in vascular smooth muscle evidence from gene-altered murine model. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, p-347-362, 2008.

PAIVA, L. A.; RAO, V. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol**. v. 62, n. 1, p. 73-8, 1998.

PALMEIRA-JÚNIOR, S. F.; ALVES, V. L.; MOURA, F. S.; VIEIRA, L. F. A. CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas e caule do *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 397-402, 2006.

PAVLOVA, O. O.; SAHACH, V. F.; SOLOVIOV, A. I. Effect of inhibiting protein kinase C on calcium sensitivity of contractile apparatus of vascular smooth muscle during vasospasms of different origins. **Fiziol Zh**, v. 49, p. 31-37, 2003.

PENN, R. B.; BENOVIC, J. L. Regulation of heterotrimeric G protein signaling in airway smooth muscle. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, p. 47-57, 2008.

PERCY, W. H. In vitro techniques for the study of gastrointestinal motility. In: **Handbook of Methods in Gastrointestinal Pharmacology**. Ed. TS Gaginella. New York: CRC Press, 1996, p. 189-224.

PEREZ, J. F.; SANDERSON, M. J. The frequency of calcium oscillations induced by 5-HT, ACH, and KCl determine the contraction of smooth muscle cells of intrapulmonary bronchioles. **J Gen Physiol**, v. 125, p. 535-553, 2005.

PEREZ-ZOGHBI, J. F.; KARNER, C.; ITO, S.; SHEPHERD, M.; ALRASHDAN, Y.; SANDERSON, M. J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 22, p. 388-397, 2009.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. de A. **Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas**, 2002. p. 45-61.

POLZIN, G. M.; STANFILL, S. B.; BROWN, C. R.; ASHLEY, D. L.; WATSON, C. H. Determination of eugenol, anethole, and coumarin in the mainstream cigarette smoke of Indonesian clove cigarettes. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 1948–1953, 2007.

POON, T. S. C.; FREEMAN, S. Cheilitis caused by contact allergy to anethole in spearmint flavoured toothpaste. **Australasian Journal of Dermatology**. v. 47, p. 300–301, 2006.

PRUDENTE, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atouman from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum). **J. Essent. Oil. Res.**, v. 5, p.255-264, 1993.

PUTNEY, J. W. Jr. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry. **Cell calcium**, v. 21, p. 257-261, 1997.

QUAST, U. Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channel? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 141, p. 332-337, 1993.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RAPPAPORT, N. G.; STEIN, J. D.; DEL RIO MORA, A. A.; DEBARR, G.; DE GROOT, P.; MORI, S. Responses of *Conophthorus* spp. (Coleoptera: Scolytidae) to behavioral chemicals in field trials: a transcontinental perspective. **Can Entomol**, v. 132, p. 925–937, 2000.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **Am. J. Physiol. Cell Physiol**, v. 288, p. C769–C783, 2005.

REMBOLD, C. M.; RIPER, D. A. V; CHEN, X. L. Focal  $[Ca^{2+}]_i$  increases detected by aequorin but not by fura-2 in histamine- and caffeine-stimulated swine carotid artery. **J Physiol**, v. 1, n. 488, p. 549-64, 1995.

REMBOLD, C. M. Eletromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARANY, M. (ed). **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York: Academic Press. 1996, p.227-239.

SAINO, E. L.; KANERVA, L. Contact allergens in toothpaste and a review of their hypersensitivity. **Contact Dermatitis**. v. 33, p. 100–105, 1995.

SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. **Neurogastroenterol Motil**, v. 20, p. 39-53, 2008.

SANDERSON, M. J.; DELMOTTE, P.; BAI, Y.; PEREZ-ZOGBHI, J. F. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by  $Ca^{2+}$  signaling and sensitivity. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, p. 23-31, 2008.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Antiinflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guyanensis*. **Fitoterapia**, v. 1, p. 65-68, 1997.

SARRIÁ, B.; PEDRÓS, C.; GALÁN, G.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J. Effects of phorbol 12, 13-diacetate on human isolate bronchus. **European Journal of Pharmacology**, v. 399, p. 65-73, 2000.

SÁRKÖZI, S.; ALMÁSSY, J.; LUKÁCS, B.; DOBROSI, N.; NAGY, G.; JÓNA, I. Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum  $Ca^{+}$ -ATPase and ryanodine receptor. **J Muscle Res Cell Motil**. v. 28, p. 167–174, 2007.



SETO, T. A.; KEUP, W. Effects of alkylmethoxybenzene and alkylmethylbenzene essentials oils on pentobarbital sleeping-time. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 180, p. 232-240, 1969.

SHABIR, S.; BORISOVA, L.; WRAY, S.; BURDYGA, T. Rho-kinase inhibition and electromechanical coupling in phasic smooth muscle; Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent mechanisms. **J. Physiol.**, v. 560, p. 839–855, 2004.

SHAHAT, A. A.; EL-BAROUTY, G.; HASSAN, R. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDEL-RAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical composition and antimicrobial activities os the essential oil from the seeds of *Enterolobium contortisiliquum* (leguminosae). **J Environ Sci Health B.** v. 43, n. 6, p. 519-525, 2008.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada.** São Paulo: Manole, 2003. p. 370-377.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS. UFSC, 2000. cap. 18.

