



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**Liza Araujo Aguiar**

*Inibição da contratilidade do músculo liso traqueal  
de ratos por um diterpeno caurano isolado de *Croton  
argyrophylloides*.*

**Fortaleza – Ceará**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**

**Liza Araujo Aguiar**

**INIBIÇÃO DA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL  
DE RATOS POR UM DITERPENÓ CAURANO ISOLADO DE *Croton  
argyrophyloides*.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

**Fortaleza - Ceará**

**2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas**

**Título do Trabalho: INIBIÇÃO DA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS POR UM DITERPENÓ CAURANO ISOLADO DE *Croton argyrophylloides*.**

**AUTORA:** Liza Araujo Aguiar

**Defesa em:** \_\_/\_\_/\_\_

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

José Henrique Leal Cardoso, Prof.Dr.(orientador)  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Walter Araujo Zin, Prof. Dr.(examinador)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Crystianne Calado Lima, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. (examinadora)  
Universidade Estadual do Ceará

---

Andreolina Noronha Coelho de Sousa, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.(suplente)  
Universidade Estadual do Ceará

À minha avó Berenice e minha mãe Regina  
Lúcia, pelo carinho com que me ensinaram a  
viver.

À minha filha Izana por ser a razão da minha  
vida.

Aos meus verdadeiros amigos, irmãos que  
escolhi, por sempre acreditarem e confiarem  
em mim.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter sempre guiado meu caminho e ter colocado pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. José Henrique Leal Cardoso, quem considero como pai científico, pela confiança, paciência, ensinamentos, apoio nas horas difíceis e pelo grande exemplo de dedicação à pesquisa científica.

A todos os meus professores do Mestrado, que contribuíram com a minha formação repassando seus conhecimentos e experiências.

À Professora Dra. Telma Leda G. de Lemos e Dr. Hércio S. Santos pela colaboração e auxílio importantes durante a fase de extração e análise do composto.

À minha mãe Regina e avó Berenice, alicerces da minha vida, pelo amor, carinho e por continuar acreditando nas palavras de uma criança que dizia que quando crescesse queria ser cientista, estamos no caminho. Ao grande amor da minha vida, minha filha Izana pela paciência de ter que ficar muitas vezes sem a mãe e por ser, muitas das vezes, a força para que nunca eu desistisse de meus objetivos. A contribuição de todas vocês é ímpar.

Ao meu namorado Eugênio Pacelli pela atenção e companheirismo, pelo inestimável apoio, paciência, compreensão, incentivo e por me acompanhar pacientemente em experimentos e mais experimentos.

Às amigas Leidiane Pinho, Daiana Cardoso, Ariadna Zambelli, Rebeca Maia e Valeska Torres pela estima e apoio preciosos infindáveis, e por mostrarem que para se alcançar um objetivo, além da determinação, são necessários também solidariedade, união e amizade.

A todos meus amigos do curso de mestrado, pelas horas de estudo e dedicação, e a todos os queridos amigos do Laboratório de Eletrofisiologia, em especial aos amigos Flávio Henrique, Humberto Joca, Karilane Rodrigues, Aldair de França Neto e Rômulo Porto, nossas discussões científicas sempre existirão.

Ao nosso técnico e amigo Pedro Militão pelo auxílio que sempre presta a todos do Laboratório de Eletrofisiologia.

Ao Franck pelos cuidados dispensados aos animais do biotério.

Aos funcionários da Coordenação do Mestrado pelos diversos serviços prestados.

Ao CNPq pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

## RESUMO

---

Diversos diterpenos cauranos isolados de extratos de plantas têm mostrado ação antiespasmódica em diferentes músculos lisos. Nesse estudo, avaliamos os efeitos do *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a-dimetilfenantreno-7,8a carbolactona-1-carboxílico (ATCC), um novo diterpeno caurano recentemente isolado de *Croton argyrophyloides*, em preparações traqueais de ratos. ATCC (2-1000 µg/mL) reduziu o tônus basal dessas preparações traqueais. Em concentrações de 20-600 µg/mL, ATCC reduziu significativamente as contrações induzidas por estimulação de campo elétrico, evocou um relaxamento dependente de concentração em traquéias pré-contraídas com K<sup>+</sup> e inibiu os componentes fásicos e tônicos das contrações induzidas por K<sup>+</sup> e ACh. Ambos os componentes das contrações induzidas por ACh foram bastante reduzidos e ampliados, pelos tratamentos prévios de indometacina (2 µM) e montelukast (10 µM) respectivamente. ATCC (300 µg/mL) reduziu as contrações evocadas por 5-HT e aboliu completamente as contrações evocadas por K<sup>+</sup> em presença de epinefrina. ATCC (100-600 µg/mL) também reduziu significativamente as contrações induzidas por ACh nas preparações traqueais em condições isentas de Ca<sup>2+</sup>. Dessa forma ATCC é capaz de bloquear as contrações que dependem da entrada de cátions divalentes através de VOCCs e ROCCs. ATCC demonstrou maior potência no bloqueio da contração dependente dos VOCCs quando comparado aos ROCCs ou a contração induzida por ACh em meio isento de cálcio. ATCC induziu um relaxamento dependente de concentração das contrações evocadas por dibutirato 12,13 de forbol, no entanto com menor potência farmacológica. Pode-se concluir que TCCA induz um efeito antiespasmódico em preparações traqueais através de vários mecanismos, mas com diferentes potências farmacológicas. Estes mecanismos parecem incluir o bloqueio de VOCCs (com maior potência), ROCCs, bloqueio da liberação de Ca<sup>2+</sup> induzida por o IP<sub>3</sub> do retículo sarcoplasmático (com potência intermediária) e redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca<sup>2+</sup>. Os diversos mecanismos de indução da atividade antiespasmódica de ATCC são modulados de forma importante pelos derivados do ácido araquidônico, mostrando a potencialidade de ATCC como um agente terapêutico para o tratamento de doenças relacionadas com o músculo liso respiratório.

**Palavras-chave:** músculo liso da via aérea; antiespasmódico; diterpeno caurano; acoplamento excitação-contração; *Croton argyrophyloides*; traquéia isolada de rato.



## ABSTRACT

---

Various kaurene diterpenes isolated from plants extracts have shown antispasmodic activity on smooth muscles. Here we assessed the effects of *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinyl)-tetradecahydro-1,4a-dimethylphenanthrene-7,8a-carbolactone-1-carboxylic acid (TCCA), a new ent-kaurene diterpene recently isolated of *Croton argyrophyloides*, on rat tracheal preparations. TCCA (2-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) decreased the preparation's basal tone. At 20-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , it significantly reduced the contractions induced by electrical field stimulation, evoked a concentration-dependent relaxation of tracheal preparations precontracted with  $\text{K}^+$  and inhibited both phasic and tonic components of the  $\text{K}^+$ - and ACh-induced contractions. Both components of ACh-induced contraction were largely reduced and enhanced respectively by indomethacin (2  $\mu\text{M}$ ) and montelukast (10  $\mu\text{M}$ ) pre-treatment. At 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , TCCA reduced the 5-HT-induced contraction and abolished that evoked by  $\text{K}^+$  in presence of epinephrine. TCCA (100-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) also significantly reduced the ACh-induced contractions of tracheal preparations under  $\text{Ca}^{2+}$ -free conditions. TCCA blocked contractions that depended on divalent cation inflow through VOCCs and ROCCs, but was more potent to block VOCC-dependent contraction than ROCCs or contraction induced by ACh in presence of  $\text{Ca}^{2+}$ -free solutions. TCCA evoked a concentration-dependent relaxation of phorbol 12, 13 dibutyrate (1  $\mu\text{M}$ )-induced contraction, but with the smallest pharmacological potency. It is concluded that TCCA induces an antispasmodic effect in tracheal preparation through several mechanisms but with different pharmacological potencies. These mechanisms seems to include blockade of either VOCCs (with greater potency) or ROCCs, blockade of  $\text{IP}_3$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum (with intermediate potency) and reduction of the sensitivity of contractile proteins to  $\text{Ca}^{2+}$ . The multi-mechanism induction of TCCA antispasmodic activity coupled with its important modulation by arachidonic acid derivatives shows TCCA as an agent with therapeutic potentiality for treatment of smooth muscle related respiratory diseases.

**Keywords:** Airway smooth muscle; Antispasmodic; Diterpene kaurene; Excitation-contraction coupling; *Croton argyrophyloides*; Rat isolated trachea.

# SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Produtos naturais.....	18
2.2 Considerações gerais sobre o gênero Croton.....	19
2.3 Propriedades biológicas de espécies de Croton e seus principais constituintes.....	19
2.4 Croton argyrophylloides Muell. Arg.....	21
2.5 Efeitos de produtos naturais sobre músculo liso traqueal.....	22
2.6 Músculo liso.....	24
2.7 Estrutura geral da traquéia.....	25
2.8 Componentes da contração.....	28
2.9 Íons cálcio e seus canais.....	29
2.10 Acoplamento excitação-contração.....	33
2.11 Acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.....	34
2.12 Mecanismo de sensibilização ao cálcio na contração do músculo liso .....	36
2.13 Relaxamento do músculo liso.....	38
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Animais .....	41
4.2 Sais, fármacos e soluções .....	41
4.3 Determinação estrutural do constituinte fixo isolado do extrato etanólico do caule de Croton argyrophylloides.....	42
4.3.1 Caracterização Estrutural de ATCC .....	43
4.4 Protocolo experimental.....	46
4.4.1 Obtenção dos tecidos traqueais .....	46
4.4.2 Teste de Atividade Antioxidante in vitro (Método da varredura do radical livre DDPH).....	54
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>

5.1. Efeitos de ATCC no tônus basal e na resposta contrátil induzida por estimulação de campo elétrico (Série 1 e 2).....	57
5.2 Efeitos de ATCC na resposta da contração sustentada e na inibição da contração induzida por K <sup>+</sup> em traquéia isolada de ratos (Série 3).....	60
5.3 Efeitos de ATCC na inibição das contrações induzidas por ACh e 5-HT em preparações traqueais (Série 4).....	62
5.4 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por ACh (60 µM) em preparações traqueais em meio nutridor 0 Ca <sup>2+</sup> (Série 5).....	66
5.5 Efeitos de ATCC e nifedipina nas contrações induzidas por Ba <sup>2+</sup> em preparações traqueais despolarizadas com K <sup>+</sup> em meio 0 Ca <sup>2+</sup> (Série 6).....	66
5.6 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por Ca <sup>2+</sup> em preparações traqueais pré-tratados com ACh em presença de nifedipina (Série 7).....	68
5.7 Efeitos de ATCC em preparações traqueais pré-contraídas com K <sup>+</sup> em presença de altas concentrações de epinefrina (Série 8).....	70
5.8 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por dibutirato de forbol (1 µM) e K <sup>+</sup> 20 mM em preparações traqueais isoladas (Série 9).....	72
5.9 Atividade antioxidante de ATCC pelo método de captura de radical livre DPPH .....	74
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** – Constituintes presentes nas espécies de *Croton*

**FIGURA 2** – *Croton argyrophyloides* Muell Arg.

**FIGURA 3** – Principais estruturas que compõem a traquéia e sua forma de C

**FIGURA 4** – Vias de sinalização molecular envolvida na contração das células musculares lisas induzidas por agonista.

**FIGURA 5** – Traçado de contração do músculo liso traqueal e seus componentes fásico e tônico.

**FIGURA 6** – Mecanismo de sensibilização ao cálcio e contração no músculo liso.

**FIGURA 07** – Estrutura química de ATCC (ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico).

**FIGURA 08** – Esquema simplificado do equipamento e dos aparelhos utilizados nos experimentos de contratilidade *in vitro*.

**FIGURA 09** – Esquema representativo da série 2. Série que avaliou o efeito do diterpeno no bloqueio da contração induzida por estimulação elétrica.

**FIGURA 10** – Esquema representativo da série 3. Séries que avaliaram a ação do diterpeno na reversão das contrações induzidas por  $K^+$  80 mM

**FIGURA 11** – Esquema representativo da série 4. Série que avaliou o efeito do diterpeno na inibição das contrações induzidas por ACh (10  $\mu$ M).

**FIGURA 12** – Esquema representativo da série 6. Série que avaliou a ação de ATCC sobre as contrações induzidas por ACh 60  $\mu$ M em meio 0  $Ca^{2+}$  com EGTA 0,2 mM.

**FIGURA 13** – Esquema representativo da série 7. Série que avaliou o diterpeno (30, 100 e 300  $\mu$ g/mL) sobre as contrações induzidas por  $Ba^{2+}$ , em meio 0  $Ca^{2+}$ , em preparações traqueais despolarizadas ( $K^+$  60 mM).

**FIGURA 14** – Esquema representativo da série 8. Série que avaliou o efeito do diterpeno na curva concentração resposta ao  $CaCl_2$  em meio 0  $Ca^{2+}$  em contrações induzidas por ACh em presença de nifedipina (10  $\mu$ M)..

**FIGURA 15** – Esquema representativo da série 9. Série que avaliou o efeito do diterpeno sobre a contração induzida e mantida por 80 mM de  $K^+$ , em presença de epinefrina (EPI), em músculo liso traqueal de ratos.

**FIGURA 16** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre o tônus basal em músculo liso traqueal (MLT) de ratos.

**FIGURA 17** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a resposta contrátil induzida por estimulação de campo elétrico em músculo liso traqueal (MLT) de ratos.

**FIGURA 18** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) na contração sustentada e na inibição da contração induzida por  $K^+$ .

**FIGURA 19** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre as contrações induzidas por ACh (10  $\mu$ M) e 5-HT (10  $\mu$ M) em traquéias de ratos

**FIGURA 20** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) (20-100  $\mu$ g/mL) nas contrações induzidas por ACh (10  $\mu$ M) em músculo liso traqueal de ratos em presença de indometacina (2  $\mu$ M) e montelucaste (10  $\mu$ M).

**FIGURA 21** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) nas contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em traquéias de ratos em meio 0  $Ca^{2+}$ .

**FIGURA 22** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) e nifedipina (10  $\mu$ M) nas contrações induzidas por  $Ba^{2+}$  em traquéias despolarizadas com KCl em meio 0  $Ca^{2+}$ .

**FIGURA 23** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) e nas contrações induzidas por  $Ca^{2+}$  em músculo liso traqueal em presença de ACh (10  $\mu$ M) e nifedipina (10  $\mu$ M).

**FIGURA 24** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a contração induzida e mantida por 80 mM de  $K^+$  em presença de epinefrina (EPI).

**FIGURA 25** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a contração induzida e mantida por 20 mM de  $K^+$  e dibutirato de forbol (PDB) 1  $\mu$ M.

**FIGURA 26** – Atividade antioxidante do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) pelo método de captura de radical livre DPPH.

## LISTA DE TABELAS

**TABELA 1** – Índices varredores da atividade antioxidante de ATCC frente ao radical DPPH.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentração de cálcio intracelular
0 Ca <sup>2+</sup>	Solução isenta de cálcio
5 - HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ba <sup>2+</sup>	Íon bário
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CaM	Calmodulina
CCE	Entrada de cálcio capacitativa
CF	Componente fásico
CIC	Liberação de cálcio induzida por cálcio
CIF	Fator de influxo de cálcio
Cl <sup>-</sup>	Íon cloreto
CLM	Cadeia leve de miosina
CT	Componente tônico
DAG	Diacilglicerol
DPH	Diidropiridina
DPPH	1,1 difenil-2-picril-hidrazil
ECE	Estimulação de campo elétrico
EGTA	Ácido etileno-bis (β-amino-etil-éter)N,N,N',N'-tetracético
EPI	Epinefrina
Gd <sup>3+</sup>	Íon gadolínio
GDP	Guanosina di-fosfato
GTP	Guanosina tri-fosfato
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe ou que promove 50% da resposta máxima
IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
IND	Indometacina
IP <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
IP <sub>3</sub> R	Receptores de IP <sub>3</sub>
K <sup>+</sup>	Íon potássio

KCl	Cloreto de potássio
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógenos
Mg <sup>2+</sup>	Íon magnésio
MK	Montelucaste sódico
ML	Músculo liso
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLT	Músculo liso traqueal
MLVA	Músculo liso das vias aéreas
Na <sup>2+</sup>	Íon sódio
Ni <sup>2+</sup>	Íon níquel
NIF	Nifedipina
NSCC	Canais catiônicos não seletivos
PM	Peso molecular
PDB	12,13 dibutirato de forbol
PIP <sub>2</sub>	fosfatidil de inositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROCC	Canais para cálcio operados por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor rianodínico
SAC	Canais ativados por estresse mecânico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOCC	Canais para cálcio operados por estoques
TM	Tyrode modificado
TRP	Receptores de potencial transiente
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
VOCC	Canais para cálcio operados por voltagem



# 1 INTRODUÇÃO

---

O interesse em todo o mundo em torno dos “produtos naturais” tem aumentado bastante durante as últimas décadas, mesmo sem levar em consideração a forte dependência dos medicamentos fitoterápicos pelos centros menos desenvolvidos. Essa dependência não é somente justificada pelo fator econômico, mas geralmente pela transmissão secular das tradições culturais de cada comunidade. O Brasil está entre os países com maior biodiversidade vegetal. Muitas dessas espécies de plantas ainda permanecem desconhecidas nos pontos de vista químico, farmacológico e no que se refere a sua ação no organismo.

Doenças respiratórias como a asma, por exemplo, já afetaram cerca de 300 milhões de indivíduos em todo mundo levam ao óbito cerca de 250 mil pessoas por ano. Estima-se que a prevalência mundial da doença varie de 1 a 18%, dependendo do país estudado (NIH, 2006). O fator fisiopatológico mais importante da asma é a inflamação das vias aéreas, na qual diversas células e elementos celulares exercem importante papel. Essa inflamação está associada à hiperresponsividade das vias, que leva a episódios recorrentes de chiado, dispnéia e tosse. O fluxo aéreo fica limitado e os possíveis mecanismos envolvidos são a contração excessiva da musculatura lisa das vias aéreas, resultado do aumento de volume e/ou contratilidade destas células (BLACK, 2004); desacoplamento da musculatura (MCPARLAND et al., 2003); espessamento da parede da via aérea por edema ou mudanças estruturais amplificando o estreitamento da via aérea, uma vez que a luz apresenta-se diminuída (WANG et al., 2003); e, ainda, nervos sensoriais podem se apresentar sensibilizados pela inflamação, levando à constrição exagerada em resposta aos mais variados estímulos. Entre a variedade de produtos estudados pelos centros de pesquisa para tratamento dessa e de outras doenças estão os compostos obtidos das 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 (LEAL-CARDOSO & FONTELES, 1999; MORAIS *et al.*, 2006)

Muitas plantas do gênero *Croton* têm uso etnofarmacológico comprovado. *Croton argyrophyloides* Muell Arg. conhecido como “marmeleiro prateado” tem comprovadas as atividades: antiedematogênica, antiinflamatória, antinociceptiva e antioxidante. Foi comprovada também ação antiespasmódica do seu óleo essencial em anéis de aorta de ratos, bem como a sua atoxicidade aguda. Partindo desse referencial temos o objetivo de identificar a ação de um derivado caurano (ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a-dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico isolado do extrato hidroalcoólico de *Croton argyrophyloides* no músculo liso traqueal de ratos, avaliando também os possíveis mecanismos adjacentes à sua atuação nesse tipo de tecido muscular. Isso com o intuito futuro de sua utilidade como ferramenta terapêutica para o tratamento de enfermidades respiratórias.

A confirmação com base científica da atividade de uma planta ou de seus metabólitos através de análises experimentais em laboratório tem fundamental valor, para a garantia no emprego seguro dos produtos naturais destas plantas no tratamento de doenças, de acordo com as suas determinadas indicações terapêuticas populares.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 Produtos naturais

A utilização de plantas como medicamento data dos primórdios das grandes civilizações. Sem dúvida os antigos chineses, os indianos e os norte-africanos são provas do engenho do homem na utilização das plantas para o tratamento de uma grande variedade de patologias (PHILLIPSON, 2001). Durante muito tempo produtos de origem mineral, vegetal e animal constituíram-se das únicas fontes de recursos terapêuticos em muitos grupos étnicos (RATES, 2001; MORAIS *et al.*, 2005).

A utilização de plantas medicinais pela população mundial mostrou-se expressiva nos últimos anos. Atualmente, cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva para o alívio de alguma manifestação patológica (WHO, 1991). Entre os anos de 1981 a 2002 entraram, no mercado de todo mundo, aproximadamente 877 novos fármacos, sendo 61% desses medicamentos originados ou baseados em produtos naturais (NEWMAN, 2003).

A biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal como a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (DIAS, 1996). Mais da metade dessas espécies são encontradas nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996).

O Nordeste brasileiro possui uma grande diversidade de plantas aromáticas, que são tradicionalmente usadas pelas comunidades da região (MORAIS *et al.*, 2005). A principal característica dessas plantas é sua adaptação ao clima semi-árido. Por apresentarem propriedades terapêuticas, muitas delas são

tradicionalmente usadas na medicina popular na forma de chás ou infusões para tratar espasmos, diarreia, alergias, inflamações e outros males dos tratos gastrointestinal e respiratório (MATOS, 2000).

## **2.2 Considerações gerais sobre o gênero *Croton***

O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família Euphorbiaceae (PALMEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2006) e compreende cerca de 800 a 1000 espécies de plantas. Têm distribuição neotropical, com poucos representantes paleotropicais (RANDAU *et al.*, 2004). Desse gênero, 650 espécies se encontram na América e 300 ocorrem no Brasil (PALMEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2006).

No nordeste brasileiro, as plantas do gênero *Croton* constituem o grupo vegetal mais numeroso. Agrupam-se nas grandes populações vegetais de marmeleiros e velames da vegetação secundária, principalmente da caatinga (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Os estudos fitoquímicos das plantas desse gênero conduziram ao isolamento de alcalóides (AMARAL & BARNES, 1998; PIETERS *et al.*, 1995; BARBOSA *et al.*, 2007), compostos flavonoídicos, triterpenóides, diterpenóides (SANTOS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2005a; LENCINA *et al.*, 2001), fitoestrógenos (como as lignanas) (PIETERS *et al.*, 1995) e metais (MACARI *et al.*, 2002). As espécies de *Croton*, geralmente, são grandes produtoras de óleo essencial, cuja composição química é rica em monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (CRAVEIRO *et al.*, 1990; LEMOS *et al.*, 1992).

## **2.3 Propriedades biológicas de espécies de *Croton* e seus principais constituintes**

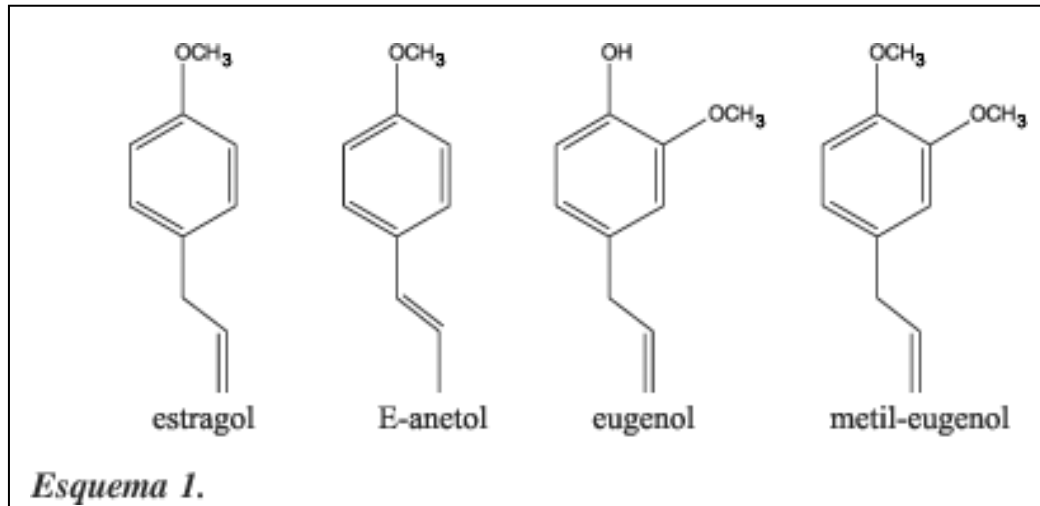
*Croton zehntneri*, *Croton cajucara*, *Croton sonderianus* e *Croton nepetaefolius* estão entre as espécies de *Croton* mais estudadas. Tais estudos foram realizados principalmente para analisar a ação de seus óleos essenciais nos diferentes sistemas biológicos.

A espécie *Croton zehntneri* (canela de cunhã) é usada na medicina popular, através da decocção ou infusão de suas folhas, para o tratamento de anorexia, de distúrbios de ansiedade e de desordens gastrintestinais (SIQUEIRA *et al.* 2006). A prospecção química demonstra que entre seus constituintes majoritários estão: estragol, anetol, eugenol, metil-eugenol e 1,8 cineol (Fig.1) (MORAIS *et al.*, 2006). O óleo essencial de *C. zehntneri* apresentou atividade antiespasmódica em íleo de cobaios (COELHO-DE-SOUZA, 1997; COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998), antinociceptiva em camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2001) e bloqueadora do acoplamento excitação contração em músculo abdominal de sapo (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995).

*Croton cajucara* Benth., conhecido popularmente como sacaca, tem o uso popular de suas cascas e folhas associado aos tratamentos de diabetes, diarreias, desordens gastrintestinais, doenças hepáticas, e tem ação no controle das taxas de colesterol (MACIEL, 2000). Um dos principais constituintes do seu óleo essencial é o linalol. O óleo essencial de *C. cajucara* tem atividade gastroprotetora, antiinflamatória, anti-mutagênica e hipoglicemiante em animais experimentais (HIMURA-LIMA *et al.*, 2000; ROSA *et al.*, 2003).

O óleo essencial de *Croton sonderianus* (marmeleiro preto) tem ação antiespasmódica em músculo liso traqueal de ratos (MENDES-MAIA, 2007) e efeito antinociceptivo em camundongos. Os principais constituintes de seu óleo são:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno, mirceno e  $\gamma$ -elemeno. Os extratos obtidos da raiz de *C. sonderianus* renderam compostos diterpênicos que exibiram atividades antibacterianas e antifúngicas (SANTOS *et al.*, 2005a).

*Croton nepetaefolius* é uma planta aromática endêmica do nordeste brasileiro conhecida pelas comunidades como “marmeleiro sabiá”, “marmeleiro cravo” ou “marmeleiro de cheiro”. É utilizada popularmente como carminativo e para tratamento de problemas gástricos (SANTOS *et al.* 2008). Seu óleo essencial tem como constituintes majoritários 1,8 cineol e cis-cariofileno. Esses compostos apresentaram ação antiespasmódica em preparações de íleo de cobaio, sendo capaz de inibir contrações dependentes e independentes de receptores (MAGALHÃES *et al.*, 2004). Estudos fitoquímicos em extratos dessa planta relataram a presença de terpenóides (VERA *et al.*, 1990).



