



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
ROMULO DE SOUSA PORTO

**AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophyloides* muell.
Arg. E DE UM DOS SEUS CONSTITUINTES O β -cariofileno EM
MÚSCULO LISO FÁSICO DE RATO.**

FORTALEZA-CEARÁ
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ROMULO DE SOUSA PORTO

**AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophyloides* muell.
Arg. E DE UM DOS SEUS CONSTITUINTES O β -cariofileno EM
MÚSCULO LISO FÁSICO DE RATO.**

Dissertação submetida ao mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

ORIENTADORA: Prof^a Dr. Andreлина Noronha Coelho de Souza.

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. José Henrique Leal-Cardoso

**FORTALEZA-CEARÁ
2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Título: AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton argyrophylloides* muell. Arg. E DE UM DOS SEUS CONSTITUINTES O β -cariofileno EM MÚSCULO LISO FÁSICO DE RATO.

Autor: Romulo de Sousa Porto

Defesa em: 29/01/2010

Conceito obtido: Satisfatório com louvor

Nota: 10,0

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Souza
(Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profa. Dra. Roseli Barbosa
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos
Universidade Federal do Ceará - UFC

A minha mãe, a quem devo tudo que sou
hoje.

AGRADECIMENTO

A minha orientadora Profa. Dra. Andrelina Noronha Coelho de Sousa por me orientar nessa etapa da minha vida.

A minha mãe Zilma pela minha formação e apoio.

A Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, pela colaboração em todos os momentos que se fizeram necessários.

As alunos de iniciação científica Isabel, Renalison, Lya e Keciany pela amizade.

Aos amigos de mestrado Liza, Elizabeth, Camille e Denise pelo companheirismo nos momentos de dificuldade

Aos professores e amigos Ariclécio Cunha de Oliveira e Crystiane Calado Lima pelo crescimento científico.

A Pedro Militão e Frank pela amizade e ajuda técnica para realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos o meu eterno agradecimento.

RESUMO

O *Croton argyrophylloides* Muell. Arg. é conhecido popularmente no Nordeste como marmeleiro prateado. Dentre os constituintes presentes no óleo essencial do *C. argyrophylloides* (OECa) temos β -cariofileno (β -CAR) que é um terpenóides com uma atividade biológica bastante significativa. O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito do OECa e de um dos seus constituintes o β -CAR em músculo liso da veia porta, íleo e bexiga. Foi observado que o OECa e o β -CAR possui efeito tanto no acoplamento eletromecânico como no farmacomecânico. No acoplamento eletromecânico a EC_{50} na presença do OECa para a contração fásica foi de $19,21 \pm 1,65 \mu\text{g/ml}$, $104,27 \pm 8,19 \mu\text{g/ml}$ e $343,54 \pm 11,71 \mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. Na contração tônica, a EC_{50} para veia porta, íleo e bexiga foi de $7,81 \pm 2,02 \mu\text{g/ml}$, $29,99 \pm 8,44 \mu\text{g/ml}$ e $92,50 \pm 11,00 \mu\text{g/ml}$. Com o β -CAR, a EC_{50} da fase fásica foi de $92,64 \pm 5,34 \mu\text{g/ml}$, $15,57 \pm 6,38 \mu\text{g/ml}$ e $214,93 \pm 11,06 \mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. A fase tônica na presença do β -CAR teve como EC_{50} $24,76 \pm 9,63 \mu\text{g/ml}$, $12,54 \pm 1,43 \mu\text{g/ml}$ e $181,19 \pm 6,66 \mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. No acoplamento farmacomecânico a EC_{50} na presença do OECa foi de $38,53 \pm 14,83 \mu\text{g/ml}$, $125,93 \pm 10,91 \mu\text{g/ml}$ e $122,19 \pm 57,33 \mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga, na contração fásica. Na contração tônica a EC_{50} foi de $16,81 \pm 2,70 \mu\text{g/ml}$, $47,97 \pm 08,09 \mu\text{g/ml}$ e $115,71 \pm 20,51 \mu\text{g/ml}$, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Em relação ao β -CAR, esse efeito foi um pouco menos expressivo nas duas fases da contração, entre os três tecidos. Com β -CAR a EC_{50} foi de $101,59 \pm 2,81 \mu\text{g/ml}$, $86,73 \pm 12,12 \mu\text{g/ml}$ e $560,20 \pm 61,88 \mu\text{g/ml}$, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga, na fase fásica e de $41,45 \pm 12,89 \mu\text{g/ml}$, $105,09 \pm 4,09 \mu\text{g/ml}$ e $461,06 \pm 7,13 \mu\text{g/ml}$, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga, na fase tônica. Em relação a contração induzida por CaCl_2 e BaCl_2 , também foi observado efeito tanto do OECa quanto do β -CAR nos três tecidos. Os resultados sugerem que tanto o OECa como o β -CAR possuem efeito nos três tecidos, mas com uma certa especificidade pela veia porta. Foi observado que tanto o OECa como o β -CAR possuem um maior efeito no acoplamento eletromecânico que no farmacomecânico. O estudo sugere que o efeito antiespasmódico do *Croton argyrophylloides* e β -cariofileno no músculo liso de íleo, veia porta e bexiga, pode ter ocorrido pelo bloqueio dos canais de cálcio, sendo predominante esse efeito nos canais do tipo VOC.

Palavras-chaves: Óleo essencial, *Croton argyrophylloides*, β -cariofileno, músculo liso.

ABSTRACT

Croton argyrophylloides Muell. Arg. is popularly known in Northeast like quince silver. Among the constituents of the essential oil of *C. argyrophylloides* (OECa) have β -caryophyllene (β -CAR) which is a terpenoid with biological activity very significantly. The aim of this study was to assess the effect of OECa and one of its constituent β -CAR in the smooth muscle of the portal vein, ileum and bladder. It was observed that OECa and β -CAR has effect on electromechanical coupling and in pharmacomechanical. Electromechanical coupling in the EC₅₀ in the presence of OECa for phasic contraction was $19.21 \pm 1.65 \mu\text{g/ml}$, $104.27 \pm 8.19 \mu\text{g/ml}$ and $343.54 \pm 11.71 \mu\text{g/ml}$ respectively for the portal vein, ileum and bladder. In the tonic contraction, the EC₅₀ for the portal vein, ileum and bladder was $7.81 \pm 2.02 \mu\text{g/ml}$, $29.99 \pm 8.44 \mu\text{g/ml}$ and $92.50 \pm 11.00 \text{ mg } \mu\text{g/ml}$. Regarding β -CAR, the EC₅₀ of phasic phase was $92.64 \pm 5.34 \mu\text{g/ml}$, $15.57 \pm 6.38 \mu\text{g/ml}$ and $214.93 \pm 11.06 \mu\text{g/ml}$ respectively for the portal vein, ileum and bladder. The tonic phase in the presence of β -CAR EC₅₀ was $24.76 \pm 9.63 \mu\text{g/ml}$, $12.54 \pm 1.43 \mu\text{g/ml}$ and $181.19 \pm 6.66 \mu\text{g/ml}$ respectively for the portal vein, ileum and bladder. Coupling pharmacomechanical the EC₅₀ in the presence of OECa was $38.53 \pm 14.83 \mu\text{g/ml}$, $125.93 \pm 10.91 \mu\text{g/ml}$ and $122.19 \pm 57.33 \mu\text{g/ml}$ respectively for the portal vein, ileum and bladder phasic contraction. Tonic contraction in the EC₅₀ was $16.81 \pm 2.70 \mu\text{g/ml}$, $47.97 \pm 08.09 \mu\text{g/ml}$ and $115.71 \pm 20.51 \mu\text{g/ml}$, respectively in the portal vein, ileum and bladder. β -CAR had less effect in both the expressive phase of contraction among the three tissues. β -CAR with the EC₅₀ was $101,59 \pm 2,81 \mu\text{g/ml}$, $86,73 \pm 12,12 \mu\text{g/ml}$ and $560,20 \pm \mu\text{g/ml}$, respectively in the portal vein, ileum and bladder during phasic and $41.45 \pm 12.89 \mu\text{g/ml}$, $105.09 \pm 4.09 \mu\text{g/ml}$ and $461.06 \pm 7.13 \mu\text{g/ml}$, respectively in the portal vein, ileum and urinary bladder in the tonic phase. For contraction induced by CaCl₂ and BaCl₂ effect was also observed both OECa as the β -CAR in the three tissues. The results suggest that both the OECa as β -CAR have effect in all three tissues, but with some specificity the portal vein. It was observed that both the OECa as β -CAR have a greater effect on electromechanical coupling than pharmacomechanical. O study suggests that the antispasmodic effect of *Croton argyrophylloides* and β -caryophyllene in the smooth muscle of the ileum, portal vein and bladder, may have occurred by blocking calcium channels, with predominant effect on this type VOC channels.

Keywords: essential oil, *Croton argyrophylloides*, β -caryophyllene, smooth muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Croton argyrophyloides</i> Muell Arg	20
Figura 2 - Fórmula molecular e estrutural do β -cariofileno	21
Figura 3 – Representação do mecanismo de contração do músculo liso.....	24
Figura 4 - Representação esquemática do sistema utilizado para registro das contrações.....	42
Figura 5 - Representação esquemática do protocolo 1	43
Figura 6 - Representação esquemática do protocolo 2	44
Figura 7 - Representação esquemática do protocolo 3.....	45
Figura 8 - Representação esquemática do protocolo 4	46
Figura 9 - Representação esquemática do protocolo 5	47
Figura 10 - Representação esquemática do protocolo 6.	48
Figura 11 - Efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	51
Figura 12 - Efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.....	53
Figura 13 - Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de 60mM de K^+ em veia porta, íleo e bexiga.....	54
Figura 14 - Efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.....	56
Figura 15 - Efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.....	58
Figura 16 - Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de 60 mM de K^+ em veia porta, íleo e bexiga.....	59
Figura 17 - Efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.....	61
Figura 18 - Efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	63

Figura 19 - Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de 50 µM de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato.....	64
Figura 20 - Efeito do β-CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	66
Figura 21 - Efeito do β-CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	68
Figura 22 - Comparação do efeito do β-CAR sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de ACh em veia porta, íleo e bexiga	69
Figura 23 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso veia porta, íleo e bexiga rato despolarizado com 60mM de K ⁺	71
Figura 24 - Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K ⁺ ...	73
Figura 25 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso de íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil.....	74
Figura 26 - Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso de íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil	75
Figura 27 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ba ²⁺ em músculo liso veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K ⁺ ...	77
Figura 28 - Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ba ²⁺ em músculo liso veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K ⁺ ...	79
Figura 29 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por 60µM de ACh em meio 0Ca ²⁺ contendo EGTA (0,2mM), em músculo liso de íleo e bexiga de rato.....	80
Figura 30 - Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por 60µM de ACh em meio 0Ca ²⁺ contendo EGTA (0,2mM), em músculo liso de íleo e bexiga de rato.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Croton argyrophyloides</i> Muell. Arg	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
AMPc -	3,5-monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
Ca _v	Canal de cálcio sensível a voltagem
Cch	Carbacol
CCE	Entrada capacitiva de cálcio capacitiva
Cl ⁻	Íon cloreto
CICR	Liberação de cálcio induzida por cálcio
CIF	Fator de influxo de cálcio
COBEA	Colégio brasileiro de experimento animal
DAG	Diacilglicerol
DHP	Diidropiridina
EC ₅₀	Concentração capaz de produzir 50% do efeito máximo
E.P.M	Erro padrão da média
EGTA	Ácido bis(2-amino-etil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetracético
GC/MS	Cromatografia gasosa/espectrometria de massa
HEX	Hexametônio
ICC	Célula intersticial de Cajal
IC ₅₀	Concentração que representa 50% do efeito inibitório máximo
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
K ²⁺ -	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
Na ⁺	Íon sódio

NaCl ₂	Cloreto de sódio
NaHCO ₂	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
nM	nanoMolar
NSSC	Canais catiônicos não seletivos
OMS	Organização mundial de saúde
OECa	Óleo Essencial de <i>Croton argyrophylloides</i> Muell. Arg.
PAETEC	Parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará
pH	Potencial hidrogenionte
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
P2X	Receptores purinérgicos sensível ao ATP
ROC	Canal operado por receptor
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor para Rianodina
SAC	Canal operado por estiramento
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOC	Canal operado por estoque
TM	Tyrode modificado
TRP	Receptor de potencial transiente
TTX	Tetrodotoxina
TW	Tween
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
VOC	Canal operado por voltagem
WHO	Organização Mundial da Saúde
ZIP-QUINASE	Proteína quinase da família ZIP
β-CAR	β-cariofileno
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Importância e Justificativa	15
1.2 Óleos Essenciais	17
1.3 Gênero <i>Croton</i>	18
1.4 <i>Croton argyrophyloides</i> Muell. Arg.....	19
1.5 β -cariofileno	20
1.6 Músculo liso.....	22
1.6.1 Músculo liso do trato gastrointestinal	25
1.6.2 Músculo liso da bexiga	27
1.6.3 Músculo liso vascular	29
1.7 Canais para cálcio	30
1.8 Semelhanças e diferenças entre os músculos lisos do íleo, bexiga e veia porta em relação aos canais para cálcio.....	34
2 OBJETIVOS	38
2.1 Geral	38
2.2 Específico	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Sais e fármacos	39
3.2 Óleo Essencial de <i>Croton argyrophyloides</i> Muell. Arg. (OECa).....	39
3.3 Soluções	40
3.4 Animais e preparação dos tecidos	41
3.5 Protocolos experimentais.....	42
3.5.1 Protocolos para músculo liso do Íleo, bexiga e veia porta.....	43
3.5.1.1 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre a contração submaximal induzida por K^+ em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta	43
3.5.1.2 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre a contração submaximal induzida por acetilcolina (ACh) em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta	44
3.5.1.3 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta despolarizado com 60 mM de K^+	44
3.5.1.4 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} , em meio $0Ca^{2+}$, em músculo liso de íleo, veia porta e bexiga pré-tratado com acetilcolina (ACh) na presença de verapamil	45
3.5.1.5 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ba^{2+} , em meio $0Ca^{2+}$, em músculo liso íleo, veia porta e bexiga pré-tratado com 60mM de K^+	46
3.5.1.6 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por	

acetilcolina, em meio $0Ca^{2+}$ mais EGTA em músculo liso de íleo, veia porta e bexiga..... 47

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 49

5 RESULTADOS..... 50

5.1 Efeito do OECa sobre a contração submaximal induzida por K^+ em músculo liso intestinal de rato..... 50

5.1.1 Efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 50

5.1.2 Efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 52

5.1.3 Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de K^+ em veia porta, íleo e bexiga de rato..... 54

5.2 Efeito do β -CAR sobre a contração submaximal induzida por K^+ em músculo liso intestinal de rato..... 55

5.2.1 Efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 55

5.2.2 Efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 57

5.2.3 Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de K^+ em veia porta, íleo e bexiga de rato..... 58

5.3 Efeito do OECa sobre a contração submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 59

5.3.1 Efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 59

5.3.2 Efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 62

5.3.3 Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato..... 63

5.4 Efeito do β -CAR sobre a contração submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 64

5.4.1 Efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 65

5.4.2 Efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato..... 67

5.4.3 Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato..... 69

5.5 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60 mM de k ⁺	70
5.6 Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60 mM de k ⁺	72
5.7 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil.....	74
5.8 Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ca ²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil.....	75
5.9 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ba ²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60mM de k ⁺	76
5.10 Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por Ba ²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60mM de k ⁺	78
5.11 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em meio 0Ca ²⁺ contendo EGTA em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	80
5.12 Efeito do β-CAR sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em meio 0Ca ²⁺ contendo EGTA em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato	81
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO	88
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância e Justificativa

O uso de plantas medicinais como meio curativo e preventivo pode ser considerado tão antigo quanto o ser humano (MARTINS *et al.*, 1994). Essas plantas foram durante séculos, os únicos agentes terapêuticos para o homem. Com o desenvolvimento da química farmacêutica no início do século XIX, as plantas medicinais passaram a ser usadas como a principal fonte de substâncias para a síntese de medicamentos, tendo uma grande contribuição em novas drogas (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

Atualmente os extratos vegetais e as plantas continuam tendo uma grande importância na área farmacêutica, através do uso de substâncias ativas isoladas como protótipos para a criação de novos fármacos, para obtenção de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos originados exclusivamente à base de extratos vegetais, como os medicamentos fitoterápicos (SCHENK *et al.*, 2001).

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

O uso popular de plantas medicinais é uma prática antiga, que passa de geração a geração, despertando com isso a necessidade de pesquisas sobre essas plantas, pois muitas vezes o conhecimento empírico desenvolvido ao longo do tempo, pode ser comprovado do ponto de vista científico, o que pode estender seu uso a sociedade industrializada (FARNSWORTH, 1988) e possibilitar uma maior validade em relação à eficácia do uso como terapia.

Apesar do Brasil ter uma rica flora e representar cerca de 20% das espécies de plantas medicinais conhecidas no mundo (PETROVICK *et al.*, 1997), o conhecimento dessas plantas nos últimos vinte anos teve um crescimento de apenas

8% ao ano (SIANI, 2003). Ainda é considerável o número de plantas que não possui seus mecanismos de ação terapêutica compreendidos, e os estudos com essas plantas, além de trazerem vantagens do ponto de vista terapêutico, também permitem a redução de importação de drogas e o aumento do desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998).

Além disso, a realização de mais estudos para validação do uso popular de plantas medicinais e descoberta de outros possíveis usos terapêuticos possibilita um melhor aproveitamento de recursos medicinais e uma acessibilidade mais ampla, de forma mais segura, a um maior número de pessoas que venham a se beneficiar do seu uso terapêutico.

Por essa importância indiscutível das plantas medicinais em relação à possibilidade de descoberta de novos compostos terapêuticos, com um custo baixo, mais acessível para a população e em menor tempo que os fármacos sintéticos (MARTINS *et al.*, 1998), a Organização Mundial de Saúde (OMS), incentiva o desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais. Com esse objetivo, o Ministério da Saúde do Brasil, formulou a portaria nº 212 (11/09/81), que inclui, nas “Diretrizes e Prioridades em Saúde” o estudo multidisciplinar de plantas medicinais (MING, 1994).

Dentre os diversos gêneros de plantas que ainda necessitam de mais estudos está o gênero *Croton*, da família das *Euphorbiaceae*, que do ponto de vista químico e farmacológico, é de grande importância econômica (ZEVALLOS-POLLITO e FILHO, 2007) devido ao fato de várias espécies desse gênero já possuírem uso com fins terapêuticos (SALATINO *et al.*, 2007). Dentre as espécies de *Croton*, temos o *Croton argyrophyloides*, que é encontrado na região Nordeste do Brasil, sendo conhecido popularmente como “marmeleiro prateado”. A espécie *Croton argyrophyloides* é rica em terpenóides, tendo predominância do sesquiterpeno β -cariofileno no óleo essencial de algumas amostras (MORAIS *et al.*, 2006). É uma espécie ainda pouco estudada, mas que já mostrou ter ação biológica em alguns estudos (LIMA *et al.*, 2006; CANUTO, 2005; CATUNDA *et al.*, 2002), necessitando com isso de mais pesquisas.

As pesquisas da ação dessas plantas no tecido muscular liso é de grande relevância, devido à importância desse tecido em vários mecanismos fisiológicos para manutenção do funcionamento normal dos sistemas orgânicos, evitando assim

estados patológicos (TOUYZ, 2000; WATERMAN *et al.*, 1994; BEST e TAYLOR, 1990).

Atualmente existe poucos estudos a respeito do efeito do óleo essencial do *Croton argyrophylloides* (OECa) e do β -cariofileno (β -CAR) sobre o músculo liso. Um desses estudos feito em músculo liso da aorta teve como resultado que o efeito do OECa e do β -CAR sobre esse músculo seria de bloquear os canais de cálcio (FARIAS, 2006)

Dependendo da localização do músculo liso, podemos ter diferenças em relação ao estoque de cálcio necessário para a contração, que pode ser provenientes do meio extracelular e intracelular. Por esse motivo, foi escolhido a veia porta, o íleo e a bexiga, pois são três músculos lisos que possuem dependência diferenciada em relação ao cálcio para contração, sendo a veia porta mais dependente do cálcio do meio extracelular, o íleo dependente tanto do meio extracelular como do intracelular e a bexiga dependendo mais do meio intracelular.

1.2 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são formados por substâncias produzidas, acumuladas ou depositadas por plantas em suas estruturas, sendo seus constituintes os princípios ativos responsáveis por conferir a ação terapêutica das plantas medicinais (SIMÕES e SPITZER, 1999). São originados por meio do metabolismo secundário, com a produção de compostos orgânicos que não possuem relação direta com o crescimento e desenvolvimento, mas com o relacionamento da planta com o meio ambiente. Esses compostos produzidos por metabolismo secundário, garantem vantagens para sobrevivência da planta e perpetuação das espécies em seu ecossistema (SANTOS, 1999).

Os óleos essenciais, que também podem ser chamados de óleo voláteis ou etéreos, são lipofílicos, na maioria das vezes odoríferos e líquidos. São encontrados nas folhas, ramos finos, cascas, frutos, flores, raízes, tronco, resinas e sementes (ZOGHBI *et al.*, 1998). As substâncias químicas encontradas nos óleos essenciais são formadas por ésteres de ácidos graxos, terpenóides, fenilpropanonas, alcoóis, aldeídos e em alguns casos, por hidrocarbonetos alifáticos

entre outros. Têm importância na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (CHARLES e SIMON, 1990). Dentre os constituintes que têm maior predominância nos óleos essenciais, estão os terpenóides (RAVEN *et al.*, 2001; VERPOORTE e MARASCHIN, 2001).

A quantidade e a natureza dessas substâncias que constituem os óleos essenciais, podem sofrer influência de fatores como a radiação, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta e outros (EVANS, 1991; VITTI e BRITO, 1999; SIMÕES e SPITZER, 1999; LARCHER, 2000; CALIXTO, 2001; GOINGUENÉ e TURLINGS, 2002).

Estudos demonstraram diversos efeitos biológicos dos óleos essenciais, dentre eles podemos citar; analgésico (BEGHETTI *et al.*, 1999), anti-hemorroidário (PRUDENTE *et al.*, 1993), miorelaxante, antiespasmódico (AYDIN *et al.*, 1999; COELHO DE SOUZA, 1997), antimalárico, anticonvulsivante (SANTOS *et al.*, 1997), antiparasitário, analgésico (OLIVEIRA, 2001), diurético, hipotensor (MENDONÇA *et al.*, 1991; BEZERRA, 1994; LAHLOU *et al.* 1999), antinociceptivo, antiinflamatório (MENEZES *et al.*, 1990; ABDON *et al.* 2002; PASSOS *et al.*, 2006), sedativo, antidiarréico (ALENCAR *et al.* 1993), gastroprotetor (PAIVA *et al.* 1998), antimicrobiano, bactericida (CIMANGA *et al.*, 2002) e antifúngico (PITAROKILI *et al.*, 2003).

1.3 Gênero *Croton*

O gênero *Croton* faz parte da família das Euforbiaceae, que é uma extensa família cosmopolita compreendendo aproximadamente 300 gêneros e 7600 espécies (CRONQUIST, 1981). O gênero *Croton* é o segundo maior gênero da família das Euforbiaceae, com quase 1.300 espécies de ervas, arbustos e árvores (WEBSTER, 1993).

É um gênero que se destaca na sua riqueza de substâncias originadas do metabolismo secundário, como terpenóides, flavonóides e alcalóides (PIETERS *et al.*, 1995; PIRES *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2005). O *Croton* é um gênero de grande dispersão no Nordeste, sendo utilizado pela população em forma de chás, infusões e cataplasmas. Dentre as propriedades biológicas do gênero *Croton*, temos:

antitumoral, antiinflamatória, antipirética, hipertensiva, antidiarréica e antiulcerogênico (ALMEIDA *et al.*, 2002; FALCÃO *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2007).