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

SIQUEIRA, R. J. B.; MAGALHÃES, P. J. C.; 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 Science**, v. 78, p.2365-2372, 2006a.

SIQUEIRA, R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COUTURE, R.; LAHLOU, S. Role of capsaicin-sensitive sensory nerves in mediation of the cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves in anaesthetized rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**,v. 33, n. 3, p. 238-247, 2006b.

SMITH, R. L.; ADAMS, T. B.; DOULL, J.; FERON, V. J.; GOODMAN, J. I.; MARNETT, L. J.; PORTOGHESE, P. S.; WADDELL, W. J.; WAGNER, B. M.; ROGERS, A. E.; CALDWELL, J.; SIPES, I. G. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances — methyl eugenol and estragole. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 851–870, 2002.

SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 57, p. 479-507, 1985.

SOARES, P. M. G.; LIMA, R. F.; PIRES, A. F.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent  $Ca^{2+}$ -channels, **Life Sciences**, v.81, n.13/8, p.1085-93, 2007.

SOUZA, M. P. Erva Doce. **Cadernos de prospecção**. UFB, 2008, v.1, n.1, p. 28-29.

STEPHENS, N. L. Structure of airway smooth muscle. In: Asthma: basics mechanisms and clinical management. **Academic Press**, 1988.

STEPHENS, N. L.; LI, W.; WANG, Y.; MA, X. The contractile apparatus of airway smooth muscle. biophysics and biochemistry. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 158, pp. S80-S94, 1998.

TANAKA, Y.; YAMASHITA, Y.; HORINOUCI, T.; KOIKE, K. Adrenaline produces the relaxation of guinea-pig airway smooth muscle primarily through the mediation of beta(2)-adrenoceptors. **J Smooth Muscle Res.**, v. 41, p. 153-161, 2005.

TAKUWA, Y.; TAKUWA, N.; RASMUSSEN, H. Measurement of cytoplasmic free  $Ca^{2+}$  concentration in bovine tracheal smooth muscle using aequorin. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. 817-827, 1987.

TAO, F. C.; TOLLOCZKO, B.; MITCHELL, C. A.; POWELL, W. S.; MARTIN, J. G. Inositol (1,4,5)Triphosphate Metabolism and Enhanced Calcium Mobilization in Airway Smooth Muscle of Hyperresponsive Rats. **Am. J. Respr. Cell Mol. Biol.** v. 23, p. 514-520, 2000.

TEIXEIRA, M. C. L.; TEUSCHER, E. **Pharmazeutische biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

TEIXEIRA, M. C. L.; COELHO, R. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; CRIDLE, D. N. Comparative effects of niflumic acid and nifedipine on 5-hydroxytryptamine-and acetylcholine-induced contraction of the rat trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 394, p. 117-122, 2000.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential oil safety: a guide for health care professionals**. New York, NY: Churehill Livigstone, 1995.

TOGNOLINI, M.; BALLABENI, V.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; IMPICCIATORE, M. BAROCELLI, E. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. **Pharmacological Research**, v. 56, p. 254-260, 2007.

TRENTINI, A. M. M.; TESKE, M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**, 4 ed. Curitiba: Herbarium Lab. Bot., 2001.

TYRODE, M. V. The mode of action of some purgative salts. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v. 20, n.205, 1910.

VAVASOUR, E. J. Trans-Anethole. Proceedings of the safety evaluation of certain food additives, fifty-first meeting of the joint fao/who expert committee of food additives (JECFA). **WHO Food Additives Series**. Geneva, WHO. v. 42, p. 5-32, 1999.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, 2003.

WELLMAN, G. C.; NELSON, M. T. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive ion channels. **Cell Calcium.**, v. 34, p. 211-229, 2003.

WIDDICOMBE, J. H. **Clinics in chest medicine**. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1986. v. 7. p. 189-192.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signaling in smooth muscle. **Cell Calcium.**, v. 38, p. 397-407, 2005.

YAGI, Y.; KUWAHARA, M.; TSUBONE, H.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel blockers induce PKC modulated oscillatory contractions in guinea pig trachea. **Comparative Biochemistry and Physiologi Part C**. v.131, p.: 511-519, 2002.

YAMAKAGE, M.; CHENG, X.; TSUJIGUCHI, N.; KAMADA, Y.; NAMIKI, A. Different inhibitory effects of volatile anesthetics on T- and L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in porcine tracheal and bronchial smooth muscle. **Anesthesiology**, v. 94, p. 683-693, 2001.

YANG, K. X. F.; BLACK, J. L. Protein kinase C induced changes in human airway smooth muscle tone: the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and Naq transport. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 315, p. 65–71, 1996.

YEA, S. S.; JEONG, H.; CHOI, C. Y.; PARK, K.; OH, S.; SHIN, J.; YUN, C. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF-AT and AP-1. **Toxicology in vitro**, v. 20, p. 1098-1105, 2006.

ZHANG, W.; GUNST, S. J. Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix. Implications for contraction. **Proc Am Thorac Soc**, v. 5, p. 32-39, 2008.

ZONDEK, B.; BERGMANN, E. Phenol methyl ethers as estrogenic agents. **Biochem. J.**, v. 32, p. 641-645, 1938.

# 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](#)