**FIGURA 1** – Constituintes presentes nas espécies de *Croton*.

#### **2.4 *Croton argyrophyloides* Muell. Arg.**

O *Croton argyrophyloides* Muell Arg. é um arbusto de ramos delgados e cilíndricos. No nordeste brasileiro, é conhecido popularmente como “marmeleiro prateado”, devido à coloração prata na parte dorsal de suas folhas (Fig. 2) (MONTE, 1980).

O óleo essencial *C. argyrophyloides* Muell. Arg. revelou ação antiedematogênica e antinociceptiva em modelos clássicos de dor e inflamação (CANUTO, 2005). Quintino-Farias (2006) descreveu em seus estudos o efeito antiespasmódico desse óleo em anéis de aorta de ratos bem como a sua atoxicidade aguda. Adicionalmente, estudos de Catunda *et al.* (2002), revelaram sua atividade antioxidante.

O óleo essencial de *C. argyrophyloides* tem como principais constituintes: espatulenol,  $\beta$ -cariofileno, alfa-pineno, beta-felandreno, beta-elemeno e 1,8-cineol. Tais constituintes variam sua composição percentual conforme o horário, época da colheita, ou parte da planta pelo qual esse óleo foi extraído (QUINTINO-FARIAS 2006). Os principais constituintes presentes no extrato fixo de *C. argyrophyloides* são os terpenóides (VERA *et al.*, 1990), classe de compostos que possui ações farmacológicas corroboradas.

a)



b)



c)



**FIGURA 2** – *Croton argyrophyloides* Muell Arg. **a)** Parte superior de *C. argyrophyloides* Muell Arg.; **b)** Detalhe da face ventral ou adaxial **c)** Detalhe da face dorsal ou abaxial da folha. A coloração prateada confere ao *C. argyrophyloides* o nome popular “marmeleiro prateado”. Fotos do arquivo pessoal do Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

## 2.5 Efeitos de produtos naturais sobre músculo liso traqueal

As pesquisas com produtos naturais (obtidos de extratos voláteis ou fixos) têm, de maneira geral, tentado caracterizar os mecanismos de ação dos mesmos.

Magalhães *et al.* (2003) investigou a ação do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* em traquéias isoladas de cobaios, e concluiu que esse óleo essencial exerce atividade antiespasmódica nesse tipo de músculo liso por um mecanismo que é provavelmente miogênico e não específico para neurotransmissores e autacóides.

Segundo Leal *et al.* (2003), o extrato hidroalcolólico de *Amburana cearensis* demonstrou efeito antiespasmódico. A substância 5,7,4'-trihidróxi-3-metóxi-flavona, uma flavona isolada desse extrato apresentou efeitos relaxantes no músculo liso traqueal de cobaios em contrações induzidas por carbacol e KCl quando comparada a teofilina. Foi sugerido que o efeito antiespasmódico desse composto é um fenômeno direto e independente do epitélio, resultante de várias ações intracelulares através da via comum de abertura de canais para cálcio e para potássio sensíveis ao ATP (LEAL *et al.*, 2006).

Paulino *et al.* (1996) realizou estudos com o extrato hidroalcolólico dos caules, folhas e raízes (1-3000 µg/mL) de *Phyllanthus urinaria* (quebra-pedra) em traquéias de cobaio. Nesse estudo, foi observado que há o relaxamento gradual do músculo liso traqueal em preparações de tecido com epitélio e sem epitélio em contrações induzidas por carbacol. Esse efeito relaxante provavelmente tenha envolvimento de canais para potássio sensíveis a ATP.

De acordo com Evangelista *et al.* (2007) o óleo essencial de *Pterodon polygalaeflorus* conhecido popularmente como faveiro azul, foi capaz de inibir preferencialmente o acoplamento eletromecânico de contração do músculo liso traqueal.

Baseado em evidências da potencialidade farmacológica dos produtos naturais na musculatura lisa, buscamos nesse trabalho, caracterizar os efeitos e analisar os possíveis mecanismos de ação de um diterpeno caurano isolado de *Croton argyrophylloides* em músculo liso traqueal isolado de ratos. Esse estudo é



pioneiro, pois ainda não há nenhum relato na literatura de seus efeitos em sistemas biológicos.

## 2.6 Músculo liso

O músculo liso, também chamado de músculo visceral, corresponde a apenas 5% da massa muscular total do ser humano (CINGOLANI & HOUSSAY, 2004). Mesmo com esse pequeno percentual, as células musculares lisas que fazem parte das paredes de muitos órgãos, são vitais para diversas funções do organismo, e seu funcionamento anormal contribui para agravar ou desenvolver muitos tipos de doenças (SOMLYO & SOMLYO, 1994; 2000).

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 e 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, comprimento ótimo para geração de força. A contração tanto de vasos quanto das vias aéreas produz aumento da resistência ao acesso de sangue e de ar, mas com pouca influência no comprimento do órgão (BERNE *et al.*, 2004).

A membrana plasmática (sarcolema) no músculo liso representa cerca de 2 a 6% do volume celular é constituída por uma bicamada lipídica com elementos protéicos inseridos. O retículo sarcoplasmático (RS) existe como uma estrutura tubular embora não apresente a organização do retículo encontrado no músculo esquelético. Os filamentos grossos (miosina) e finos (actina) estão organizados em unidades contráteis análogas aos sarcômeros do músculo esquelético. No ML estão presentes estruturas chamadas de corpos densos, que têm função comparável aos discos Z do músculo estriado. Estas estruturas servem para conduzir força mecânica e proporcionar acoplamento entre miofilamentos e o estroma do tecido conjuntivo (BERNE *et al.*, 2004).

A estrutura das células musculares lisas difere em cada órgão quanto as suas dimensões, feixes, camadas, respostas aos estímulos contráteis, características de inervação e função. De acordo com a inervação, o músculo liso

pode ser classificado como multiunitário e unitário e em relação a sua atividade contrátil como músculo tônico ou fásico.

O músculo liso multiunitário possui células que são pouco acopladas, com fibras que podem contrair-se independentemente das outras e são controladas em grande parte por sinais neurais, tendo uma densa inervação dos sistemas simpáticos e parassimpáticos. Esse pode ser encontrado no músculo ciliar dos olhos, brônquios, músculo piloeletor, assim como outras estruturas. O músculo liso unitário se caracteriza pela presença de massa única, que se contrai como um sincício (como uma só unidade). Essas fibras em geral se apresentam agregadas em camadas ou feixes, estando aderidas por suas membranas celulares que contêm múltiplos pontos de adesão. Tais pontos conferem a capacidade de transmitir a força contrátil de uma célula para a célula seguinte. As membranas são acopladas a junções abertas, pelas quais pode ocorrer a livre passagem de íons, de modo que os potenciais de ação ou mesmo o fluxo iônico possa passar por fibras adjacentes. As células do músculo liso da via aérea *in vivo* funcionam como um sincício (BAI *et al.*, 2004; STEVEN & HAI, 2000; CRIMI *et al.*, 2001; MOURA, 2004). Outros tecidos nos quais podem ser encontrados esses tipos de células são: ureteres, artérias de resistência, arteríolas, músculo uterino, trato gastrointestinal entre outros (KNOT *et al.*, 1996).

O músculo liso tônico pode ser identificado por ter mudanças graduais no potencial de membrana em resposta aos estímulos, como ocorre nas vias aéreas e vasos de médio e grande calibre. O músculo liso fásico gera atividades de onda lenta, desenvolve potenciais de ação que conduzem à contração, o que pode ser observado principalmente nos músculos lisos: gastrointestinal, uterino, veia porta e bexiga (GUYTON & HALL, 2002).

## **2.7 Estrutura geral da traquéia**

As vias aéreas podem ser classificadas dependendo da sua localização em superiores e inferiores. As vias aéreas superiores correspondem às fossas nasais, faringe e porção superior da traquéia. As vias aéreas inferiores

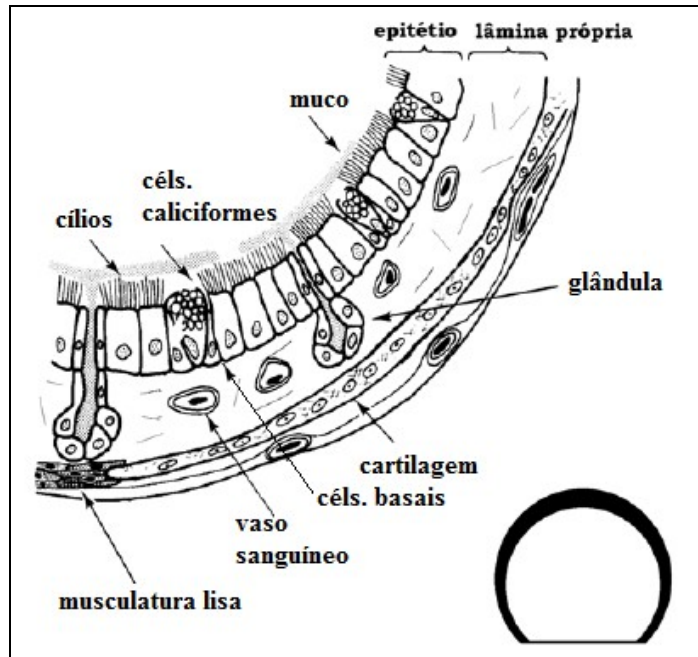
correspondem à porção inferior da traquéia e suas ramificações, brônquios, bronquíolos e alvéolos. O tubo traqueal tem início logo abaixo da laringe e uma de suas funções é a de conduzir o ar até os pulmões aquecendo-o e umidificando-o. A traquéia apresenta duas porções, uma cervical e outra torácica, apresentando como característica um número variável de anéis cartilagosos (variando de 16 a 20) ou semi-anéis cartilagosos sobrepostos em forma de C cujas extremidades livres estão voltadas para a região dorsal (Fig. 3). Esses anéis estão sobrepostos uns sobre os outros através da membrana cricotraqueal.

A região posterior da traquéia se caracteriza por ser composta basicamente de músculo liso. Esse músculo tensiona as bordas das cartilagens e evita com que elas se separem. Tal característica promove uma motilidade da porção posterior. A membrana cricotraqueal reveste a parte externa da traquéia e une os anéis cartilagosos até a carina principal, local onde a traquéia se divide em brônquio principal direito e esquerdo (STEPHENS, 2001; GUNST & TANG, 2000). O músculo liso das vias aéreas (MLVA) está distribuído desde a traquéia até os ductos alveolares. Anatomicamente circunda o lúmen dos brônquios e bronquíolos, sendo este último o sítio de maior proporção de músculo liso na parede, em relação ao diâmetro da luz (AMRANI & PANETTIERI, 2003).

A traquéia tem sido uma fonte conveniente e clássica para estudos bioquímicos e biofísicos dos elementos contráteis do músculo liso, por conseguir simular satisfatoriamente os fenômenos de constrição das vias aéreas. O MLVA de mamíferos controla o diâmetro das vias aéreas e a resistência à passagem do ar. O tônus muscular é controlado por vários sinais externos que são traduzidos em trabalho útil através de proteínas contráteis. Assim como nos músculos esquelético e cardíaco, as células do MLVA contêm miofibrilas constituídas de actina, miosina. Outros componentes (como tropomiosina, caldesmon, calponina, MLCK e fosfatases) são similares ao encontrados em outros músculos lisos (RUSSELL, 1986; GERTHOFFER, 1991).

Os tecidos traqueais e bronquiolares são formados por quatro camadas (do interior para o exterior) (Fig. 3): camada mucosa (que consiste do epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado e uma lâmina própria sobre a qual repousa o epitélio); camada submucosa (estão localizadas as porções secretoras serosas);

camada muscular com peças cartilagosas e camada adventícia. São encontrados principalmente três tipos de células no epitélio traqueobrônquico tais como: células ciliadas, células caliciformes e células basais (FEREZ, 2008).



**FIGURA 3** – Principais estruturas que compõem a traquéia e sua forma de C.

O epitélio das vias aéreas consiste em uma população heterogênea de células que formam junções muito próximas, chegando a impedir o acesso a estruturas subjacentes e age como uma barreira imunológica e física a substâncias irritantes ou microrganismos. Também executa funções diversas, incluindo motilidade ciliar, secreção mucosa e transporte de íons (SPINA, 1998).

As células epiteliais das vias aéreas são capazes de sintetizar, também, uma ampla variedade de substâncias biologicamente ativas de forma que a lesão dessas células pode afetar a responsividade das vias aéreas de várias formas: (1) O epitélio atua como uma barreira fisiológica para difusão, assim ao ocorrer o dano epitelial, alérgenos, irritantes, gases e agonistas atingem com mais facilidade a célula muscular lisa. (2) A camada epitelial protege os neurônios da estimulação por produtos inalados, como os citados anteriormente. Portanto, a camada epitelial ao ser danificada expõe os neurônios sensoriais à ação de irritantes, causando

consequentemente, broncoconstrição reflexa. (3) A camada epitelial tem uma função metabólica. Acetilcolina, histamina e neuropeptídios podem ser sintetizados e/ou metabolizados pelas células epiteliais. Dessa forma, uma disfunção da camada epitelial pode resultar no aumento da concentração de vários agentes contráteis. (4) Finalmente, o epitélio das vias aéreas possui função secretora, ele sintetiza muco, citocinas e quimiocinas e libera fatores relaxantes, como a prostaglandina  $E_2$  e o óxido nítrico (BOUSHEY *et al.*, 1980; STERK & BEL, 1989; FOLKERTS & NIJKAMP, 1998). Desta forma, torna-se evidente o papel ativo do epitélio na resposta a diversos agentes farmacológicos, bem como na modulação da função do músculo liso das vias aéreas em muitas espécies (SPINA, 1998).

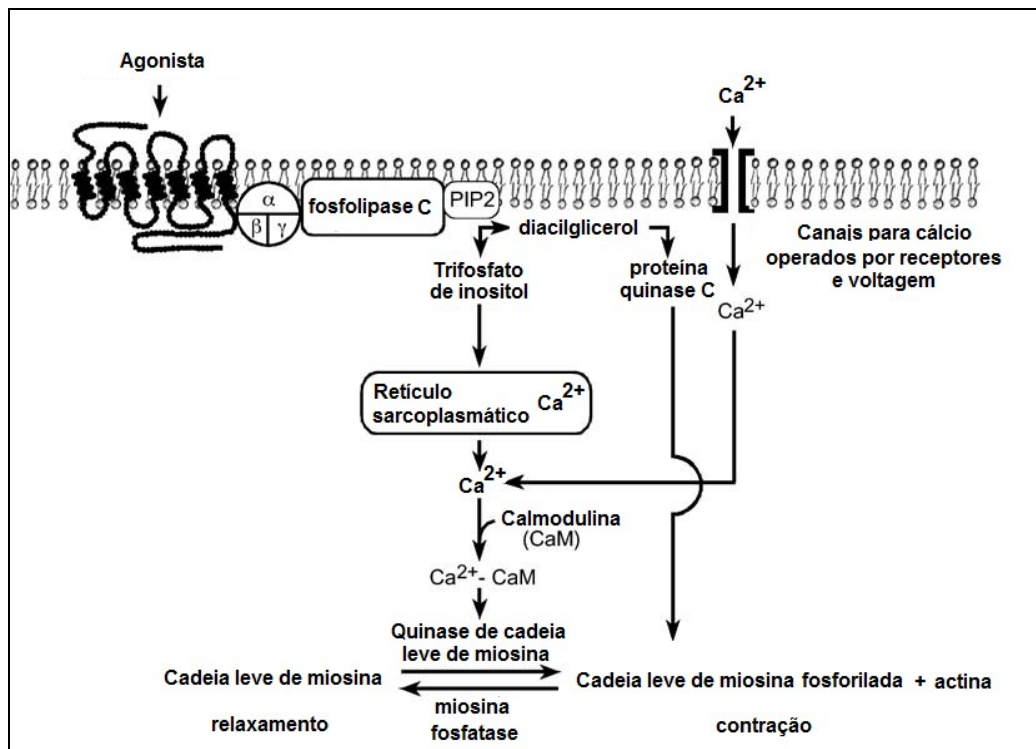
## 2.8 Componentes da contração

As principais proteínas envolvidas no processo de contração muscular lisa são: miosina, actina, caldesmon, calmodulina e tropomiosina. A miosina do músculo liso é semelhante à encontrada no músculo estriado e em outras células não musculares. É um hexâmero composto de duas cadeias pesadas (PM aprox. 200.000) e dois pares de cadeias leves (PM aprox. 20.000). A actina (PM aprox. 43.000) é uma proteína globular monomérica que em forma iônica se encontra polimerizada como um filamento helicoidal duplo. A calmodulina (PM aprox. 16.000) é uma proteína multifuncional ligante de cálcio possuindo 4 sítios ativos, sendo um importante mediador de muitos efeitos regulatórios desse íon em vários sistemas, inclusive na contratilidade do músculo liso. O caldesmon (PM aprox. 140.000) apresenta uma estrutura dimérica que se encontra associada à actina na ausência de cálcio. Na presença desse íon, forma-se o complexo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, que se liga ao caldesmon, deslocando-o da sua ligação com o filamento de actina, expondo, dessa forma, seus sítios de ligação com a miosina. A tropomiosina (PM aprox. 66.000) é uma proteína fibrosa que junto com o caldesmon ocupa os sulcos formados pelos filamentos de actina (PAIVA *et al.*, 2005).

## 2.9 Íons cálcio e seus canais

Os íons cálcio controlam diversas funções celulares, abrangendo respostas de curta duração como a contração muscular e a secreção, como também respostas de longa duração tais como a transcrição, divisão e morte celular (BERRIDGE *et al.*, 2003).

Nos processos contráteis os íons cálcio, quando associados à proteína calmodulina, formam o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ - calmodulina, que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (20KDa - MLCK), permitindo que haja a fosforilação da miosina de cadeia leve, que leva à interação da miosina e da actina, usando como energia a quebra do ATP (SOMLYO *et al.*, 1999). O processo acima descrito só é possível devido ao aumento da concentração de cálcio no citoplasma do músculo liso por meio de canais iônicos presentes na membrana plasmática e retículo sarcoplasmático do músculo liso, que podem ser ativados por despolarização, por estímulos mecânicos ou pela ação de agonistas (Fig. 4).



**FIGURA 4** – Vias de sinalização molecular envolvidas na contração das células musculares lisas induzidas por agonista. A resposta contrátil é iniciada por um rápido e transiente aumento da concentração de cálcio intracelular seguida pela interação cálcio calmodulina para estimular a fosforilação da cadeia leve de miosina (HILGERS & WEEB, 2005).

Os canais para cálcio são classificados de acordo com a condutância, a sensibilidade às drogas, sobretudo, de acordo com a sua cinética de ativação (ERTEL *et al.*, 2000). Os canais específicos para cálcio podem ser operados por voltagem (VOCC) e por receptores de membrana (ROCC). Além desses canais próprios para cálcio, existem canais catiônicos não seletivos permeáveis ao cálcio, que permitem a passagem desses íons. Entre eles temos os canais para cálcio operados por estoque (SOCC) ou entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitiva (CCE) (PUTNEY & RIBEIRO, 2000) e os canais ativados por estresse mecânico que são chamados de SAC. No músculo liso das vias aéreas, segundo Sweeney *et al.* (2002), existem pelo menos três classes de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcolema: VOCCs, ROCCs e SOCCs.

Os canais de cálcio do tipo VOCC são canais ativados pela despolarização por meio de estímulos químicos ou elétricos e os ROCCs por ativação de receptores através de alterações químicas.

Os canais dependentes de voltagem podem pertencer a três famílias, de acordo com suas propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas: canais sensíveis a diidropiridina (DHP) ativados por alta voltagem (tipo-L,  $\text{Ca}_{V1.1}$ ,  $\text{Ca}_{V1.2}$ ,  $\text{Ca}_{V1.3}$ ,  $\text{Ca}_{V1.4}$ ), canais insensíveis à diidropiridina ativados por alta voltagem ( $\text{Ca}_{V2.1}$ ,  $\text{Ca}_{V2.2}$ ,  $\text{Ca}_{V2.3}$ ) e canais ativados por baixa voltagem (tipo-T,  $\text{Ca}_{V3.1}$ ,  $\text{Ca}_{V3.2}$ ,  $\text{Ca}_{V3.3}$ ) (ERTEL *et al.*, 2000).

Os canais do tipo L ou canais sensíveis a DHP, presentes nos músculos esqueléticos e lisos, são canais ativados por um potencial de membrana mais positivo, quando ocorre uma forte despolarização (CATTERALL, 1995), sendo um dos principais responsáveis pela contração muscular tanto no músculo liso quanto no músculo esquelético.

No músculo liso, canais do tipo L podem ser ativados indiretamente pela ação de diversos outros canais que causam despolarização da membrana, como os canais de  $\text{Cl}^-$  dependentes de cálcio, canais catiônicos não seletivos, e possivelmente pelos SOCCs. Os canais de  $\text{Cl}^-$  dependentes de cálcio são ativados pelo cálcio liberado do retículo sarcoplasmático via proteína  $\text{G}/\text{IP}_3\text{R}$ , causando um efluxo de  $\text{Cl}^-$  ativado por  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à despolarização da membrana e ativando com isso os canais para cálcio tipo L (SANDERS, 2008).

Da família dos canais insensíveis a diidropiridina ativados por alta voltagem, fazem parte os canais do tipo P e Q que estão presente no cérebro, neurônio motor e rim, o canal N, que está presente no SNC e SNP e o R presente no cérebro (ERTEL *et al.*, 2000). São canais que são ativados por forte despolarização e estão relacionados principalmente com a liberação de neurotransmissores.

Os canais ativados por baixa voltagem (tipo T) são canais ativados próximos ao potencial de repouso da membrana, sendo rapidamente inativados, estão presentes no sistema nervoso, músculo cardíaco e alguns tipos de músculo liso. Esse tipo de canal provavelmente tem a função de desenvolver a atividade espontânea ou a atividade marca-passo de alguns tipos de músculo liso (FRY *et al.*, 2006).

Os canais do tipo ROCC, englobam os canais operados por ligante, no qual o mais comum é o receptor  $P_{2X}$  ligado ao ATP, e os canais que são abertos por receptores acoplados a proteína G, dentre eles os canais sensíveis ao  $IP_3$  ( $IP_3R$ ) e os sensíveis a rianodina (RyR) que estão presentes no retículo sarcoplasmático, sendo de fundamental importância para o mecanismo contrátil do músculo liso (McCARRON *et al.*, 2004). Os canais sensíveis  $IP_3$  são abertos através do aumento da concentração de  $IP_3$  intracelular, que ocorre pela ação da fosfolipase C (PLC) mediante a quebra do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) pela ação da proteína G ou a tirosina quinase acoplada ao receptor na membrana plasmática estando o mesmo ativado por um agonista, que pode ser um hormônio, um neurotransmissor ou um fator de crescimento. Atualmente são identificadas 3 isoformas de canais para cálcio com receptores para  $IP_3$ ;  $IP_3R_1$ ,  $IP_3R_2$  e  $IP_3R_3$  (FOSKETT *et al.*, 2007).

Os canais para cálcio do tipo RyR, são canais ativados por correntes de cálcio provenientes tanto do canais VOCCs, quanto dos canais de cálcio com receptores de  $IP_3$  (WRAY *et al.*, 2005). São canais onde correntes de cálcio ativam a liberação de cálcio (CIC). Sua ativação contribui para o aumento da concentração de cálcio intracelular em alguns tipos de músculo liso. Assim como os  $IP_3R$ , foram identificados três isoformas de RyR; a  $RyR_1$  que esta presente no músculo esquelético, a  $RyR_2$  localizada no músculo cardíaco e a  $RyR_3$  localizada na artéria cerebral (WELLMAN & NELSON, 2003).



Os canais para cálcio operados por estoques (SOCC) são canais permeáveis aos íons cálcio presentes na membrana plasmática, e são ativados pela depleção de cálcio dos estoques intracelulares, possibilitando a recarga dos estoques de cálcio do retículo através da entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  desses canais da membrana (PUTNEY *et al.*, 2001). Os mecanismos de ativação desse tipo de canal ainda não estão totalmente estabelecidos, mas existem duas hipóteses para sua ação: Nas células musculares da aorta, por exemplo, a ação desse canal pode ocorrer pela liberação de cálcio do RS, quando ocorre depleção dos seus estoques, de um fator de influxo de cálcio (CIF) que vai atuar sobre os SOCCs; A outra hipótese foi observada nas células musculares da veia porta, onde pela depleção dos estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, ocorreria uma via onde a proteína quinase C (PKC), causaria a fosforilação de uma proteína celular. Ainda não se sabe qual proteína é fosforilada pelo o PKC. Se a quinase vai agir diretamente sobre a proteína do canal ou sobre um intermediário levando a abertura dos SOCCs, (ALBERT & LARGE, 2003).

Bloqueadores seletivos para SOCCs ainda são escassos. Cátions como  $\text{Ni}^{2+}$ , ou  $\text{Gd}^{3+}$  inibem entrada de cálcio pelo SOCC em uma variedade de ML, no entanto, em alguns desses músculos esses agentes bloqueiam também a ação dos ROCCs (MARTHAN, 2004). Uma ferramenta importante para estudar a entrada capacitativa de cálcio tem sido o estudo com inibidores da bomba de cálcio (ácido ciclopiazônico e tapsigargina) que inibem a recaptação de cálcio nos estoques intracelulares levando a uma depleção passiva dos mesmos (PUTNEY *et al.* 2001).

Os SOCCs provavelmente não tenham somente o papel de recarregar os estoques de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS, mas tenha participação da contração sustentada, que pode ocorrer diretamente pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  dos SOCCs ou pela estimulação indireta, por despolarização dos canais VOCC. Provavelmente o receptor envolvido com os canais do tipo SOCC, sejam os receptores de potencial transiente (TRP) do tipo  $\text{TRP}_2$ ,  $\text{TRP}_4$  e  $\text{TRP}_5$ . Esse receptor foi inicialmente achado em fotorreceptores de *Drosophila*, tendo um papel fundamental na entrada de cálcio operada por estoque (CLAPHAM *et al.* 2001; BEECH *et al.*, 2000).