As folhas desse gênero apresentam revestimento piloso, inteiras ou raramente trilobadas com estípulas. Suas flores são esbranquiçadas e pequenas. A maior parte das espécies desse gênero é odorífera, com a distribuição das substâncias do metabolismo secundário em todos os órgãos da planta, predominando nas folhas e nas cascas do caule (MONTE, 1980).

1.4 *Croton argyrophyloides* Muell. Arg.

O *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. (figura 1) é conhecido popularmente no Nordeste como marmeleiro prateado (MONTE, 1980), é um arbusto de ramos delgados, cilíndricos e escabros. Suas folhas possuem uma base obtusa e apresentam a parte ventral verde fosca e opaca.

É uma espécie que é muito utilizada na região agreste de Pernambuco, onde o chá da casca do caule é utilizada para tratar cólicas intestinais (ALBUQUERQUE e ANDRADE, 2002). Além desse uso popular, já foram realizados alguns estudos que comprovaram que o *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. possui varias ações biológicas, como antimicrobiano (ALBUQUERQUE *et al.*, 1974), antiedematogênico, antinociceptivo (CANUTO, 2005), antioxidante (CATUNDA *et al.*, 2002; MORAIS *et al.*, 2006) e agente larvicida (LIMA *et al.*, 2006).

Através de análise de diferentes amostras do OECa no Laboratório de Química e Produtos Naturais da UECE, foi possível observar a freqüência de alguns constituintes presentes nessa espécie, como o espatulenol, trans-cariofileno, alfa-pineno, beta-felandreno, beta-elemeno e 1,8 cineol.



FIGURA 1 - *Croton argyrophyloides* Muell Arg.

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

1.5 β -cariofileno (β -CAR)

Dentre os constituintes que têm maior predominância nos óleos essenciais, estão os terpenóides (RAVEN, 2001; VERPOORTE e MARASCHIN, 2001). Os terpenóides são substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas, sendo formados por unidades isoprenóides. São classificados de acordo com o número de unidade isoprenóides em mono-, sesqui-, di- e tri-terpenos (MURAKAMI *et al.*, 2004).

O β -cariofileno (β -CAR) é um terpenóides classificado em sesquiterpenos e possui 15 átomos de carbono (figura 2). É uma substância não tóxica, pouco irritante, sendo muito comum no óleo essencial de várias plantas (MARTIN *et al.*, 1993; MORAIS *et al.*, 2006; MEVY *et al.*, 2007; SENATORE *et al.*, 2006).

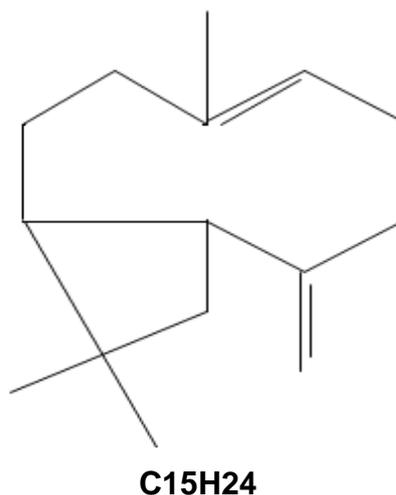


FIGURA 2 - Fórmula molecular e estrutural do β -cariofileno
Fonte: SIMÕES *et al.*, 1999.

Dentre as várias espécies de plantas onde é possível encontrar o β -CAR temos: *Vernonia scorpioides* (TOIGO *et al.*, 2004), *Annona cherimola* (RIOS *et al.*, 2003), *Psidium guajava* L. (LOZOYA *et al.*, 2002; LUTTERODT, 1989; CRAVEIRO *et al.*, 1981), *Pterodon polygalaeflorus* (EVANGELISTA *et al.*, 2007; LEONHARDT, 2009), *Cordia verbenácea* (PASSOS *et al.*, 2006), *Croton argyrophyloides* (FARIAS, 2006) dentre outras.

É um sesquiterpeno com atividade biológica bastante significativa, como pode ser observado em vários trabalhos, onde foi relatada a ação antimicrobiana (TOIGO *et al.*, 2004; RIOS *et al.*, 2003), ação contra cólicas, antidiarréica (LOZOYA *et al.*, 2002; LUTTERODT, 1989; CRAVEIRO *et al.*, 1981), miorelaxante em traquéia de ratos (EVANGELISTA *et al.*, 2007), antialérgica, antiinflamatória (PASSOS *et al.*, 2006), neuroprotetora (CHANG *et al.*, 2007), dentre outras.

Estudos com camundongos e Artêmias, mostraram que o β -CAR é atóxico, em relação aos efeitos agudos, com DL_{50} de $9,84 \pm 0,01$ g/kg para camundongos e IC_{50} de 274, 53 μ g/ml para Artêmias (FARIAS, 2006).

1.6 Músculo liso

O músculo liso, que também é chamado de músculo visceral, corresponde a apenas 5% da massa muscular total do ser humano (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004). Apesar desse baixo percentual, o músculo liso tem uma grande importância, devido a sua presença em órgãos vitais e por possibilitar a manutenção da homeostasia do organismo.

O músculo liso pode ser classificado levando em conta duas características: 1) a inervação, podendo ser multiunitário, unitário e intermediário e em relação, 2) sua atividade contrátil como tônico ou fásico. O músculo liso multiunitário possui células que são pouco acopladas, com fibras que podem contrair-se independentes das outras e são controladas em grande parte por sinais neurais, tendo uma densa inervação dos sistemas simpáticos e parassimpático. Podem ser encontrados no músculo ciliar dos olhos, brônquios, músculo piloerector, assim como outras estruturas. O músculo liso unitário contém junções abertas entre suas células, tendo aderência entre as membranas celulares, permitindo que o potencial elétrico de uma fibra seja propagada para outras, atuando como um sincício. Esse tipo de célula está presente nos ureteres, artérias de resistência, arteríolas, útero, trato gastrointestinal e outros (KNOT *et al*, 1996). O intermediário que se caracteriza por ter características tanto do multiunitario como do unitário, é observado na traquéia (BURNSTOCK, 1970).

O músculo visceral tônico pode ser identificado por responder a estímulos com mudanças graduais no potencial de membrana, 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 no músculo liso de diferentes órgãos (GUYTON e HALL, 2002).

Durante a contração, o músculo liso desenvolve duas fases contráteis, sendo uma que ocorre quase que exclusivamente devido à liberação do cálcio do retículo sarcoplasmático (RS), que é chamada de contração fásica, e outra que ocorre pelo influxo de cálcio através da membrana plasmática, chamada de contração sustentada tônica (BOLTON, 1979).

O músculo liso, assim como o músculo esquelético, possui proteínas filamentosas que são os filamentos de miosina e actina. Esses filamentos são responsáveis pela geração da força muscular (KUO e SEOW, 2004).

O filamento de miosina encontrado no músculo liso é do tipo miosina-II, possuindo atividade ATPase lenta. O filamento de actina está associado com outras proteínas, como a tropomiosina, a caldesmon e a calponina. A caldesmon é responsável pelo direcionamento e a estabilização do acoplamento da actina com a miosina. A calponina por inibir a atividade ATPase da miosina (MINO *et al.*, 1998), necessária para a contração muscular. O filamento fino de actina no músculo liso não possui troponina C, com isso a proteína que vai ter alta afinidade pelo cálcio no músculo liso será a calmodulina, que possui quatro sítios de ligação para o cálcio, tendo a função de ser receptor intracelular de cálcio e ativar o ciclo das pontes cruzadas (MANI e KAY, 1996).

Além da via de ativação neuronal, por meio do sistema nervoso autônomo, o músculo liso, diferentemente do músculo esquelético, pode ser ativado por outros mecanismos, como vias hormonais ou estiramento. Isso ocorre devido à membrana do músculo liso conter muitos tipos diferentes de receptores, capazes de desenvolver a contração ou inibi-la (NIXON *et al.*, 1994).

As bases químicas para a contração muscular lisa se assemelham em parte com a do músculo esquelético, com a interação entre a actina e a miosina ativada pelo aumento da concentração de cálcio intracelular e a degradação do trifosfato de adenosina (ATP) a difosfato de adenosina (ADP) para o fornecimento da energia para a contração, gerando as mudanças conformacionais e tracionamento dos filamentos contrateis (GUNST e TANG, 2000).

Os íons cálcio são essenciais para o desenvolvimento da contração do músculo liso. A concentração aumentada de Ca^{2+} permite que esses íons interajam com a calmodulina. Isto faz com que a enzima quinase de cadeia leve de miosina seja ativada, causando a fosforilação da miosina de cadeia leve. A fosforilação da miosina ativa a função ATPase da mesma, possibilitando a interação da miosina com a actina (TANSEY *et al.*, 1990; D'ANGELO *et al.*, 1992; ALLEN e WALSH, 1994; JIANG e STEPHENS, 1994; MURPHY, 1994).

Após essa seqüência de eventos, ocorre a desfosforilação da miosina, pela ação da enzima fosfatase miosínica de cadeia leve (MLCP). Isso vai ocorrer quando a concentração de cálcio é reduzida abaixo do nível para manter a

contração ($< 1\mu\text{M}$), inibindo a ação ATPase da miosina e a contração (SHIMIZU *et al.*, 1994; SHIRAZI *et al.*, 1994; WEBB, 2003).

Existem vários mecanismos que podem levar ao aumento da concentração de cálcio necessária para a contração. Dentre eles temos: o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico. O acoplamento eletromecânico ocorre quando canais para Ca^{2+} voltagem dependentes existentes na membrana plasmática são abertos em resposta a um potencial de ação, que se propaga pela membrana celular permitindo o influxo de cálcio do meio externo. O acoplamento farmacomecânico se desenvolve com a abertura de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático, ativados por segundo mensageiro como inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3). Esse mecanismo ocorre pela interação de um agonista com o receptor de membrana, causando a ativação da proteína G (REMBOLD, 1996) (figura 3).

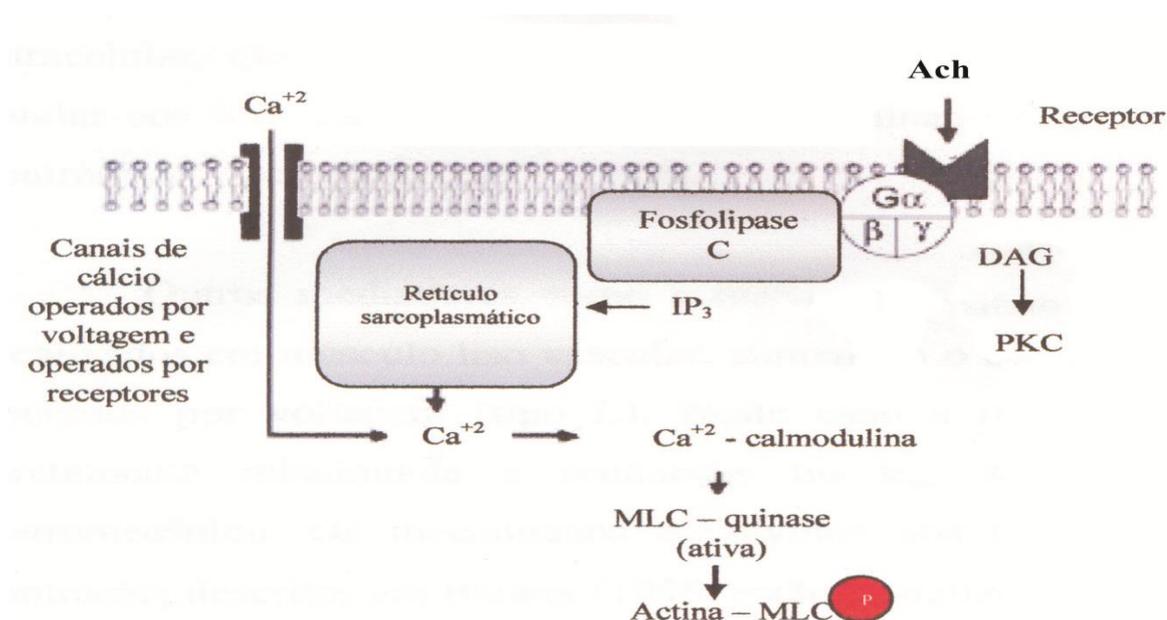


FIGURA 3 - mecanismo de contração do músculo liso
Fonte: WEBB, 2003.

A proteína G ativa a fosfolipase C permitindo formação do segundo mensageiro (IP_3 e DAG), a partir da quebra do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), que irá atuar nos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (BOLTON *et al.*, 1999; AIDLEY, 1998). Somado a isso também ocorre, via proteína G, a inibição da adenilato ciclase que reduz a produção de AMPc, facilitando a contração e a

produção da proteína kinase C (PKC) pelo DAG, que iria atuar na ativação dos canais para cálcio operados por voltagem e na sensibilidade do maquinário contrátil ao cálcio

O relaxamento da contração do músculo liso ocorre pela redução da concentração de cálcio intracelular. Essa redução pode ocorrer pela ação da bomba de cálcio existente no retículo sarcoplasmático e na membrana plasmática, por ação dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (FLOYD e WRAY, 2007), ativação dos canais de K^+ existentes na membrana plasmática e pela ação de proteínas específicas chamadas de calsequestrina e calreticulina existentes no retículo sarcoplasmático que são ligantes de Ca^{2+} (MISSIAEN *et al.*, 1992; SPERELAKIS, 1993).

Atualmente existe a hipótese que a contração do músculo liso pode ser desenvolvida na ausência de cálcio. Isso poderia ocorrer devido à inativação da fosfatase miosínica de cadeia leve e fosforilação da cadeia leve da miosina sem a necessidade da ação da miosina quinase de cadeia leve. Os possíveis responsáveis por tal ação seriam as proteínas do tipo quinase (DENG *et al.*, 2001), dentre as quais a PKC, Rho quinase e, possivelmente, um intermediário que pode ser comum as duas vias que é a ZIP-quinase (NIRO e IKEBE, 2001).

A PKC juntamente com a Rho-quinase teria sua ação sobre a fosfatase miosínica de cadeia leve, inibindo a ação da fosfatase sobre a miosina de cadeia leve fosforilada (GANITKEVICH *et al.*, 2002). As duas teriam também a função de fosforilar a miosina de cadeia leve. A ZIP-quinase pode ser a provável responsável pela fosforilação da miosina de cadeia leve, permitindo a contração na ausência de cálcio (HARNETT e BIANCANI, 2003).

1.6.1 Músculo liso do trato gastrointestinal

A função primordial da musculatura lisa gastrointestinal é a propulsão, mistura do conteúdo luminal e controle do fluxo do bolo alimentar. O padrão de motilidade gastrointestinal está na dependência da localização da musculatura lisa no trato gastrointestinal (KUNZE e FURNESS, 1999), com o músculo liso da região proximal do estômago e esfíncteres responsáveis por uma contração tônica sustentada harmonizada e a musculatura da região distal do estômago, intestino

delgado e cólon por uma contração rítmica desenvolvida por ondas lentas, caracterizadas por ciclos de despolarização e repolarização da membrana (MURTHY, 2006).

A atividade elétrica do músculo liso gastrintestinal é lenta e quase contínua. Essa atividade é formada por duas formas básicas de ondas elétricas: ondas lentas e ondas espigais (spikes). As ondas lentas em geral não são responsáveis pela contração muscular, com exceção do estômago. Elas atuam principalmente controlando o aparecimento de potenciais em espiga e estes por sua vez causam a maior parte das contrações (CHRISTENSEN, 1971).

O músculo liso do trato gastrintestinal é organizado em feixes, formados por um grande número de fibras musculares liso. Possui uma camada longitudinal e uma circular. A conexão entre as fibras dessas camadas é feita por junções abertas, permitindo o movimento de íons de uma célula para outra (UEHARA e BURNSTOCK, 1970; SOMLYO, 1985; MOSS e HOFMANN, 1992). São fibras uninucleadas, com aproximadamente 200 a 500 μm de comprimento e de 2 a 10 μm de diâmetro.

A tensão que é formada no músculo liso gastrintestinal é desenvolvida nas três dimensões, sendo principal a que ocorre ao longo do eixo longitudinal (SOMLYO, 1985; MOSS e HOFMANN, 1992).

As camadas de músculo liso circular e longitudinal são responsáveis pelo peristaltismo do trato gastrintestinal. O peristaltismo inicia pelo estiramento da parede gastrintestinal pelo bolo alimentar (WATERMAN *et al.*, 1994). Este estiramento faz com que sejam disparados reflexos, em que a camada muscular circular próximo ao bolo alimentar se contraia e a camada muscular circular distal se relaxe. Em relação à camada muscular longitudinal, a camada próxima ao bolo alimentar se relaxa e a distal ao bolo alimentar se contrai. Este mecanismo permite que o alimento seja propelido para adiante no trato gastrintestinal.

Existem diferenças em relação à mobilização dos íons cálcio para contração entre o músculo circular e o longitudinal. No músculo liso circular ocorre principalmente à quebra do PIP_2 e formação de IP_3 . O músculo liso longitudinal possui pequenas quantidades de PIP_2 e com isso pouco IP_3 é sintetizado. Os receptores presentes no retículo sarcoplasmático do músculo longitudinal não possuem alta afinidade pelo IP_3 . Eles exibem mínima afinidade pelo IP_3 e

apresentam receptores de Ryanodiana de alta afinidade e sensibilidade pelo Ca^{2+} e ADP- Ribose Cíclica (MURTHY, 2006).

O trato gastrintestinal é controlado por um sistema nervoso próprio, que é chamado de sistema nervoso entérico. Este sistema atua juntamente com o sistema nervoso autônomo por meio do sistema parassimpático e simpático. O sistema nervoso entérico é formado por dois plexos; o mioentérico ou de Auerbach e o submucoso ou de Meissner. O plexo mioentérico, encontrado entre as camadas musculares longitudinais e circulares, controla o movimento gastrintestinal e o submucoso controla as secreções gastrintestinais e o fluxo sanguíneo local (LUNDGREN *et al.*, 1989).

O tipo de canal para cálcio responsável pela contração sustentada do músculo liso gastrintestinal é o canal para cálcio do tipo L (alto umbral), que recebe essa denominação de acordo com a cinética de ativação, inativação, condutância, especificidade iônica e sensibilidade a drogas e toxinas (SPEDDING e PAOLETTI, 1992). A adição de verapamil ou nifedipina nesses canais cessar a contração sustentada gastrintestinal por bloqueio esses canais (FARRUGIA, 1999).

O trato gastrintestinal possui células especializadas chamadas de células intersticiais de Cajal, que são responsáveis pela motilidade espontânea gastrintestinal. Essas células possuem propriedades de fibroblastos e de células musculares lisas e estão em comunicação com as camadas musculares lisas longitudinal e circular por meio de junções gap (SANDERS *et al.*, 2004).

1.6.2 Músculo liso da bexiga

A bexiga tem a capacidade de armazenar grandes volumes de urina sem que ocorra um aumento na pressão intravesical (COOLSAET, 1985), tendo o músculo liso a capacidade de mudar de comprimento sem alterações significativas na tensão. O não aumento da pressão durante o enchimento normal e a distensão da bexiga, foi de início, relacionada o mecanismo reflexo, sendo, após evidências experimentais relatadas como independentes da inervação extrínseca.

O musculo liso da bexiga é formado por feixes entrelaçados de células musculares lisas, sendo uma unidade integrada de feixes musculares

interconectados. Entre esses feixes musculares estão feixes de colágeno e elastina, com a função de manutenção da arquitetura da parede da bexiga durante o enchimento e prevenindo o estiramento (MURAKUMO *et al.*, 1995).

O músculo liso da bexiga, assim como o vascular, traqueal e outros é dependente do cálcio para a contração. O influxo de cálcio através dos canais para cálcio operados por voltagem é o evento que medeia as mudanças na concentração interna de cálcio, induzidas por despolarização. Essa despolarização permite um influxo de cálcio através dos canais de cálcio tipo L, o que induz uma liberação de cálcio dos estoques intracelulares, constituindo a maior porção do aumento transitório da concentração interna de Ca^{2+} (TAKAHASHI *et al.*, 2004).

A retirada de cálcio extracelular e bloqueadores dos canais do tipo L como a nifedipina, diminui a razão de crescimento e amplitude do potencial de ação (MOSTWIN, 1986). A contração do músculo liso detrusor é dependente de segundo mensageiro mediado por acetilcolina ou seu análogo o carbacol (Cch) (IACOVOU *et al.*, 1990).

A inervação do trato urinário inferior tem componente parassimpático e simpático. O componente parassimpático é dependente da inervação sacral da medula. A estimulação neuronal parassimpática ocorre em sua maioria por receptores muscarínicos do tipo M_3 , tendo como principal neurotransmissor excitatório a acetilcolina (MARTÍNEZ *et al.*, 2005).

O núcleo na medula sacral do detrusor possui conexão com a ponte e o lobo frontal do sistema nervoso central (SNC). O SNC é responsável por exercer uma inibição constante sobre o núcleo do detrusor, evitando a contração da bexiga e a micção. Essa ação do SNC é inicialmente inconsciente e torna-se consciente após os estímulos aferentes dos receptores de distensão.

Assim como no trato gastrointestinal, células intersticiais semelhantes as ICC também estão presentes no trato urinário. Na bexiga elas estão localizadas tanto no tecido suburotelial, como nas camadas de músculo liso, tendo associação com nervos intramurais. Sua função é de gerar a excitação espontânea da bexiga (YANAI *et al.*, 2006). Essa atividade espontânea está relacionada com contrações que são resistentes à tetrodotoxina (TTX) e não podem ser bloqueadas por hexametônio (HEX), atropina e bloqueadores de α -adrenoceptores.

1.6.3 Músculo liso vascular

O sistema vascular é formado por artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias. As artérias, arteríolas, vênulas e veias possuem como principais funções permitir o fluxo sanguíneo e regulação da pressão sanguínea (PUGSLEY e TABRIZCHI, 2000). Já os capilares têm importância fundamental na troca de nutrientes.

Esses vasos são formados por três camadas, que são chamados de túnicas. São: elas a túnica externa, túnica media e túnica interna (BORYSERNKO e BERINGER, 1984).

A túnica externa esta localizada na porção externa do vaso, com predominância de fibras elásticas na sua composição. A túnica media esta presente na região intermediaria e possui como principais componentes músculo liso e fibras elásticas, sendo essa camada mais desenvolvida nas artérias. A túnica interna localiza-se na região interna e tem como principal constituinte tecido epitelial, denominado de endotélio. Os capilares são os únicos vasos que possuem somente a túnica interna (BERNE e LEVY, 2004).

Dentre esses vasos o mais elástico são as artérias, por estarem sujeitas a uma maior pressão arterial e por possuírem uma túnica média mais desenvolvida.

As células do músculo liso vascular possuem um diâmetro maior na região central. O diâmetro maximo dessas células varia de 5 a 10 μm e longitudinalmente entre 20 a 200 μm . São células de morfologia fusiformes, contendo em sua estrutura filamentos protéicos de miosina e actina. Sendo menor o conteúdo de miosina e maior de actina, quando comparado ao músculo esquelético (BORON e BOULPAEP, 2005).

O tecido muscular liso possui inervação sensitiva e motora, provenientes das fibras pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo, que respondem a estímulos mecânicos e químicos. Dentre as substancias químicas que podem causar estimulação do músculo liso vascular temos, a serotonina (RAMAGE e VILLALÓN, 2008), aldosterona (CACHOFEIRO *et. al.*, 2008), oxido nítrico, adrenalina, acetilcolina e outros (BOLTON, 1979; RANG *et. al.*, 2004).