Existem canais não específicos para os íons  $\text{Ca}^{2+}$ , que permitem a passagem não só desse íon, mas, também, de outros cátions. Essas estruturas são

denominadas canais catiônicos não seletivos (NSCC), que podem ser ativados tanto por agonista, como por estímulo mecânico. Quando ativados, podem contribuir com o aumento do cálcio citosólico, por permitir a passagem de cálcio ou de um cátion, como o  $\text{Na}^+$ , causando a despolarização da membrana e com isso a ativação dos canais tipo-L. Os canais catiônicos que são estimulados por uma ação mecânica são chamados de mecanosensitivos ou canais operados por estiramento (GUIBERT *et al.*, 2008).

## 2.10 Acoplamento excitação-contração

O termo acoplamento excitação-contração está relacionado à cadeia de processos que ligam um estímulo a seus efeitos na modificação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma (KURYAMA *et al.*, 1998).

A regulação do tônus do músculo liso traqueal é feita por um sinal extracelular que provoca resposta celular de força através de dois tipos gerais de transdução de sinal: 1. Acoplamento eletromecânico (dependente da função de canal e fluxos iônicos, caracterizado pelas mudanças no potencial transmembrana -  $E_m$ ); 2. Acoplamento farmacomecânico (mediado por substância química independente de mudanças no potencial transmembrana) (GERTHOFFER, 1991).

Independentemente de como a célula seja ativada para que haja a contração, o mediador final será o aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , que é necessário para a fosforilação das cadeias leves de miosina (MOSS & HOFMANN, 1992). No músculo liso das vias aéreas, a variação nas concentrações de cálcio intracelular é um fator decisivo para a transdução de sinais na regulação da contração muscular, proliferação celular e expressão de genes. Uma grande variedade de eventos celulares é controlada por um aumento transiente da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . As duas maiores fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  são o meio extracelular e os estoques intracelulares (RS e mitocôndria). Sabe-se que a liberação dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , principalmente do RS, desempenha papel central para o início do processo contrátil do MLVA de várias espécies animais, incluindo humanos (MARTHAN, 2004; BALEMBA *et al.*, 2008)

## 2.11 Acoplamento eletromecânico e farmacomecânico

No músculo liso traqueal tanto as fontes intracelulares como extracelulares são importantes para o desenvolvimento de força (EVANGELISTA *et al.*, 2007). O cálcio entra no meio citosólico através de pelo menos duas vias: VOCC (principalmente canais do tipo L) e canais catiônicos operados por receptor (ROCC). As contrações evocadas por  $K^+$  alto são mediadas via acoplamento eletromecânico, unicamente por efeitos voltagem-dependentes (COBURN & YAMAGUCHI, 1977). Em concentrações altas de potássio a membrana do tecido de músculo liso traqueal é despolarizada, em seguida são ativados os VOCCs que causam um influxo de cálcio através da membrana. Tal influxo medeia a liberação de cálcio induzida por cálcio pelo RS, o qual resulta no desenvolvimento de força e a contração (KIRKPATRICK *et al.*, 1975). Esse cálcio liberado no meio intracelular também intercede na ação de correntes de  $Cl^-$  (dependentes de cálcio) e de cátions não-seletivos, bem como supressão de correntes de  $K^+$  (BAZÁN-PERKINS *et al.*, 1998; JANSSEN, 2002).

Outro mecanismo de regulação do cálcio intracelular é o acoplamento farmacomecânico que se caracteriza pela abertura de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, ativados por ligantes nos receptores de membrana que ativam segundos mensageiros como inositol-(1,4,5)- trifosfato ( $IP_3$ ) e o diacilglicerol (DAG).

Nesse mecanismo agonistas como a acetilcolina, norepinefrina, 5-HT ou endotelina ligam-se ao receptores presentes na membrana, e essa ligação faz com que o tal receptor sofra uma mudança conformacional e exponha um sítio com alta afinidade para ligar no terminal C da subunidade de uma proteína G heterotrimétrica em seu estado inativo.

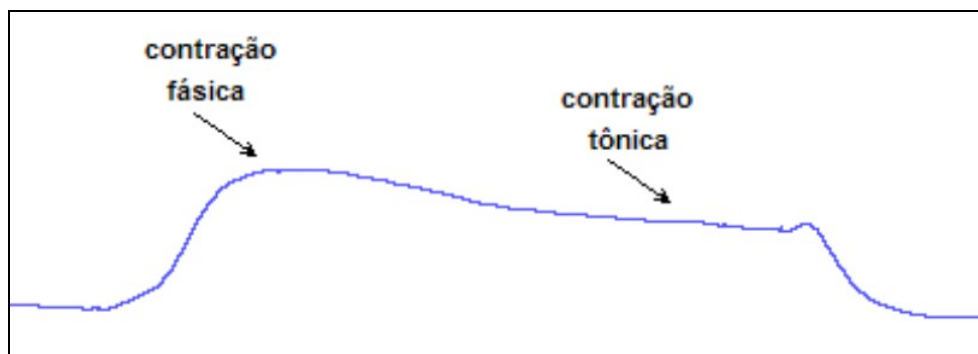
A ligação da proteína G ao receptor leva à substituição de GDP por GTP e induz uma mudança na estrutura seguida de dissociação da subunidade do dímero. A subunidade alfa da proteína G ativa a fosfolipase C. Essa enzima é específica para o lipídio de membrana fosfatidil-inositol 4-5 bifosfato para catalisar dois potentes segundos mensageiros: trifosfato de inositol e diacilglicerol. A ligação de  $IP_3$  em seus receptores no retículo sarcoplasmático resulta na liberação de cálcio no citosol. O DAG juntamente com o cálcio ativa a proteína quinase C que fosforila algumas

proteínas específicas. Existem várias isoenzimas da PKC no músculo liso e cada uma tem seu papel específico em cada tecido (por exemplo: vascular, uterino, intestinais etc).

A proteína quinase C ativada é capaz de acionar vários substratos, inclusive a calponina, levando à perda de sua habilidade em inibir a actomiosina ATPase. A fosforilação de intermediários da via da MAPK – que ativa fatores de transcrição de genes envolvidos na promoção do crescimento do MLVA – também é mediada pela PKC. A MAPK e a PKC fosforilam e estimulam a atividade catalítica da PLA<sub>2</sub>, com liberação de ácido araquidônico e metabólitos (BILLINGTON & PENN, 2003).

Ocorre também via proteína G a inibição da adenilato ciclase, diminuindo a produção de AMPc e com isso facilitando a contração, e a produção da proteína cinase C (PKC) pelo DAG, que iria atuar na ativação dos canais de cálcio operados por voltagem e na sensibilidade do maquinário contrátil ao cálcio. Adicionalmente a ativação da PKC pelo DAG, que iria atuar na ativação dos canais de cálcio operados por voltagem e na sensibilidade do maquinário contrátil ao cálcio.

A contração no músculo liso em resposta a vários agentes é freqüentemente composta por duas fases: um componente fásico rápido seguido por um lento, sustentado, denominado componente tônico (Fig. 5) (BOLTON, 1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de Ca<sup>2+</sup> no músculo liso (estoques de Ca<sup>2+</sup> ativados por IP<sub>3</sub> no RS) (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 1989) e ativação dos canais de Ca<sup>2+</sup> da membrana (REMBOLD, 1996).



**FIGURA 5** –Traçado de contração do músculo liso traqueal e seus componentes fásico e tônico.

O componente fásico é rápido e é geralmente representado como um pico de contração. Tal característica se deve ao fato da célula abrir os canais para cálcio presentes nos estoques do RS, o qual, uma vez liberado promove uma resposta contrátil sem que haja sustentação da mesma. A resposta tônica é conhecida como sendo associada aos processos que tornam a contração sustentada ao longo da geração do estímulo. Nesse estágio são ativados os canais para cálcio ativados por voltagem (VOCCs) e os canais para cálcio operados por receptor (ROCCs) que se abrem utilizando a fonte extracelular de cálcio mantendo o efeito sustentado da contração (JUCA, 2007; REMBOLD, 1996).

## **2.12 Mecanismo de sensibilização ao cálcio na contração do músculo liso**

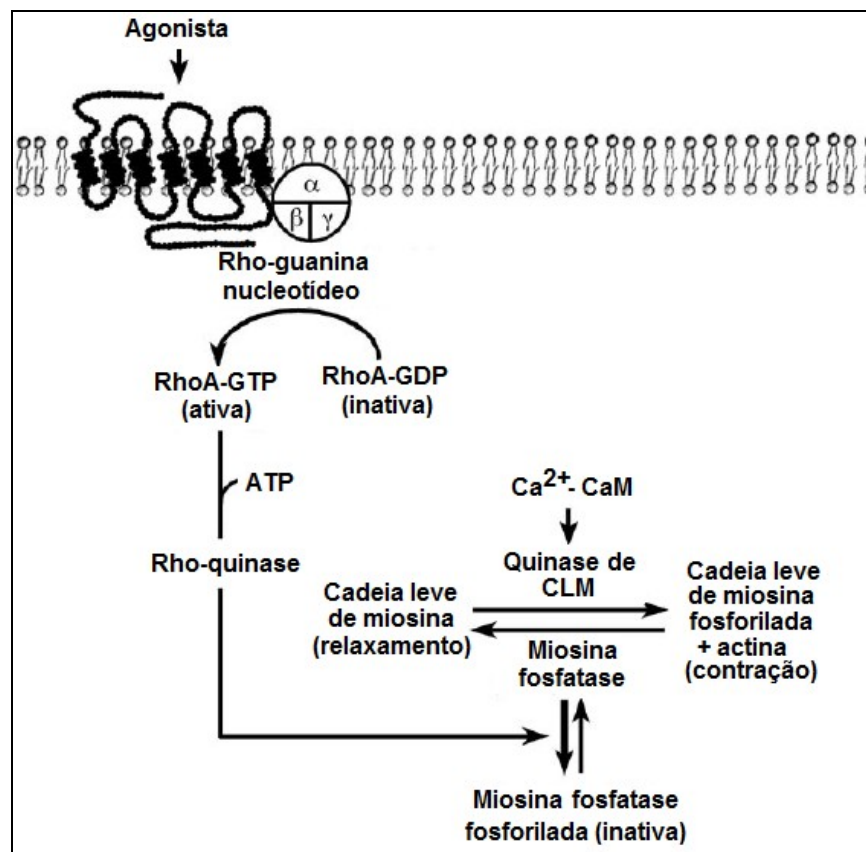
Além da ativação dependente de cálcio da quinase de cadeia leve de miosina, o estado de fosforilação da cadeia leve de miosina também é regulada pela fosfatase de cadeia leve de miosina, que remove o fosfato de alta energia da CLM para promover o relaxamento.

Na fosfatase de cadeia leve de miosina existem 3 sub-unidades. Uma sub-unidade catalítica de 37 KDa, uma sub-unidade variável de 20 KDa e uma sub-unidade de ligação à miosina de 110-130 KDa. A sub-unidade de ligação a miosina quando fosforilada inibe a atividade enzimática da fosfatase CLM permitindo que a CLM permaneça fosforilada promovendo assim a contração.

Alguns dos possíveis mensageiros para a sensibilização das proteínas contráteis ao cálcio, são a PKC e o ácido araquidônico (AA) (PAVLOVA *et al.*, 2003). A evidência que demonstra o papel da PKC e a sensibilização dessas proteínas ao cálcio pelos ésteres de forbol, é o fato de que agonistas que promovem a sensibilização ao  $Ca^{2+}$ , também liberam DAG que é o ativador natural da PKC. Os ésteres de forbol (diterpenóides) se ligam à PKC somente na presença de fosfolipídeos (principalmente fosfatidilserina). Os mecanismos de ação da PKC e do AA a nível celular são diferentes. Ao passo que a PKC promove a fosforilação da serina 19 da CLM<sub>20</sub> (SOMLYO & SOMLYO, 1994), o ácido araquidônico também aumenta a fosforilação da CLM<sub>20</sub>, mas pela inibição da desfosforilação mesmo na

presença de uma concentração constante de cálcio intracelular (GONG *et al.*, 1994).

A pequena proteína G RhoA seguida da Rho quinase desempenham um papel importante na regulação da atividade da fosfatase CLM. A Rho quinase uma serina/treonina quinase fosforila a subunidade de ligação da miosina na fosfatase CLM, inibindo sua atividade, promovendo assim, o estado fosforilado da CLM (Fig. 6). Inibidores farmacológicos da Rho quinase como o fasudil, Y-27632, bloqueia essa atividade por competir pelo sitio de ligação de ATP na enzima. A Rho quinase induz a inibição do relaxamento de segmentos de músculo liso isolados em resposta a diferentes agonistas. No animal intacto, a ação farmacológica de inibidores da Rho quinase têm mostrado que há o relaxamento do músculo liso nas artérias, resultando numa diminuição da pressão arterial (WEBB, 2003).



**FIGURA 6** – Mecanismo de sensibilização ao cálcio e contração no músculo liso. A contração no músculo liso também pode ser controlada por um mecanismo independente de cálcio envolvendo ligação a um receptor acoplado a proteína G. Quando agonistas se ligam ao receptor pela parte externa da membrana do músculo liso, a Rho-GTP é ativada pelo fator de troca do nucleotídeo Rho-guanina (HILGERS & WEBB, 2005).

### 2.13 Relaxamento do músculo liso

O relaxamento do músculo liso ocorre como resultado da remoção dos estímulos contráteis ou por ação direta de uma substância que estimula inibição do mecanismo contrátil. Independentemente, o processo de relaxamento requer uma diminuição da concentração intracelular de cálcio e aumento da atividade da fosfatase de cadeia leve de miosina. Os mecanismos que sequestram ou removem o cálcio intracelular ou aumentam a atividade da fosfatase podem se alterar contribuindo para a responsividade anormal do músculo liso. A remoção do cálcio intracelular leva ao relaxamento do músculo liso. Vários mecanismos implicam na remoção do cálcio citosólico e envolvem o RS e a membrana sarcoplasmática. Roux & Marhl (2004) sugerem que a diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  se deve, pelo menos em parte, à recaptação do  $Ca^{2+}$  que foi liberado do RS pela mitocôndria.

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

Folkerts & Nijkamp (1998) mostraram que existe uma provável interação entre substâncias biologicamente ativas produzidas pelo epitélio da via aérea e o relaxamento do MLVA. O mecanismo envolvido nos relaxamentos espontâneos é claramente diferente do que é provocado eletricamente. Este último parece não ser mediado por autacóides liberados pelo epitélio (JANSSEN & WATTIE, 1996; JANSSEN & NANA, 1997).

Alguns agonistas como o óxido nítrico promovem broncodilatação por ativação de canais de  $K_{Ca}$ , promovendo hiperpolarização e, supressão de correntes de entrada de  $Cl^-$  (JANSSEN *et al.*, 2000).

A captação de cálcio para o RS é dependente de ATP. A  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  ATPase do RS quando fosforilada, liga dois íons cálcio que são em seguida transportados para a face luminal do RS e liberados. O magnésio é necessário para ativar a enzima, pois ele liga o sítio catalítico da ATPase para mediar a reação.

Experimentalmente é possível inibir a  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase do RS por vários agentes farmacológicos, como por exemplo: vanadato, taspigargina e ácido ciclopiazônico. A ligação de proteínas à  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase do RS também pode contribuir para a diminuição dos níveis intracelulares de cálcio. Estudos recentes têm identificado a calsequestrina e calreticulina como proteínas de ligação ao cálcio no RS do músculo liso. A membrana também tem  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ -ATPase proporcionando um mecanismo adicional para reduzir o cálcio na célula.

Esta enzima difere das proteínas do RS na medida em que tem um domínio auto-inibitório que pode ser ligado pela calmodulina, causando a estimulação da bomba de cálcio da membrana. Trocadores de  $Na^+/Ca^{2+}$  também estão localizados na membrana plasmática e ajudam na diminuição intracelular de cálcio. A baixa afinidade desse antiportador está intimamente atrelada aos níveis intracelulares de cálcio e pode ser inibida pela amilorida e quinidina.

Canais para cálcio operados por receptor e por voltagem localizados na membrana plasmática são importantes no influxo de cálcio e na contração muscular lisa, como anteriormente mencionado. A inibição destes canais pode provocar relaxamento. Antagonistas desses canais como a dihidropiridina, fenilalquilaminas, e benzotiazepinas se ligam a receptores distintos sobre proteína do canal e inibem a entrada de cálcio no músculo liso.



### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos farmacológicos e o mecanismo de ação do ácido *rel*-(1s, 4as, 7s, 8as)-7-(1-vinil)-ácido *rel*-(1s, 4as, 7s, 8as)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico, diterpeno isolado de *Croton argyrophyloides*, na musculatura traqueal de ratos

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar os parâmetros farmacológicos da ação relaxante e antiespasmódica de ATCC.
- Elucidar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação de ATCC no músculo liso traqueal de ratos.
- Determinar os parâmetros farmacológicos do efeito antioxidante de ATCC

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos, *Rattus norvegicus*, variedade Wistar, masculino, com massa corporal entre 250-350 gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Ceará e mantidos em quarentena no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará. Os animais foram mantidos em caixas de propileno forradas com maravalha de pinho em ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*.

Todos os protocolos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais CEUA-UECE (protocolo nº 06379067-0). A manipulação dos animais, antes e durante os experimentos, obedeceu às normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 4.2 Sais, fármacos e soluções

Os sais e fármacos utilizados nesse trabalho foram de pureza analítica, foram produzidos pela Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), Merck Chemical (Darmstadt, Alemanha) e Merck Sharp & Dohme (Campinas, SP, Brasil).

Para o meio de perfusão foi utilizado solução de Tyrode modificada contendo a seguinte composição ( 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. Em soluções com alto teor de K<sup>+</sup> (60 mM), foi feita a substituição do NaCl por quantidade isomolar de KCl, para que não fosse alterada a osmolaridade e a força iônica da solução.

Soluções isentas de cálcio foram preparadas pela simples omissão de  $\text{CaCl}_2$  e adição de 0,2 mM de ácido etileno-bis ( $\beta$ -amino-etil-éter)N,N,N',N'-tetracético (EGTA). Soluções com  $\text{BaCl}_2$ , foram feitas pela substituição do  $\text{CaCl}_2$  por quantidade isomolar de  $\text{BaCl}_2$ . As soluções de ACh, nifedipina, serotonina (5-HT), epinefrina (EPI) e PDB foram preparadas pela diluição da substância pura em água destilada.

As soluções estoque de ATCC (10 mg/mL) foram preparadas imediatamente antes de seu uso nos experimentos. O diterpeno foi dissolvido com alíquota de tween 80, seguida de agitação vigorosa em vortex. A concentração final do solvente (tween 80) dentro da câmara de perfusão não ultrapassou 0,1 %.

#### **4.3 Determinação estrutural do constituinte fixo isolado do extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyloides***

O material vegetal (caule) de *Croton argyrophyloides* foi coletado em agosto de 2005 no município de Crato, Ceará. A identificação botânica foi realizada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, na Universidade Federal do Ceará, pelo professor Dr. Edson Paula Nunes. A planta está depositada com número da exsicata nº 27600.

A extração, o isolamento e as análises físicas e espectroscópicas para validação da estrutura do composto foram realizadas pelo Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará em colaboração com a Profa. Dra. Telma Leda Gomes Lemos e Dr. Hélcio S. Santos seguindo o protocolo abaixo descrito.

O caule (1,0 kg), seco à temperatura ambiente, foi triturado e submetido à extração a frio com etanol. A solução obtida foi destilada sob pressão reduzida fornecendo o extrato etanólico (66,0 g), que foi adsorvido em 45 g de gel de sílica e submetido à coluna cromatográfica contendo 100 g gel de sílica, utilizando os eluentes: hexano (frações 1-5), clorofórmio (frações 6-27), acetato de etila (frações 28-35) e etanol (frações 36-46), obtendo-se um total de quarenta e seis frações, de 100 mL cada. As frações clorofórmio (frações 6-27) 40,0 g foram reagrupadas,

adsorvidas em 30 g de gel de sílica e recromatografadas sobre 70 g de gel de sílica com hexano (F' 1-3), hexano/acetato de etila (9:1 F' 4-8; 8:2 F' 9-12; 6:4 F' 13-17; 4:6 F' 18-22; 2:8 F' 23-24), acetato de etila (F' 25-26) e etanol (F' 27), obtendo-se um total de vinte e sete frações, de 100 mL cada. As frações (F' 15-16) e (F' 9), obtidas com hexano/acetato de etila (6:4) e (8:2) reunidas forneceram cerca de 3,0 g do composto a ser caracterizado.

O estudo fitoquímico do extrato etanólico do caule de *Croton argyrophyloides* possibilitou o isolamento e caracterização com base nos dados espectroscópicos da substância denominada ATCC (ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico) (Fig. 7).

#### 4.3.1 Caracterização Estrutural de ATCC

O aparelho utilizado para a obtenção dos espectros de absorção na região do infravermelho foi o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1000-FT. Os pontos de fusão da amostra foram obtidos em equipamento de microdeterminação digital da METTLER TOLEDO. Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-300 e DPX-500 ( $^1\text{H}$ : 300 e 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 75 e 125 MHz), utilizando  $\text{CDCl}_3$  como solvente e TMS como padrão interno. Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro de massas, aparelho Shimadzu QP5050A, operando em 70 eV.

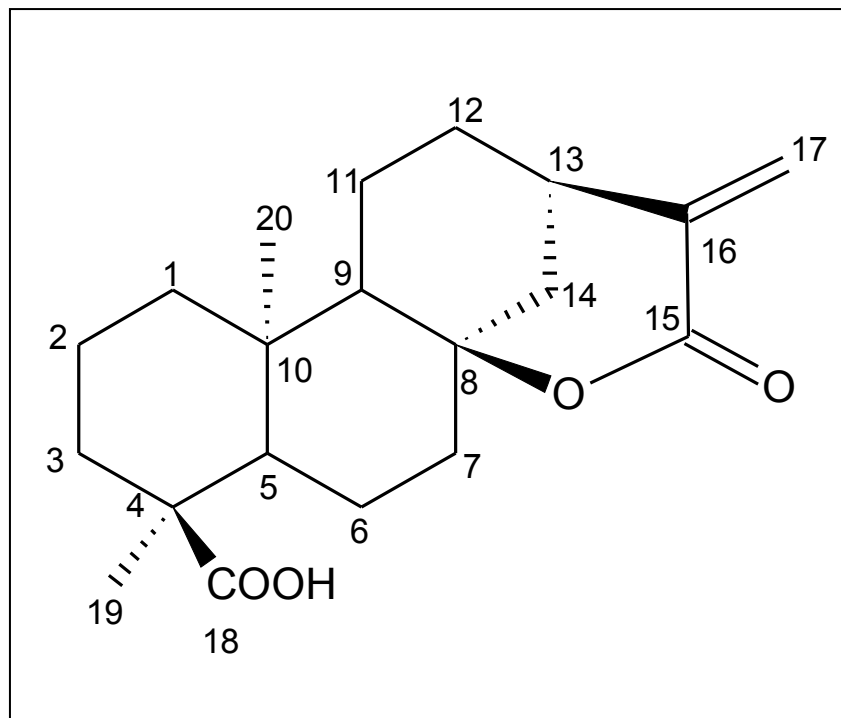
A substância denominada ATCC foi isolada sob a forma de um sólido branco amorfo, solúvel em clorofórmio com ponto de fusão de 215,6-218,6 °C e rotação óptica específica de  $[\alpha]_D = -136^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 0,38$ ). A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (Anexo 1a, p. 91) apresentou bandas em 3163  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{O-H}}$  de ácido), 1712  $\text{cm}^{-1}$  e 1673  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1626  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1232 e 1186  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{C-O}}$ ).

O espectro de massas (Anexo 3a, p. 94) apresentou o pico do íon molecular com  $m/z$  332  $[\text{M}]^+$ , correspondente à fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ , a qual

indica um IDH de sete, das quais três podem ser atribuídas à presença de duas carbonilas e de uma ligação dupla carbono-carbono, e as demais permitiu-nos deduzir para a estrutura um sistema tetracíclico.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Anexos 1b e 2a p. 91 e 93) apresentou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,42 (s) e 5,542 (s) que caracterizam hidrogênios em um sistema de ligação dupla carbono-carbono exocíclico. A diferença nos deslocamentos químicos desses hidrogênios venéficos pode ser explicada pela desproteção exercida pela conjugação com a carbonila (ressonância) e pelo efeito anisotrópico, ou seja, o hidrogênio *cis* em relação ao grupo carbonila sofre maior efeito de desproteção. Também foi possível observar que os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  1,07 (3H-20, s) e 1,17 (3H-19, s), correspondem a hidrogênios de dois grupos metílicos.

A análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ - $\{^1\text{H}\}$  (Anexo 2b, p. 93) e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPT 135° (Anexo 4, p. 95) indicou a presença de dois grupos carbonílicos, sendo um de ácido carboxílico em  $\delta_{\text{C}}$  183,80 (C-18), enquanto o outro seria uma carbonila lactônica  $\alpha$ - $\beta$ -insaturada em  $\delta_{\text{C}}$  166,71 (C-15) como observado no espectro na região do infravermelho. Os deslocamentos químicos para carbonos vinílicos em  $\delta_{\text{C}}$  139,50 (C-16) e 127,12(CH<sub>2</sub>-17) confirmaram a presença da ligação dupla exocíclica em conjugação com um grupo carbonila observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$ . O sinal em  $\delta_{\text{C}}$  85,54 refere-se a um carbono não hidrogenado oxigenado, sugerindo que o quarto oxigênio presente na estrutura seria parte de um resíduo lactônico.



**FIGURA 07** – Estrutura química de ATCC (ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico).

## **4.4 Protocolo experimental**

### **4.4.1 Obtenção dos tecidos traqueais**

Os animais foram sacrificados por exsanguinação. Em seguida foi realizada a abertura da face ventral do pescoço por uma incisão longitudinal medial da pele e afastamento das glândulas e dos músculos para a exposição e a remoção da traquéia. Esta foi rapidamente transferida para uma placa de Petri contendo solução nutritora de Tyrode Modificado (TM)

O tecido traqueal foi manuseado para eliminação dos tecidos anexos e seccionamento de segmentos circulares traqueais contendo entre 3-5 anéis cartilagosos, cuidadosamente manuseados para preservar a integridade do epitélio.

Esses segmentos foram montados verticalmente em câmaras para banho de órgão isolado com 5 mL de capacidade, contendo solução de TM oxigenada por borbulhamento contínuo de ar, mantido em pH 7,4 e temperatura de 37°C.