A musculatura lisa desses vasos possui mecanismo contrátil semelhante aos outros músculos, respondendo a estímulos eletromecânicos e/ou

farmacomecânicos. Sua contração é dependente do aumento do cálcio citoplasmático, que pode ser originado do meio extracelular e/ou intracelular (NILSSON, 1998).

São músculos que podem ser tônicos, desenvolvendo um tônus basal sustentado, como a aorta, ou fásicos, com variações da sua atividade elétrica, apresentando uma atividade rítmica espontânea, como a veia porta (PAIVA e FARIAS, 2005).

No músculo fásico, a atividade rítmica espontânea acredita-se ser desenvolvida pela ação de células intersticiais, que são semelhantes as células intersticiais de Cajal do músculo liso do trato gastrintestinal (HARRUN *et al.*, 2005). Essa contração espontânea rítmica ocorreria através dos canais de cálcio do tipo T.

No músculo liso vascular são identificados vários tipo de canais para cálcio, como os canais operados por voltagem (VOC), canais operados por receptor (ROC) e canais catiônicos não seletivos permeáveis ao cálcio como os canais operados por estoque (SOC), canais operados por estresse mecânico (SAC) e canais ligados a ligantes, como o canal com o receptor purinérgicos P2X.

Em relação aos músculos vasculares fásicos, mais especificamente a veia porta, a vasoconstrição seria uma resposta secundária obtida via segundo mensageiro, que causariam a abertura principalmente de canais para Cl^- dependentes de cálcio, causando a despolarização e abertura dos canais para Ca^{2+} voltagem dependentes do tipo L (BURT, 2003).

A veia porta é uma veia formada pela veia mesentérica superior e veia esplênica. Em relação às outras veias, ela possui como diferença a ausência de válvulas, podendo em situações específicas desenvolver um fluxo reverso. A veia porta é responsável por receber o sangue venoso proveniente de todo o intestino, do baço, do pâncreas e da vesícula biliar, direcionando esse fluxo para o fígado (MARTINELLI, 2004).

1.7 Canais de cálcio

O cálcio é o elemento fundamental para que ocorra o funcionamento normal dos sistemas orgânicos. Sendo primordial para a contração do músculo liso.

Os íons cálcio quando associado à proteína calmodulina, forma o complexo Ca^{+2} - calmodulina, que ativa a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), permitindo a fosforilação da miosina de cadeia leve, levando a interação da miosina e da actina, usando como energia a quebra do ATP (SOMLYO *et al.*, 1999). Este evento 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 visceral, que são ativados por despolarização, agonistas ou por estímulos mecânicos.

Os canais específicos para cálcio podem ser operados por voltagem (VOC) e canais para cálcio operados por receptores de membrana (ROC). 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 operados por estoque (SOC) ou entrada de Ca^{2+} capacitiva (CCE) (PUTNEY e RIBEIRO, 2000), os canais ativados por estresse mecânico que são chamados de SAC e os canais operados por ligantes.

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

Os VOCs, de acordo com a sua propriedade eletrofisiológica e farmacológica pode pertencer a três famílias: canais sensíveis a diidropiridina (DHP) ativados por alta voltagem (tipo-L, $\text{CaV}_{1.1}$, $\text{CaV}_{1.2}$, $\text{CaV}_{1.3}$, $\text{CaV}_{1.4}$), canais insensíveis a diidropiridina ativados por alta voltagem ($\text{CaV}_{2.1}$, $\text{CaV}_{2.2}$, $\text{CaV}_{2.3}$) e canais ativados por baixa voltagem (tipo-T, $\text{CaV}_{3.1}$, $\text{CaV}_{3.2}$, $\text{CaV}_{3.3}$) (ERTEL *et al.*, 2000).

Os canais do tipo L ou canais sensíveis a DHP estão presentes nos músculos esqueléticos e lisos, são canais que são 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 causa a despolarização da membrana, como os canais para Cl^- dependentes de cálcio e canais catiônicos não seletivos. Os canais para 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 Cl^- ativada por Ca^{2+} ,

levando despolarização da membrana e ativando com isso os canais para cálcio tipo L (SANDERS, 2001).

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 esta presente no SNC e sistema nervoso periférico (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 do tipo T, são canais que são 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 ROC, englobam os canais operados receptores acoplados a proteína G, dentre eles os canais sensíveis ao IP_3 ($InsP_3R$) 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 PLC mediante a quebra do PIP_2 pela ação da proteína G ou 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 foi identificado 3 isoformas dos 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 que são ativados por correntes de cálcio provenientes tanto do canais VOCs, quando dos canais para cálcio com receptores de IP_3 (WRAY *et al.*, 2005). São canais onde correntes de cálcio ativam a liberação de cálcio (CICR). 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 e NELSON, 2003).

Atualmente foi observado que os canais ativados por IP₃ também sofrem a ação do cálcio. As concentrações de cálcio citosólica, na presença de IP₃, podem ativar ou inativar esses canais. Isso ocorre devido à existência nesses canais de sítios de ligações de cálcio, que dependendo da concentração de cálcio no citoplasma, podem aumentar ou diminuir a probabilidade de abertura do canal. A ação do cálcio sobre esses canais vai depender da presença e da concentração do IP₃ ligado ao receptor, sendo mais sensível a inibição pelo cálcio quando existe baixa concentração de IP₃ (< 100 nM). A inibição também ocorre quando o receptor não estiver ligado ao IP₃ e quando mesmo ligado ao IP₃ existir altas concentrações de cálcio no citoplasma. O aumento da probabilidade de abertura desses canais pelo Ca²⁺ citoplasmático, só irá ocorrer na presença do IP₃ (CHALMERS *et al.*, 2007).

Além dos canais específicos para cálcio, existem outros canais sem especificidade para o cálcio, mas que permitem a passagem de cálcio. São eles os canais catiônicos não seletivos (NSCC), que são canais que podem ser ativados por agonista, por um estímulo mecânico e por depleção dos estoques de cálcio do retículo. São canais que não possuem seletividade por cálcio. Quando ativados podem contribuir com o aumento do cálcio citosólico, por permitir a passagem de cálcio ou de um cátion, como o 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 operado por estiramento (SAC) (GUIBERT *et al.*, 2008). Um provável efeito desses canais em relação à ativação por um estímulo mecânico, pode ser observado em músculo liso vascular, quando ocorre a elevação da pressão intravascular.

Em alguns músculos lisos existem canais catiônicos não seletivos que são ativados por ATP. Esses canais estão acoplados a receptores chamados de P2X, que são ativados na presença de ATP liberado junto a alguns neurotransmissores (GEVER *et al.*, 2006). Os receptores do tipo potencial transiente também podem estar envolvidos com os canais catiônicos não seletivos.

Os canais operados por estoques (SOC) são canais presentes na membrana plasmática, que são ativados pela depleção dos estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático, possibilitando a recarga dos estoques de cálcio do retículo (McFADZEAN e GIBSON, 2002).

Os mecanismos de ativação desse tipo de canal ainda não estão totalmente desvendados, mas existem duas hipóteses para sua ação. Nos miócitos

da aorta, a ação desse canal pode ocorrer pela liberação do RS, quando ocorre depleção dos seus estoques, de um fator de influxo de cálcio (CIF), que vai agir sobre os SOCs. A outra hipótese foi observada nas células musculares da veia porta, onde pela depleção dos estoques 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. Também não está elucidado se a quinase vai agir diretamente sobre a proteína do canal ou sobre um intermediário levado a abertura dos SOCs, (ALBERT e LARGE, 2003).

Provavelmente os SOCs, não têm somente o papel de recarregar os estoques de Ca^{2+} do RS, mas tenham participação da contração sustentada, que pode ocorrer diretamente pelo influxo de Ca^{2+} dos SOCs ou pela estimulação indireta, por despolarização e abertura dos canais VOC. Possivelmente o receptor envolvido com os canais do tipo SOC, são os receptores de potencial transiente (TRP) do tipo TRP_2 , TRP_4 e TRP_5 . Esse tipo de receptor foi inicialmente achado em fotorreceptores de *Drosophila*, tendo um papel fundamental na entrada de cálcio operada por estoque (BEECH *et al.*, 2004).

1.8 Semelhanças e diferenças entre os músculos liso do íleo, bexiga e veia porta em relação aos canais para cálcio.

O músculo liso do íleo, da bexiga e veia porta possuem diferenças e semelhanças entre si. Em relação à semelhança, a que mais se destaca é a classificação desses músculos, em músculo fásico. Por serem músculos fásicos esses três tipos de músculo apresentam atividade espontânea, com ciclos de contração seguindo por relaxamento (MIKKELSEN, 1985; SANDERS *et al.*, 2004; ANDERSSON e ARNER, 2004).

O provável responsável por tal atividade são células especializadas que possuem características tanto de músculo liso, como de fibroblastos, estando localizadas em contato com o músculo liso de cada estrutura. Estas células são denominadas de células intersticiais, e foram primeiro identificadas no trato gastrointestinal, onde receberam o nome de células intersticiais de Cajal. Na bexiga

(VAN DER AA *et al.*, 2004) e veia porta (HARHUN *et al.*, 2005) a localização dessas células é mais recente.

Uma das hipóteses da ação dessas estruturas nos três tipos de músculo para causar a motilidade espontânea é através da abertura de canais para cálcio do tipo T, que permite um influxo de cálcio, causando a motilidade espontânea (FRY *et al.*, 2006; CRIBBS, 2006). Além da provável participação dos canais para cálcio tipo T, também existe a hipótese da existência de outros canais na geração e propagação dessa atividade nos três tipos de músculos lisos, que são os canais para cálcio tipo L e canais para cloreto ativados por cálcio.

Nos três tipos de músculo é observada a presença de canais para cálcio do tipo sensíveis a diidropiridina (canais para cálcio do tipo L) e canais para cálcio insensíveis a diidropiridina (canais de cálcio do tipo T) (BOLTON *et al.*, 1999; ZHONG *et al.*, 1999; SUI *et al.*, 2003). Além desses canais específicos para cálcio ainda existe a presença de canais que permitem a passagem de cálcio, mas não tem especificidade para esses íons, que são os canais catiônicos não seletivos (THORNELOE e NELSON, 2004; ALBERT *et al.*, 2007). Nesse três tipos de músculo liso existe outros tipos de canais para íons, que não são permeáveis ao cálcio, que são os canais para cloreto ativados por cálcio e canais para potássio ativados por cálcio (ANDERSSON e ARNER, 2004; NILSSON, 1998; VOGALIS *et al.*, 1998).

Nos três tipos de músculo liso é possível também identificar a presença de receptores purinérgicos ativados por ATP do tipo P2X (GEVER *et al.*, 2006). Tanto o íleo como a bexiga e a veia porta exibem canais para cálcio do tipo SOC e canais do tipo SAC. Os três tipos de músculo liso emitem pequenas liberações espontâneas de cálcio, que quando provenientes do IP₃R são chamados de puffs (PARKER e YAO, 1991) e dos RyR são os sparks (JAGGAR *et al.*, 2000).

Uma das diferenças existentes entre esses músculos lisos fásicos, está na via de Ca²⁺ predominante para o aumento da concentração de cálcio citosólico responsável pela contração, podendo ser proveniente do meio extracelular e/ou proveniente do meio intracelular dos estoques do retículo sarcoplasmático.

Na veia porta, a predominância do cálcio para a contração é oriundo do meio extracelular, que entra na célula principalmente por meio dos canais para cálcio do tipo L (KAMISHINA e McCARRON, 1996). Nesse músculo liso, a estimulação por agonista ligado a proteína G, causa a estimulação da liberação dos estoques intracelulares de cálcio por receptores de IP₃, o cálcio liberado estimula a abertura

dos canais para cloreto dependentes de cálcio que causam a despolarização e a abertura dos canais tipo L, causando a contração. Além das correntes de cloreto dependentes de cálcio, foi observado em veia porta de coelhos, que alguns agonistas, como a norepinefrina, podem ativar correntes catiônicas não seletivas e correntes de potássio ativados por cálcio, sendo a primeira responsável pela despolarização e a segunda pela limitação da despolarização (BYRNE e LARGE, 1988).

O músculo liso da veia porta apresenta uma fase fásica da contração, que é em maior parte dependente dos estoques intracelulares, pouco proeminente em relação aos outros músculos fásicos. Sua contração tônica, ao contrário da fásica, é bem desenvolvida. Na contração fásica, os canais para cálcio do tipo VOCs terão ação primordial de recarregar os estoques intracelulares. A liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) em veia porta parece ser pouco representativa ou até mesmo ausente, tendo pouca contribuição no aumento do cálcio induzido por despolarização (KAMISHINA e McCARRON, 1996).

Na bexiga, o cálcio responsável pela contração, é originado quase que totalmente dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático, que são liberados pelos receptores do tipo RyR e IP₃R. Os canais do tipo L nesse tipo de músculo parecem ter a função de recarregar os estoques intracelulares de cálcio (WU *et al.*, 2002).

Em bexiga humana, foi observado que a estimulação por agonista colinérgicos causa quase que exclusivamente a liberação do cálcio dos estoques intracelulares, com pouco ou nenhuma alteração do potencial de membrana, causando a estimulação dos receptores IP₃ e estimulando os RyR por CICR. O mecanismo CICRs que ocorre ativando os canais RYR por meio da ativação dos VOCs é mais importante no músculo liso de bexiga (HOTTA *et al.*, 2007) que em veia porta (KAMISHINA e McCARRON, 1996).

Durante a contração do músculo liso de bexiga é observado que a fase fásica da contração é bem mais desenvolvida que a tônica, o que pode ser provavelmente explicado pela maior dependência do cálcio intracelular que o extracelular.

No íleo, a dependência dos estoques de cálcio extracelular e do cálcio intracelular ocorre de maneira sinérgica, com a participação tanto do cálcio intracelular como do extracelular durante a contração. Quando ocorre a contração do

músculo liso do íleo por um agonista muscarínico ocorre à estimulação, via proteína G, da liberação do cálcio intracelular com ativação dos canais catiônicos não seletivos, com predominância da passagem dos íons Na^+ e despolarização da membrana, causando a abertura dos VOCs do tipo L e influxo do cálcio extracelular (ZHOLOS, 2006).

Nesse caso os canais do tipo L são necessários para a contração sustentada. Essa contribuição dos canais do tipo L na contração do músculo liso do íleo pode ser observada pela indução da contração por agonistas muscarínico na presença de bloqueadores dos canais do tipo L ou na ausência do cálcio extracelular, onde é observada uma redução da contração. Outros canais, como os de cloreto e os de K^+ podem também ser abertos e contribuir para a despolarização e ativação dos canais do tipo L (SANDERS, 2008).

O íleo apresenta as duas fases da contração equivalentes, sem o predomínio de uma sobre a outra, mostrando a possível dependência tanto do cálcio intracelular como do extracelular para a contração. Quando se bloqueia a liberação do cálcio dos estoques intracelulares é observada uma redução de até 73% da contração fásica induzida por agonista muscarínico (GORDIENKO *et al.*, 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Analisar os efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg e de seu constituinte β -cariofileno (β -CAR) em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

2.2 Específico

- Determinar a ação farmacológica do OECa e do seu constituinte β -CAR, caracterizando seu efeito sobre a atividade contrátil no músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.
- Investigar o mecanismo de ação farmacológica do OECa e do seu constituinte β -CAR nos parâmetros contrateis do acoplamento farmacomecânico e eletromecânico da contração muscular lisa de veia porta, íleo e bexiga.
- Verificar a existência de especificidade do OECa e do seu constituinte β -CAR em relação ao músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.
- Observar o efeito do OECa e do seu constituinte β -CAR na liberação dos estoques de cálcio do meio intracelular e extracelular nos três tecidos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Sais e fármacos

Os sais que foram usados no preparo das soluções fisiológicas possuíam grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (ST. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, BR). Sendo a concentração expressas em milimol/litro (mM/L) ou micromol/Litro (μ M/L).

Foram utilizadas as seguintes substâncias: cloridrato de acetilcolina (ACh), polyoxyethylenesorbitan tristearate ou Tween 80 (TW) e ácido etileno-bis (β -amino-etil-éter)-N, N, N, N-tetracético (EGTA).

3.2 Óleo Essencial de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. (OECa)

O estudo foi feito com óleo essencial proveniente de uma amostra de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. originada da cidade de Viçosa do Ceará, coletada no em abril de 2005. O óleo essencial de *Croton argyrophyloides* Muell. Arg foi obtido das folhas através de método de hidrodestilação, no Departamento de Química e Física da Universidade Estadual do Ceará.

A classificação botânica da planta foi confirmada pelo Dr. Afrânio Fernandes, e uma amostra desta espécie consta do acervo do Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A composição química do OECa foi determinada no parque de desenvolvimento tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará, através do método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/ MS, Hewllet-Packard 5971) onde foram observados os seguintes constituintes majoritário: 26,65% de espatulenol, 13,13% de oxido β -cariofileno, 12,15% de β -elemene, 10,94% de β -cariofileno e 5,16% de germacrene B e outros (tabela 1).

TABELA 1 - composição do óleo essencial do *Croton argyrophyllodes* Muell. Arg. listados por ordem de saída na coluna não polar do cromatógrafo de gás.

<i>CONSTITUINTES</i>	<i>%</i>
α - Pineno	2,43
Sabineno	2,29
1,8-cineol	4,31
β - Elemene	12,15
β - cariofileno	10,94
Aromadendreno	2,30
α - humuleno	2,56
Allo- aromadendreno	3,41
β - selineno	2,83
Germacrene B	5,16
Espatulenol	26,65
Oxido β - cariofileno	13,13
Outros constituintes não identificados	13,84
<i>TOTAL</i>	<i>100</i>

Fonte: Amostra coletada em viçosa do Ceará em Abril de 2005.

3.3 Soluções

Foi utilizada como solução nutritiva Tyrode modificado (TM) contendo em mM: NaCl 136,0; KCl 5,0; MgCl₂ 0,98; CaCl₂ 2,0; NaH₂PO₄ 0,36; NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5 com pH ajustado para 7,4. A solução de Tween (TW) 80 a 1% será obtida pela diluição de TW diretamente em TM.

O OECa foi utilizado a partir de soluções estoques, feitas com a diluição do óleo em TM em alguns protocolos e em outros diluindo em solução de TM e TW, seguido de agitação manual.

A solução zero cálcio foi preparada com a omissão de CaCl₂ da solução de TM e adição de 0,2 mM de EGTA

3.4 Animais e preparação dos tecidos

Os animais utilizados foram ratos Wistar (machos), com peso entre 200 g a 250 g, oriundos do biotério central da Universidade Federal do Ceará e mantidos na Universidade Estadual do Ceará, permanecendo em gaiolas com água e ração *ad libidum*, e aclimatizados com ciclos naturais dia / noite.

A manipulação dos animais seguiu as normas de manipulação de animais de laboratório determinadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo os protocolos passado pela aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará com o nº 08439490-0.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e logo após pesados. Foi então feita uma incisão cirúrgica longitudinal da pele na face ventral da região abdominal. Após isso foi removido, por dissecação, tiras do íleo, bexiga e veia porta. A veia porta, antes de ser retirada do rato, foi amarrada com fio de algodão. Os tecidos foram transferidos rapidamente para uma placa de Petri contendo solução fisiológica de Tyrode com pH de 7,4, onde foi feita a preparação e a limpeza do tecido para montagem. O estudo foi realizado no músculo liso longitudinal do íleo, bexiga e veia porta.

As amostras tanto do íleo como da bexiga e veia porta, foram montadas, cada uma por vez, em câmaras de perfusão contendo 5 ml da solução nutritiva de Tyrode, aerado por borbulhamento de ar atmosférico, com temperatura de 37°C e pH de 7,4, permanecendo por um período de estabilização de 1 hora antes de iniciar os protocolos. A força de contração foi mensurada por transdutor de força (Grass, Modelo FT03), sendo uma extremidade conectada ao transdutor e a outra a uma base fixa, por meio de fio de algodão. O transdutor acoplado a um pré-amplificador (DATAQ modelo PM 100), e este conectado na entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador IBM Pentium, sendo os dados convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software Windaq versão 1,65 (DATAQ Instrumentos, Inc. USA) para análise posterior (figura 4). Os experimentos foram realizados de forma a sempre existirem preparações controles e experimentais, que foram submetidas aos mesmos protocolos e situações.

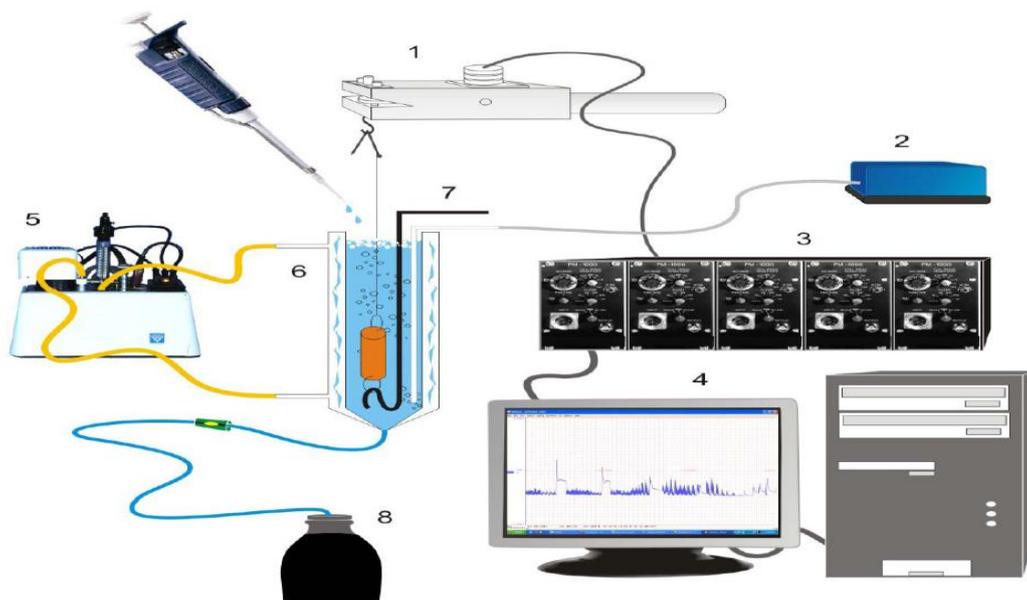


FIGURA 4 - Representação esquemática do sistema utilizado para registro das contrações: 1) transdutor de força (Grass, modelo FT 03), 2) Bomba de oxigenação, 3) Amplificador (DATAQ, modelo PM 1000), 4) Sistema Windaq DI-200, 5) Banho de circulação, 6) Cuba 5 ml, 7) Haste fixa, 8) Coletor
 Fonte: JUCÁ, 2007.

3.5 Protocolos experimentais

Para todos os tecidos (veia porta, íleo e bexiga) utilizados, foram realizadas curvas concentração-resposta, usando concentrações de 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml e 1000 µg/ml, para determinar os efeitos do OECa e do β-CAR. Em alguns protocolos, a concentração final foi até 1300 µg/ml. As curvas foram obtidas pela exposição dos tecidos a concentrações crescentes, cumulativas ou não, adicionadas ao banho, por período suficiente para formação de um platô da resposta. Em todos os experimentos foram testada a viabilidade da preparação, através de uma contração inicial obtida pela adição de 60 mM de KCl.

O grupo experimental recebeu o tratamento com OECa e β-CAR, e o controle apenas o veículo nas mesmas concentrações presentes nas soluções de OECa e do β-CAR. O veículo que foi utilizado nos grupos controle, foi à solução fisiológica contendo Tween (TW) 80.

Com o objetivo de avaliar o efeito do OECa e do β -CAR em um determinado parâmetro seguiu-se, sempre que possível, o protocolo de colher o valor do parâmetro no controle (controle inicial), depois em presença do óleo e constituinte, e após a lavagem deste, em intervalos regulares, até a recuperação (controle posterior).

3.5.1 Protocolos para músculo liso do Íleo, bexiga e veia porta.

3.5.1.1 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre a contração submaximal induzida por K^+ em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta (protocolo 1).