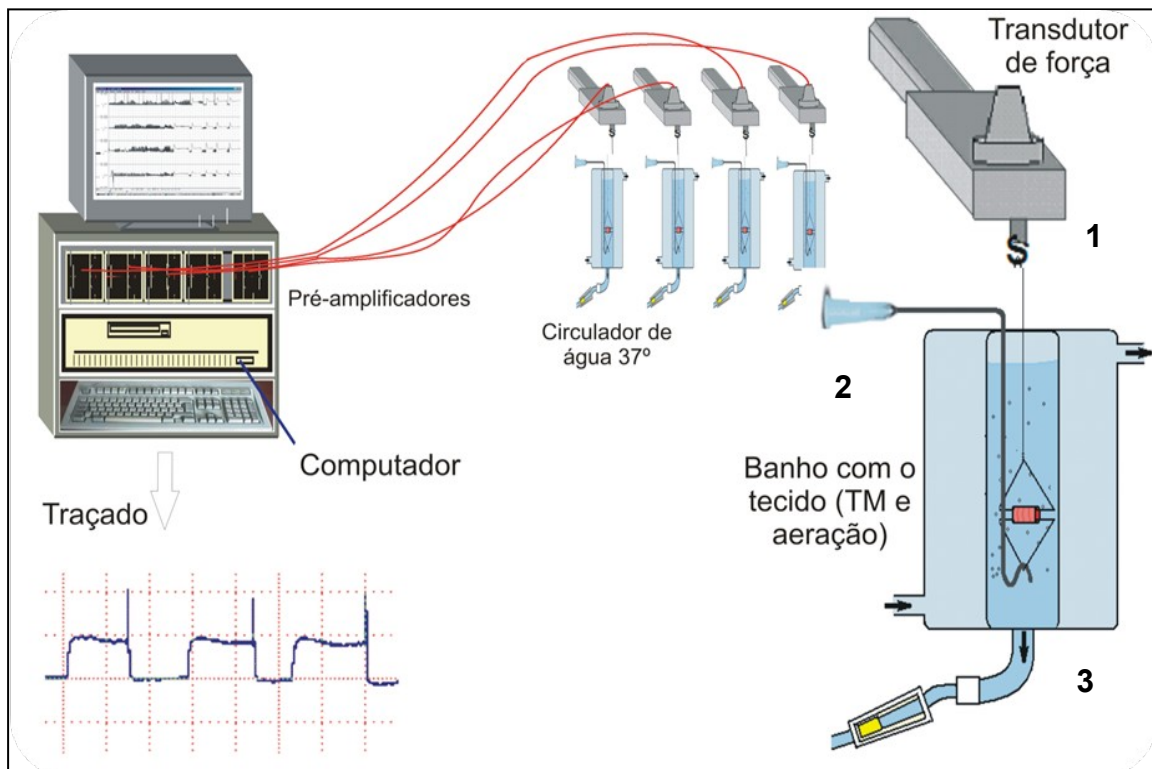
Cada segmento traqueal foi montado ajustando-os entre dois triângulos metálicos. Um desses triângulos conectado a uma base fixa, e outro ajustado a um transdutor de força por um fio de algodão.

As respostas musculares mecânicas (geração de força ou relaxamento) foram transformadas em sinal elétrico por um transdutor de força (Grass, modelo FT 03) conectado a um pré-amplificador diferencial (PM-1000, DATAQ Instruments, Inc., EUA). Este pré-amplificador fica acoplado a uma placa conversora analógica-digital (DI-200, DATAQ Instruments, Inc., EUA) instalada em um microcomputador de mesa. Os dados foram convertidos em pontos e armazenados em arquivos pelo software WINDAQ versão 1,65 (DATAQ Instrumentos, Inc. EUA).

Após a montagem do tecido no equipamento, a traquéia foi submetida à estabilização sob tensão de 1 g.F durante uma hora, para manutenção do tensionamento fisiológico e para adequação às novas condições. Essa força exercida pelo tecido no final da estabilização foi considerada como nível zero, linha de base ou tônus basal da amostra. Alterações para acima da linha de base foram

consideradas como contrações e para baixo como relaxamento. Nos canais do grupo controle, foram administrados somente o veículo (TM + Tween® 80 0,2%), e esses traçados foram registrados no mesmo intervalo de tempo dos canais teste. Um esquema simplificado dos equipamentos é mostrado na figura 8.

No protocolo onde a estimulação por campo elétrico foi utilizada, as contrações foram induzidas por um estimulador elétrico de fabricação local, capaz de gerar trens de pulsos com duração de 0,1 a 100 ms com corrente de até 150 mA e tensão máxima de 150 V ligados a eletrodos para estimulação de campo bem próximos à preparação tecidual.



**FIGURA 08** – Esquema simplificado do equipamento e dos aparelhos utilizados nos experimentos de contratilidade *in vitro*. 1) transdutor de força 2) Haste fixa na qual se acopla o triângulo metálico com a traquéia e ponto de saída da aeração 3) Cuba para banho de tecido com circulação de água a 37°C.

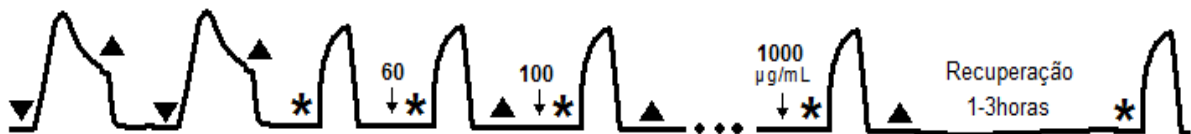
Após o período de estabilização, foram evocadas duas contrações iniciais com  $K^+$  60 mM para avaliar a responsividade do tecido traqueal. Tais tecidos foram considerados estáveis, quando as duas contrações controle apresentaram



amplitudes similares.

**Série 1:** Essa série experimental foi realizada para avaliar os efeitos de ATCC (2-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) no tônus espontâneo de preparações traqueais com epitélio. ATCC foi adicionado ao banho de órgão de forma cumulativa em intervalos de 5 minutos. Experimentos semelhantes foram realizados com a adição do veículo como controle (Tween 80 0,01 % v.v) na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver o diterpeno.

**Série 2:** Realizada para avaliar os efeitos de ATCC no bloqueio da contração induzida por estímulo de campo elétrico (ECE). Após o período de estabilização foi testada a viabilidade do tecido traqueal por meio de contrações por estímulo de campo elétrico ( $a = 60 \text{ mA}$ ,  $f = 10 \text{ Hz}$ , pulso = 0,5 ms) com duração de 30 segundos. Antes de cada estimulação nas condições acima descritas, foram adicionadas ao banho de órgão concentrações crescentes e não cumulativas do diterpeno (20 - 600  $\mu\text{g/mL}$ ). Finalmente, os tecidos foram submetidos a lavagens sucessivas com TM e avaliada sua responsividade através da estimulação elétrica, como ilustra a figura abaixo (Figura 9).



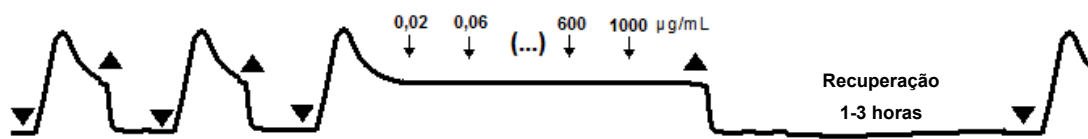
**FIGURA 09** – Esquema representativo da série 2. Série que avaliou o efeito do diterpeno no bloqueio da contração induzida por estimulação elétrica. Os símbolos “▼” indicam a adição da alíquota de  $\text{K}^+$  60 mM; os símbolos “▲” indicam as lavagens com Tyrode modificado (TM) para troca da solução ou retirada do composto; os símbolos “\*” indicam o momento do estímulo elétrico; “↓” indica o momento da adição das alíquotas do diterpeno e suas respectivas concentrações finais no banho em  $\mu\text{g/mL}$ .

**Série 3:** Para avaliar a ação de ATCC no acoplamento eletromecânico, foram realizados dois experimentos nessa série experimental: 1. Efeito de ATCC na reversão da contração induzida e mantida por  $\text{K}^+$  80 mM (Fig. 10a); 2. Efeito de ATCC na inibição da contração induzida por  $\text{K}^+$  60 mM (Fig. 10b). No primeiro deles, após verificada a responsividade do tecido com duas contrações de  $\text{K}^+$  60 mM, foi

induzida uma contração por  $K^+$  (80 mM). No platô da contração, o ATCC foi adicionado de forma crescente e cumulativa, em concentrações que variaram de 20 a 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

No segundo experimento foram observados os efeitos inibitórios da exposição prévia e não cumulativa de ATCC (20 - 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 5 minutos antes da indução de contrações submaximais (aproximadamente 70% da resposta máxima) de  $K^+$  60 mM. Nos experimentos de inibição foram analisados dois componentes da resposta contrátil: a fase inicial, pico da contração ou componente fásico (CF) seguido por uma fase de declínio e manutenção estável da contratilidade ou componente tônico (CT). Os efeitos do veículo na mesma faixa de concentração utilizada para dissolver o diterpeno também foram analisados. Finalmente, as preparações traqueais foram recuperadas com lavagens sucessivas de TM durante 2 horas para verificar sua responsividade.

(a)



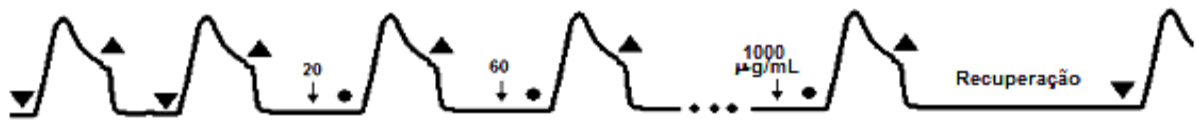
(b)



**FIGURA 10** – Esquema representativo da série 3. Séries que avaliaram a ação do diterpeno na reversão das contrações induzidas por  $K^+$  80 mM (a) e na inibição das contrações induzidas por  $K^+$  60 mM (b). “▼” representa a adição da alíquota de  $K^+$  (60 ou 80 mM); “▲” representa lavagem com TM para retirada do  $K^+$ , do composto ou do veículo. “↓” indica o momento da adição das alíquotas do diterpeno e suas respectivas concentrações finais ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no banho.

**Série 4:** Esse item de investigação avaliou a capacidade de ATCC em inibir uma contração subsequente induzida por ACh (10  $\mu\text{M}$ ) ou 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ), observando as alterações no que se refere ao acoplamento farmacomecânico. Nessa série de

experimentos foram avaliados os efeitos inibitórios da exposição prévia do ATCC (20-1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), adicionado de forma crescente e não cumulativa, 5 minutos antes de serem induzidas contrações submaximais (70% da resposta máxima) de ACh 10  $\mu\text{M}$ . Na inibição das contrações induzidas por 5-HT, (10  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada uma concentração única do diterpeno (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os segmentos traqueais foram mantidos em meio nutridor normal (TM) e suas respostas na inibição da contração por ACh foram analisadas em seus componentes fásicos e tônicos. No final dos experimentos os tecidos traqueais foram recuperados com lavagens sucessivas de TM durante 2 horas para verificar a viabilidade do tecido, como demonstra o esquema da figura 11.



**FIGURA 11** – Esquema representativo da série 5. Série que avaliou o efeito do diterpeno na inibição das contrações induzidas por ACh (10  $\mu\text{M}$ ). “▼” representa a adição de  $\text{K}^+$  60 mM; “●” indica a adição de ACh 10  $\mu\text{M}$ . Os protocolos de bloqueio das contrações induzidas por 5-HT e ACh por ATCC, foram semelhantes, no entanto, para o bloqueio da contração induzida por 5-HT, o ATCC foi utilizado em apenas uma concentração (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); “▲” representa a lavagem com TM para retirada do  $\text{K}^+$ , da ACh ou do composto; “↓” indica o momento da adição das alíquotas do diterpeno e suas respectivas concentrações finais no banho ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Série 5:** Em experimentos semelhantes ao descrito acima, os efeitos da exposição prévia ao diterpeno (20 -1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nas contrações induzidas por ACh (10  $\mu\text{M}$ ) foram analisados em segmentos traqueais pré-tratados com a adição de indometacina (IND) 2  $\mu\text{M}$  (bloqueador inespecífico dos produtos da ciclo-oxigenases) ou montelucaste sódico (MK) 10  $\mu\text{M}$  (inibidor do receptor de leucotrienos), 15 minutos antes da adição da ACh 10  $\mu\text{M}$  (ou seja, 10 minutos antes da adição de ATCC) no banho de tecido em solução nutridora normal.

**Série 6:** Para avaliar a participação do cálcio intracelular no efeito relaxante de ATCC, realizou-se um protocolo no qual, a solução de Tyrode modificado foi preparada sem adição de  $\text{CaCl}_2$  e com a inclusão do quelante de cálcio EGTA 0,2

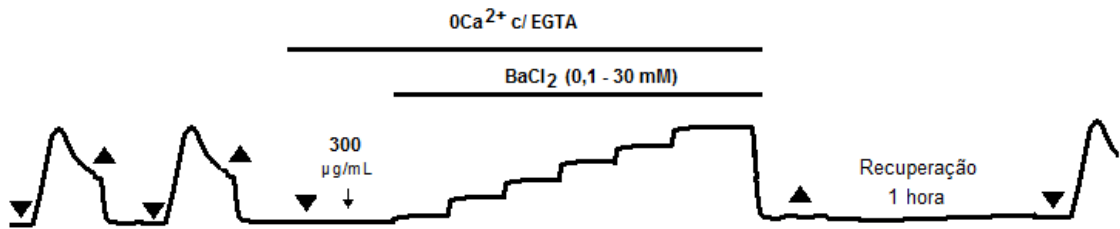
mM (solução Tyrode 0  $\text{Ca}^{2+}$ ). Inicialmente, foi testada a viabilidade da preparação traqueal com uma contração induzida por 60 mM de  $\text{K}^+$  e uma contração com ACh 60  $\mu\text{M}$  em Tyrode, utilizadas como controle inicial. Em seguida, o tecido foi lavado com Tyrode 0  $\text{Ca}^{2+}$  com EGTA (0,2 mM). Passados aproximadamente três minutos, foi induzida contração por ACh (60  $\mu\text{M}$ ) sustentada durante 5 minutos, em seguida lavado com Tyrode 0  $\text{Ca}^{2+}$ . Esse procedimento foi repetido 3 vezes de modo que os estoques intracelulares fossem depletados, fato observado pela diminuição da resposta contrátil para próximo dos níveis basais. O tecido foi novamente lavado com Tyrode, e contraído por 60 mM de  $\text{K}^+$ . Em seguida, foram feitas duas novas lavagens com Tyrode 0  $\text{Ca}^{2+}$ , e adicionado ao banho uma concentração única de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do ATCC ou ainda veículo, e assim, outra contração com ACh foi induzida. As alterações na contração induzida por ACh na presença do diterpeno foram comparadas com o controle inicial e com o controle no qual a contração em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$  está sem o composto. O delineamento do protocolo está ilustrado (Fig. 12) abaixo:



**FIGURA 12** – Esquema representativo da série 6. Série que avaliou a ação de ATCC sobre as contrações induzidas por ACh 60  $\mu\text{M}$  em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$  com EGTA 0,2 mM. Os símbolos “▼” indicam a adição de  $\text{K}^+$  60 mM; “●” representa a adição de ACh 10  $\mu\text{M}$ ; “○” indica o momento da adição do meio isento de cálcio; os “▲” indicam as lavagens com TM para retirada do  $\text{K}^+$ , da ACh ou do composto; “↓” indica o momento da adição da alíquota do diterpeno na concentração de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

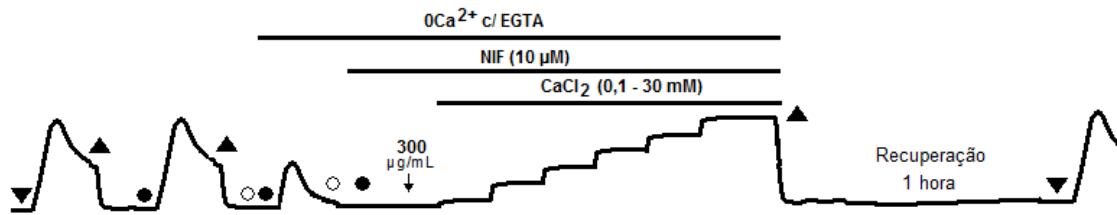
**Série 7:** Essa série experimental foi realizada com a finalidade de avaliar os efeitos inibitórios de ATCC nas contrações induzidas pela adição do  $\text{Ba}^{2+}$ , um íon de passagem seletiva através dos VOCCs, em preparações traqueais despolarizadas por  $\text{K}^+$  60 mM em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$ . Após verificar a responsividade do tecido pela indução de uma contração por 60 mM de  $\text{K}^+$ , a solução nutritora de TM foi substituída por meio 0  $\text{Ca}^{2+}$  com o agente quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , EGTA (0,2 mM), e  $\text{K}^+$  (60 mM) (CUTHBERT *et al*, 1994). Em seguida, ATCC foi adicionado ao banho nas

concentrações (30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Após 5 minutos de incubação foi realizada uma curva concentração-efeito ao bário pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de  $\text{BaCl}_2$  (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM). O veículo (Tween 80) foi testado usando as mesmas concentrações utilizadas para dissolver o composto. Por fim, o tecido foi recuperado por meio de lavagens sucessivas com Tyrode modificado durante 60 minutos e testada novamente a viabilidade do tecido (Fig. 13).



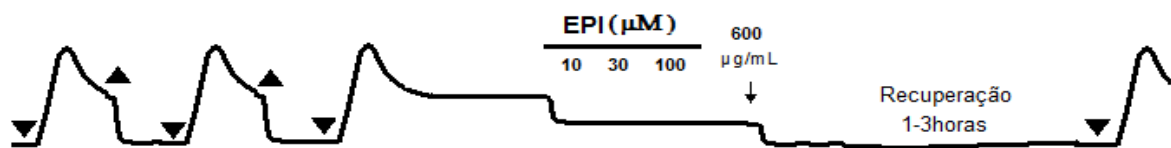
**FIGURA 13** – Esquema representativo da série 7. Série que avaliou o diterpeno (30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre as contrações induzidas por  $\text{Ba}^{2+}$ , em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$ , em preparações traqueais despolarizadas ( $\text{K}^+$  60 mM). Os “▼” indicam a adição da concentração de  $\text{K}^+$  60 mM; os “▲” indicam as lavagens com TM para retirada do  $\text{K}^+$ , do  $\text{Ba}^{2+}$  ou do composto; “↓” indica o momento da adição da alíquota de ATCC para obtenção das concentrações finais de 30, 100 ou 300  $\mu\text{g/mL}$ .

**Série 8:** Para investigar o efeito de ATCC sobre canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por receptor (ROCCs), foi utilizado nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canal de cálcio voltagem dependente, para que fosse garantida a não participação desses canais nos eventos contráteis. A viabilidade do tecido foi testada com  $\text{K}^+$  60 mM e ACh 10  $\mu\text{M}$ . Em seguida, a preparação foi lavada com Tyrode sem  $\text{Ca}^{2+}$  contendo EGTA (0,2 mM) e os estoques intracelulares do retículo foram depletados em três contrações induzidas por ACh (60  $\mu\text{M}$ ) e lavagens com 0  $\text{Ca}^{2+}$ . Logo após foi adicionada nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), ACh (10  $\mu\text{M}$ ) e o diterpeno ATCC (30, 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ ). Imediatamente após a adição desses agentes, foi realizada uma curva concentração-efeito pela adição de  $\text{CaCl}_2$  nas seguintes concentrações: 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 mM. A seguir a preparação foi novamente lavada com Tyrode, e os tecidos recuperados com lavagens sucessivas de TM durante uma hora. O grupo controle foi feito conforme a descrição acima, e no lugar do composto, foi adicionado somente o veículo. As contrações obtidas na presença do ATCC foram quantificadas e comparadas ao controle inicial. O esquema experimental está demonstrado na figura 14.



**FIGURA 14** – Esquema representativo da série 8. Série que avaliou o efeito do diterpeno na curva concentração resposta ao  $\text{CaCl}_2$  em meio  $0 \text{ Ca}^{2+}$  em contrações induzidas por ACh em presença de nifedipina ( $10 \mu\text{M}$ ). Os “▼” indicam a adição da concentração de  $\text{K}^+$   $60 \text{ mM}$ ; os “▲” indicam as lavagens com TM para retirada do  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , nifedipina ou ATCC; os símbolos “●” indicam a adição da ACh ( $10 \mu\text{M}$ ); o “○” indica a adição da solução de  $0 \text{ Ca}^{2+}$ ; “↓” indica o momento da adição de ATCC para obtenção das concentrações finais de  $30$ ,  $100$  ou  $300 \mu\text{g/mL}$ .

**Série 9:** Para avaliar se os efeitos de ATCC se relacionavam com a afinidade por  $\beta_2$ -adrenoceptores, foi realizado um protocolo experimental com epinefrina, um clássico relaxante das vias aéreas, que medeia suas ações primariamente agindo nos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. (TANAKA *et al.*, 2005). Após a verificação da viabilidade do tecido traqueal com duas contrações em  $\text{K}^+$   $60 \text{ mM}$  em meio TM, foi induzida uma nova contração com  $\text{K}^+$   $80 \text{ mM}$  e, no momento do platô da contração, foi adicionada EPI ( $10$ ,  $30$  e  $100 \mu\text{M}$ ) de forma crescente e cumulativa para dessensibilizar os receptores  $\beta_2$ , em seguida, o ATCC foi adicionado na concentração de  $300 \mu\text{g/mL}$ , como ilustra o esquema da figura 15.



**FIGURA 15** – Esquema representativo da série 9. Série que avaliou o efeito do diterpeno sobre a contração induzida e mantida por  $80 \text{ mM}$  de  $\text{K}^+$ , em presença de epinefrina (EPI), em músculo liso traqueal de ratos. Os símbolos “▼” indicam a adição da concentração de  $\text{K}^+$   $60 \text{ mM}$ ; os “▲” indicam as lavagens com TM para retirada do  $\text{K}^+$ , da EPI ou do composto; “↓” indica o momento da adição do diterpeno para obtenção da concentração final de  $300 \mu\text{g/mL}$ .

**Série 10.** Nessa série de experimentos foram avaliados efeitos de ATCC em contrações induzidas por  $\text{K}^+$   $20 \text{ mM}$  e PDB  $1 \mu\text{M}$  em meio nutridor normal. Os

ésteres de forbol são diterpenos pentacíclicos agentes promotores de tumor e ativadores da proteína quinase C (DRUMMOND & HUGHES, 1987). Em solução nutritiva com 0,2 mM de EGTA e sem adição de  $\text{Ca}^{2+}$  os ésteres do forbol induzem, no músculo liso vascular, uma contração que independe totalmente do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extra para o meio intracelular e se deve à ativação da proteína quinase C (REMBOLD, 1996). Se um dado agente relaxa o anel de aorta pré-contraído pelo  $\text{K}^+$  e pelo éster do forbol, isto pode sugerir que este agente esteja bloqueando a contração por atuação ou na proteína quinase C, ou em algum outro ponto da cascata bioquímica de reações da contração muscular lisa distal à etapa da proteína quinase C.

Em nossos experimentos após a verificação da responsividade do tecido foi evocada uma pequena contração com  $\text{K}^+$  20 mM em meio nutritivo Tyrode modificado. Em seguida, as preparações traqueais foram incubadas com o dibutirato de forbol 1  $\mu\text{M}$ . No platô da contração induzida pelo éster, o diterpeno (50, 150, 400, 600 e 1000 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionado de forma não cumulativa. No final do experimento, o tecido foi recuperado com lavagens sucessivas de TM no período de 1 hora e certificada novamente sua viabilidade por meio de uma contração induzida por  $\text{K}^+$  60 mM.

#### **4.4.2 Teste de Atividade Antioxidante in vitro (Método da varredura do radical livre DPPH).**

O método varredor do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) é uma técnica simples e precisa para avaliação da atividade antioxidante. Este radical livre é fortemente colorido e a capacidade varredora é visualizada pelo desaparecimento da cor.

Em um tubo de ensaio colocou-se 3,9 mL de solução metanólica  $6,5 \times 10^{-5}$  M do radical livre DPPH, em seguida, adicionou-se 0,1 mL de solução metanólica da amostra dos extratos (10 mg/mL) as análises foram feitas em triplicata em espectrofotômetro a 515 nm em diferentes tempos (0 a 60 min). Para o cálculo do

potencial de inibição ou índice de varredura do DPPH da amostra, em percentual (IV %) foi utilizada a fórmula:

$$IV = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \times 100$$

Onde  $A_{DPPH}$  significa absorbância inicial da solução de DPPH e  $A_{AMOSTRA}$  a absorbância final. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram considerados positivos se a absorbância decresce estequiometricamente com a perda da cor da solução de DPPH. Para comparação, utilizou-se a quercetina (um flavonóide) como padrão na proporção molar Quercetina/DPPH de 0,1 (YEPEZ *et al.*, 2002)



#### **4.5 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM (n), onde n representa o número de experimentos. Os gráficos e análise estatística foram feitos através dos softwares SigmaPlot 9.0 e SigmaStat 3.1, respectivamente.

Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Os testes de normalidade e homocedasticidade das variâncias foram calculados automaticamente pelo programa. As curvas de regressão logística foram feitas por meio equação de Hill que calculou 4 parâmetros (máximo, mínimo,  $EC_{50}$  e hillslope). Utilizamos análise de variância (ANOVA) seguida de técnica de contraste (testes paramétricos ou não paramétricos) conforme apropriado.

## 5 RESULTADOS

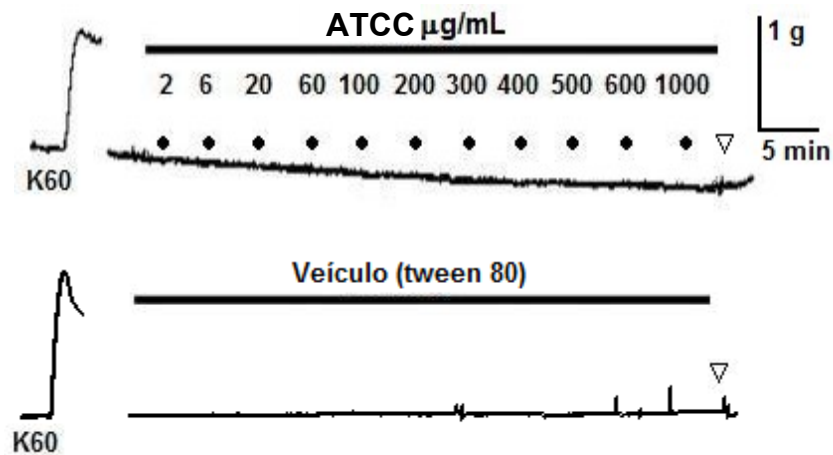
---

### 5.1. Efeitos de ATCC no tônus basal e na resposta contrátil induzida por estimulação de campo elétrico (Série 1 e 2).