Este protocolo foi realizado com a finalidade de observar o efeito do OECa ou β -cariofileno na contração do músculo liso que ocorre pelo acomplamento eletromecânico. Inicialmente foi realizada, uma curva concentração-dose-resposta para a obtenção da concentração de K^+ que promoveu uma contração submaximal ($\cong 70$ a 80 % da contração máxima obtida) em músculo liso. Essa concentração foi utilizada para induzir a contração no músculo liso e tomada como controle inicial do experimento. Diferentes concentrações de OECa ou β -cariofileno foram adicionadas ao banho, de forma não cumulativa, por um período de 5 minutos, e em seguida, na presença de uma dada concentração do OECa ou do β -cariofileno, a mesma concentração de KCl que promoveu contração submaximal foi adicionada ao banho (figura 5). As amplitudes dessas contrações foram medidas e comparadas com aquelas do controle.

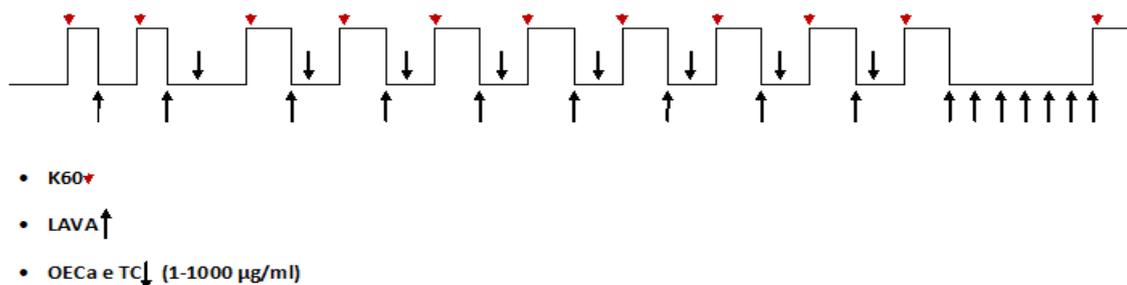


FIGURA 5 - representação esquemática do protocolo 1.

3.5.1.2 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre a contração submaximal induzida por acetilcolina (ACh) em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta (protocolo 2).

Com a finalidade de investigar o efeito do OECa ou β -cariofileno sobre a o acoplamento farmacomecânico, foi induzido uma contração submaximal obtida pela exposição do tecido a ACh. O protocolo foi iniciado com a determinação da concentração de ACh que induziu a contração submaximal que corresponde à aproximadamente 70 a 80 % da contração máxima obtida, sendo esta contração utilizada como controle. O OECa ou β -cariofileno foi adicionado ao banho em concentrações crescentes e não cumulativas, 5 minutos antes da adição da concentração de ACh que produziu contração submaximal. No grupo controle foi adicionado apenas o veiculo. A resposta foi quantificada e comparada à resposta controle (figura 6).

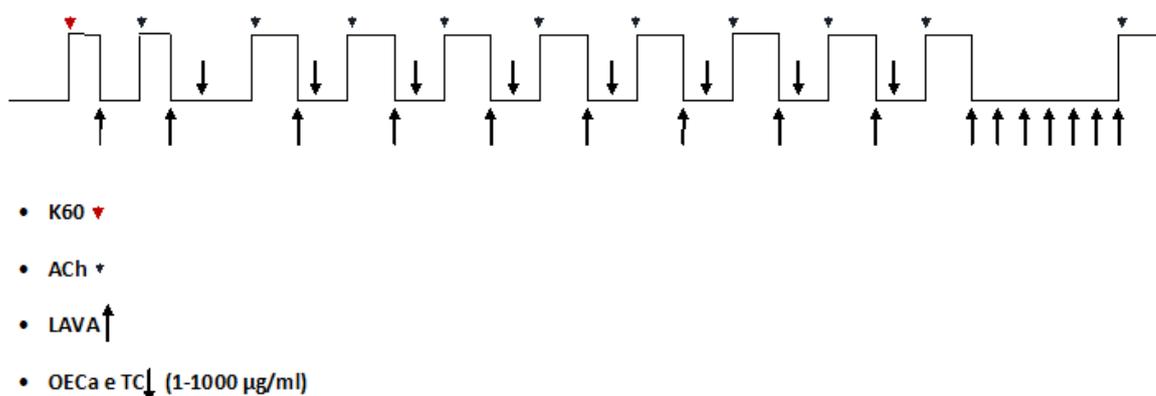


FIGURA 6 - representação esquemática do protocolo 2.

3.5.1.3 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso do íleo, bexiga e veia porta despolarizado com 60 mM de K^+ (protocolo 3).

Este protocolo foi utilizado para determinar o possível efeito do OECa e do β -cariofileno na contração induzida por Ca^{2+} . Após verificar a responsividade do tecido pela indução de uma contração por 60 mM de K^+ , o músculo liso foi mantido

em uma solução de Tyrode com K^+ alto (60mM) sem $CaCl_2$ e contendo um agente quelante de Ca^{2+} , o EGTA (0,2 mM), para assegurar um meio com o mínimo de Ca^{2+} possível (CUTHBERT *et al*, 1994). Em seguida foi realizada uma curva concentração-efeito ao cálcio pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de $CaCl_2$ (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM). Esta curva foi tomada como controle inicial. A preparação então foi novamente lavada com Tyrode com K^+ alto sem Ca^{2+} e com EGTA, onde uma nova curva concentração-efeito para o Ca^{2+} foi realizada, na presença de 300 μ g/ml de OECa ou 100 μ g/ml de β -cariofileno. Ao final, o tecido foi recuperado por lavagens sucessivas com Tyrode por 60 minutos, e repetida a curva concentração-efeito para o Ca^{2+} em tyrode com K^+ alto contendo EGTA (controle posterior). As curvas concentração-efeito obtidas em presença de OECa ou β -cariofileno foram quantificadas e comparadas com a curva controle (inicial)(figura 7).

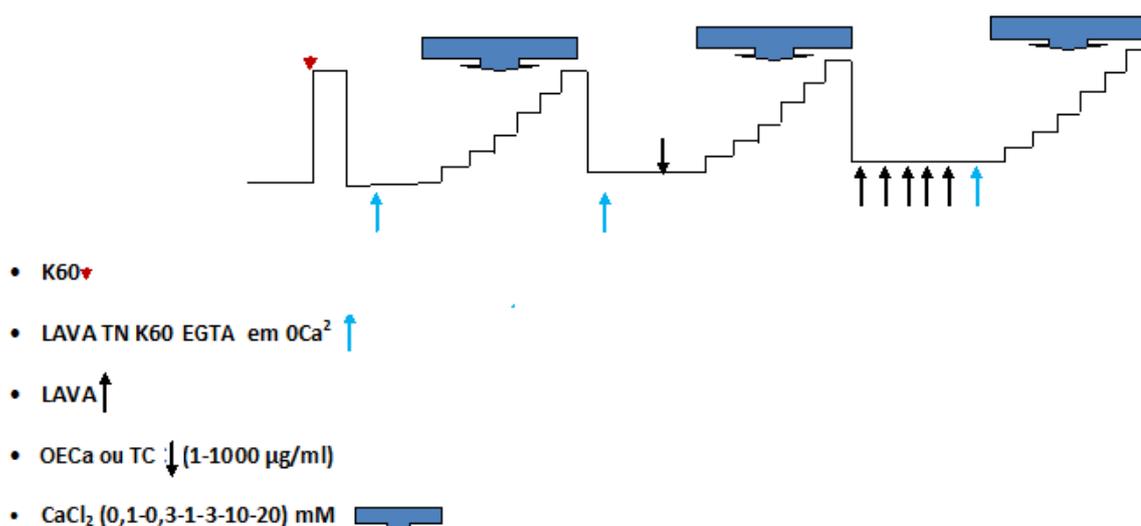


FIGURA 7 - representação esquemática do protocolo 3.

3.5.1.4 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em meio 0Ca²⁺, em músculo liso de íleo, veia porta e bexiga pré-tratado com acetilcolina (ACh) na presença de verapamil (protocolo 4).

Para investigar o efeito do OECa ou β -cariofileno sobre canais para Ca^{2+}

operados por receptor (ROC) de membrana plasmática, realizamos o protocolo descrito abaixo. Utilizamos o verapamil (1 μ M), um bloqueador de canal de cálcio voltagem dependente, para garantir a não participação desses canais nos eventos contráteis. Após testar a responsividade do tecido com 60 mM de K⁺, a preparação foi lavada com Tyrode sem Ca²⁺ contendo EGTA (0,2 mM), e verapamil (1 μ M). Imediatamente após a adição de ACh (10 μ M), foi realizada uma curva concentração-efeito pela adição de CaCl₂ nas seguintes concentrações: 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM, constituindo o controle inicial. A seguir a preparação foi novamente lavada com Tyrode sem Ca²⁺ e contendo EGTA (0,2 mM), além de verapamil (1 μ M). Imediatamente após adição de ACh (10 μ M) a curva concentração-efeito para o Ca²⁺ foi repetida na presença de 300 μ g/ml de OECA ou 100 μ g/ml de β -cariofileno. As contrações obtidas em presença do OECA ou β -cariofileno foram quantificadas e comparadas ao controle inicial (figura 8).

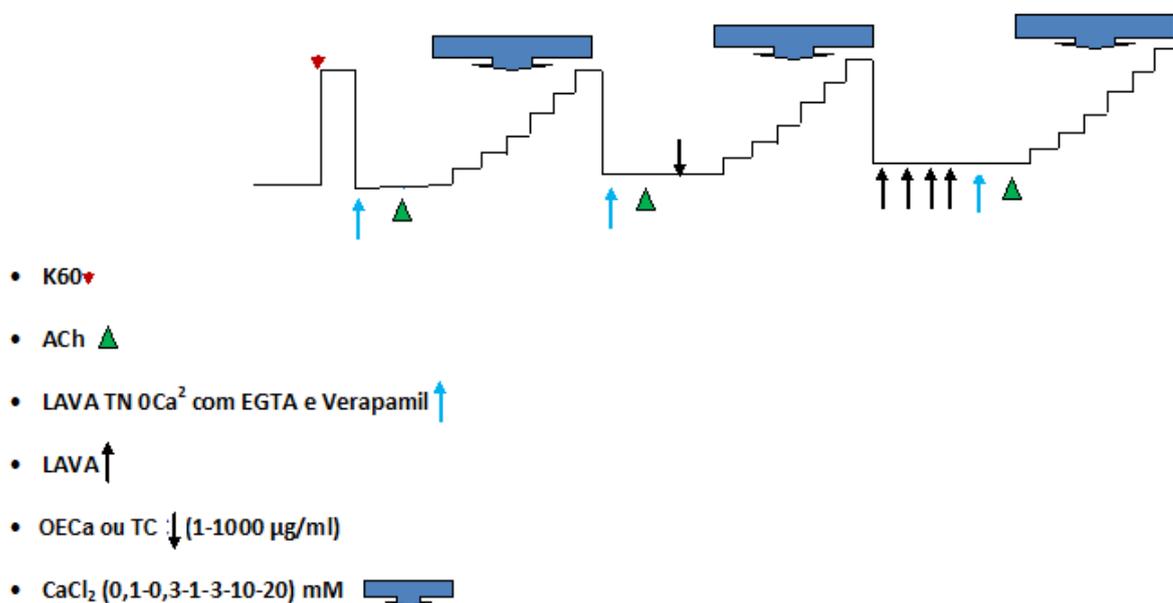


FIGURA 8 - representação esquemática do protocolo 4.

3.5.1.5 Efeito do OECA ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por Ba²⁺ em meio 0Ca²⁺, em músculo liso de íleo, veia porta e bexiga pré-tratado com 60 mM de K⁺ (protocolo 5).

O protocolo foi realizado para investigar ação do OECA e do β -cariofileno

sobre os estoques de cálcio provenientes do meio extracelular necessários para a contração. Após verificar a responsividade do tecido pela indução de uma contração por 60 mM de K^+ , o músculo liso intestinal foi mantido em uma solução de Tyrode com K^+ alto (60mM), $0Ca^{2+}$ e contendo um agente quelante de Ca^{2+} , o EGTA (0,2 mM), para assegurar um meio sem Ca^{2+} (CUTHBERT *et al*, 1994). Em seguida a foi realizada uma curva concentração-efeito ao bário pela adição de concentrações crescentes e cumulativas de $BaCl_2$ (0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM). Esta curva foi tomada como controle inicial. A preparação então foi novamente lavada com Tyrode com K^+ alto sem Ca^{2+} e contendo EGTA, onde uma nova curva concentração-efeito para o Ba^{2+} foi realizada, na presença de 300 $\mu g/ml$ de OECa ou 100 $\mu g/ml$ de β -cariofileno. Ao final, o tecido foi recuperado por lavagens sucessivas com Tyrode por 60 minutos, e repetida a curva concentração-efeito para o Ba^{2+} em tyrode com K^+ alto sem $CaCl_2$ contendo EGTA (controle posterior). As curvas concentração-efeito obtidas em presença de OECa ou β -cariofileno foram quantificadas e comparadas com a curva controle (inicial)(figura 9).

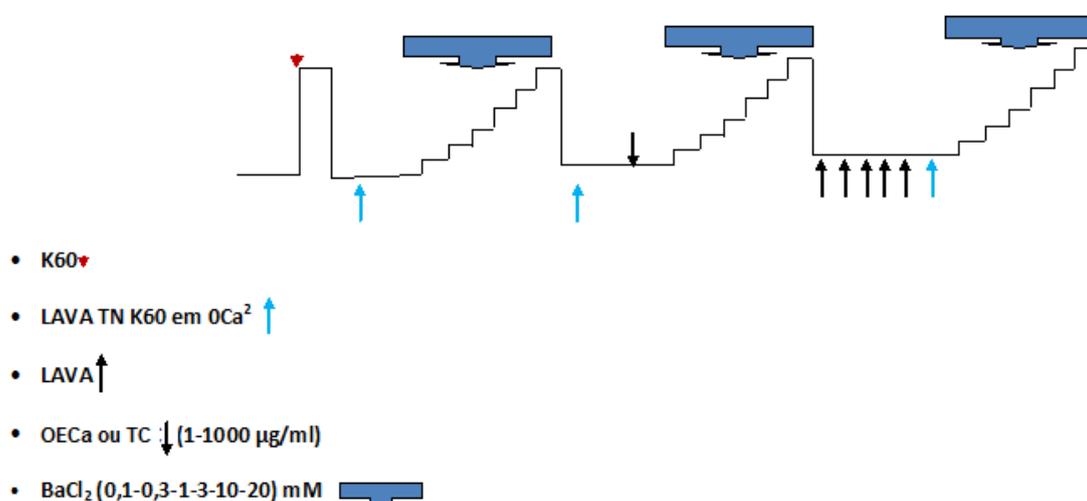


FIGURA 9 - representação esquemática do protocolo 5.

3.5.1.6 Efeito do OECa ou β -cariofileno sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em meio $0Ca^{2+}$ mais EGTA em músculo liso de íleo, veia porta e bexiga (protocolo 6).

O protocolo foi realizado para investigar ação do OECa e do β -cariofileno

sobre os estoques de cálcio provenientes do meio intracelular necessários para a contração. Inicialmente, foi testada a viabilidade da preparação com uma contração induzida por 60 mM de K^+ . Em seguida, o tecido foi lavado com tyrode $0Ca^{2+}$ mais EGTA (0,2 mM). Imediatamente após foi induzida contração máxima por ACh (60 μ M), que foi utilizada como controle inicial. O tecido foi novamente lavado com tyrode normal, e contraído por 60 mM de K^+ . Em seguida, foi feita nova lavagem com tyrode $0Ca^{2+}$ mais EGTA. A concentração do OECa de 300 μ g/ml ou 100 μ g/ml de β -cariofileno, ou ainda veículo, foi adicionado ao banho, e outra contração com ACh foi induzida. As alterações na contração induzida por ACh na presença do OECa ou β -cariofileno, ou ainda veículo, foram comparadas com o controle inicial (figura 10).

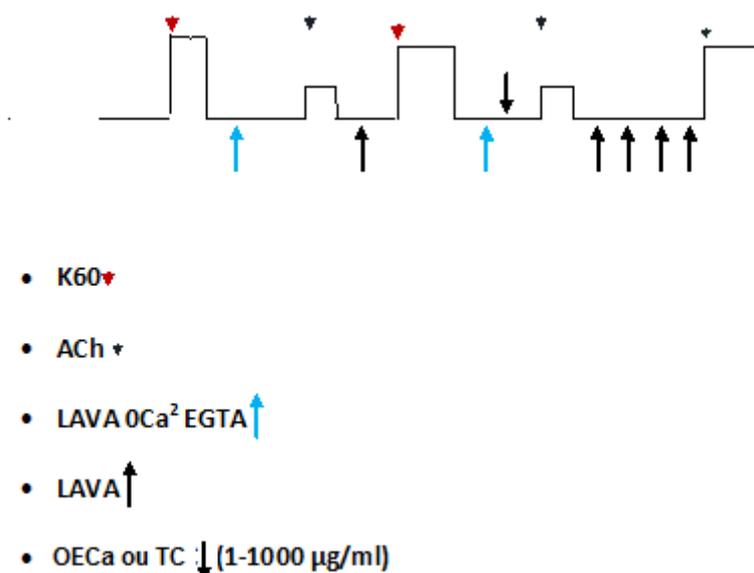


FIGURA 10 - representação esquemática do protocolo 6.

4 ANALISE ESTATÍSTICA

A apresentação dos resultados foi como média \pm E.P.M. (n), onde E.P.M é o erro padrão da média e “n” o número de experimentos. Os resultados para serem considerados significativos, apresentaram probabilidades de ocorrência da hipótese nula menor que 5% $p < 0,05$. Os gráficos foram produzidos por meio do software Sigma Plot 10. Sendo utilizado o teste ANOVA seguido de um teste de comparação múltipla conforme seja necessário. Os cálculos de IC50 ou EC50 foram feitos por interpolação semilogaritmica, sendo considerado como a concentração de substância capaz de produzir 50% de sua inibição ou de seu efeito máximo, calculado individualmente para cada experimento.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do OECa sobre a contração submaximal induzida por K⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

5.1.1 Efeito do OECa no componente fásico da contração induzida por K⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de K⁺ capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 60 mM de K⁺ para o íleo e veia porta, e 50 mM de K⁺ para bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração fásica, que teve como amplitude média $0,388 \pm 0,024$ g, $1,728 \pm 0,063$ g e $1,127 \pm 0,069$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. O OECa foi capaz de promover o bloqueio da contração nos três tecidos, como pode ser visto na figura 11, de forma dependente da concentração.

Esse efeito foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$, ANOVA seguido de t-test) a parti das concentrações de 10 µg/ml, 30 µg/ml e 300 µg/ml respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. O OECa na concentração de 1000 µg/ml bloqueou totalmente a contração em veia porta e reduziu para $2,30 \pm 0,76\%$, e $4,92 \pm 0,80\%$ respectivamente em íleo e bexiga, a contração em relação ao controle (n=6). A CI_{50} na presença do OECa para cada tecido foi de $19,21 \pm 1,65$ µg/ml, $104,27 \pm 8,19$ µg/ml e $343,54 \pm 11,71$ µg/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Como pode ser observado, o OECa foi mais potente em bloquear a contração na veia porta do que nos outros tecidos, apresentando diferenças significativa entre as EC_{50} do OECa nos três tecidos (One way ANOVA com $p < 0,001$).

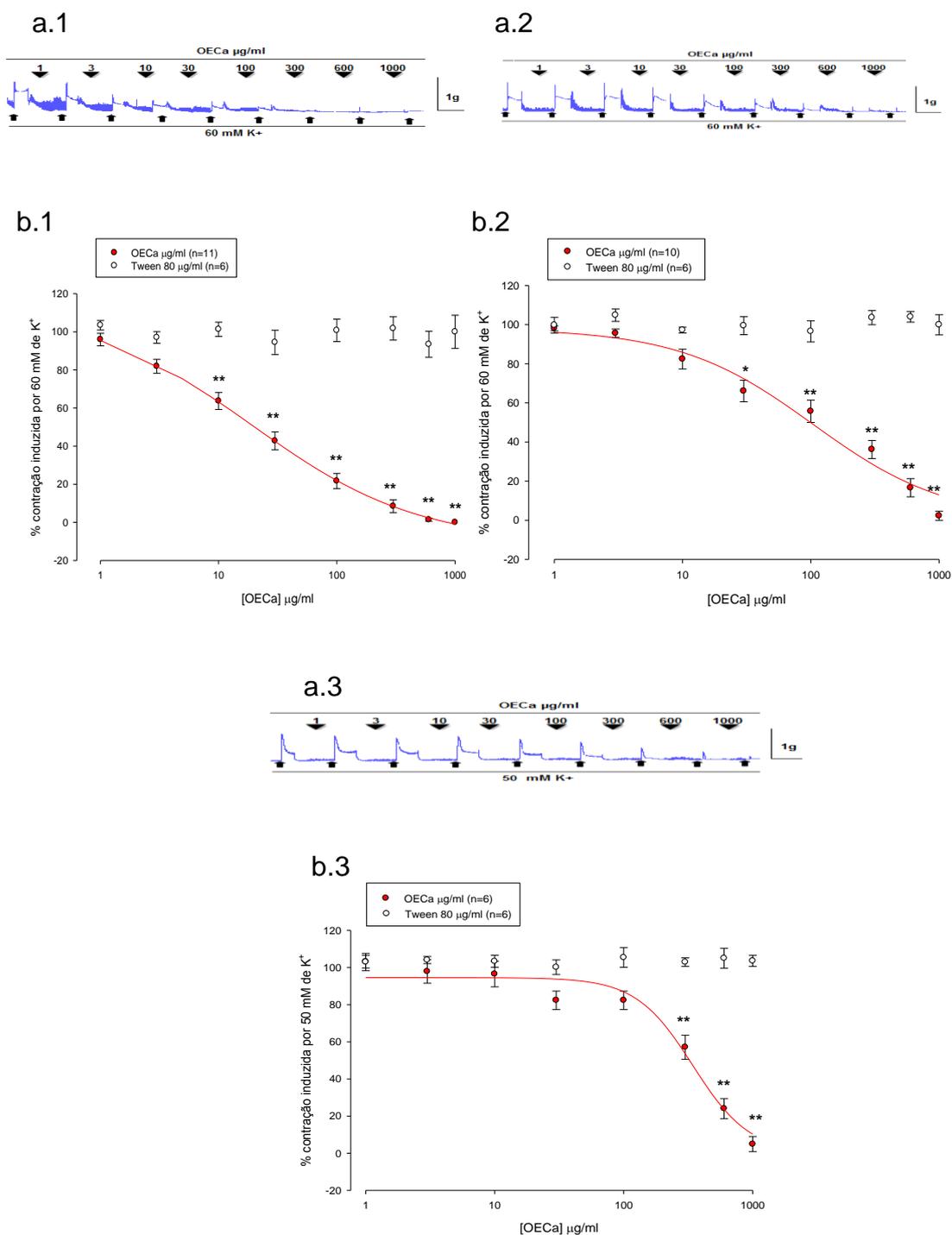


FIGURA 11 - Efeito do OECA sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçado representativo mostrando o bloqueio das contrações induzidas por K^+ . ▼ Indica o momento da aplicação de uma dada concentração do OECA; ▴ Indica o momento da aplicação do agente contraturante. b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECA sobre a contração fásica submaximal induzida por 60mM de K^+ em músculo liso de veia porta, ileo e bexiga de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.1.2 Efeito do OECa no componente tônica da contração induzida por K⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de K⁺ capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 60mM de K⁺ para o íleo e veia porta, e 50mM de K⁺ para bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração tônica, que teve como amplitude média $0,175 \pm 0,022$ g, $0,662 \pm 0,031$ g e $0,313 \pm 0,051$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. Assim como observado na contração fásica, o OECa foi capaz de promover o bloqueio da contração nos três tecidos, como pode ser visto nas figuras 12, de forma dependente da concentração. Esse efeito foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de t-test) a parti das concentrações de 30 µg/ml, 10 µg/ml e 3 µg/ml respectivamente em veia porta, íleo e bexiga.