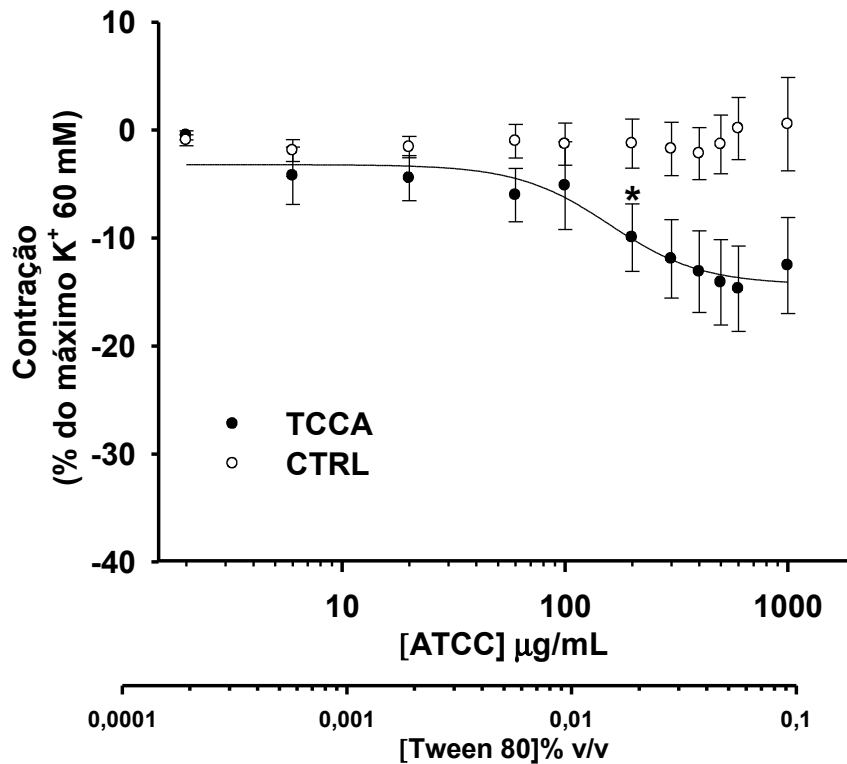
As contrações induzidas por  $K^+$  60 mM nos segmentos traqueais corresponderam, em média, a  $0,98 \pm 0,13$  g ( $n = 8$ ). A adição de concentrações crescentes e cumulativas do diterpeno no tônus basal espontâneo (2-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) relaxou significativamente as preparações traqueais ( $n = 8$ ;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak), A  $IC_{50}$  encontrada para esse relaxamento foi de  $98,96 \pm 27,76$   $\mu\text{g/mL}$  com um efeito máximo correspondendo a  $14,6 \pm 3,9$  % da amplitude da contração inicial induzida por  $K^+$  60 mM (Figs. 16a e 16b). Os efeitos relaxantes de ATCC foram significativamente diferentes do controle a partir da concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Os efeitos da exposição ao composto foram reversíveis em todas as preparações após uma hora de lavagem com TM.

Adicionalmente, a exposição prévia das preparações durante 5 minutos ao ATCC (20-600  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu, de maneira concentração dependente, as contrações induzidas pelo estímulo de campo elétrico ( $a = 60$  mA,  $f = 10$  Hz, pulso = 0,5 ms) quando comparado ao controle (Figs. 17a;  $n = 7$ ;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak). A  $IC_{50}$  para o grupo exposto ao diterpeno foi  $247,73 \pm 9,99$   $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 17b). Os efeitos inibitórios do diterpeno passaram a ser significantes a partir da concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 7$ ;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak). O veículo, quando adicionado nas mesmas concentrações usadas para dissolver o diterpeno, não afetou o tônus basal e as contrações as contrações induzidas por estímulo elétrico.

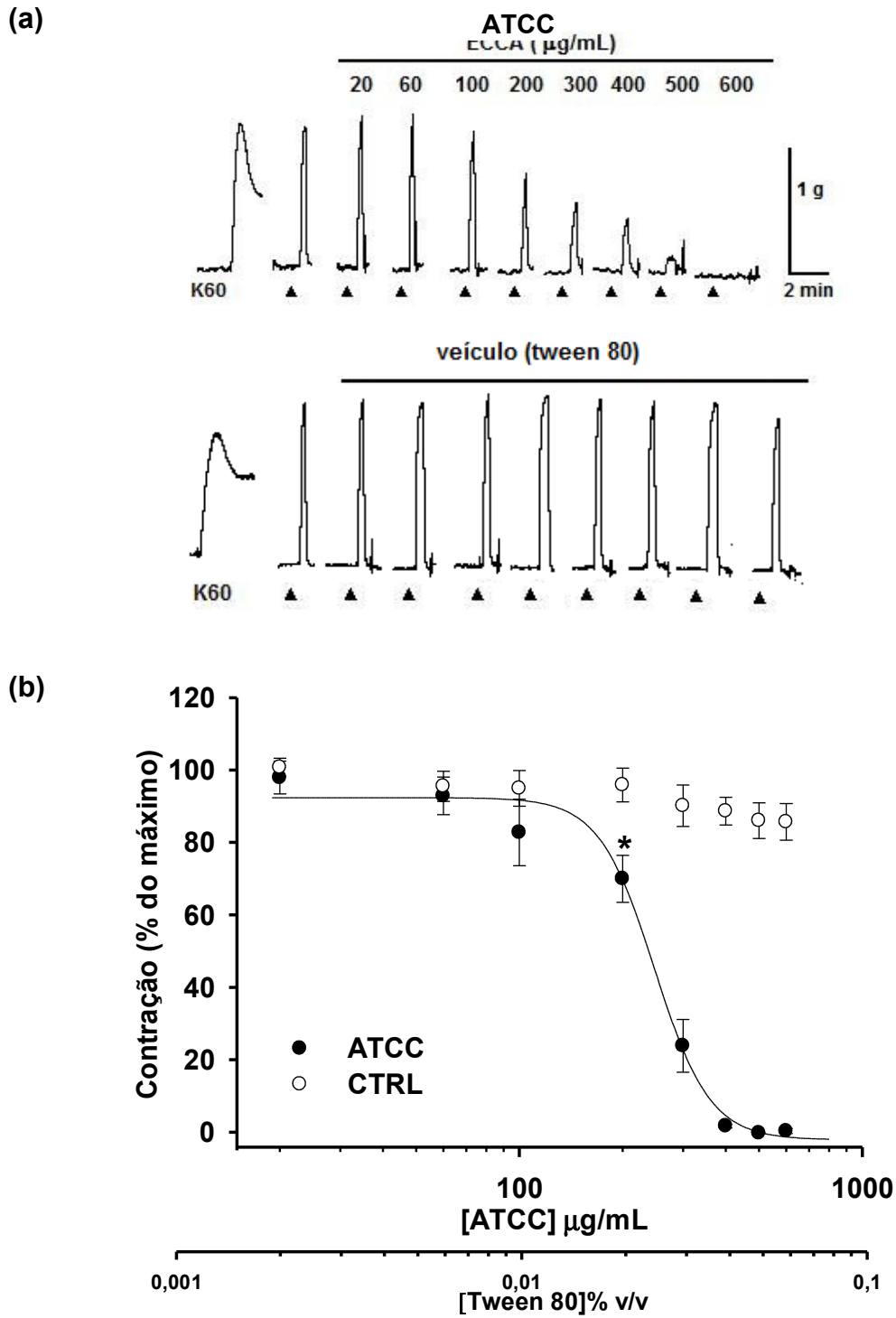
(a)



(b)



**FIGURA 16** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre o tônus basal em músculo liso traqueal de ratos (MLT) de ratos. **a)** Traçado experimental mostrando o veículo e o efeito relaxante de ATCC (2–1000 µg/mL) sobre o tônus basal espontâneo em traquéia de ratos. Após a lavagem, representada pelo “▽”, o tônus foi recuperado. O símbolo “●” indica a adição de ATCC (2-1000 µg/mL) no banho. **b)** Curva concentração resposta da ação de ATCC (2-1000 µg/mL; n = 8; “●”) ou do veículo (Tween 80 - 0,001-0,1%, v/v; “○”) em MLT de ratos. Os resultados foram expressos pelo relaxamento % da resposta máxima de K<sup>+</sup> 60 mM em média % ± EPM%; “n” = número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$  em relação ao controle (two-way ANOVA, Holm-Sidak).



**FIGURA 17** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a resposta contrátil induzida por estimulação de campo elétrico em músculo liso traqueal (MLT) de ratos. **a)** Traçado experimental mostrando a ação de ATCC e do veículo nas contrações induzidas pelo estímulo elétrico efeito antiespasmódico de ATCC (20-600  $\mu\text{g/mL}$ ) e sobre a contração induzida por estímulo elétrico ( $a = 60 \text{ mA}$ ,  $f = 10 \text{ Hz}$ , pulso = 0,5 ms). O símbolo “▲” representa o momento do estímulo após prévia adição de ATCC (20–1000  $\mu\text{g/mL}$ ) **b)** Gráfico demonstrando a ação de ATCC (2-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) nas contrações induzidas por estimulação elétrica. Os resultados foram expressos pelo relaxamento da resposta máxima da contração (RM) pela média%  $\pm$  EPM%; “n” = número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle ( $n = 8$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak).

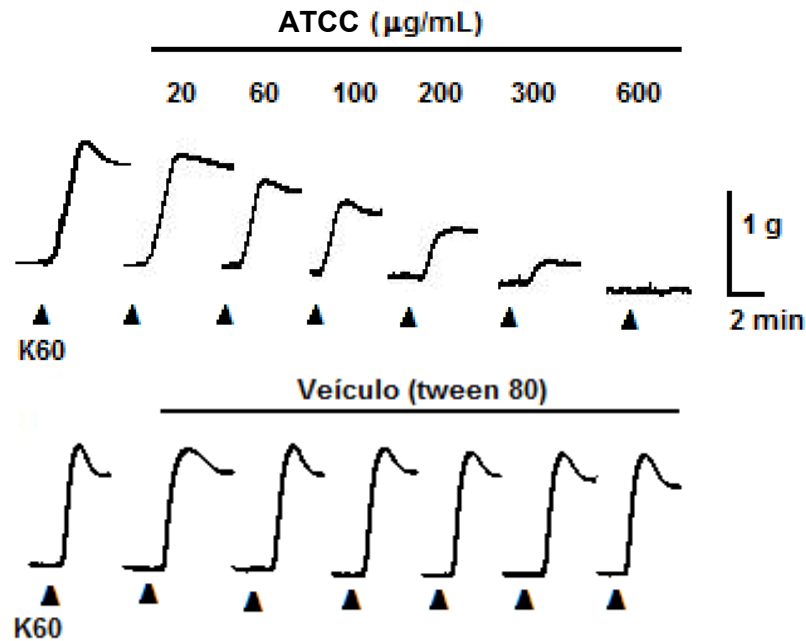
## 5.2 Efeitos de ATCC na resposta da contração sustentada e na inibição da contração induzida por $K^+$ em traquéia isolada de ratos (Série 3).

A exposição prévia das preparações traqueais, por 5 minutos, a concentrações crescentes e não cumulativas do diterpeno, no intervalo de concentração de 20 a 600  $\mu\text{g/mL}$  inibiu de forma concentração dependente as contrações induzidas por  $K^+$  60 mM (Fig. 18a). A ação inibitória do composto foi observada nos componentes fásicos e tônicos da contração ( $n = 6$ ;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak).

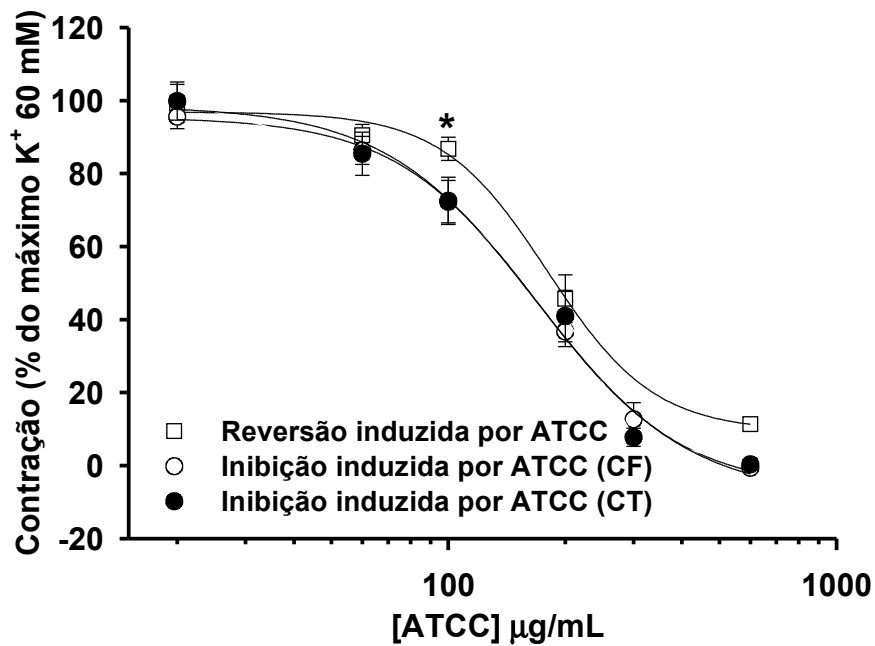
O efeito inibitório do diterpeno apresentou diferença significativa do controle (veículo) a partir da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  em ambos componentes. No entanto, não houve diferença entre as  $IC_{50}$ , quando comparados entre si, os componentes fásicos ( $IC_{50} = 170,28 \pm 8,67$ ) e tônicos ( $IC_{50} = 168,22 \pm 28,74$ ) (Fig. 18b;  $P < 0,05$ ; one-way ANOVA, Holm-Sidak).

Nos experimentos que avaliaram a ação do diterpeno na reversão da contração induzida e mantida por  $K^+$  80 mM, observou-se que entre as concentrações de 20 e 600  $\mu\text{g/mL}$ , ATCC promoveu relaxamento dependente de concentração com  $IC_{50} = 180,34 \pm 15,79 \mu\text{g/mL}$  ( $n = 7$ ) (Fig. 18b). Não foi encontrada diferença estatística entre os valores de  $IC_{50}$  dos efeitos do diterpeno nos protocolos experimentais de reversão e de inibição da resposta contrátil induzida por  $K^+$  ( $P < 0,05$ ; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

(a)



(b)



**FIGURA 18** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) na contração sustentada e na inibição da contração induzida por  $K^+$ . **a)** Traçado original representando a ação de ATCC sobre a inibição da contração induzida  $K^+$  60 mM. O símbolo “▲” representa o momento da adição de  $K^+$  60 mM após exposição com o diterpeno (20–1000  $\mu\text{g/mL}$ ) **b)** Gráfico representativo do efeito relaxantes de ATCC. Os resultados foram expressos em % da resposta máxima da contração (RM) em média  $\pm$  EPM %; “n” = número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (n = 6; two-way ANOVA, Holm-Sidak).

### 5.3 Efeitos de ATCC na inibição das contrações induzidas por ACh e 5-HT em preparações traqueais (Série 4)

ATCC (20-1000 µg/mL) promoveu inibição dependente de concentração das contrações sub-maximais induzidas por ACh (10 µM) (Fig. 19a). Essa inibição foi observada em ambos componentes contráteis, com  $IC_{50}$  de  $284,75 \pm 8,17$  µg/mL para o componente fásico e  $IC_{50} = 211,99 \pm 11,54$  µg/mL para o componente tônico, com diferença estatística significativa (Fig. 19b) ( $n = 5$ ;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

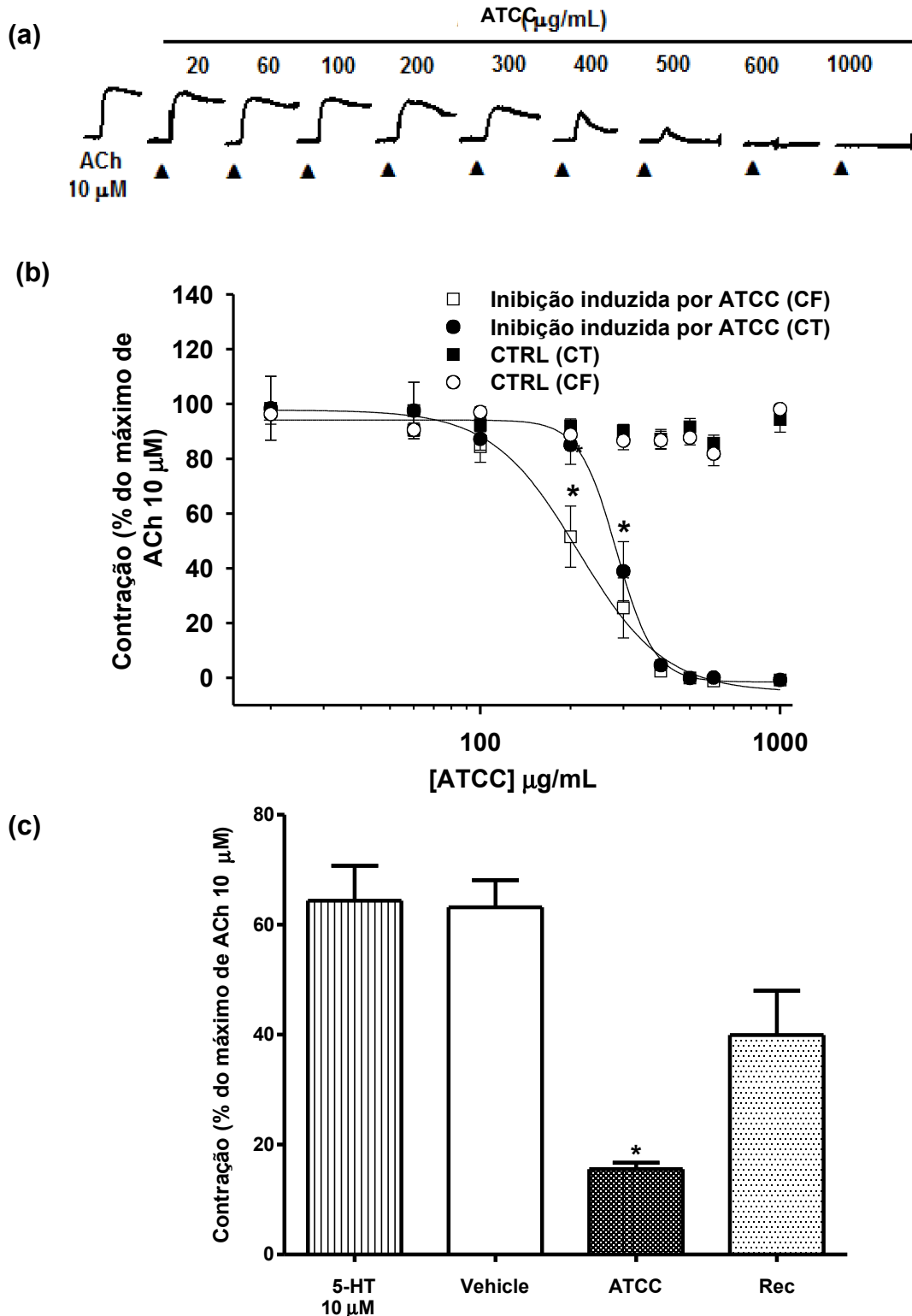
Em outras preparações experimentais, a resposta contrátil induzida por 5-HT (10 µM) correspondeu a  $64,39 \pm 6,33\%$  da contração inicial induzida por ACh (10 µM). ATCC inibiu significativamente as contrações induzidas por 5-HT ( $n = 5$ ;  $P < 0,001$ , one-way ANOVA, Holm-Sidak) para  $15,56 \pm 1,04 \%$  quando comparadas com a resposta da contração induzida por 5-HT controle na presença ( $63,15 \pm 4,96 \%$ ) e na ausência do veículo ( $64,39 \pm 6,33\%$ ) (Fig. 19c).

Os efeitos inibitórios de ATCC foram também observados nas contrações induzidas por ACh (10 µM) em presença de indometacina (2 µM), com  $IC_{50}$  de  $161,49 \pm 6,65$  µg/mL para o CF e  $91,48 \pm 4,46$  µg/mL para o CT. Em presença de montelucaste sódico (10 µM), houve bloqueio que ocorreu com  $IC_{50}$  de  $483,48 \pm 10,17$  µg/mL para o CF e  $370,93 \pm 23,18$  µg/mL para o CT (Figs. 20a e 20b). Além disso, os valores de  $IC_{50}$  dos protocolos de inibição de ATCC na contração induzida por ACh mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos realizados na presença de indometacina e montelucaste. ATCC apresentou diferença significativa, quando comparado ao veículo, a partir das concentrações de 300 µg/mL e 200 µg/mL para os componentes fásicos e tônicos, respectivamente ( $P < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak).

Para os grupos tratados com indometacina e montelucaste, os efeitos inibitórios promovidos por ATCC apresentaram diferenças significantes do controle a partir de 100 µg/mL (CF) e 60 µg/mL (CT) nos grupos pré-tratados com indometacina; e 500 µg/mL (CF) e 400 µg/mL (CT) nos grupos pré-tratados com montelucaste sódico (Figs. 20a e 20b;  $P < 0,001$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak).

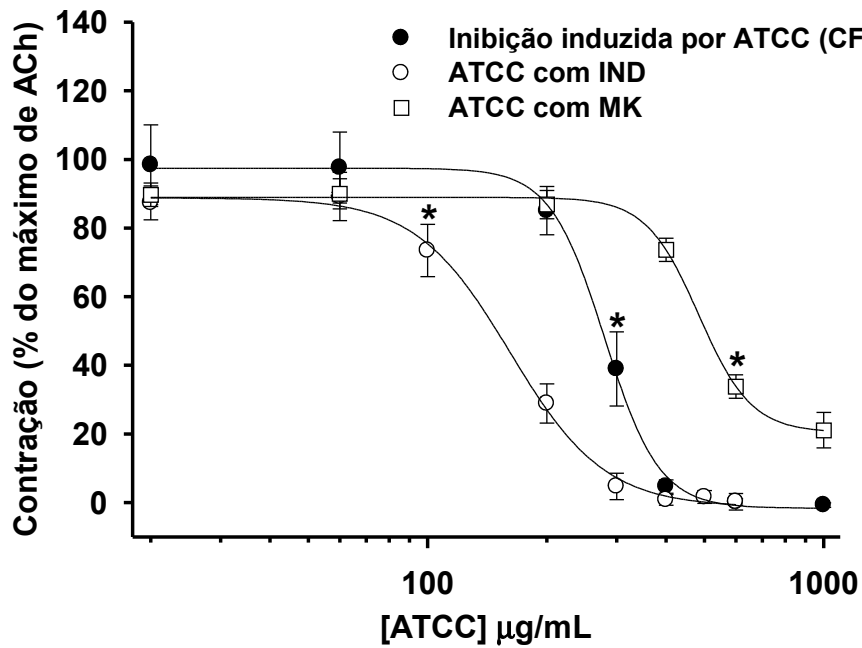
As alterações induzidas pelo ATCC, na ausência ou na presença dos inibidores, foram reversíveis após lavagens sucessivas com Tyrode modificado durante de 2 horas. Experimentos utilizando o veículo em concentrações semelhantes às usadas para dissolver ATCC, não causaram diferença na resposta contrátil induzida pela ACh (10  $\mu$ M) ( $P < 0,05$ ; one-way ANOVA, Holm-Sidak).



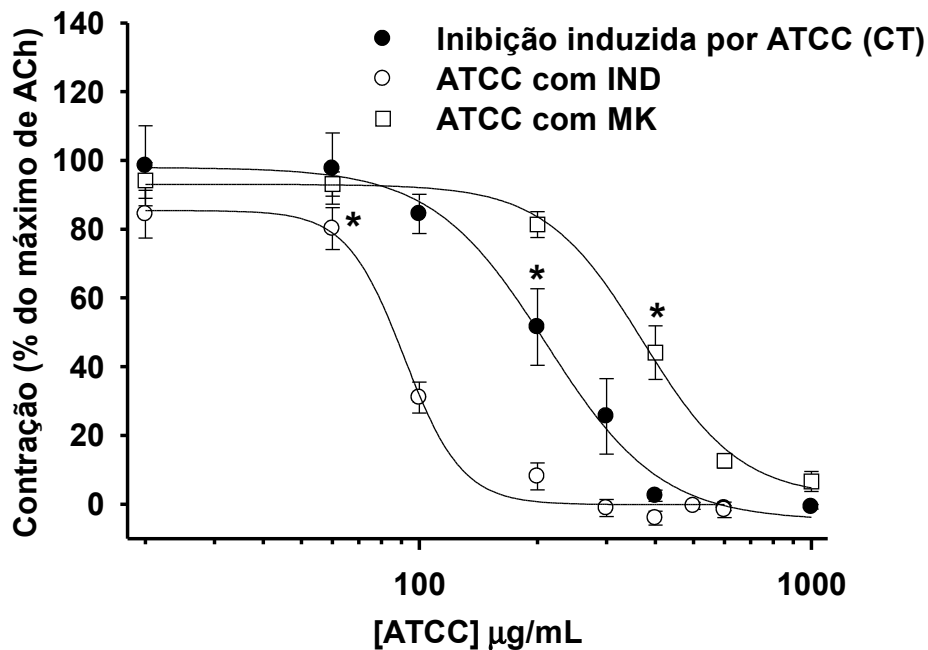


**FIGURA 19** – Efeitos do ácido *rel*-(1*S*, 4*aS*, 7*S*, 8*aS*)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4*a* dimetilfenantreno-7,8*a*-carb lactona-1-carboxílico (ATCC) sobre as contrações induzidas por ACh (10  $\mu$ M) e 5-HT (10  $\mu$ M) em traquéias de ratos **a**) Traçado original representando o efeito de ATCC (20-600  $\mu$ g/mL) na inibição da contração induzida por ACh (10  $\mu$ M). Os símbolos “▲” representam o momento da adição de ACh 10  $\mu$ M após 5 minutos de exposição ao diterpeno. **b**) Gráfico representativo do efeito relaxante produzido por ATCC nos componentes fásico (CF) e tônico (CT) da contração por ACh (10  $\mu$ M). **c**) Gráfico representando a ação de ATCC na contração induzida por 5-HT (10  $\mu$ M) em traquéias de ratos. Os resultados foram expressos em média%  $\pm$  EPM%; “n”= número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (one- (**b**) e two-way ANOVA (**c**) seguido de Holm-Sidak.

(a)



(b)



**FIGURA 20** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) (20-100 µg/mL) nas contrações induzidas por ACh (10 µM) em músculo liso traqueal de ratos em presença de indometacina (2 µM) e montelucaste (10 µM). Gráficos representativo da ação de ATCC no componente fásico (a) e tônico (b) da contração induzida por ACh 10 µM. Grupo experimental e controle (n=8). Os resultados foram expressos pelo relaxamento da resposta máxima da contração (RM) pela média% ± EPM%; “n” = número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (two-way ANOVA, Holm-Sidak).

#### **5.4 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por ACh (60 $\mu$ M) em preparações traqueais em meio nutridor 0 $\text{Ca}^{2+}$ (Série 5).**

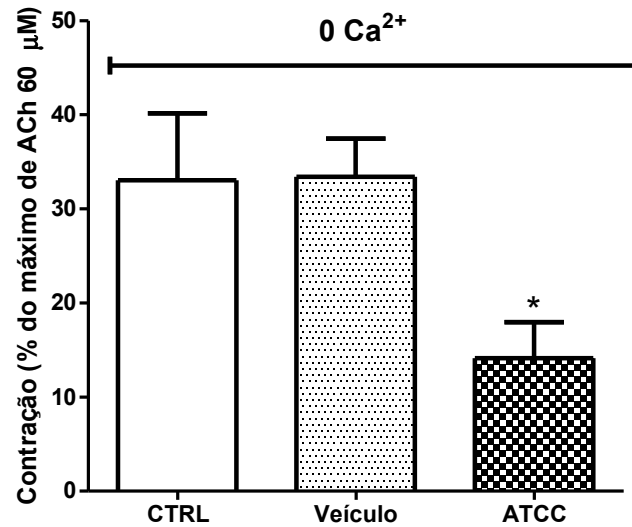
As contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em meio nutridor 0  $\text{Ca}^{2+}$  apresentaram amplitudes menores do que as respostas contráteis induzidas em Tyrode modificado, e corresponderam a  $33,05 \pm 7,12$  % da contração inicial em ACh em meio nutridor com concentração normal de  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM). A adição de ATCC (300  $\mu$ g/mL), 5 minutos antes da indução da contração por ACh (60  $\mu$ M), inibiu significativamente (Fig. 21;  $n = 8$ ;  $P < 0,05$ ; one-way ANOVA, Holm-Sidak) essas contrações para  $14,12 \pm 3,84$  % dessa contração inicial. O adição do veículo não interferiu na resposta contrátil à ACh (60  $\mu$ M).

#### **5.5 Efeitos de ATCC e nifedipina nas contrações induzidas por $\text{Ba}^{2+}$ em preparações traqueais despolarizadas com $\text{K}^+$ em meio 0 $\text{Ca}^{2+}$ (Série 6).**

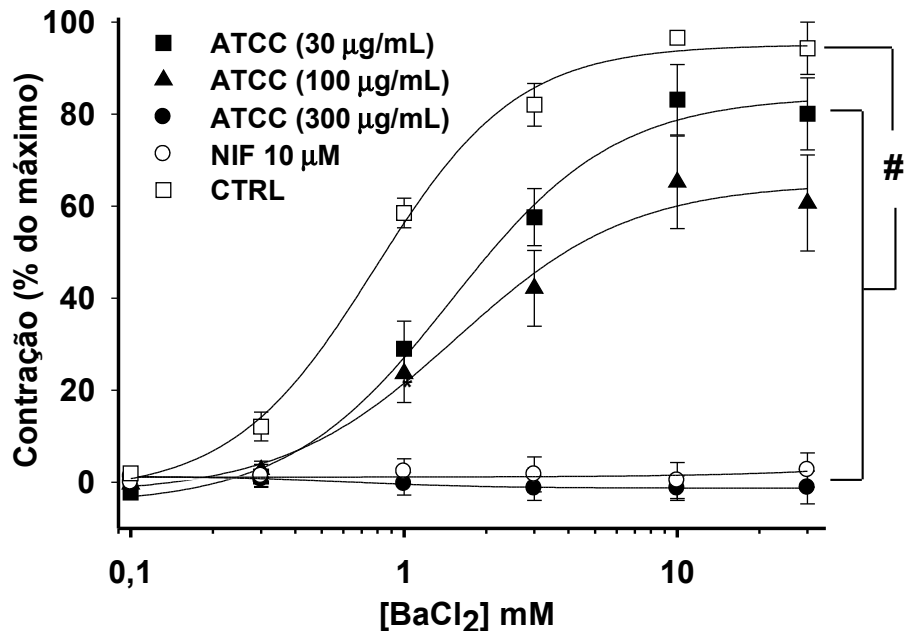
Em preparações traqueais mantidas em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$  (com 0,2 mM de EGTA) e despolarizadas com  $\text{K}^+$  60 mM, a adição, no banho de órgão, de alíquotas crescentes e cumulativas de  $\text{BaCl}_2$  (0,1-30 mM;  $n = 8$ ) induziu um aumento na resposta contrátil dependente de concentração, que se tornou significante a partir da concentração de 1 mM (Fig. 22;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

A concentração de  $\text{Ba}^{2+}$  que induziu 50% da resposta máxima foi de  $0,80 \pm 0,11$  mM. A contração em resposta a curva de  $\text{BaCl}_2$  foi significativamente inibida pela exposição prévia à ATCC (30, 100 e 300  $\mu$ g/mL,  $n = 8$ ) ou nifedipina (10  $\mu$ M,  $n = 8$ ) (Fig. 22). A resposta máxima para 30 mM de  $\text{Ba}^{2+}$  foi significativamente reduzida para  $80,05 \pm 7,84$ % (comparado ao controle:  $1,53 \pm 0,26$  g), para  $60,67 \pm 10,45$ % (comparado ao controle:  $1,39 \pm 0,29$  g), para  $1,16 \pm 3,12$ % abaixo do tônus basal (comparado ao controle:  $1,40 \pm 0,29$  g) e para  $2,66 \pm 1,37$ % (comparado ao controle:  $1,26 \pm 0,15$ g) na presença do diterpeno 30, 100, 300  $\mu$ g/mL e nifedipina (10  $\mu$ M), respectivamente.

Em todos os experimentos da série, os efeitos inibitórios do diterpeno e da nifedipina foram reversíveis após lavagens sucessivas com Tyrode modificado por um período de uma hora.



**FIGURA 21** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) nas contrações induzidas por ACh (60 μM) em traquéias de ratos em meio 0 Ca<sup>2+</sup>. Os resultados foram expressos pelo relaxamento da resposta máxima da contração (RM) em média% ± EPM%; “n” é o número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (one-way ANOVA, Holm-Sidak).

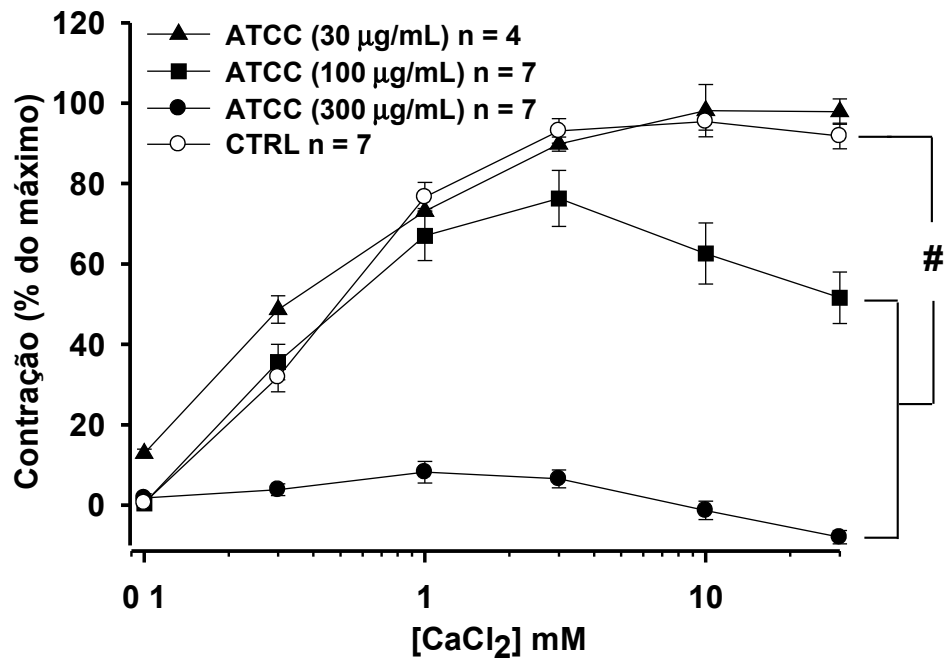


**FIGURA 22** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) e nifedipina (10 μM) nas contrações induzidas por Ba<sup>2+</sup> em traquéias despolarizadas com K<sup>+</sup> em meio 0 Ca<sup>2+</sup>. Gráfico representativo da ação de ATCC (30, 100 e 300 μg/mL) na curva de BaCl<sub>2</sub> (0,1-30 mM). Os resultados foram expressos em % da resposta máxima da contração (RM) em média% ± EPM %; “n” = número de experimentos. O símbolo # representa significância estatística para  $P < 0,05$ , das curvas em relação ao controle (n = 8; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

### **5.6 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por $\text{Ca}^{2+}$ em preparações traqueais pré-tratados com ACh em presença de nifedipina (Série 7).**

A adição crescente e cumulativa de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 – 30 mM), em preparações traqueais mantidas em meio 0  $\text{Ca}^{2+}$  com ACh (10  $\mu\text{M}$ ) e nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ), induziu contrações que apresentaram seus efeitos máximos na concentração de 10 mM. Essa curva de cálcio foi significativamente reduzida pela exposição prévia das preparações traqueais ao ATCC nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e tornaram-se estatisticamente diferentes do controle a partir das concentrações 3,0 e 0,3 mM de  $\text{CaCl}_2$ , respectivamente.

A resposta máxima ao  $\text{CaCl}_2$  10 mM foi reduzido significativamente para  $62,62 \pm 7,62 \%$  e  $1,31 \pm 1,06 \%$  (abaixo do tônus basal) em presença de ATCC 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fig. 23;  $P < 0,05$ ; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).



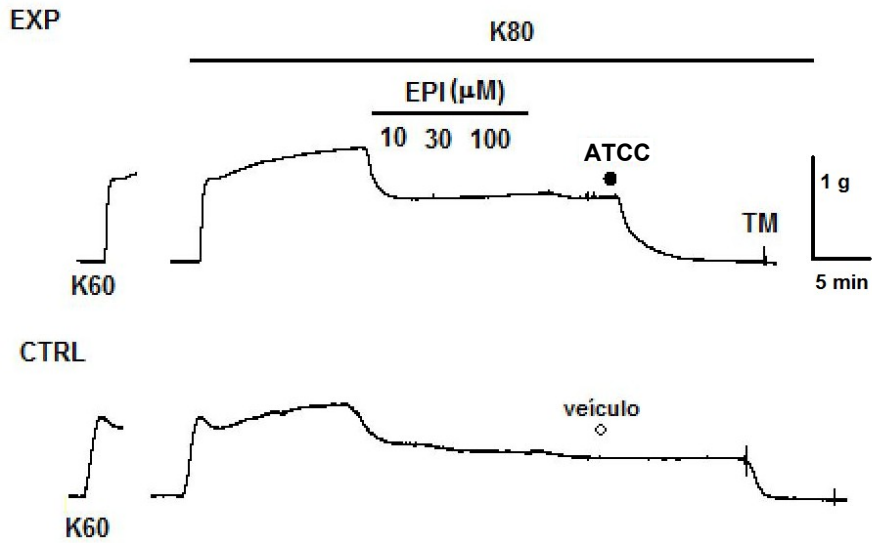
**FIGURA 23** – Efeitos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) e nas contrações induzidas por Ca<sup>2+</sup> em músculo liso traqueal em presença de ACh (10 µM) e nifedipina (10 µM). Gráfico representativo da ação de ATCC (100 e 300 µg/mL) na curva de CaCl<sub>2</sub> (0,1-30 mM). Os resultados foram expressos em % da resposta máxima da contração (RM) em média% ± EPM %; “n” = número de experimentos. O símbolo # representa significância estatística para  $P < 0,05$ , das curvas em relação ao controle (n = 7; two-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

### **5.7 Efeitos de ATCC em preparações traqueais pré-contraídas com K<sup>+</sup> em presença de altas concentrações de epinefrina (Série 8).**

Nas preparações traqueais pré-contraídas com K<sup>+</sup> 80 mM a adição de epinefrina 10, 30 e 100 µM reduziu significativamente as contrações para  $59,64 \pm 6,08$  (n = 7);  $59,04 \pm 6,81$  (n = 7) e  $65,76 \pm 7,98$  (n = 7) da contração controle, respectivamente. No entanto, não houve diferença entre as concentrações crescentes de EPI, o que indica a desensibilização dos receptores (Fig. 24b;  $P < 0,05$ ; one-way ANOVA, seguido de Holm-Sidak).

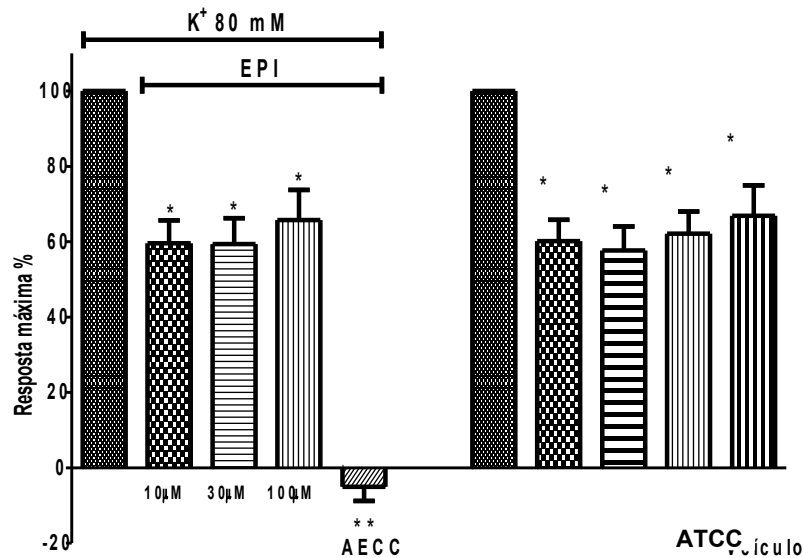
Nessas condições, a contração residual de K<sup>+</sup> 80 mM foi completamente revertida após a adição de ATCC (300 µg/mL) para  $5,02 \pm 3,72$  % abaixo do tônus basal (Figs. 24a e 24b;  $P < 0,05$ ; one way ANOVA, Holm-Sidak).

a)



Efeito do diterpeno (ICA) sobre a contração induzida e mantida por 80 mM de  $K^+$  em presença de epinefrina de forma cumulativa.

b)

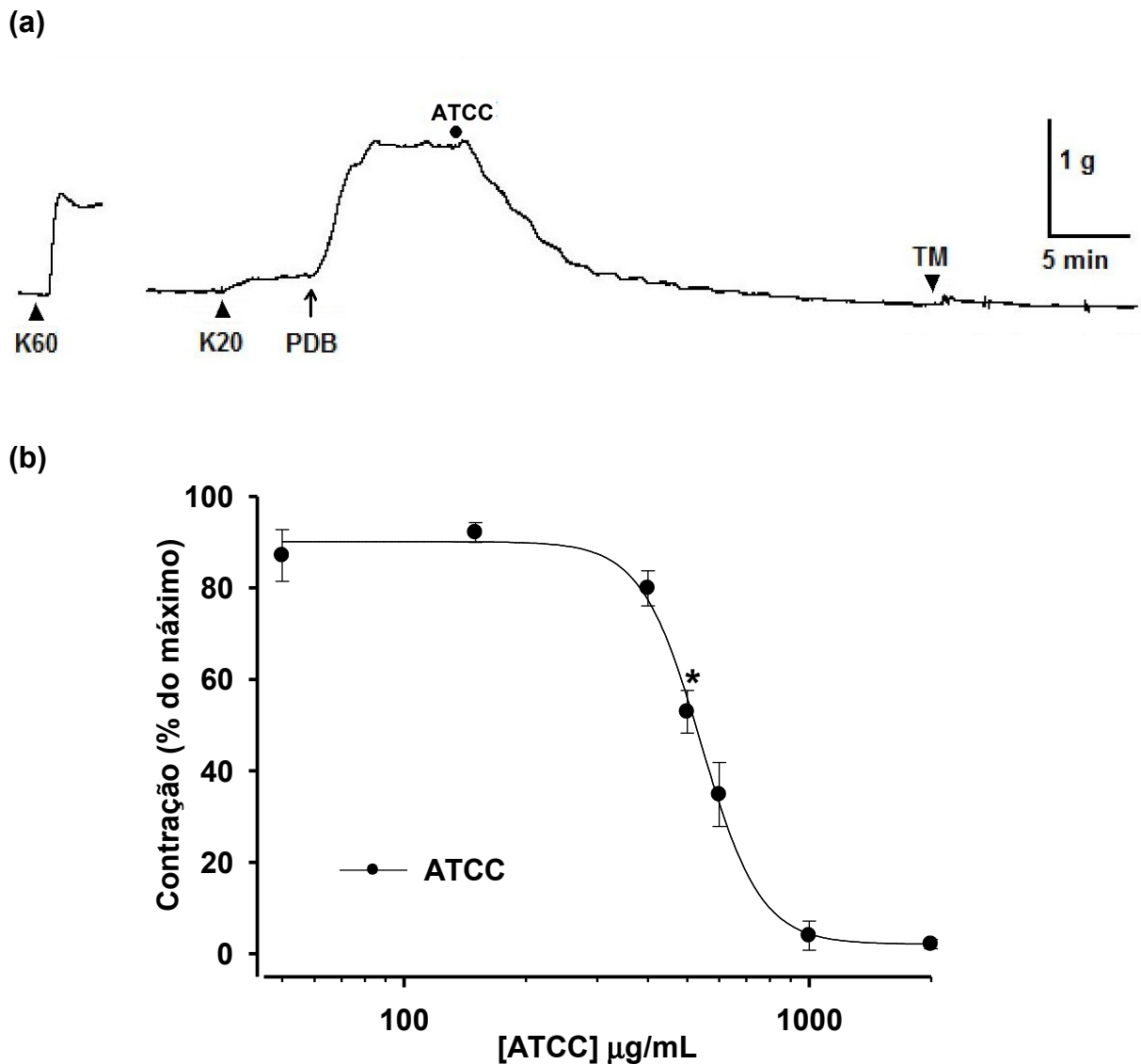


**FIGURA 24** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a contração induzida e mantida por 80 mM de  $K^+$  em presença de epinefrina (EPI).  $n = 7$  experimental;  $n = 6$  controle. **a)** Traçado original representando o efeito de ATCC (300  $\mu$ g/mL) na da contração induzida por K80 mM e adição de concentrações crescentes de EPI. Os símbolos  $\blacktriangle$  representam o momento da adição de  $K^+$  80 mM. Os círculos preto e branco representam a adição do diterpeno e do veículo, respectivamente. **b)** Gráfico representativo do efeito de ATCC na contração induzida por  $K^+$  80 mM em presença de EPI. Os resultados foram expressos pelo relaxamento da resposta máxima (RM) da contração de  $K^+$  80 mM em média%  $\pm$  EPM% e “n” o número de experimentos. O símbolo \* representa a significância em relação ao CTRL ( $P < 0,05$  one-way ANOVA, seguido de teste de Holm-Sidak).



### **5.8 Efeitos de ATCC nas contrações induzidas por dibutirato de forbol (1 $\mu$ M) e $K^+$ 20 mM em preparações traqueais isoladas (Série 9).**

Em preparações traqueais mantidas em solução de TM, o ativador de PKC dibutirato de forbol (1  $\mu$ M) juntamente com  $K^+$  20 mM induz uma lenta e sustentada contração. Quanto essa contração atingiu o platô, o ATCC (50-2000  $\mu$ g/mL) foi adicionado, promovendo um relaxamento dependente de concentração com valor de  $IC_{50} = 540,37 \pm 13,28$   $\mu$ g/mL. Esse efeito máximo correspondeu a  $2,13 \pm 1,03$  % ( $n = 6$ ) da amplitude máxima. Os efeitos relaxantes de ATCC tornaram-se significantes a partir da concentração de 500  $\mu$ g/mL (Figs. 25a e 25b) ( $P < 0,05$ ; two-way ANOVA, Holm-Sidak). Qualquer alteração causada pela adição diterpeno ao banho foi reversível após lavagens sucessivas com TM durante 1 hora.



**FIGURA 25** – Efeito do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) sobre a contração induzida e mantida por 20 mM de K<sup>+</sup> e dibutirato de forbol (PDB) 1 µM. **(a)** Traçado original e gráfico **(b)** representando o efeito de ATCC (1000 µg/mL) na contração induzida por K20 mM e PDB 1 µM. Os “▲” indicam o momento da adição de k60 ou K20 mM. O símbolo “●” indica o momento da adição do diterpeno; “↑” indica o momento da adição de PDB e “▼” o momento da lavagem com Tyrode. Os resultados foram expressos em % da resposta máxima da contração (RM) em média% ± EPM%; n = número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (two-way ANOVA, seguido de Holm-Sidak).

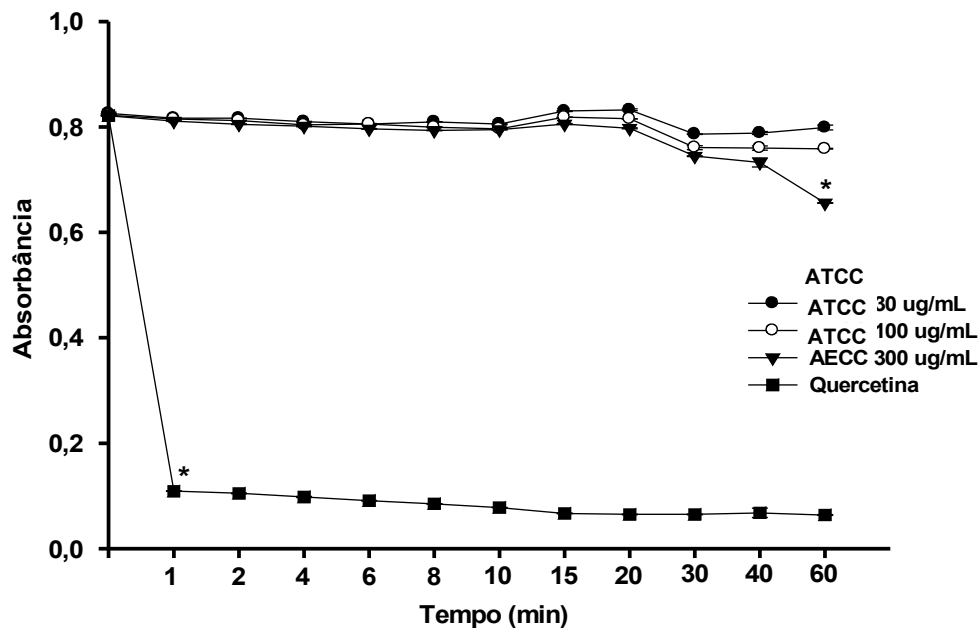
### 5.9 Atividade antioxidante de ATCC pelo método de captura de radical livre DPPH

O diterpeno exposto em diferentes tempos (1-60 minutos) ao radical livre DPPH, em todas as concentrações testadas, apresentou um baixo índice de varredura quando comparado com o padrão quercetina (Fig. 26). Os dados estão resumidos na tabela 1.

**TABELA 1** – Índices varredores da atividade antioxidante de ATCC frente ao radical DPPH.

Amostra	IV%
ATCC 30 µg/mL	3,80 ± 0,90
ATCC 10 µg/mL	8,66 ± 0,04
ATCC 300 µg/mL	21,03 ± 0,20
Quercetina	92,26 ± 0,64

Atividade antioxidante de AECC em presença do radical livre DPPH



**FIGURA 26** – Atividade antioxidante do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1-carboxílico (ATCC) pelo método de captura de radical livre DPPH. Gráfico representando a atividade antioxidante de ATCC (30, 100 e 300 µg/mL) comparado ao padrão quercetina. Os resultados foram expressos em média absorbância% ± EPM%; “n”= número de experimentos. O símbolo \* representa significância estatística para  $P < 0,05$ , em relação ao controle (two-way ANOVA, seguido de Holm-Sidak).

## 6 DISCUSSÃO

---

O presente estudo demonstrou que ATCC induziu em preparações traqueais, efeitos relaxantes e antiespasmódicos. Com nossos resultados foi possível observar que ATCC relaxou significativamente o tônus basal e inibiu as contrações induzidas por estimulação elétrica. Esses efeitos inibitórios mostraram ação em ambos os acoplamentos, eletro- e farmacomecânico, com diferentes valores de  $EC_{50}$ , o que suporta a hipótese de que existam diferentes mecanismos de ação envolvidos na atividade antiespasmódica do ATCC sobre o MLT. É importante salientar, que esse é o primeiro estudo que relata os efeitos farmacológicos do ácido *rel*-(1S, 4aS, 7S, 8aS)-7-(1-vinil)-tetradecahidro-1,4a-dimetilfenantreno-7,8a-carbolactona-1, uma substância nova isolada de *C. argyrophyloides*, em sistemas biológicos, em especial o músculo liso traqueal, sendo esse trabalho, portanto, inédito.

O diterpeno relaxou o tônus basal espontâneo com  $EC_{50}$  de  $98,96 \pm 27,76$   $\mu\text{g/mL}$ . Embasando-se neste dado, pesquisou-se o efeito espasmolítico do ATCC em vários tipos de atividade contrátil.

O diterpeno bloqueou as contrações decorrentes da estimulação de campo elétrico (ECE) de forma concentração dependente ( $IC_{50}$  de  $247,73 \pm 9,99$   $\mu\text{g/mL}$ ). As contrações induzidas por ECE foram bloqueadas pelo antagonista muscarínico atropina e pelo bloqueador neural lidocaína (Dados não mostrados). Nessas condições, a contração induzida por ECE em preparação de músculo liso estimuladas por campo elétrico com pulsos de duração curta (0,5 ms) se deve principalmente à estimulação colinérgica pós-ganglionar e liberação de ACh (NAGTEGAAL *et al.*, 1995; LECCI *et al.*, 2004). O ATCC inibiu também o tônus alterado com  $K^+$  80 mM ( $IC_{50}$ :  $180.34 \pm 15.79$   $\mu\text{g/mL}$ ). Essas diferentes  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  sugerem que, pelo menos no músculo liso da traquéia, diferentes mecanismos modulam o relaxamento e/ou inibição do tônus basal, da contração induzida por estimulação elétrica e do tônus modificado por altas concentrações de  $K^+$ .