O OECa na concentração de 600 ug/ml foi capaz de bloquear totalmente a contração do íleo. Em relação à veia porta e bexiga, nessa mesma concentração, ocorreu uma redução respectivamente para $1,21 \pm 0,81$ % e $4,16 \pm 2,63$ % da contração em relação ao controle (n=6). A EC₅₀ na presença do OECa foi de $7,81 \pm 2,02$ µg/ml, $29,99 \pm 8,44$ µg/ml e $92,50 \pm 11,71$ µg/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Ocorreu diferenças significativa entre as EC₅₀ do OECa nos três tecidos (One Way ANOVA com $p < 0,001$).

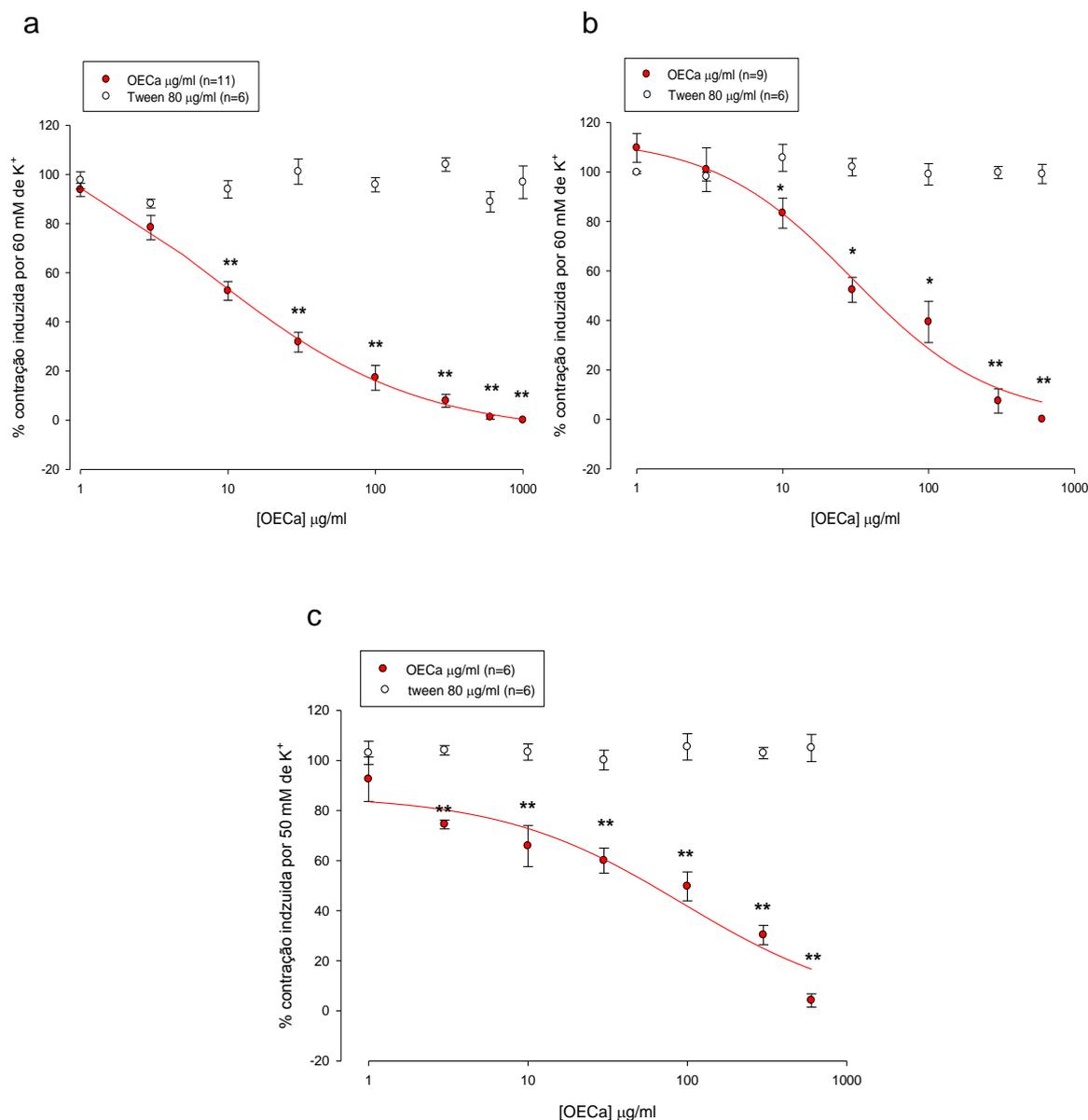


FIGURA 12 - Efeito do OECA sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECA sobre a contração tônica submaximal induzida por 60mM de K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM, “n” expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.1.3 Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de K^+ em veia porta, íleo e bexiga de rato.

Nas figuras 13 podemos comparar o efeito do OECa sobre a contração fásica versus a tônica induzida pela a concentração de K^+ capaz de causar uma contração submaximal nos três tecidos. Como pode ser observado, em veia porta e bexiga, não ocorreu diferenças significativas em relação à contração fásica e tônica. Foi possível observar diferenças significativas entre as EC_{50} do OECa nos três tecidos (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,001$).

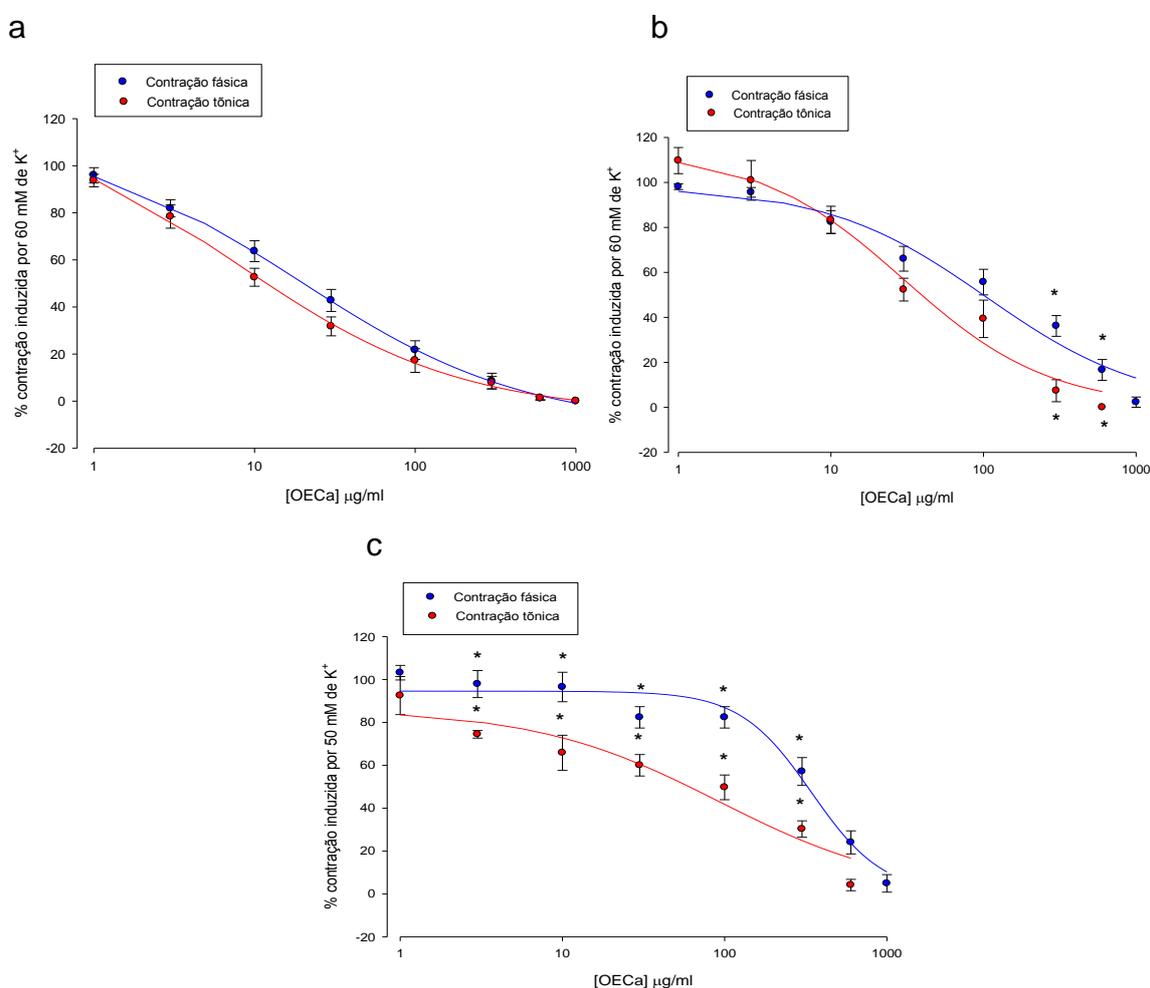


FIGURA 13 - Comparação do efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica induzida pela concentração submaximal de 60mM de K^+ em veia porta, íleo e bexiga. a (veia porta), b (bexiga) e c (íleo) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECa sobre a contração fásica e tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM. (*) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.2 Efeito do β -CAR sobre a contração submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

5.2.1 Efeito do β -CAR no componente fásico da contração induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de K^+ capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 60mM de K^+ para o íleo e veia porta, e 50mM de K^+ para bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração fásica, que teve como amplitude média $0,247 \pm 0,030$ g, $1,133 \pm 291,18$ g e $1,320 \pm 141,28$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. O efeito do β -CAR sobre a contração fásica nos três tecidos pode ser observado nas figuras 14. Esse efeito foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, ANOVA seguido de t-test) à partir da concentração de $10 \mu\text{g/ml}$ em veia porta e íleo e de $30 \mu\text{g/ml}$ em bexiga. O β -CAR na concentração de $1000 \mu\text{g/ml}$ reduziu para $15,58 \pm 4,72\%$ e para $12,14 \pm 2,36\%$ respectivamente em veia porta e bexiga a contração em relação ao controle ($n=6$). Em íleo, com a concentração de $600 \mu\text{g/ml}$, a contração foi reduzida para $1,38 \pm 0,30$ da contração em relação ao controle ($n=6$). A EC_{50} do β -CAR para cada tecido foi de $92,64 \pm 5,34 \mu\text{g/ml}$, $15,57 \pm 6,38 \mu\text{g/ml}$ e $214,93 \pm 11,06 \mu\text{g/ml}$, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Comparando as EC_{50} nos três tecidos, foi observado diferenças significativa (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,001$).

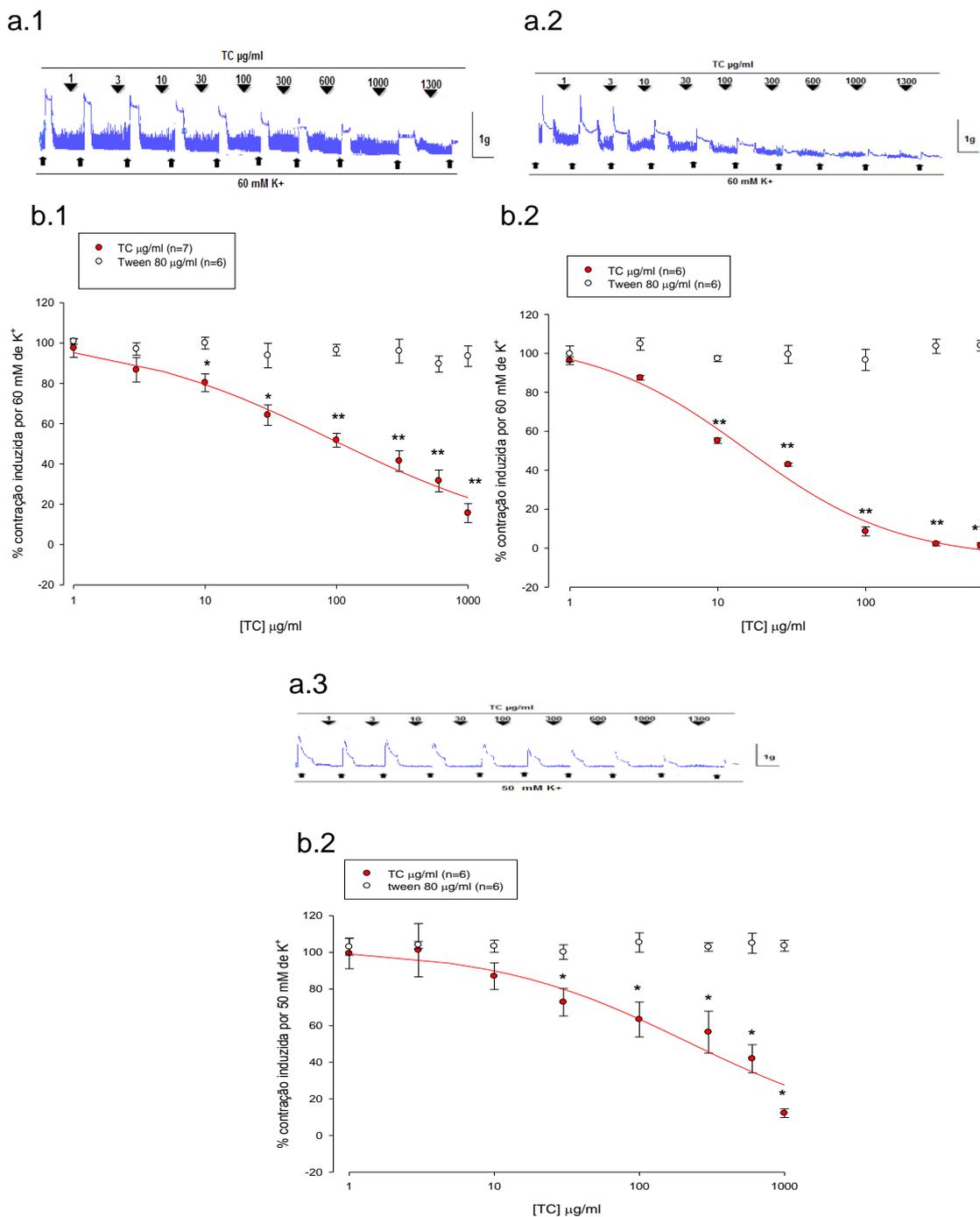


FIGURA 14 - Efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçado representativo mostrando o bloqueio das contrações induzidas por K^+ . \blacktriangledown Indica o momento da aplicação de uma dada concentração do β -CAR; \blacksquare Indica o momento da aplicação do agente contraturante. b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por 60mM de K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.2.2 Efeito do β -CAR no componente tônica da contração induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de K^+ capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 60 mM de K^+ para o íleo e veia porta, e 50mM de K^+ para bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração tônica, que teve como amplitude média $0,137 \pm 0,035$ g, $0,239 \pm 0,073$ g e $0,542 \pm 0,067$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. Na figuras 15 podemos observar a ação do β -CAR sobre a contração induzida por K^+ em veia porta, íleo e bexiga respectivamente. O β -CAR mostrou um bloqueio estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de t-test) a partir da concentração de 10 μ g/ml em veia porta e íleo, e 100 μ g/ml em bexiga. A EC_{50} para cada tecido foi de $24,76 \pm 9,63$ μ g/ml, $12,54 \pm 1,43$ μ g/ml e $181,19 \pm 6,66$ μ g/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Foi encontrada diferenças da EC_{50} entre a bexiga e veia porta, e bexiga e íleo (One Way ANOVA com $p < 0,001$).

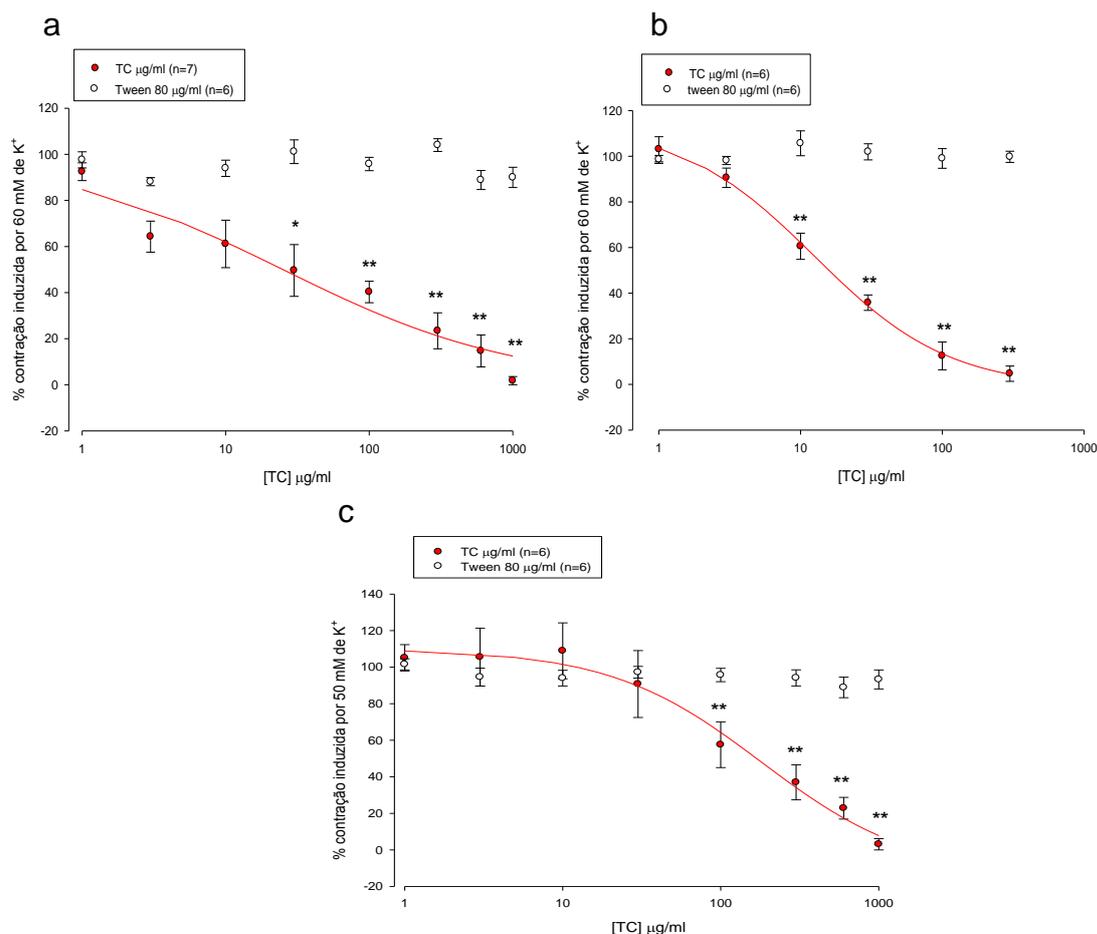


FIGURA 15 - Efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta de rato, íleo e bexiga. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por 60 mM de K^+ em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.2.3 Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração fásica e tônica submaximal induzida pela concentração de K^+ em veia porta, íleo e bexiga de rato.

Na figura 16 podemos comparar o efeito do β -CAR sobre a contração fásica versus a tônica induzida pela a concentração de K^+ capaz de causar uma contração submaximal nos três tecidos. Como pode ser observado nas figuras, não ocorreu diferenças significativas em relação a EC_{50} na fase fásica e tônica da contração nos três tecidos (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,05$ e $p < 0,001$).

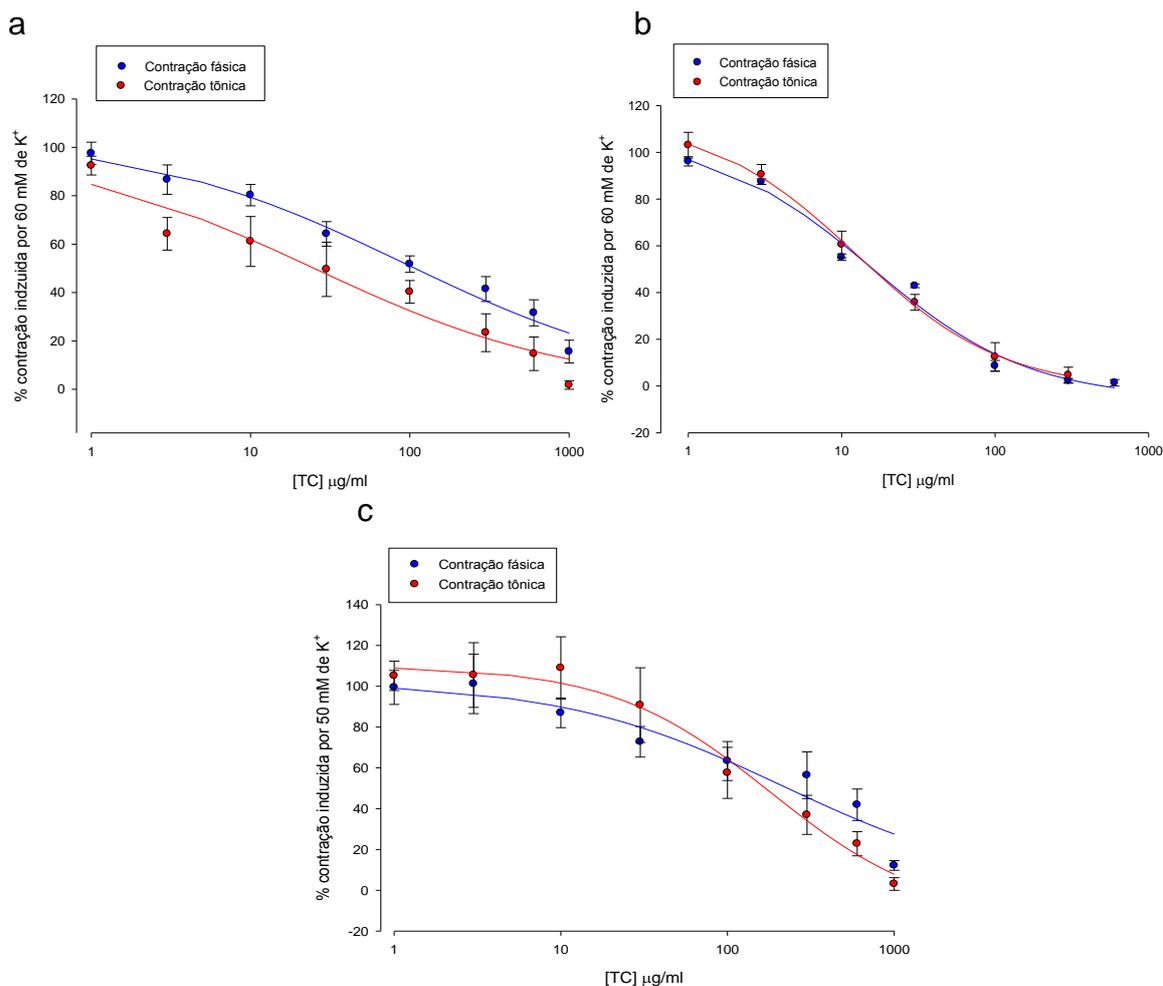


FIGURA 16 - Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração submaximal fásica e tônica induzida pela concentração de 60 mM de K⁺ em veia porta, íleo e bexiga. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração fásica e tônica submaximal induzida por K⁺ em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K⁺ e as barras verticais o EPM.