Baseado no bloqueio da contração induzida por  $K^+$  80 mM, hipotetizou-se que o efeito inibitório do diterpeno no acoplamento eletromecânico estivesse associado a inibição dos VOCCs. O bloqueio das contrações em resposta a concentrações crescentes e cumulativas de  $BaCl_2$  (0,1-30 mM) em meio 0  $Ca^{2+}$  em

presença e  $K^+$  alto (60 mM) é coerente com esta hipótese. Sabe-se que o cátion  $Ba^{2+}$  é um íon que tem seletividade em atravessar a membrana através dos VOCCs, permeando muito pouco os ROCCs (MURRAY & KOTLIKOFF, 1991). Outros diterpenos cauranos também apresentam atividades relaxantes e antiespasmódicas em outras preparações de músculo liso através do bloqueio de VOCCs (AMBROSIO *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 2003). Em estudos realizados com outro diterpeno caurano (ácido caurenóico) na contratilidade de aorta (TIRAPELLI *et al.*, 2004) e do músculo uterino (DE ALENCAR CUNHA *et al.*, 2003) está relatado o potente efeito antiespasmódico daquele agente, cuja causa foi atribuída à inibição do influxo de cálcio do meio extracelular por bloqueio dos canais VOCCs.

Para avaliar a ação do ATCC no acoplamento farmacomecânico, primeiramente, analisamos os efeitos de ATCC no influxo de cálcio através dos ROCCs. Para isso, foram realizados experimentos em presença de nifedipina (para remoção da influência dos VOCCs), de ACh (para ativação dos ROCCs) e de TM inicialmente isenta de cálcio, em seguida, foram induzidas contrações pela adição de  $CaCl_2$  (0,1-30 mM) cumulativamente, o ATCC foi capaz de inibir as contrações nessas condições. Esses dados sugerem que a atividade antiespasmódica de ATCC também seja mediada parcialmente pela diminuição da entrada de  $Ca^{2+}$  através dos ROCCs. Observou-se, contudo, que enquanto a concentração de 300  $\mu g/mL$  de ATCC bloqueia totalmente a resposta máxima da adição de  $Ba^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  em ambos os protocolos para verificar atuação em VOCCs e ROCCs, respectivamente, 100  $\mu g/mL$  de ATCC bloqueia apenas parcialmente as respostas nesses protocolos. Esse dado, que sugere potência similar de atuação em ambos os protocolos, também sugerem a possibilidade de o ATCC estar atuando no acoplamento excitação contração em etapa distal ao influxo de  $Ca^{2+}$  do meio extra para o meio intracelular.

Nossos resultados demonstraram que ATCC foi mais potente em inibir as contrações induzidas por ACh em seu componente tônico (CT) ( $IC_{50} = 211,99 \pm 11,54 \mu g/mL$ ) quando comparado com seu componente fásico (CF) ( $IC_{50} = 284,75 \pm 8,17 \mu g/mL$ ). Sabe-se que a contração induzida por agonistas muscarínicos tem caráter principalmente farmacomecânico (ou seja, independente de alterações nos potenciais transmembrana) (SOMLYO & SOMLYO, 1968; COBURN & BARON, 1990) e que o componente fásico tem sido atribuído à liberação de cálcio dos estoques do retículo sarcoplasmático, especialmente induzido por  $IP_3$ . Já o

componente tônico é caracterizado pela entrada de cálcio via sarcolemal, resultante do influxo de cálcio insensível a diidropiridina, através dos canais operados por receptor (ROCCs) (CUTHBERT *et al.*, 1994) e pelos VOCCs (ZHOU *et al.*, 2008). A comparação entre as IC<sub>50</sub> para bloqueio dos componentes fásico e tônico permite a conjectura de bloqueio de VOCCs e ROCCs na membrana sarcoplasmática, visto que o influxo de Ca<sup>2+</sup> do meio extracelular nas contrações induzidas por ACh tem importante participação na manutenção do componente contrátil sustentado (CT) (CUTHBERT *et al.*, 1994). Adicionalmente, ainda comparando os valores de IC<sub>50</sub>, demonstramos experimentalmente que ATCC apresentou potência significativamente maior em inibir o acoplamento eletromecânico (K<sup>+</sup>) quando comparadas com o CF e CT da via farmacomecânica (ACh), reforçando a proposta da ação inibitória de ATCC nos mecanismos contráteis dependentes de despolarização.

Quando comparados, os valores de IC<sub>50</sub> do bloqueio de ATCC nas contrações induzidas por estímulo de campo elétrico (IC<sub>50</sub> = 247,73 ± 9,99 µg/mL) estão mais próximos da IC<sub>50</sub> para bloqueio do CF das contrações evocadas por ACh do que do correspondente valor para bloqueio da contração induzida por K<sup>+</sup>. Este fato está em coerência com o fato do estímulo elétrico com pulsos de duração de 0,5 ms requerer liberação de ACh dos neurônios e/ou terminações intramurais para produção da contração.

Para avaliar a possível participação da via adrenérgica no mecanismo de ATCC, foi realizada uma série experimental em presença de epinefrina, um agonista β-adrenérgico administrado como broncodilatador (HIROTA *et al.*, 2003). Após a dessensibilização dos receptores e adição do diterpeno (300 µg/mL) observou-se que o composto aboliu completamente a contração. Com isso, excluiu-se a possibilidade de um mecanismo adrenérgico como uma via pela qual o diterpeno pudesse agir induzindo relaxamento. Corroborando nossos resultados, as pesquisas realizadas por Tirapelli e colaboradores (2004) sugeriram que o ácido caurenóico pudesse agir através de mecanismos independentes de receptores β<sub>2</sub>-adrenérgicos em outras preparações de músculo liso.

ATCC foi capaz de interferir ainda no acoplamento farmacomecânico inibindo as contrações induzidas por serotonina (10 µM). Essa ação inibitória de ATCC poderia ser considerada, em parte, a um bloqueio dos canais do RS ativados por IP<sub>3</sub>. A hipótese dessa interferência intracelular é reforçada pelo bloqueio

significante no componente fásico do acoplamento farmacomecânico, onde o cálcio liberado é principalmente mediado pelo  $IP_3$  (Pelaia *et al.*, 2008). Para investigar a veracidade de tal hipótese, foram realizados protocolos experimentais em solução nutritora adicionada de EGTA e isenta de  $Ca^{2+}$ . Dessa forma o desenvolvimento da força contrátil registrada deve ser resultante apenas da ativação dos canais de cálcio sensíveis ao  $IP_3$ . De fato, muitos estudos relatam que as contrações evocadas por agonista no músculo liso das vias aéreas aparentemente não são afetadas sob condições em que o influxo de cálcio voltagem-dependente é prevenido pela remoção do cálcio extracelular (JANSSEN, 2002; FARLEY & MILES, 1978).

Experimentalmente, as contrações evocadas por ACh em meio 0  $Ca^{2+}$  corresponderam cerca de  $33,05 \pm 7,12$  % das contrações evocadas em meio nutritor normal (TM). Quando exposto previamente ao diterpeno caurano (300  $\mu\text{g/mL}$ ), esses valores foram reduzidos para  $14,12 \pm 3,84$  % da contração controle (TM), resultado que concorda com a sugestão de um mecanismo intracelular pelo qual o diterpeno possa agir em parte inibindo a contração no que se refere a liberação de cálcio do RS mediada por  $IP_3$ .

Dando continuidade a investigação das vias de atuação intracelular do diterpeno, foi avaliado o efeito de ATCC no componente de contração de sensibilidade ao cálcio, mais precisamente na via de sinalização do PKC. Para isso, realizamos um protocolo experimental na qual foi induzida uma contração com  $K^+$  20 mM e PDB, um potente e específico ativador de PKC, em meio nutritor com cálcio (2 mM). O PDB promoveu grande amplificação da resposta contrátil a 20 mM de  $K^+$ . ATCC relaxou de forma concentração dependente essas contrações amplificadas pelo PDB com  $IC_{50}$  ( $540,37 \pm 13,28$   $\mu\text{g/mL}$ ) maior do que todas as outras encontradas. Esse dado sugere que a causa da amplificação da resposta contrátil pelo PDB é um mecanismo diferente daqueles das contrações induzida por altas  $K^+$  e por outros por agonistas como ACh e serotonina. O dado sugere também que o ATCC é capaz de relaxar uma contração induzida por esse mecanismo, embora com menor potência farmacológica. Existe uma série de evidências disponíveis na literatura sugerindo que o alvo celular para os ésteres de forbol é a PKC, o que produz aumento da sensibilidade dos elementos contráteis ao  $Ca^{2+}$  (DRUMMOND & HUGHES, 1987; SOMLYO & SOMLYO, 1994; 2000). Além disso, a contração induzida pelo PDB é independente da liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares

(ORTON *et al.*, 1990; SAVINEAU *et al.*, 1991). Em nosso estudo ocorreu em uma condição na qual a concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  foi normal (2 mM) e a adição de  $\text{K}^+$  20 mM permitiu que houvesse um aumento do influxo de cálcio do meio externo. Nesse caso, é admissível que se proponha outro mecanismo de ação do composto, embora essa via não pareça ser a mais importante para explicar o mecanismo de ATCC. Assim, o relaxamento quase completo provocado por ATCC para apenas  $2,13 \pm 1,03$  % da contração inicial mantida por PDB 1  $\mu\text{M}$  e  $\text{K}^+$  20 mM, provavelmente se deve a uma atuação na etapa que envolve a PKC ou etapa anterior (em relação a sequência de eventos), o que está de acordo com a hipótese de ação intracelular. Qualquer possibilidade de que o relaxamento da contração mantida pelo éster de forbol seja devido a um declínio natural da preparação é improvável, pois a comparação do curso temporal da resposta contrátil ao PDB na ausência e presença de ATCC mostrou-se estatisticamente significativa na comparação em todos os tempos arrolados.

Um dado interessante deste estudo é que a indometacina, um bloqueador da COX (BALZARY, & COCKS, 2006), aumentou a potência farmacológica do efeito antiespasmódico do ATCC e o montelucaste, um bloqueador da lipooxigenase (WALIA *et al.*, 2006), a diminuiu. Sabe-se que o epitélio traqueal, bem como outros tecidos residentes na traquéia, sintetiza derivados do ácido araquidônico que modulam a contratilidade do músculo liso da traquéia. Os derivados do ácido araquidônico pela via da ciclooxigenase são principalmente prostaglandinas (BERGSTRON *et al.*, 1964) e pela via da lipooxigenase são principalmente os leucotrienos (WALIA *et al.*, 2006). Os dados desse estudo mostraram que a indometacina e o montelucaste interferiram com efeitos opostos sobre a potência farmacológica do ATCC, sugerindo, então, que os derivados do ácido araquidônico, endogenamente sintetizados por essas duas vias metabólicas, têm efeitos modulatórios opostos sobre importantes mecanismos da contratilidade do MLT, quais sejam aqueles inibidos pelo ATCC.



## 7 CONCLUSÃO

---

- ✓ É possível concluir, portanto, que ATCC possui ação relaxante e antiespasmódica em preparações de músculo liso traqueal *in vitro*.
- ✓ Sugerimos que ATCC atue por meio de diferentes mecanismos, tendo em vista a capacidade de inibir os acoplamentos eletro e farmacomecânicos, e os diferentes valores de IC<sub>50</sub> encontrados.
- ✓ Sugerimos que a ação antiespasmódica de ATCC no músculo liso traqueal seja, em parte, atribuída à inibição do influxo de cálcio extracelular por VOCCs e ROCCs de membrana.
- ✓ Adicionalmente, propomos que o diterpeno atue intracelularmente, envolvido no bloqueio de receptores de IP<sub>3</sub> e agindo de forma menos potente no mecanismo de sensibilização ao cálcio. A ação inibitória de ATCC parece ser independente da via adrenérgica.
- ✓ É possível sugerir também que derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), endogenamente sintetizados, têm efeitos modulatórios opostos sobre importantes mecanismos da contratilidade do MLT, quais sejam aqueles inibidos pelo ATCC.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Science**, v. 45, n. 9, p. 757-786, 1989.

ALBERT, A. P.; LARGE, W. A. Store-operated  $Ca^{2+}$ -permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 345-356, 2003.

ALBUQUERQUE, A.A.C.; SORENSON, A.L.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole in skeletal muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 41- 49.1995.

AMARAL, A. C. F.; BARNES, R. A. A tetrahydroprotoberberine alkaloid from *Croton hemiargyreus*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 445-447, 1998.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; DA COSTA, F. B.; DE OLIVEIRA, A. M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, n. 10, p. 925–933, 2006.

AMRANI, Y.; PANETTIERI, R. A. Airway smooth muscle: contraction and beyond. **The International Journal of Biochemistry & Biology**, v.35, n. 3, p.272-276, 2003.

BAI, T. R.; BATES, J. H. T.; BRUSASCO, V.; CAMORETTI-MERCADO, B.; CHITANO, P.; DENG, L. H.; DOWELL, M.; FABRY, B.; FORD, L. E.; FREDBERG, J. J.; GERTHOFFER, W. T.; GILBERT, S. H.; GUNST, S. J.; HAI, C.M.; HALAYKO, A. J.; HIRST, S. J.; JAMES, A. L.; JANSSEN, L. J.; JONES, K. A.; KING, G. G.; LAKSER, O. J.; LAMBERT, R. K.; LAUZON, A. M., LUTCHEN, K. R.; MAKSYM, G.N.; MEISS, R. A.; MIJAILOVICH, S.M.; MITCHELL, H. W.; MITCHELL, R. W.; MITZNER, W.; MURPHY, T. M.; PARE, P. D.; SCHELLENBERG, R. R.; SEOW, C. Y.; SIECK, G. C.; SMITH, P. G.; SMOLENSKY, A. V.; SOLWAY, J.; STEPHENS, N. L.; STEWART, A. G.; TANG, D. D.; WANG, L. On the terminology for describing the length-force relationship and its changes in airway smooth muscle. **Journal of Applied Physiology**, n. 97, n. 6, p. 2029–2034, 2004.

BALEMBA, O. B.; BARTOO, A. C.; NELSON, M. T.; MAWE, G. M. Role of mitochondria in spontaneous rhythmic activity and intracellular calcium waves in the guinea pig gallbladder smooth muscle. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, n. 2, p. G467-G473, 2008.

BARBOSA, P. S.; ABREU, A. S.; BATISTA, E. F.; GUILHON, G. M. S. P.; MÜLLER, A. H.; ARRUDA, M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, A. C.; SECCO, R. S. Glutarimide alkaloids and terpenoids from *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 887-90, 2007.

- BAZÁN-PERKINS, B.; CARBAJAL, V.; SOMMER, B.; MACÍAS-SILVA, M.; GONZALEZ-MARTINEZ, M.; VALENZUELA, F.; DANIEL, E. E.; MONTAÑO, L. M. Involvement of different  $Ca^{2+}$  pools during the canine bronchial sustained contraction in  $Ca^{2+}$ -free medium: lack of effect of PKC inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, n. 5, p. 567–573, 1998.
- BEECH, D. J.; MURAKI, K.; FLEMMING, R. Non-selective cationic channel of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. **The Journal of Physiology**, v. 559, n. 3, p. 685-706, 2000.
- BENHAM, C. D.; TSIEN, R. W. Calcium-permeable channels in vascular smooth muscle: voltage-activated, receptor-operated and leak channels. **Society of General Physiologists Series**, v. 42, p. 45–64, 1987.
- BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Fisiologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, n. 4, p. 517-529, 2003.
- BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 2, doi: 10.1186/1465-9921-4-2, 2003.
- BOLTON, T. B. Mechanisms of action of neurotransmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v.59, p. 606-718, 1979.
- BOUSHEY, H. A.; M. J.; HOLTZMAN, J. A.; SHELLER, NADEL J. A. State of the art: bronchial hyperreactivity. **American Review of Respiratory Disease**, n. 121, p. 389-413, 1980.
- CANUTO, K. M. Efeito **Antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial do Croton Argyrophyloides Muell. Arg.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- CATTERAL, W. A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 493-53,1995.
- CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. Atividade Antioxidante de Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste do Brasil. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 4, n. 2, p. 23-29, 2002.
- CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia Humana de Houssay**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- CLAPHAM, D. E.; RUNNELS, L. W.; STRUBING, C. The TRP ion channel family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 387-396, 2001.

COBURN, R. F.; BARON, C. B. Coupling mechanisms in airway smooth muscle. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 258, p. L119–L133. 1990.

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

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, Fortaleza.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 3, p. 189-194, 1998.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L. The essential oil of *Croton adenocalyx* A.DC. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, p. 145-146, 1990.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: UFC, 1981, 210p.

CRIMI E.; MILANESE M.; PINGFANG S.; BRUSASCO V. Allergic inflammation and airway smooth muscle function **Science of the Total Environment**, v. 270, n. 1-3, 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 - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 266, p. L620-L627. 1994.

DE ALENCAR-CUNHA, K. M.; PAIVA, L. A. F., SANTOS, F. A., GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V. S. N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorfii* on rat uterus *in vitro*. **Phytotherapy Research** n. 17, p. 320-324, 2003.

DIAS, B. F. S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** 1 ed. Campinas: André Tosello, 1996, 10p.

DRUMMOND, H. H.; HUGHES, P. J. The interaction of natural products with cellular signaling mechanisms. **Phytotherapy research**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 1987.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; REYES-PEREZ, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER,

L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels, **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 365-368, 2000.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A.; DOS SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 515-22. 2007.

FARLEY, J. M.; MILES, P. R. The sources of calcium for acetylcholine-induced contractions of dog tracheal smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 207, n. 2, p. 340-346, 1978.

FEREZ D. **Fisiologia Respiratória**. Disponível em: [http://www.unifesp.br/dcir/anestesia/fisio\\_resp.pdf](http://www.unifesp.br/dcir/anestesia/fisio_resp.pdf), acessado em 12 de maio de 2008.

FOLKERTS, G.; NIJKAMP, F.P. Airway epithelium: more than just a barrier! **Trends in Pharmacological Science**, v. 19, n. 8, p. 334-341, 1998.

FOSKETT, J. K.; WHITE, C.; KING-HO, C.; MAK, D.-O. D. Inositol trisphosphate receptor  $Ca^{2+}$  release channels. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 593-658, 2007.

FRY, C. H.; SUI, G.; WU, C. T-type  $Ca^{2+}$  channels in no-vascular smooth muscles. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p. 231-239, 2006.

GERTHOFFER, W. T.; MURPHEY, K. A.; MANGINI, J.; BOMAN, S.; LATTANZIO, JR, F. A. Myosin phosphorylation and calcium in tonic and fasic contractions of colonic smooth muscle. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 260, n. 6, p.G958-G964, 1991.

GONG, C.; XIN-WEI, R., TE-PEI, F. Block of induction and maintenance of calcium-induced LTP by inhibition of protein kinase C in postsynaptic neuron in hippocampal CA1 region. **Brain Research**, v. 646, n. 2, p. 230-234, 1994.

GUIBERT, C.; DUCRET, T.; SAVINEAU, J. P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 98, n. 1, p. 10-23, 2008.

GUNST S. J.; TANG D. D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. **European Respiratory Journal**, v. 15, n. 3, p. 600-616, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 413-415, 2002.

HILGERS, R.H.P.; WEBB, R.C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230 n. 11, 829-935, 2005.

HIMURA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M.; NUNES, D. S.; SOUZA-BRITO, A. R. M. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton*

*cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HIROTA, K.; HASHIBA, E.; YOSHIOKA, H.; KABARA, S., MATSUKI, A. Effects of three different L-type  $\text{Ca}^{2+}$  entry blockers on airway constriction induced by muscarinic receptor stimulation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 90, n. 5, p. 671-675, 2003.

JANSSEN, L. J. Ionic mechanisms and  $\text{Ca}^{2+}$  regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.282, n. 1-4, p. L1161-L1178, 2002.

JANSSEN, L. J.; NANA, R.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase mediates rhythmic spontaneous relaxations in canine airway smooth muscles. **Respiration Physiology**, v. 108, n. 2, p. 187-194, 1997.

JANSSEN, L. J.; PREMJI, M.; LU-CHAO, H.; COX, G.; KESHAVJEE, S.  $\text{NO}^+$  but not NO radical relaxes airway smooth muscle via cGMP-independent release of internal  $\text{Ca}^{2+}$ . **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v.278, n. 5, p. 899-905, 2000.

JANSSEN, L. J.; WATTIE, J. Non-neurogenic electrically evoked relaxation in canine airway smooth muscle involves action of free radical on  $\text{K}^+$  channels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.279, n. 2, p. 813-821, 1996.

JUCÁ, D. M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno no músculo liso gastrintestinal de ratos: efeito miorelaxante e pró-cinético**. 2007. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

KIRKPATRICK, C. T.; JENKINSON, H. A.; CAMERON, A. R. Interaction between drugs and potassium-rich solutions in producing contraction in bovine tracheal smooth muscle: studies in normal and calcium-depleted tissues. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 2, n. 6, p. 559–570, 1975.

KNOT, H.; BRAYDEN, J.; NELSON, M. Calcium channels and potassium channel. In: BARANY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction. New York: **Academic Press**, v. 16. p. 203-219, 1996.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic  $\text{Ca}^{+2}$ -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-triphosphate in pharmacomechanical coupling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 30, p. 17997-18004, 1989.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; ITOH, T.; INOVE, R. Physiological Features of Visceral Smooth Muscle Cells, with special reference to receptors and Ion channels. **Physiological Reviews**. v. 78, n. 3, p. 811-920, 1998.

LEAL, L. K. A.M.; NECHIO, M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; FONTENELE, J. B.; RIBEIRO, R. A.; VIANA, G. S. B. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant

activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 335-340, 2003.

LEAL, L. K. A. M.; COSTA, M. F.; PITOMBEIRA, M.; BARROSO, V. M.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Science**, v. 79, n. 1, p. 98-104, 2006.

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, 1999.

LEMO, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO A. A.; BARBOSA, R. C. S. B.; LIMA, E. O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, n. 2, p. 266-268, 1992.

LENCINA, C.; PIRES, V. S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Ball. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 89-93, 2001.

MACARI, P. A. T.; SOUSA, R.R.; CRESPO, M. L. L.; MARTINS, P. A.; VIEIRA, J. D. D.; VELOSA, A. C.; FÁVERO, O.; GOMES, E. P. C. Comparação entre os metais presentes em *Croton floribundus* Spreng. e *Baccharis dracunculifolia* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 76-77, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; ARRUDA, A. C.; PAMPLONA, S. G. S. R.; VANDERLINDE, F. A.; LAPA, A. J.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N. F.; COLUS, I. M. S.; FARIAS, R. A. F.; LUNA-COSTA, A. M.; RAO V. S. N. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 41-55, 2000.

MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. A. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 5, p. 539-546, 2004.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; VASCONCELOS-DOS-SANTOS, M. A.; PRADINES, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 874-877, 2003.

MARTHAN, R. Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle. **American Journal of Physiology - Lung Cell and Molecular Physiology**, n. 286, n. 5, p. L907-L908, 2004.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais** - Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil, 2 ed: Imprensa universitária da UFC, Fortaleza. 2000, 345p.



McCARRON, J. G.; BRADLEY, K. N.; MACMILLAN, D.; CHALMERS, S.; MUIR, T. C. The sarcoplasmic reticulum, Ca<sup>2+</sup> trapping, and wave mechanisms in smooth muscle, **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 3, p. 138-147, 2004.

MENDES-MAIA, P. V. **Efeitos do óleo essencial de *Croton sonderianus* sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de ratos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

MONTE, F. J. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste -*Croton Argyrophylloides* Muell. Arg.** 1980. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS-NETO, J. S.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J. H. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

MORAIS, S. M.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

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

MOURA C. T. M. **Participação dos canais de cálcio na hiperreatividade induzida por ovoalbumina em traquéias isoladas de ratos**. 2004. Tese (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MÜLLER S., TIRAPELLI C.R., DE OLIVEIRA A.M., MURILO R., CASTRO V., MERFORT I. Studies of ent-kaurane diterpenes from *Oyedaea verbesinoides* for their inhibitory activity on vascular smooth muscle contraction. **Phytochemistry**, v. 63, p. 391-396, 2003.

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

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

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

ORTON, E. C.; RAFFESTIN, B.; MCMURTRY, I. F. Protein kinase C influences rat pulmonary vascular reactivity. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 141, n. 3, p. 654-658, 1990.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Mecanismos de contração do músculo liso vascular. **Revista Brasileira de Hipertensão**, n. 12, v. 12, p. 89-92, 2005.

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 de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 3, p. 397-402, 2006.

PAULINO, N.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. The relaxant effect of extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig isolated trachea. Evidence for involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, n. 11, p. 1158-63. 1996.

PAVLOVA, O. O.; SAHACH, V. F.; SOLOVÍOV A. I. Effect of inhibiting protein kinase C on calcium sensitivity of contractile apparatus of vascular smooth muscle during vasospasms of different origins. **Fiziologičnyi Zhurnal**, v. 9, n. 6, p. 31-7, 2003.

PELAIA, G.; RENDA, T.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A.; BUSCETI, M. T.; AGATI S.; CAPUTI, M.; CAZZOLA, M. MASELLI, R.; MARSICO, S. A. Molecular mechanisms underlying airway smooth muscle contraction and proliferation: Implications for asthma. **Respiratory Medicine**, v. 102, p. 1173-1181, 2008.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, n. 3, p. 237-43, 2001.

PIETERS, L.; DE BRUYNE, T.; VAN POEL, B.; VINGERHOETS, R.; TOTTE, J.; VAN DEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A. *In vivo* wound healing activity of Dragon's blood (*Croton* spp.), a traditional South American drug, and its constituents. **Phytomedicine**, n. 2, p. 17-22, 1995.

PUTNEY, J. W.; BROAD, L. M.; BRAUN, F. J.; LIEVREMONT, J.P.; BIRD, G. S.; Mechanisms of capacitative calcium entry. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 2223-2229, 2001.

PUTNEY, J. W.; RIBEIRO, C. M. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. **Cell and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 8-9, p. 1272-1286, 2000.