5.3 Efeito do OECa sobre a contração submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

5.3.1 Efeito do OECa no componente fásico da contração induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de ACh

capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 50 μ M, 0,3 μ M e 4 μ M respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração fásica, que teve como amplitude média 0,262 \pm 0,011 g, 1,669 \pm 0,018 g e 1,184,33 \pm 0,186 g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. O OECA foi capaz de promover o bloqueio da contração nos três tecidos, como pode ser visto nas figuras 17, de forma dependente da concentração. Esse efeito foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de t-test) a partir das concentrações de 30 μ g/ml em veia porta e íleo, e 100 μ g/ml em bexiga.

O OECA na concentração de 1000 μ g/ml reduziu para 4,16 \pm 0,53%, 2,99 \pm 1,09% e 9,50 \pm 3,25% respectivamente em veia porta, íleo e bexiga, a contração em relação ao controle (n=6). A EC₅₀ do OECA para cada tecido foi de 38,53 \pm 14,83 μ g/ml, 125,93 \pm 10,91 μ g/ml e 122,19 \pm 57,33 μ g/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. As EC₅₀ na presença do OECA mostrou diferença significativa entre bexiga e íleo, e bexiga e veia porta, entre íleo e veia porta. O OECA foi mais potente em bloquear a contração na veia porta do que nos outros tecidos.

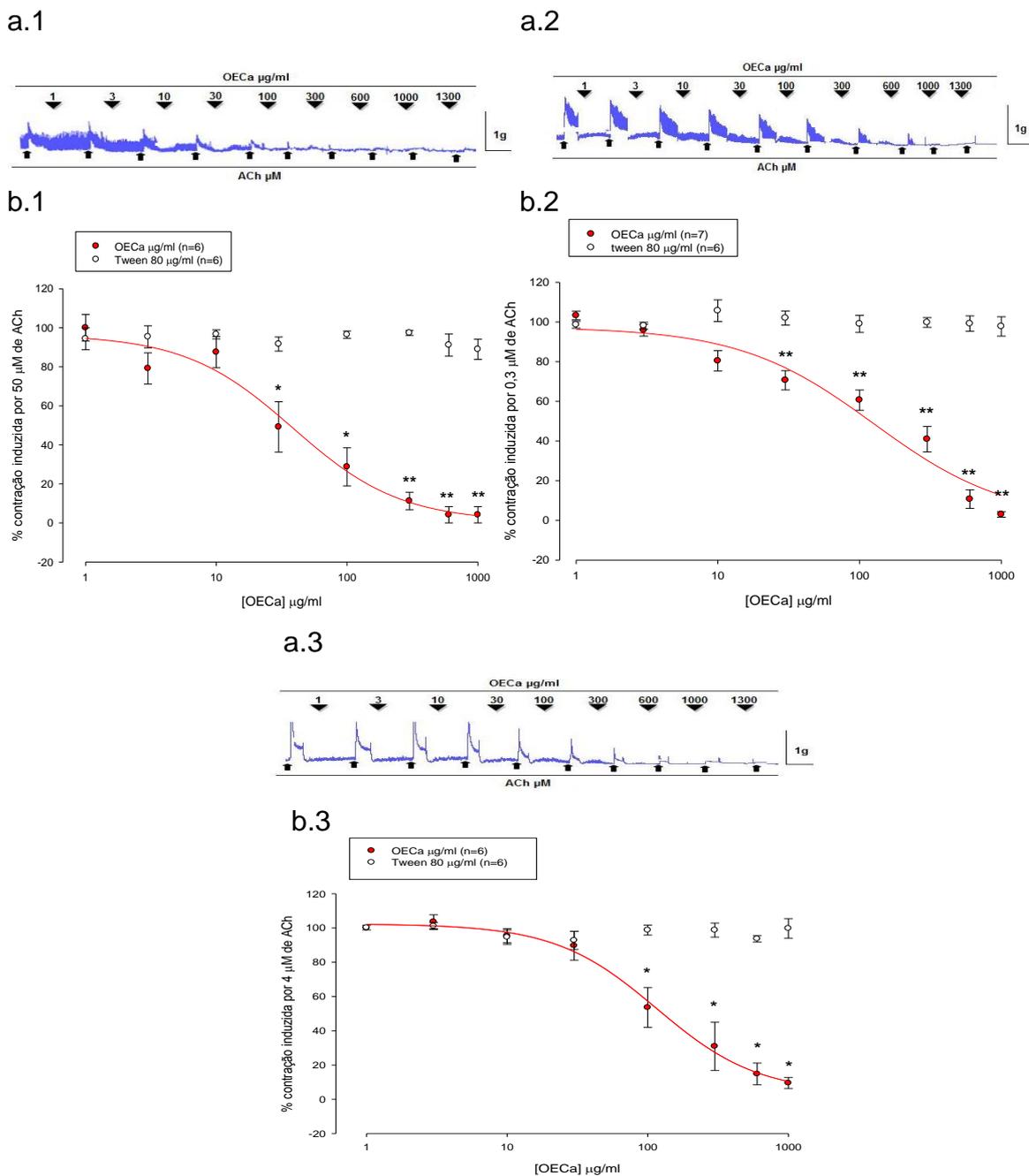


FIGURA 17 - Efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçado representativo mostrando o bloqueio das contrações induzidas por ACh. ▼ Indica o momento da aplicação de uma dada concentração do OECa; ▲ Indica o momento da aplicação do agente contraturante b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECa sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida por ACh e as barras verticais o EPM, “n” expressa o número de experimentos. (*) e (**) representam a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.3.2 Efeito do OECa no componente tônica da contração induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga a concentração de ACh capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 50 μ M, 0,3 μ M e 4 μ M respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração tônica, que teve como amplitude média 0,098,08 \pm 0,015 g, 0,887 \pm 0,138 g e 0,414 \pm 0,082g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga.

O OECa foi capaz de promover o bloqueio da contração nos três tecidos, como pode ser visto nas figuras 18, de forma dependente da concentração. Esse efeito foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de t-test) a partir das concentrações de 30 μ g/ml em veia porta, íleo e bexiga. O OECa na concentração de 300 μ g/ml bloqueou totalmente a contração na veia porta. Em íleo o bloqueio total foi na concentração de 1000 μ g/ml. Na bexiga, OECa na concentração de 1000 μ g/ml, reduziu a contração tônica em relação ao controle para 2,04 \pm 1,07% (n=6). A EC_{50} do OECa para cada tecido foi de 16,81 \pm 2,70 μ g/ml, 47,97 \pm 08,09 μ g/ml e 115,71 \pm 20,51 μ g/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Assim como observado na contração fásica, as EC_{50} apresentaram diferenças significativas entre bexiga e íleo, e bexiga e veia porta, entre íleo e veia porta. O OECa, na contração tônica, também se mostrou mais potente em bloquear a contração na veia porta do que os outros dois tecidos.

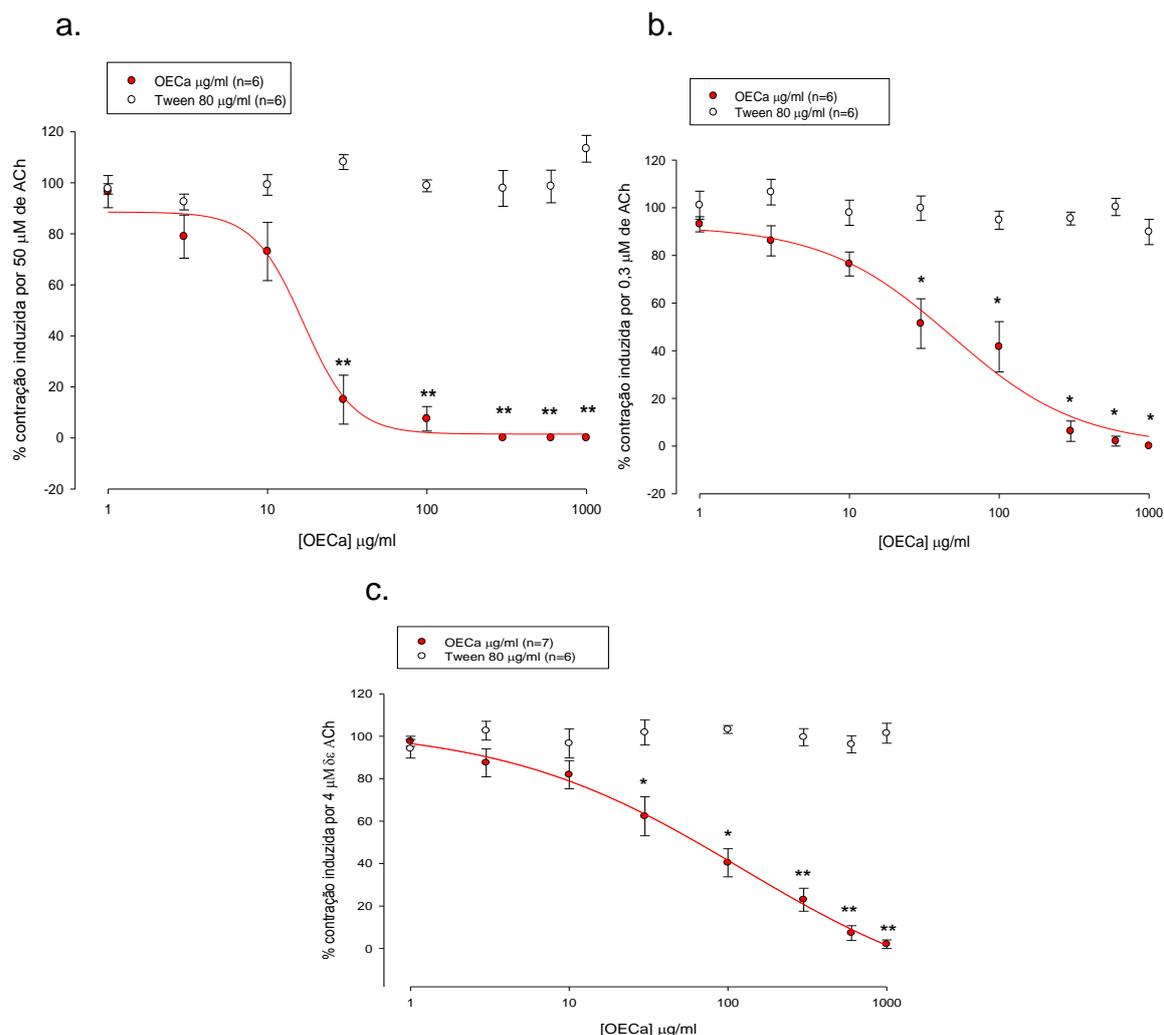


FIGURA 18 - Efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECa sobre a contração tônica submaximal induzida por 50 μM de ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de ACh e as barras verticais o EPM, “n” expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.3.3 Comparação do efeito do OECa sobre contração submaximal fásica e tônica induzida pela concentração de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato.

Na figura 19 podemos comparar o efeito do OECa sobre a contração subamximal fásica vesus a tônica induzida pela concentração de ACh nos três tecidos. Como pode ser observado, na presença do OECa, ocorreu diferença

significativa em relação a EC_{50} da contração fásica versus a tônica na contração em músculo liso somente em íleo ($p < 0,001$, ANOVA).

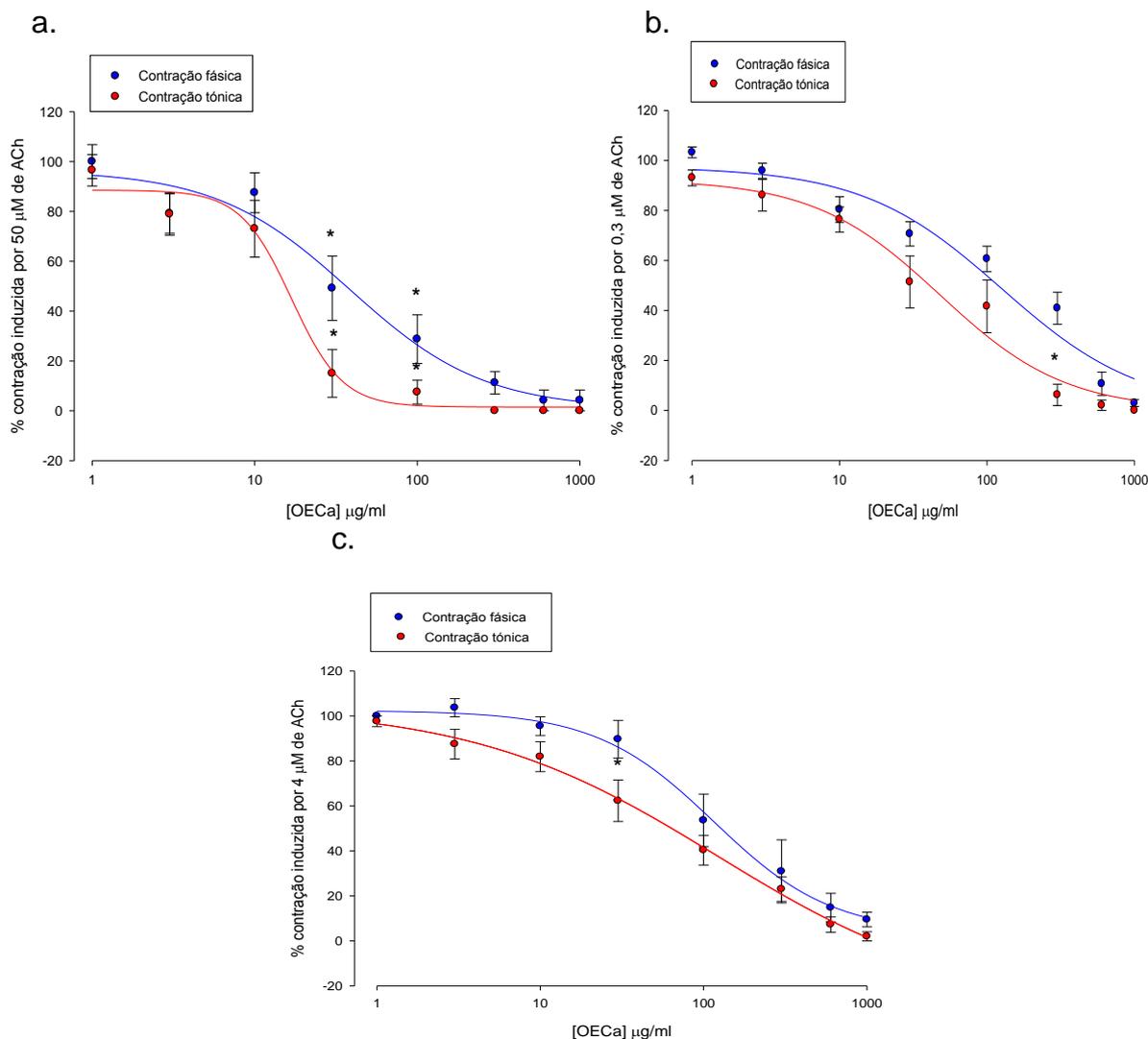


FIGURA 19 - Comparação do efeito do OECA sobre a contração submaximal fásica e tônica induzida pela concentração de 50 μ M de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do OECA sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de ACh e as barras verticais o EPM. (*) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.4 Efeito do β -CAR sobre a contração submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

5.4.1 Efeito do β -CAR no componente fásico da contração induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga.

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de ACh capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 50 μ M, 0,3 μ M e 4 μ M respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração fásica, que teve como amplitude média $0,188 \pm 0,07$ g, $1,404 \pm 0,198$ g e $1,339 \pm 0,050$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. O β -CAR foi capaz de promover o bloqueio parcial da contração nos três tecidos, como pode ser visto nas figuras 20, de forma dependente da concentração. O bloqueio foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$, ANOVA seguido de t-test) a partir das concentrações de 30 μ g/ml em íleo e veia porta. Em bexiga a concentração foi significativa a partir de 100 μ g/ml. O β -CAR na concentração de 1300 μ g/ml reduziu em $52,84 \pm 5,14\%$, $36,68 \pm 1,64\%$ e $62,06 \pm 3,77\%$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga, a contração em relação ao controle ($n=6$). A EC_{50} com o β -CAR foi de $101,59 \pm 2,81$ μ g/ml, $86,73 \pm 12,12$ μ g/ml e $560,20 \pm 61,88$ μ g/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Ocorreu diferença significativa entre a EC_{50} na bexiga quando comparada com os outros dois tecidos, mas não houve diferença entre veia e íleo ($p < 0,001$, ANOVA seguido de t-test).

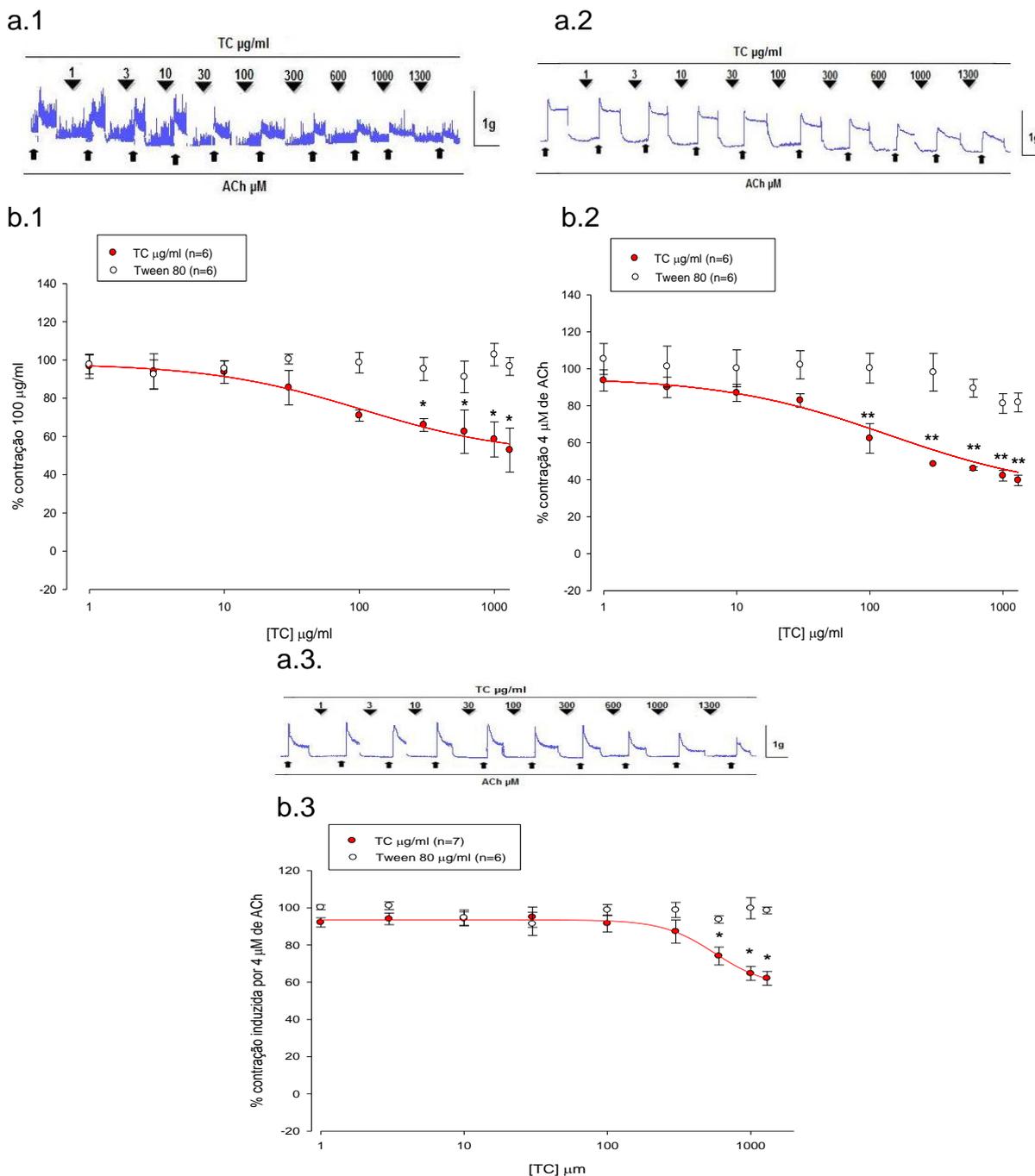


FIGURA 20 - Efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçado representativo mostrando o bloqueio das contrações induzidas por ACh. ▼ Indica o momento da aplicação de uma dada concentração do β -CAR; ▲ Indica o momento da aplicação do agente contraturante b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração fásica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida por ACh e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (**) representam a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.4.2 Efeito do β -CAR no componente tônico da contração induzida por ACh em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga

Em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga, a concentração de ACh capaz de causar uma contração submaximal, obtida após uma curva concentração efeito, foi de 50 μ M, 0,3 μ M e 4 μ M respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa concentração foi capaz de causar uma contração tônica, que teve como amplitude média $0,050 \pm 0,08$ g, $0,857 \pm 0,120$ g e $0,711 \pm 0,091$ g, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. O β -CAR foi capaz de promover o bloqueio parcial da contração nos três tecidos, como pode ser visto nas figuras 21, de forma dependente da concentração. O β -CAR na concentração de 1300 μ g/ml reduziu a contração tônica em relação ao controle para $45,86 \pm 1,68$ %, $37,81 \pm 2,89$ % e $30,88 \pm 9,49$ % respectivamente em veia porta, íleo e bexiga (n=6). A EC_{50} na presença do β -CAR para cada tecido foi de $41,45 \pm 12,89$ μ g/ml, $105,09 \pm 4,09$ μ g/ml e $461,06 \pm 7,13$ μ g/ml, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Foi encontrada significância estatística entre as EC_{50} do β -CAR nos três tecidos ($p < 0,001$, ANOVA seguido de t-test).

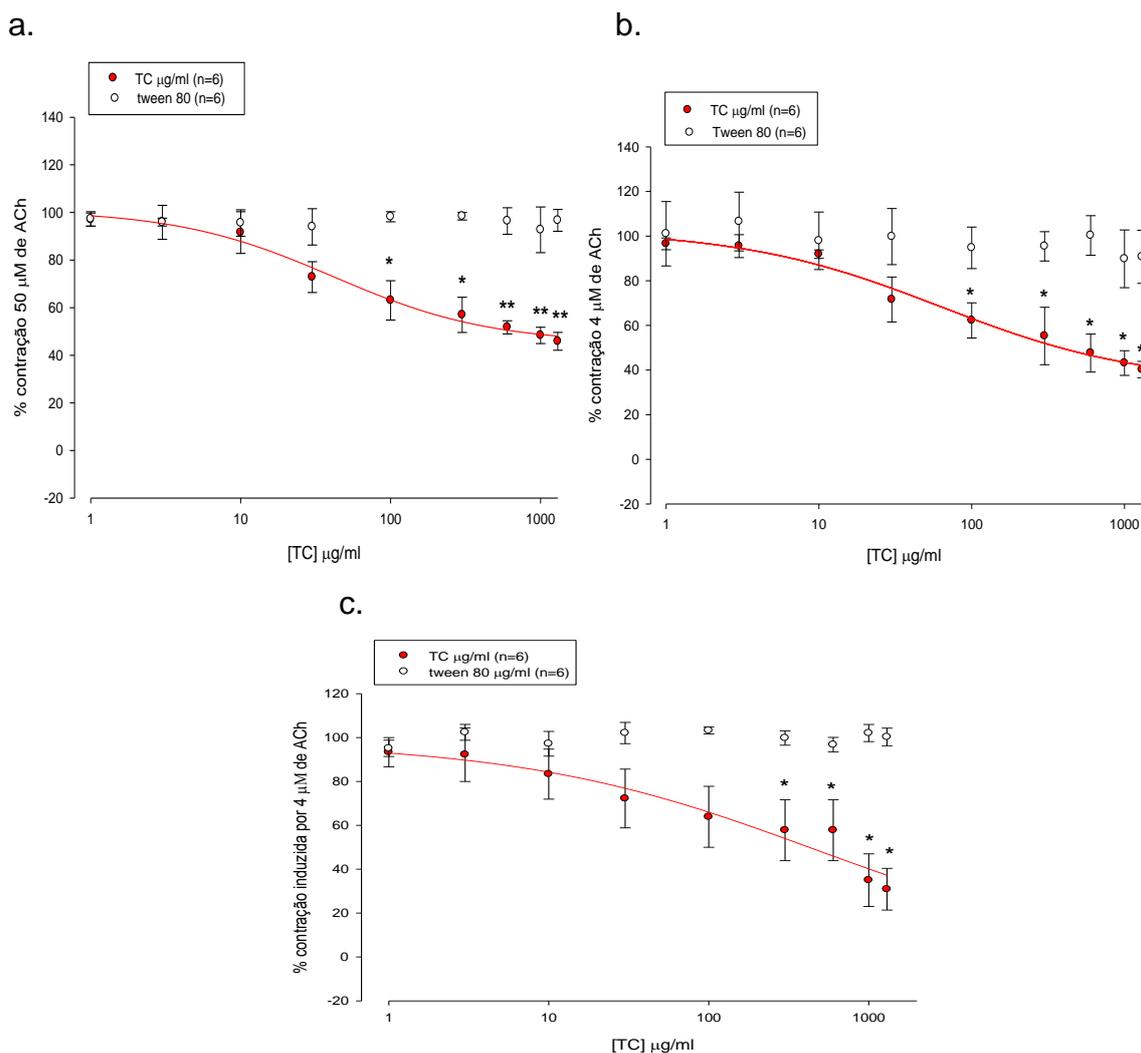


FIGURA 21 - Efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por K^+ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por $50 \mu\text{M}$ de ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de ACh e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (**) representa a diferença estatística significativa em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.4.3 Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração submaximal fásica e tônica induzida pela concentração de ACh em veia porta, íleo e bexiga de rato.

Na figura 22 podemos comparar o efeito do β -CAR sobre a contração submaximal fásica versus a tônica induzida pela concentração de ACh nos três tecidos. Como pode ser observado, o β -CAR teve diferença significativa em relação a EC_{50} contração fásica versus a tônica somente em veia porta e bexiga ($p < 0,001$, ANOVA).

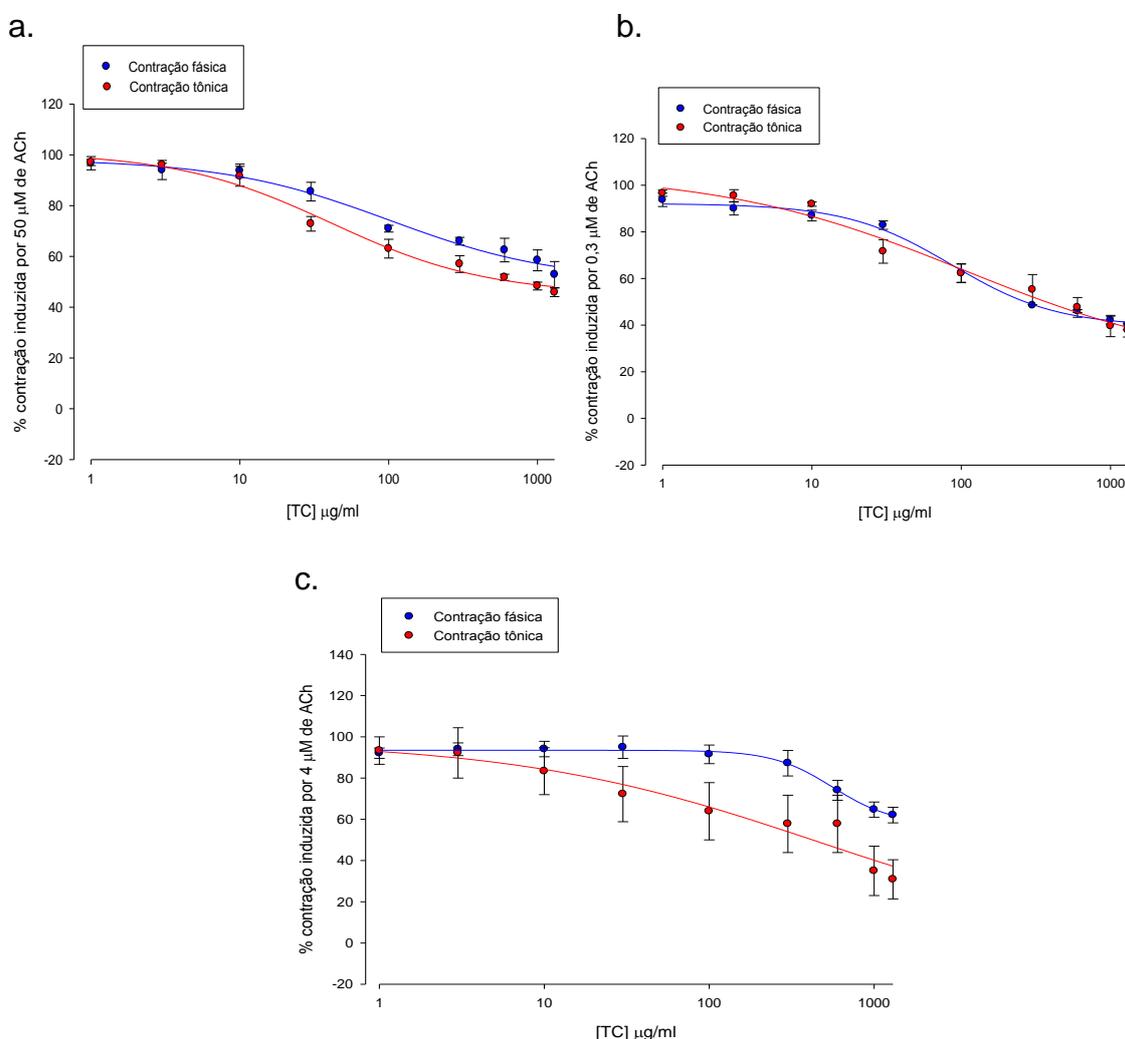


FIGURA 22 - Comparação do efeito do β -CAR sobre a contração submaximal fásica e tônica induzida pela concentração de ACh em veia porta, íleo e bexiga. a (veia porta), b (íleo) e c (bexiga) Representação gráfica mostrando a curva concentração efeito do β -CAR sobre a contração tônica submaximal induzida por ACh em músculo liso de veia porta de rato. Cada ponto representa a média do % da contração em relação à resposta contrátil controle induzida pela concentração submaximal de K^+ e as barras verticais o EPM.

5.5 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60 mM de K^+ .

Em veia porta, íleo e bexiga de rato mantido despolarizado por 60 mM de K^+ em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA (0,2mM), a adição de Ca^{2+} nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20mM promoveu contração. O OECa na concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$, adicionado 5 minutos antes do Ca^{2+} , foi capaz de inibir de forma significativa a curva promovida pela adição de Ca^{2+} , como pode ser observado nas figuras 23 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, ANOVA seguido do teste Holm-Sidak). O OECa iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1 mM de Ca^{2+} nas três amostras e reduziu a amplitude máxima da contração para $7,88 \pm 2,62 \%$, $9,88\% \pm 3,19\%$ e $10,66 \pm 4,39\%$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga do controle ($n=6$). Após um período de 2 horas de lavagens sucessivas da preparação, o tecido recuperou sua resposta contrátil ao ser estimulado novamente por uma curva concentração efeito para o Ca^2 . Não foi observado diferença significativa do feito do OECa na contração induzida por CaCl_2 em relação aos três tecidos.

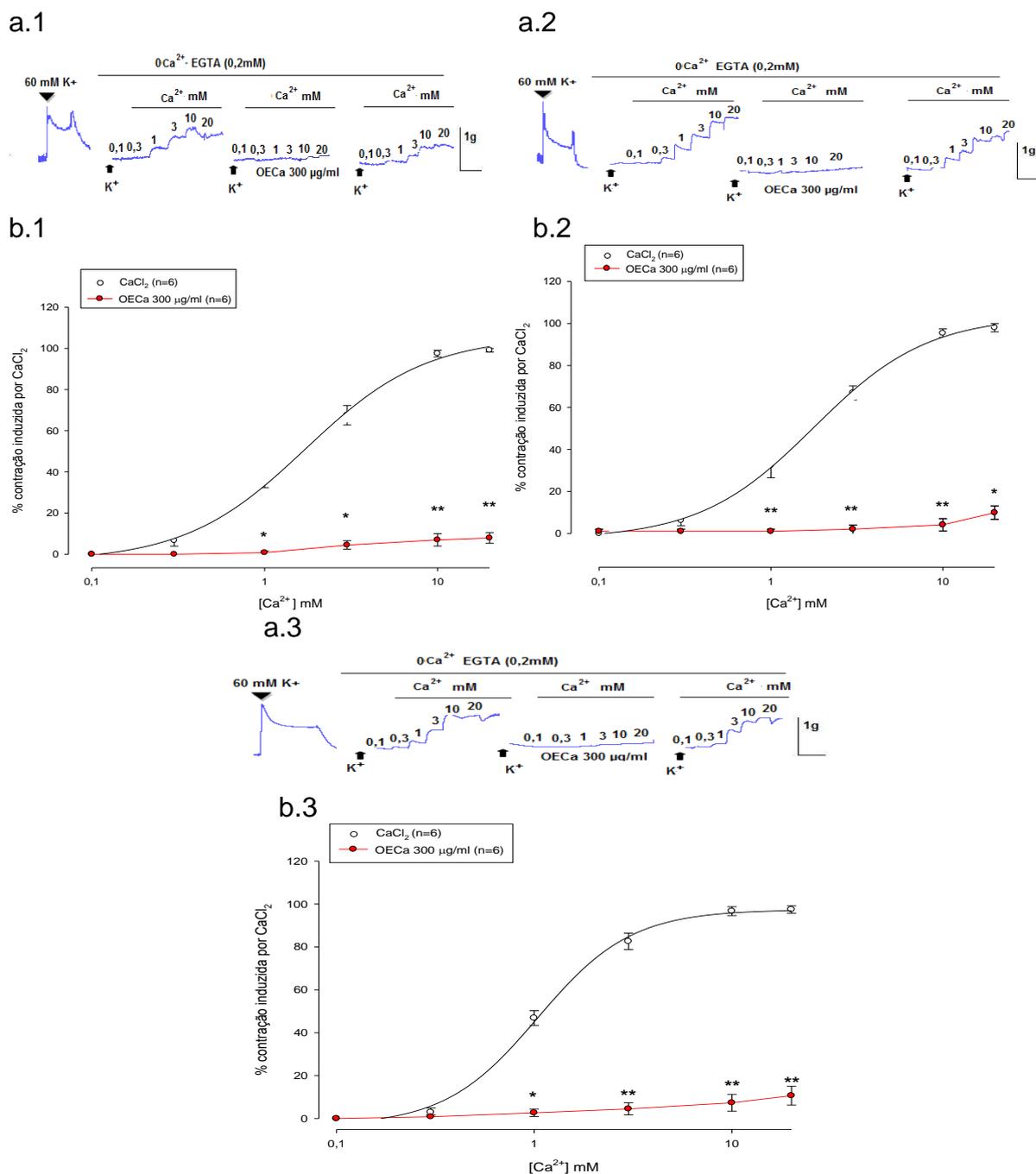


FIGURA 23 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K^+ . a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçados típicos mostrando a inibição de forma concentração dependente do OECa na contração induzida por Ca^{2+} em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA (0,2mM) e 60mM de K^+ . b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ca^{2+} presença do OECa (300 $\mu\text{g/ml}$). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ca^{2+} e as barras verticais o EPM, o "n" expressa o número de experimentos, (*) e (**) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.6 Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60 mM de K^+ .

Em veia porta, íleo e bexiga de rato mantido despolarizado por 60 mM de K^+ em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA (0,2mM), a adição de Ca^{2+} nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20mM promoveu contração. O β -CAR na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, adicionado 5 minutos antes do Ca^{2+} , foi capaz de inibir de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, ANOVA seguido do teste Holm-Sidak) a curva promovida pela adição de Ca^{2+} , como pode ser observado nas figuras 24. O β -CAR iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1 mM de Ca^{2+} nas três amostras e reduziu a amplitude máxima da contração para $39,59 \pm 5,01 \%$, $23,39 \pm 4,98 \%$ e $58,27 \pm 11,10 \%$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga da contração controle ($n=6$). Após um período de 2 horas de lavagens sucessivas da preparação, o tecido recuperou sua resposta contrátil ao ser estimulado novamente por uma curva concentração efeito para o Ca^{2+} . Foi observado diferenças significativas ($p < 0,05$, ANOVA) entre as concentrações, a partir de 1 mM, em íleo e bexiga, em relação ao efeito do β -CAR em bloquear a contração induzida por cálcio. Em veia porta não foi encontrada diferença significativa quando comparada com os outros dois tecidos.

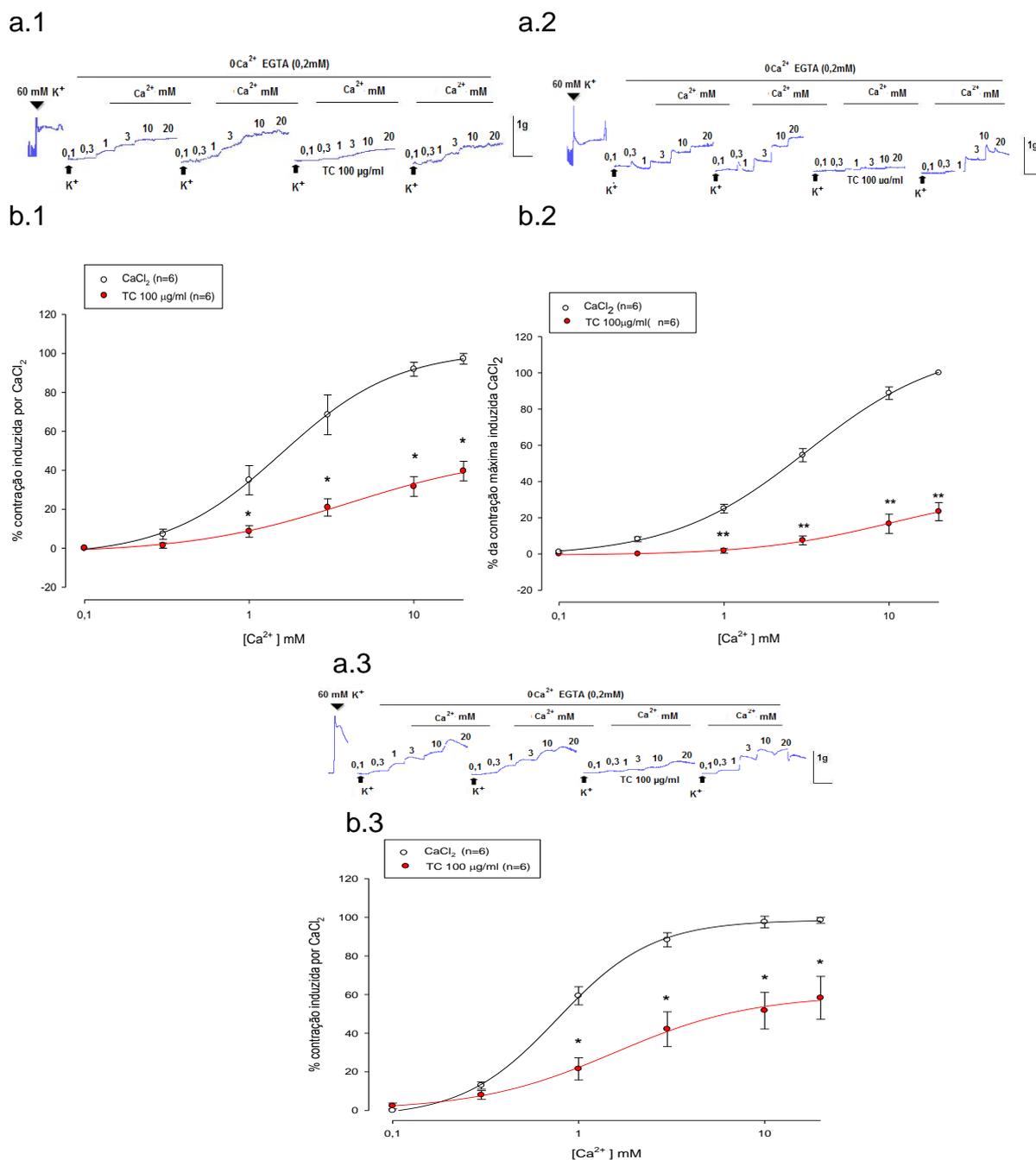


FIGURA 24 - Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K^+ . a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçados típicos mostrando a inibição de forma concentração dependente do TC na contração induzida por Ca^{2+} em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA (0,2mM) e 60mM de K^+ . b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ca^{2+} presença do β -CAR (100 $\mu\text{g/ml}$). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ca^{2+} e as barras verticais o EPM, o "n" expressa o número de experimentos, (*) e (**) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.7 Efeito do OEca sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil.

Em amostra de tecido muscular liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh ($10 \mu\text{M}$) em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA($0,2\text{mM}$) e verapamil ($1 \mu\text{M}$), a adição de Ca^{2+} nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM promoveu contração somente em íleo e bexiga. A veia porta não respondeu a este protocolo. Na figura 25 podemos observar que o OEca na concentração de $300 \mu\text{g/ml}$, adicionado 5 minutos antes do Ca^{2+} , foi capaz de inibir de forma significativa a curva promovida pela adição de Ca^{2+} . O OEca iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1mM de Ca^{2+} em íleo e bexiga, reduzindo a amplitude máxima da contração para $30,00 \pm 10,19 \%$ para íleo e $44,09 \pm 5,20 \%$ para a bexiga do controle ($n=6$). Não foi observado diferença significativa do efeito do OEca na contração induzida por CaCl_2 em relação aos dois tecidos.

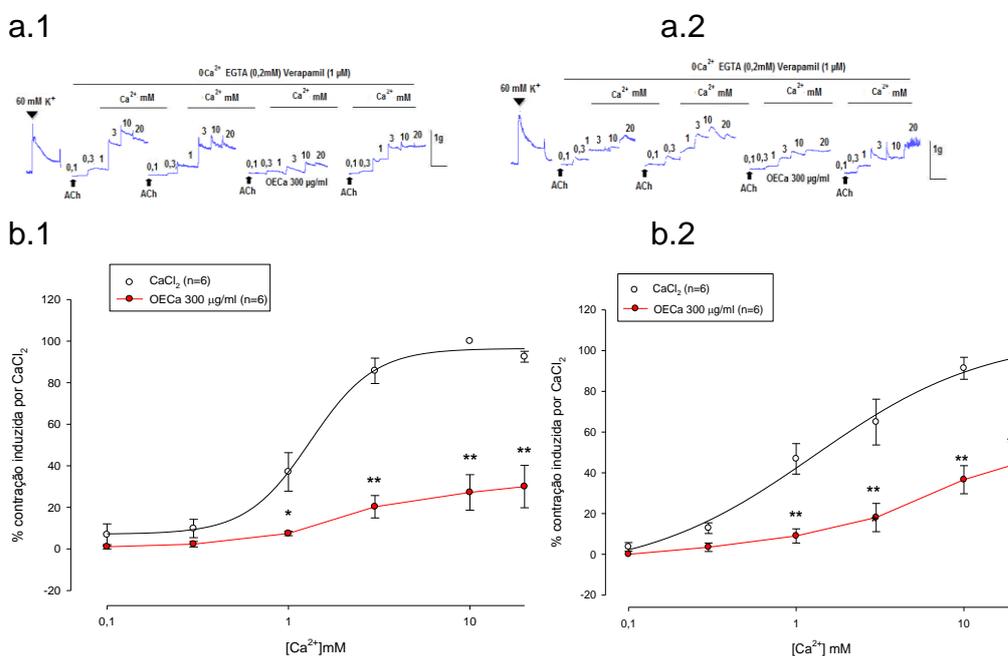


FIGURA 25 - Efeito do OEca sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil. a.1 (íleo) e a.2 (bexiga) Traçados típicos mostrando o efeito de forma concentração dependente do OEca na contração induzida por Ca^{2+} em meio 0Ca^{2+} contendo ACh ($10 \mu\text{M}$) e verapamil($1\mu\text{M}$). b.1 (íleo) e b.2 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ca^{2+} na presença do OEca ($300\mu\text{g/ml}$). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ca^{2+} e as barras verticais o EPM, “n” expressa o número de experimentos. (*) e (**) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.8 Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil.

Em amostra de tecido muscular liso de veia porta, íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh (10 μM) em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA(0,2mM) e verapamil (1 μM), a adição de Ca^{2+} nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM promoveu contração. Na figura 26 podemos observar que o β -CAR na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, adicionado 5 minutos antes do Ca^{2+} , foi capaz de inibir parcialmente de forma significativa ($p < 0,05$, ANOVA seguido do teste Holm-Sidak) a curva promovida pela adição de Ca^{2+} . O β -CAR iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1mM de Ca^{2+} em duas das três amostra de tecido e reduziu a amplitude máxima da contração para $64,63 \pm 9,93\%$ para íleo e $78,03 \pm 7,63\%$ para a bexiga do controle ($n=6$). O tecido utilizado da veia porta não respondeu a este protocolo. Não foi observado diferença significativa do efeito do β -CAR na contração induzida por CaCl_2 em relação aos dois tecidos.

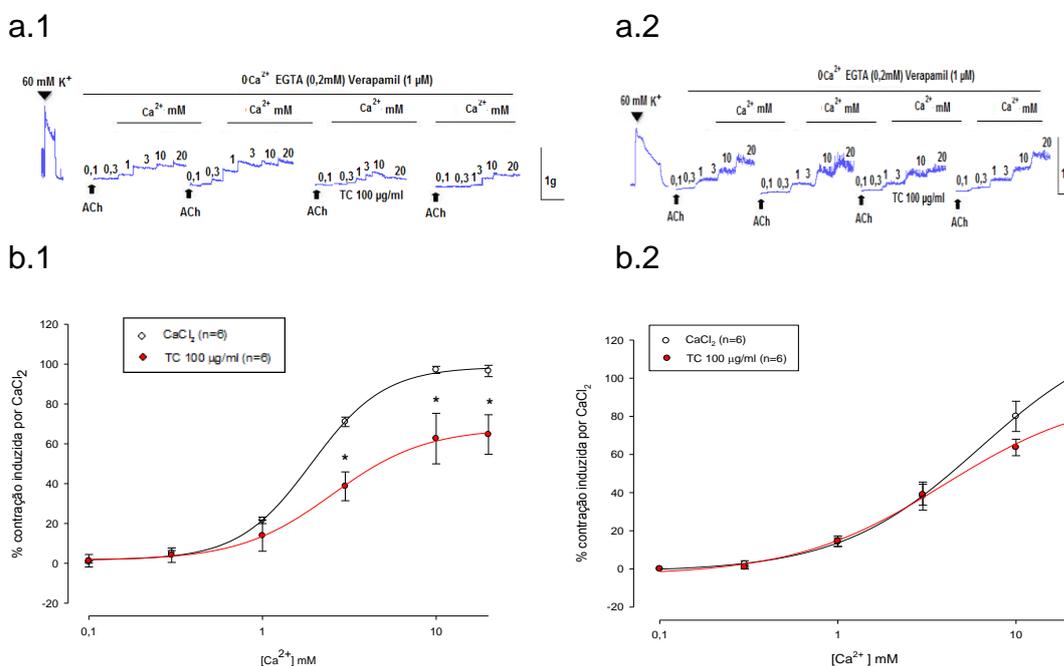


FIGURA 26 - Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ca^{2+} em músculo liso de íleo e bexiga de rato pré-tratado com ACh em presença de verapamil. a.1 (íleo) e a.2 (bexiga) Traçados típicos mostrando o efeito de forma concentração dependente do β -CAR na contração induzida por Ca^{2+} em meio 0Ca^{2+} contendo ACh (10 μM) e verapamil (1 μM). b.1 (íleo) e b.2 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ca^{2+} na presença do β -CAR (100 $\mu\text{g/ml}$). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ca^{2+} e as barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.9 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por Ba²⁺ em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60mM de K⁺.