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

RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 14, p. 89-96, 2004.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

- REMBOLD, C. M. Biochemistry of Smooth Muscle Contraction In: Bárány, M. (org.) **Electromechanical and pharmacomechanical coupling**. San Diego: Academic Press, p.227-239, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780120781607> acessado em 27 de maio de 2008.
- ROSA, M. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- ROUX, E.; MARHL, M. Role of Sarcoplasmic Reticulum and Mitochondria in  $Ca^{2+}$  Removal in Airway Myocytes. **Biophysical Journal**, v. 86, n. 4, p. 2583–2595, 2004.
- RUSSEL, J. A. Tracheal smooth muscle. **Clinics in Chest Medicine**. v. 7, n. 2, p. 189-200, 1986.
- SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 20, p. 39-53, 2008.
- SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* next term in mice. **Life Science**, v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005b.
- SANTOS, H. S.; MESQUITA, F. M. R.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos Casbanos e acetofenonas de *Croton nepetaefolius* (Euphorbiaceae). **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 601-604, 2008.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15, p. 321-25, 2005a.
- SAVINEAU, J. P.; MARTHAN, R. E.; CREVEL, H. Contraction of vascular smooth muscle induced by phorbol 12,13 dibutyrate in human and rat pulmonary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 639-644, 1991.
- 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, n. 20, p. 2365-2372, 2006.
- SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1/3, p. 1-15, 1996.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**, v. 522, n. 2, p. 177-185, 2000.
- SOMLYO, A. P.; WU, X.; WALKER, L.A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, Kinases, and phosphatases. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 134, p. 201-234, 1999.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, n. 129-145, 1968.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, n. 372, p. 231 – 236, 1994.

SPINA, D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.158, p. 141-145, 1998.

[STEPHENS N. L](#) . Airway smooth muscle. **Lung**. v. 179, n. 6, p. 333-373. 2001.

STERK, P. J.; BEL, E. H. Bronchial hyperresponsiveness: the need for a distinction between hypersensitivity and excessive airway narrowing **European Respiratory Journal**, n. 2, p. 267-274, 1989.

STEVEN, S.; HAI C. M. Mechanical signals and mechanosensitive modulation of intracellular  $[Ca^{2+}]$  in smooth muscle. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 279, p.1375-1384, 2000.

SWEENEY, M. MCDANIEL, S. S.; PLATOSHYN, O.; ZHANG, S.; YU, Y.; LAPP, B.R.; ZHAO, Y.; THISTLETHWAITE, P. A.; YUAN, J. X.-J. Y. Role of capacitative  $Ca^{2+}$  entry in bronchial contraction and remodeling. **Journal of Applied Physiology**, v.92, n. 4, p.1594-1602, 2002.

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. **Journal of Smooth muscle**, v. 41, p. 153-161, 2005.

TIRAPELLI, C. R.; AMBROSIO, S. R.; DA COSTA, F. B.; COUTINHO, S. T.; DE OLIVEIRA, D. C. R.; DE OLIVEIRA, A. M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233-241, 2004.

VERA, L. A.; MONTE, F. J. Q.; BRAZ-FILHO, R. A New Casbane-Type Diterpenoid from *Croton nepetaefolius*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 6, p. 1566–1571, 1990.

WANG L., MCPARLAND B.E., PARE P.D., The functional consequences of structural changes in the airways: implications for airway hyperresponsiveness in asthma. **Chest**, v. 123, n. 3, p. 356S-62S, 2003.

WEBB, R. C. Smooth Muscle Contraction and Relaxation. **Advances in Physiology Educations**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WELLMAN, G. C.; NELSON, M. T. Signaling between SR and plasmalemma in smooth muscle: sparks and the activation of  $Ca^{2+}$ -sensitive ion channels. **Cell Calcium**, n. 34, n. 3, p. 211-229, 2003.

WHO. **Guidelines for the assessment of Herbal Medicines**, World Health Organization, Geneva, 1991.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, n. 3-4, p. 397-407, 2005.

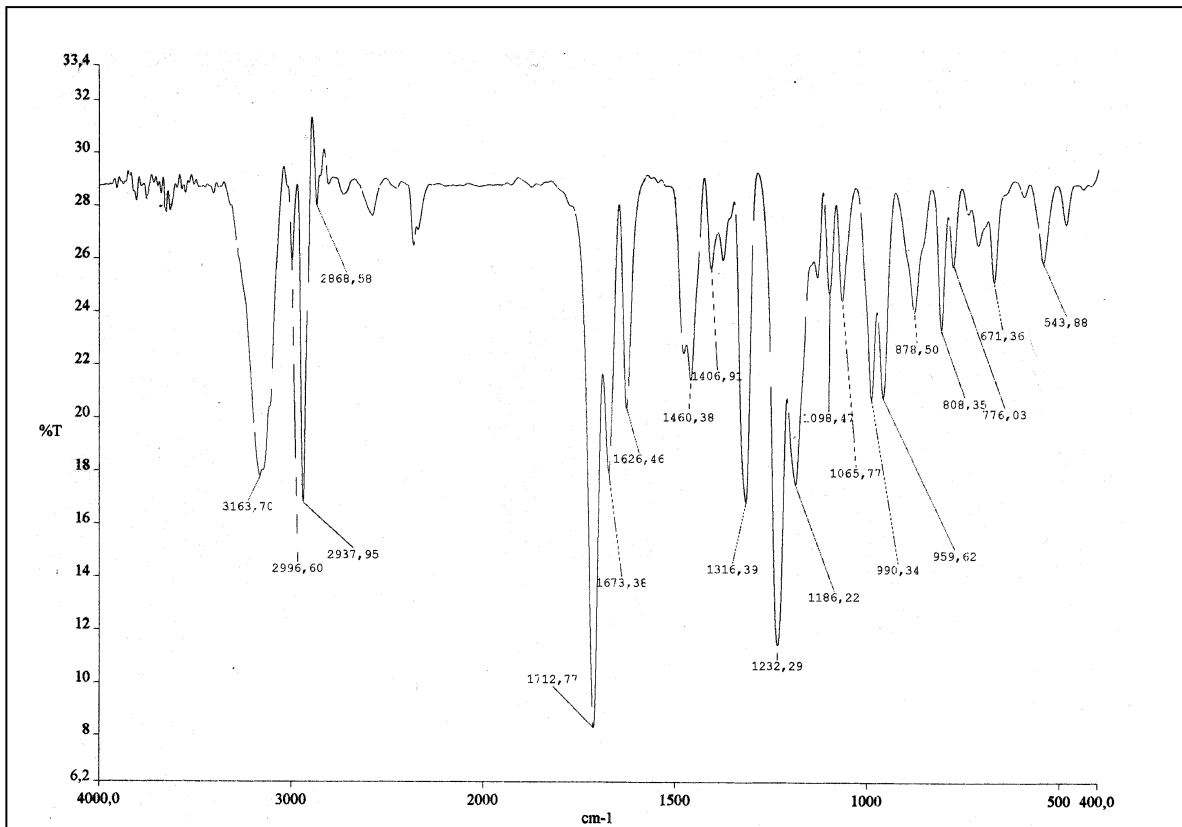
YAMAKAGE, M.; CHENG, X.; TSUJIGUCHI, N.; KAMADA, Y.; NAMIKI, A. Different inhibitory effects of volatile anesthetics on T- and L-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in porcine tracheal and bronchial smooth muscle. **Anesthesiology**, v. 94, p. 683-693, 2001.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 194, n. 7, p. 879-84, 2002.

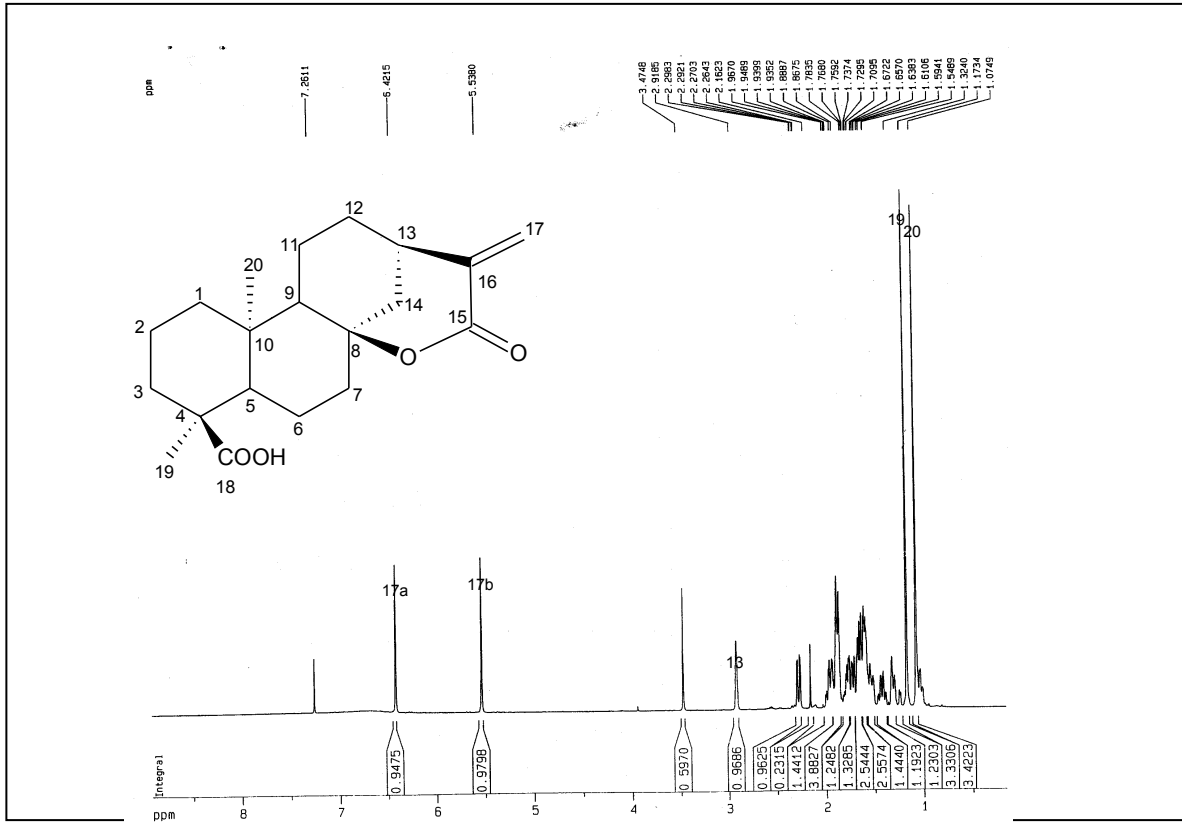
# ANEXOS

## ANEXO 1

1a - Espectro na região do IV. de ATCC.

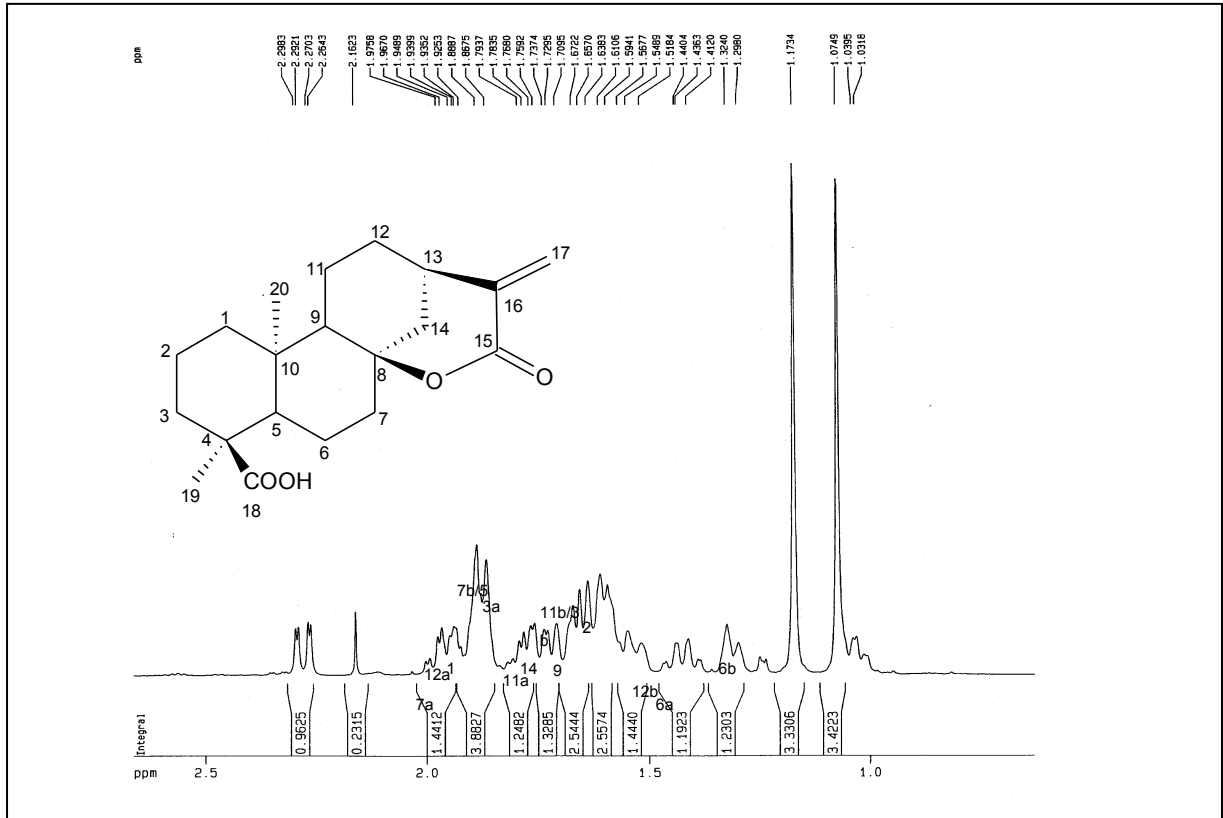


## ANEXO 1

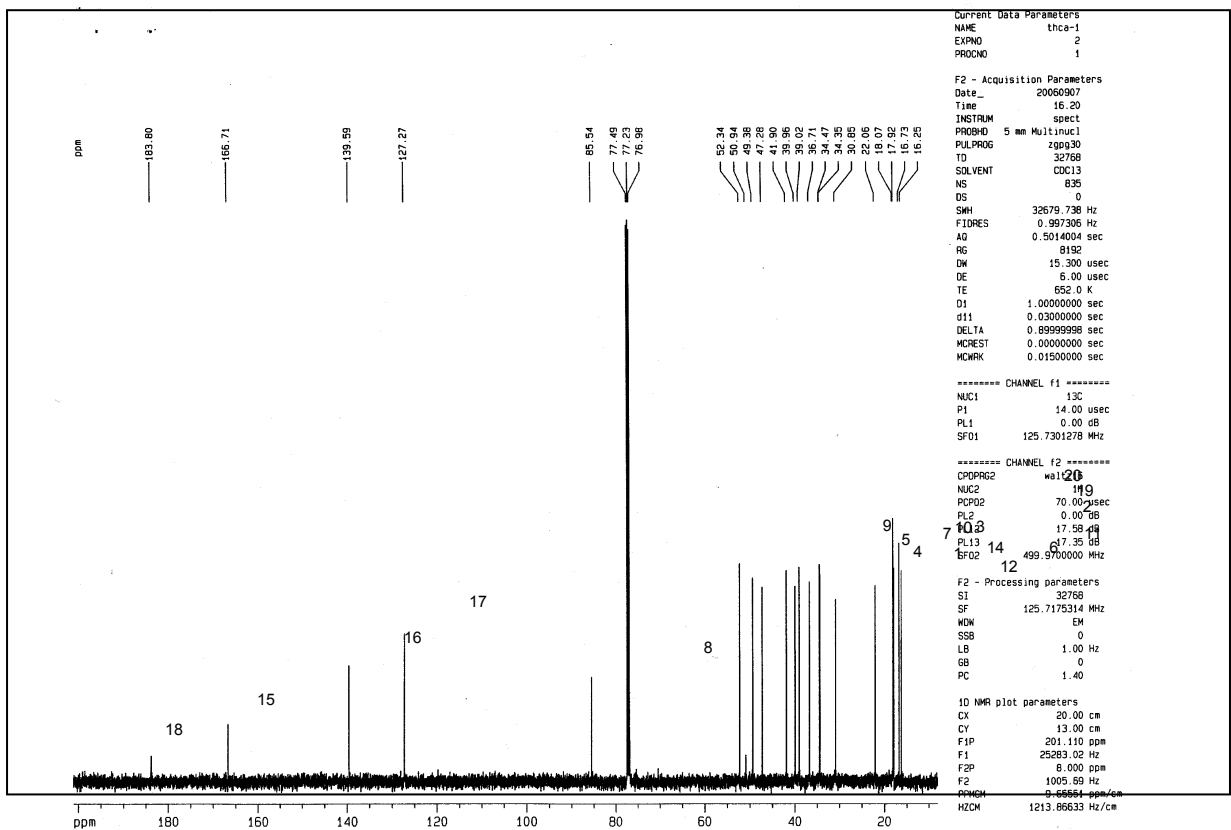
1b - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de ATCC

ANEXO 2

2a - Espectro de RMN <sup>1</sup>H - expansão (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz) de ATCC



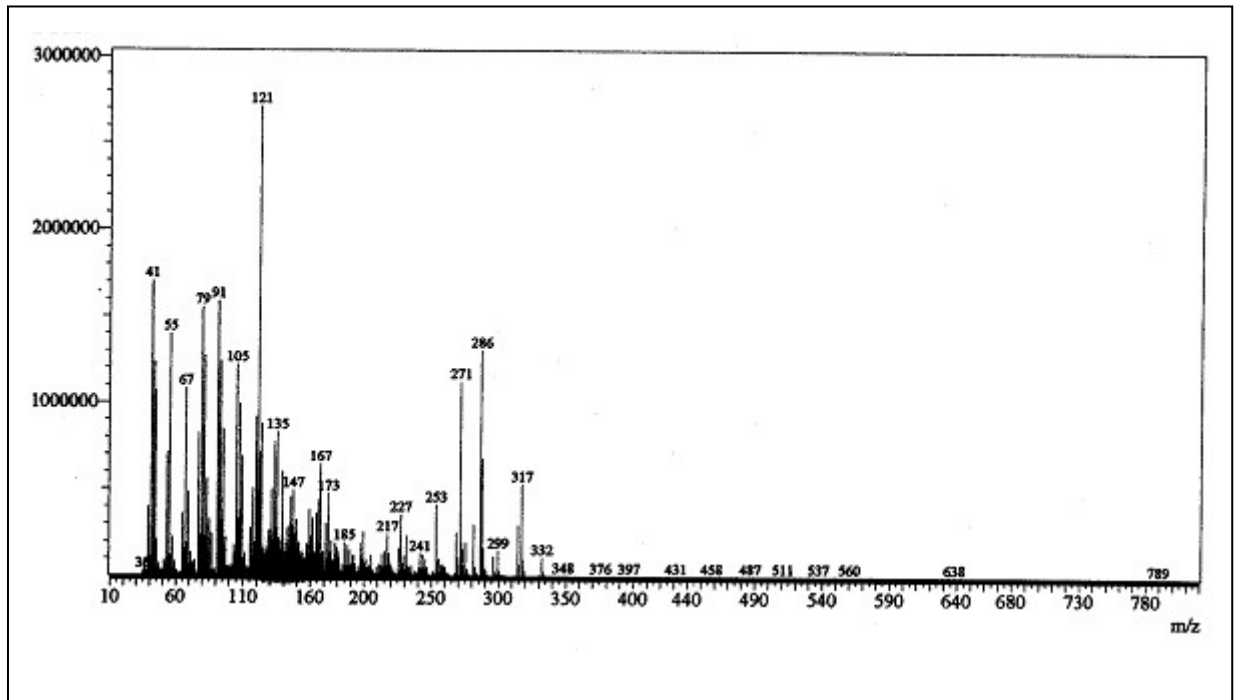
2b - Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) de ATCC



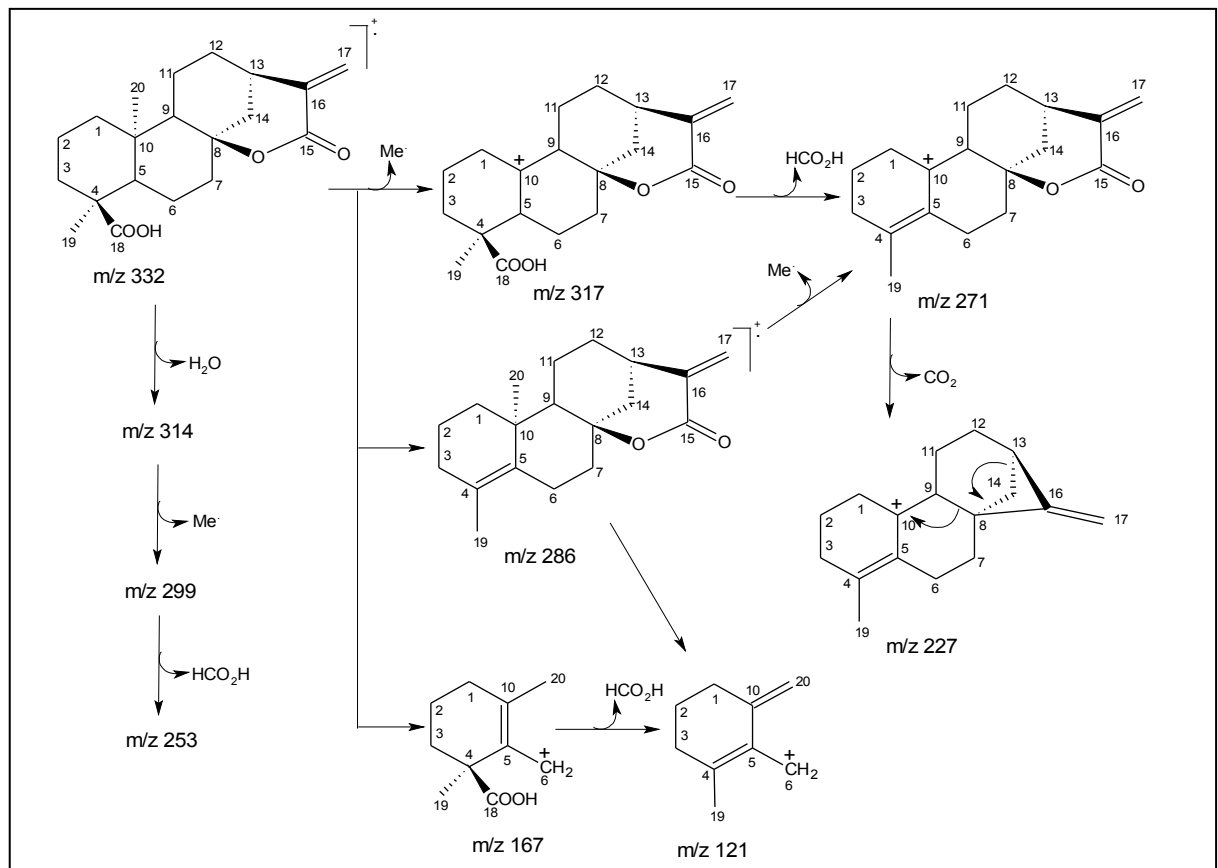


## ANEXO 3

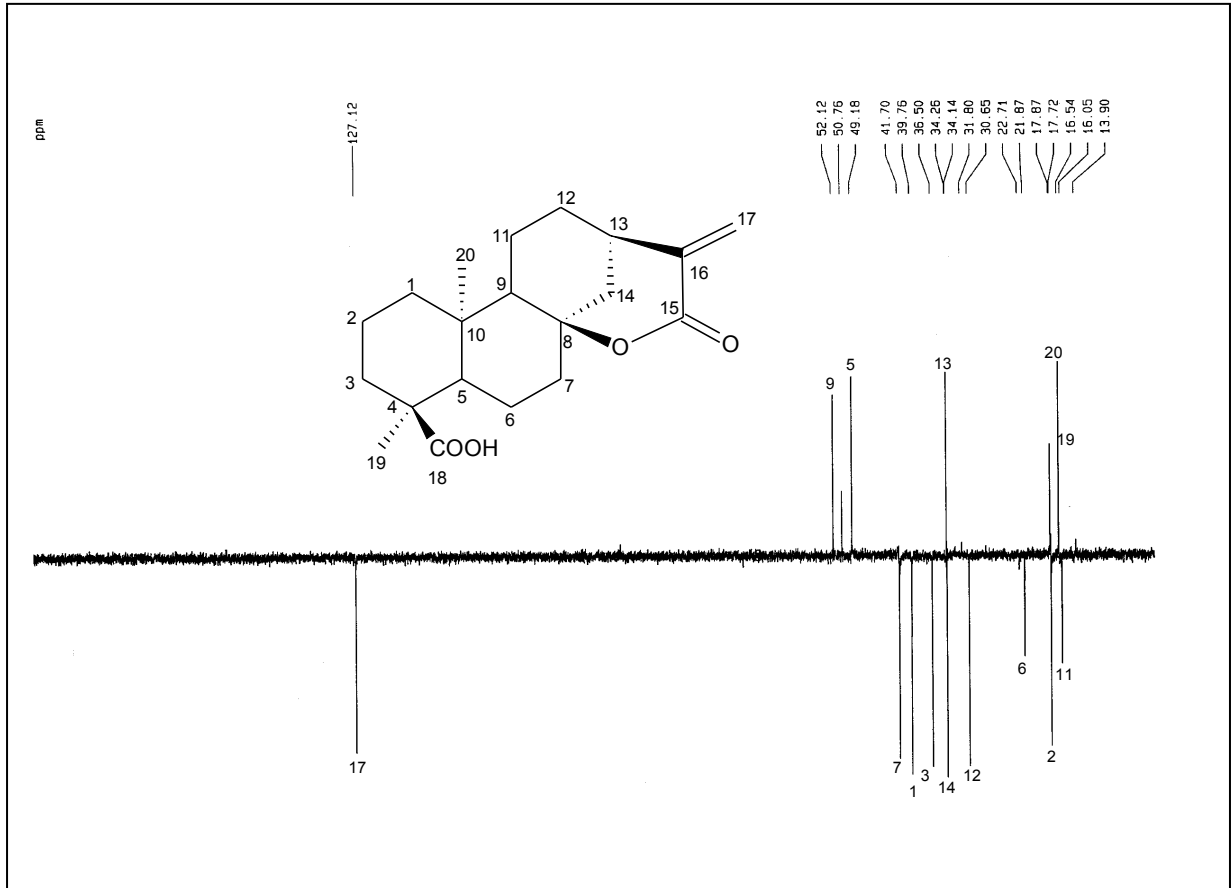
## 3a - Espectro de massas de ATCC



## 3b - Fragmentos propostos para justificar os picos principais observados no espectro de massas (EM) de ATCC



## ANEXO 4

Espectro de RMN<sup>13</sup>C-DEPT 135° (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz) de ATCC

# 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](#)