Em veia porta, íleo e bexiga de rato mantido despolarizado por 60 mM de K⁺ em meio 0Ca²⁺ contendo EGTA (0,2mM), a adição de Ba²⁺ nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM promoveu contração. Na figura 27 podemos observar que o OECa na concentração de 300 µg/ml, adicionado 5 minutos antes do Ba²⁺, foi capaz de inibir de forma significativa a curva promovida pela adição de Ba²⁺. O OECa iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1mM de Ba²⁺ nas três amostra de tecido e reduziu a amplitude máxima da contração para 4,87 ± 1,99 % para veia porta, 7,75 ± 2,41 % para o íleo e 19,13 ± 4,81 % para a bexiga do controle (n=6). Foi observado diferença significativa (ANOVA seguido de t-test com p<0,001) do efeito do OECa na contração induzida por BaCl₂ somente entre veia porta e bexiga.

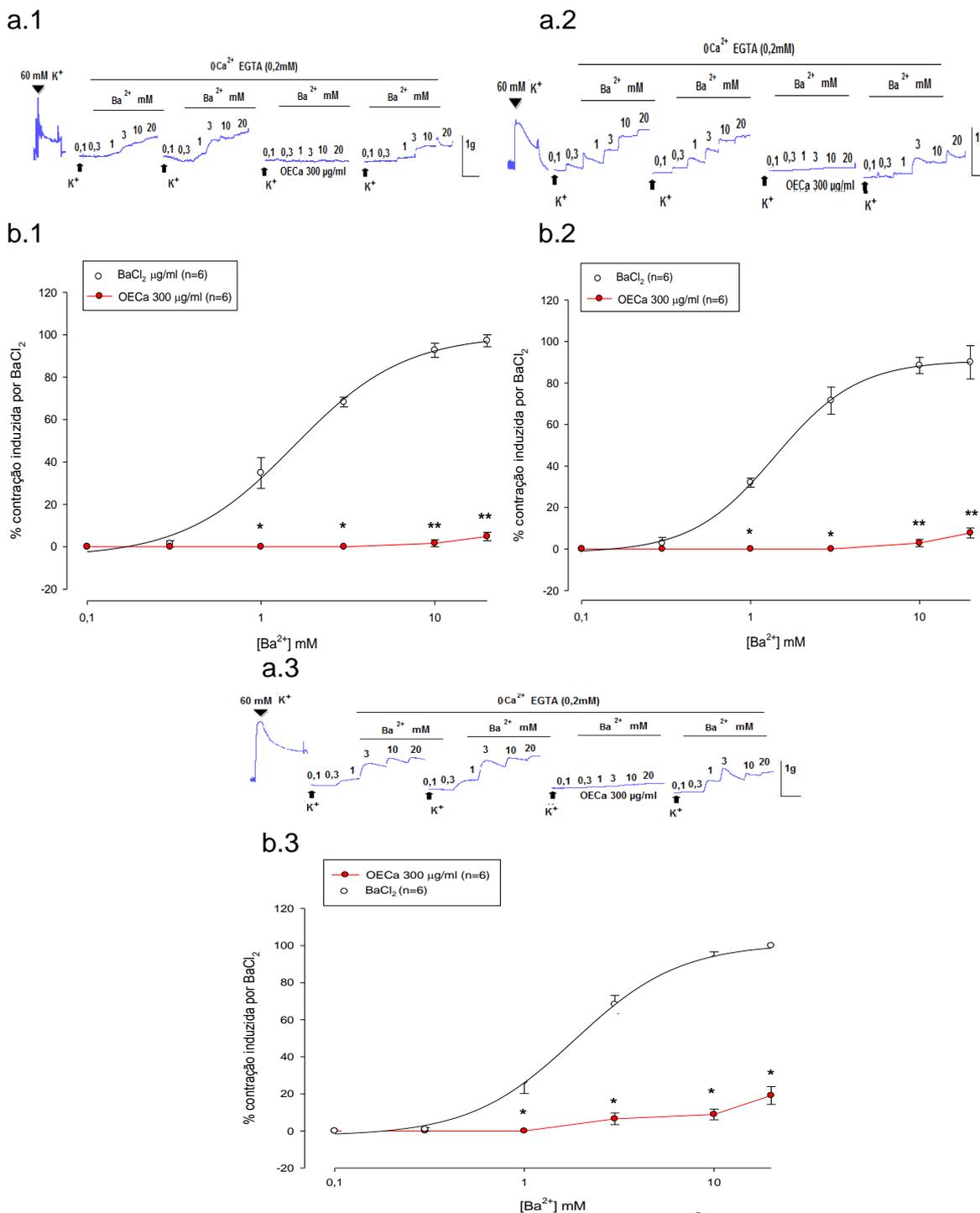


FIGURA 27 - Efeito do OECA sobre as contrações induzidas por Ba^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K^+ . a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçados típicos mostrando a inibição de forma concentração dependente do OECA na contração induzida por Ba^{2+} em meio $0Ca^{2+}$ contendo EGTA (0,2mM) e 60mM de K^+ . b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ba^{2+} na presença do OECA (300µg/ml). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ba^{2+} e as barras verticais o EPM, o "n" expressa o número de experimentos, (*) e (**) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.10 Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ba^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado por 60mM de K^+ .

Em veia porta, íleo e bexiga de rato mantido despolarizado por 60 mM de K^+ em meio $0Ca^{2+}$ contendo EGTA (0,2mM), a adição de Ba^{2+} nas concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 20 mM promoveu contração. Na figura 28 podemos observar que o β -CAR na concentração de 100 μ g/ml, adicionado 5 minutos antes do Ba^{2+} , foi capaz de inibir de forma significativa a curva promovida pela adição de Ba^{2+} . O β -CAR iniciou seu efeito inibitório sobre a concentração de 1mM de Ba^{2+} nas três amostra de tecido e reduziu a amplitude máxima da contração para $67,23 \pm 10,13$ % para veia porta, $53,48 \pm 5,09$ % para o íleo e $72,22 \pm 7,91$ % para a bexiga em relação ao controle de cada tecido (n=6). Não foi observado diferença significativa do efeito do β -CAR na contração induzida por $BaCl_2$ em relação aos três tecidos.

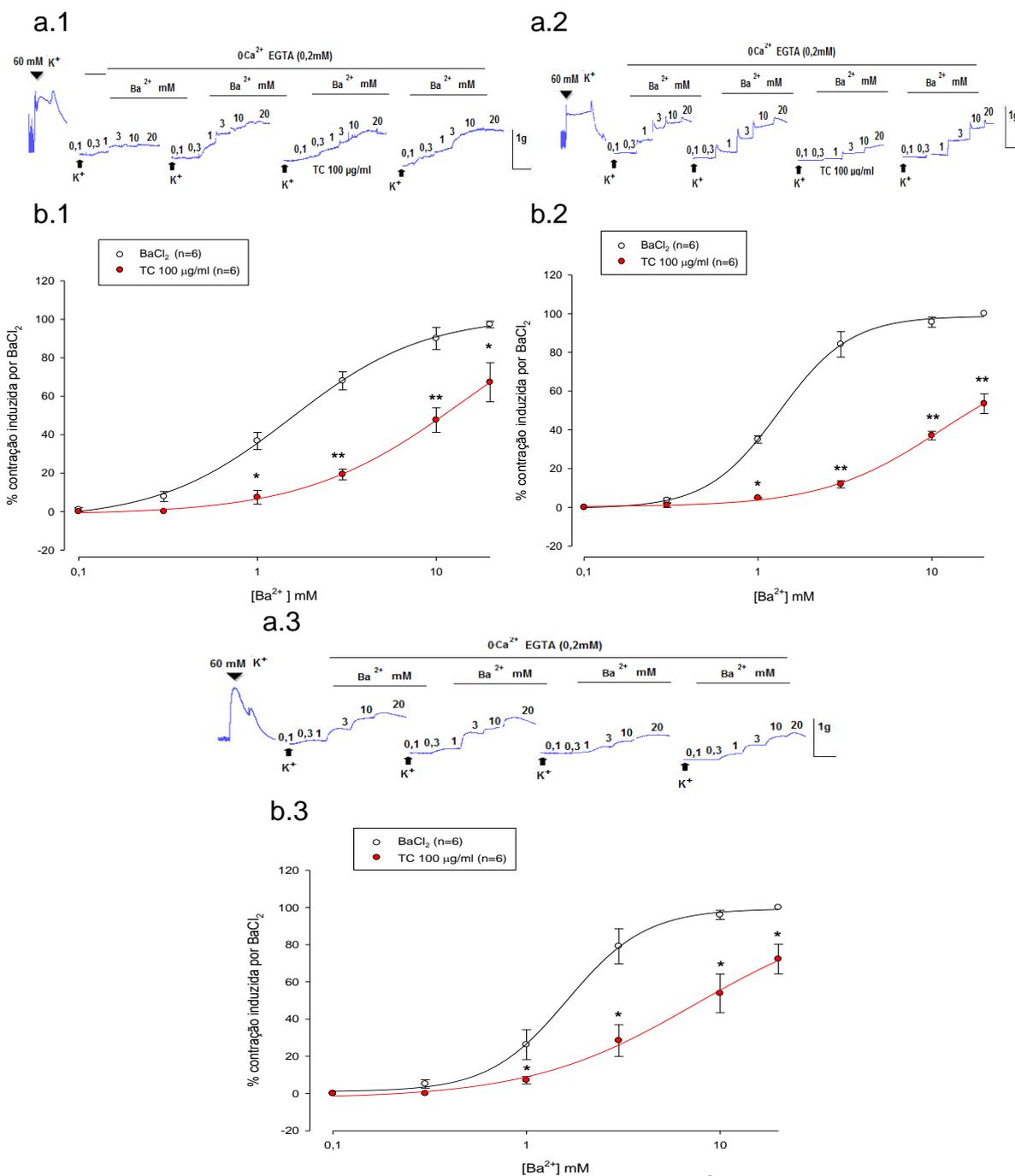


FIGURA 28 - Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por Ba^{2+} em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato despolarizado com 60mM de K^+ . a.1 (veia porta), a.2 (íleo) e a.3 (bexiga) Traçados típicos mostrando a inibição de forma concentração dependente do β -CAR na contração induzida por Ba^{2+} em meio $0Ca^{2+}$ contendo EGTA (0,2mM) e 60mM de K^+ . b.1 (veia porta), b.2 (íleo) e b.3 (bexiga) Representação gráfica de curvas concentração efeito para o Ba^{2+} na presença do β -CAR (100 μ g/ml). Cada ponto representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo Ba^{2+} e as barras verticais o EPM, o "n" expressa o número de experimentos, (*) e (**) representam significância estatística em relação ao controle para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.11 Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em meio $0Ca^{2+}$ contendo EGTA em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

Com o intuito de verificar o efeito do OECa sobre a contração de ACh em meio $0Ca^{2+}$ contendo o quelante de cálcio EGTA, foi adicionado 5 minutos antes da contração induzida por ACh a concentração de 300 $\mu\text{g/ml}$ de OECa. Considerou-se como sendo referencial (100%) os controles induzido por ACh em meio $0Ca^{2+}$. A média dessas contrações foi comparada com as médias obtidas quando as contrações foram induzidas por ACh na presença do OECa em meio $0Ca^{2+}$. Pode ser observado na figura 29, que o OECa reduziu em média a contração induzida por ACh em valores percentuais para $57,30 \pm 10,65 \%$ em íleo. Em relação a bexiga, após a adição do OECa sobre a contração induzida por ACh, foi obtido o valor médio em percentual de $100,83 \pm 0,83 \%$. Após tratamento estatístico, não foi encontrada diferença significância entre os tecidos. O tecido utilizado da veia porta não respondeu a este protocolo.

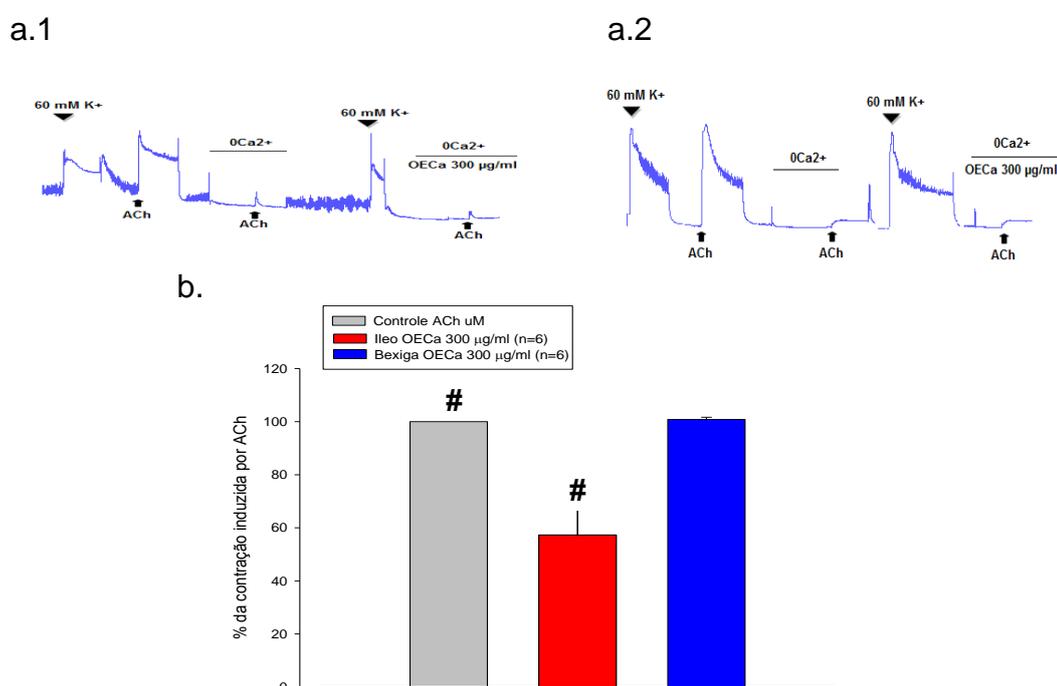


FIGURA 29 - Efeito do OECa sobre as contrações induzidas por 60 μM de ACh em meio $0Ca^{2+}$ contendo EGTA (0,2mM), em músculo liso de íleo e bexiga de rato. Em a.1 (íleo) e a.2 (bexiga) traçados típicos mostrando as contrações induzida por ACh com o OECa em meio $0Ca^{2+}$ respectivamente em íleo e bexiga. b Representação gráfica do efeito do OECa sobre a contração induzida por ACh em meio $0Ca^{2+}$. Cada barra representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo ACh e as pequenas barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (#) representam significância estatística em relação ao controle e bexiga, respectivamente para $p < 0,001$ (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

5.12 Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por acetilcolina, em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA em músculo liso de veia porta, íleo e bexiga de rato.

Com o intuito de verificar o efeito do β -CAR sobre a contração de ACh em meio 0Ca^{2+} contendo o quelante de cálcio EGTA, foi adicionado 5 minutos antes da contração induzida por ACh a concentração de $100\ \mu\text{g/ml}$ de β -CAR. Considerou-se como sendo referencial (100%) os controles induzido por ACh em meio 0Ca^{2+} . A média dessas contrações foi comparada com as obtidas quando as contrações foram induzidas por ACh na presença do β -CAR em meio 0Ca^{2+} . Pode ser observado na figura 30, que o β -CAR reduziu em média a contração induzida por ACh em valores percentuais para $65,27 \pm 9,23\%$ em íleo. Em relação a bexiga, após a adição do β -CAR sobre a contração induzida por ACh, foi obtido o valor médio em percentual de $100,0 \pm 0,0\%$. Após tratamento estatístico, foi encontrada significância em relação aos dados experimentais no do músculo liso do íleo quando comparado com o grupo controle e a bexiga ($n=6$) ($p<0,05$, ANOVA). A veia porta não respondeu a este protocolo.

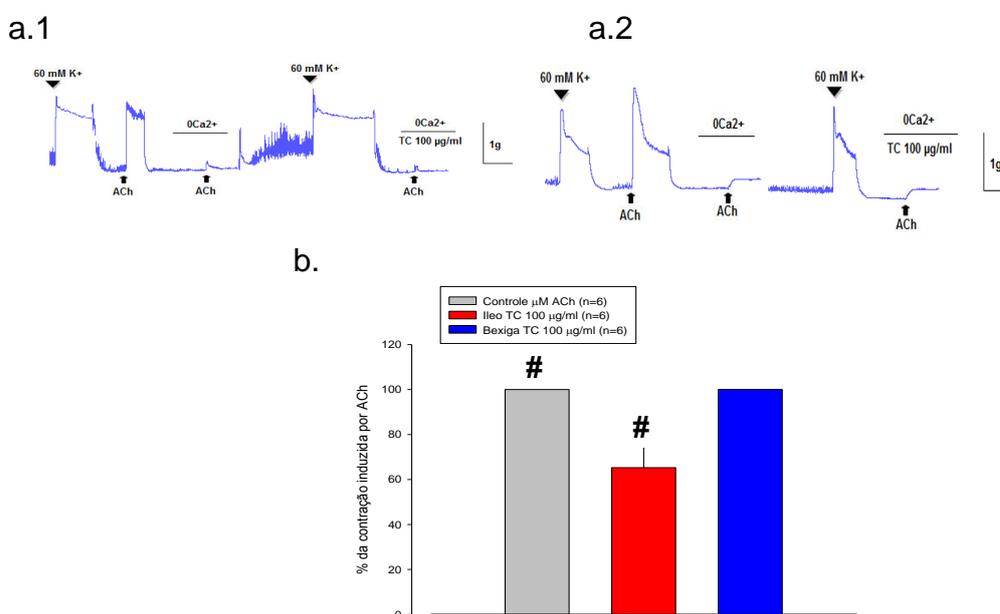


FIGURA 30 - Efeito do β -CAR sobre as contrações induzidas por $60\ \mu\text{M}$ de ACh em meio 0Ca^{2+} contendo EGTA ($0,2\text{mM}$), em músculo liso de íleo e bexiga de rato. Em a.1 (íleo) e a.2 (bexiga) traçados típicos mostrando as contrações induzida por ACh com o β -CAR em meio 0Ca^{2+} respectivamente em íleo e bexiga. b Representação gráfica do efeito do β -CAR sobre a contração induzida por ACh em meio 0Ca^{2+} . Cada barra representa a média do % da resposta contrátil máxima induzida pelo ACh e as pequenas barras verticais o EPM, "n" expressa o número de experimentos. (*) e (#) representam significância estatística em relação ao controle e bexiga, respectivamente para $p<0,05$ (ANOVA seguido do teste Holm-Sidak).

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi possível observar que na contração induzida por potássio, que ocorre por meio do acoplamento eletromecânico, os três tecidos tiveram um efeito antiespasmódico em relação a adição tanto do OECa como do β -CAR. Esse efeito pode ser observado tanto na fase fásica da contração como na tônica. A veia porta foi o tecido onde foi obtido um maior efeito do OECa em relaxar a contração da fase fásica. O OECa na veia porta teve uma EC_{50} de $19,21 \pm 1,65$ $\mu\text{g/ml}$, seguido do íleo com EC_{50} de $104,27 \pm 8,19$ $\mu\text{g/ml}$ e o último a bexiga com EC_{50} de $343,54 \pm 11,71$ $\mu\text{g/ml}$. As EC_{50} do OECa nos três tecidos apresentaram diferenças estatísticas significantes (One Way ANOVA com $p < 0,001$), sendo a veia porta o tecido onde o OECa apresentou a menor EC_{50} .

Esse maior efeito em relação ao OECa em bloquear a fase fásica da contração na veia porta em relação aos outros dois tecidos, pode ter ocorrido devido a esse tecido ter uma participação pouco significativa do mecanismo do CICR (KAMISHINA e McCARRON, 1996), que permite a abertura dos canais de cálcio do RS ligados aos receptores RyR. Fato este que geraria uma pequena contração fásica, que seria rapidamente abolida pela ação do OECa. Os outros dois tecidos possuem uma contribuição maior em relação a este mecanismo, sendo de maior importância na bexiga (HOTTA *et al.*, 2007), o que pode explicar o efeito menor do OECa quando comparado aos outros dois tecidos.

Em relação ao β -CAR, também foi observado um efeito nessa fase da contração, com o constituinte apresentado EC_{50} de $92,64 \pm 5,34$ $\mu\text{g/ml}$, $15,57 \pm 6,38$ $\mu\text{g/ml}$ e $214,93 \pm 11,06$ $\mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia, íleo e bexiga. As EC_{50} do β -CAR nos três tecidos foram diferentes significativamente entre si (One Way ANOVA com $p < 0,001$) e também diferentes em relação ao OECa (ANOVA, seguido de t-test com $p < 0,001$). Com β -CAR foi possível observar um maior efeito no íleo do que os outros dois tecidos, seguidos pela veia porta e bexiga.

O efeito mais significativo do OECa na veia porta em relação ao β -CAR também na veia porta pode ter ocorrido devido a outro constituinte existente no OECa, que tenha um maior efeito na veia porta que nos outros dois tecidos. Em relação à contração tônica, tanto o OECa como o β -CAR tiveram efeitos em reduzir essa

contração. A contração tônica apresentou na presença do OECa EC_{50} de $7,81 \pm 2,02 \mu\text{g/ml}$, $29,99 \pm 8,44 \mu\text{g/ml}$ e $92,50 \pm 11,71 \mu\text{g/ml}$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. A EC_{50} do OECa na bexiga mostrou ser maior e com diferença significativa em relação ao íleo e veia porta (ANOVA, seguido de t-test com $p < 0,001$).

Essa menor EC_{50} do OECa em veia porta e íleo, que são tecidos que possuem uma contribuição importante em relação a formação da contração tônica, pode indicar que o óleo apresentaram um efeito mais específico na contração dependente da entrada do cálcio do meio extracelular para o meio citosólico, entrada esta característica da fase tônica da contração. O menor efeito do OECa na bexiga pode ter ocorrido devido a essa fase tônica, provavelmente, na bexiga ter uma maior contribuição do cálcio do RS do que os outros dois tecidos. Em bexiga a entrada de cálcio do meio extracelular é utilizada em grande parte para recarregado o cálcio do RS (WU *et al.*, 2002).

Em relação ao β -CAR, também foi observado o bloqueio da contração tônica. O β -CAR apresentou EC_{50} na veia porta e íleo de $24,76 \pm 9,63 \mu\text{g/ml}$ e $12,54 \pm 1,43 \mu\text{g/ml}$ respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre os dois tecidos. Sobre a bexiga, o β -CAR mostrou um menor efeito, tendo sua EC_{50} de $181,19 \pm 6,66 \mu\text{g/ml}$, que foi maior e diferente significativamente (ANOVA, seguido de t-test com $p < 0,001$) em relação os outros dois tecidos. Isso pode mostrar que tanto o OECa como o β -CAR possuem efeito em bloquear a entrada do cálcio do meio extracelular, característica da fase tônica da contração. E que esse bloqueio é maior com OECa do que com o β -CAR, o que pode indicar que o efeito do OECa não ocorre somente pela ação do β -CAR, mas também pela efeito de algum outro constituinte.

Na comparação entre a fase fásica e tônica nos três tecidos sobre efeito do OECa, foi possível observar que as EC_{50} mostraram ser diferentes significativamente e menores na fase tônica em relação a fase fásica tanto em veia porta (One Way ANOVA com $p < 0,05$), como em íleo e bexiga (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,001$). O que vem corroborar com o que foi observado até agora, onde o OECa possuem um maior efeito na contração que depende mais da entrada do cálcio do meio extracelular pelos canais do tipo VOC (ERTEL *et al.*, 2000) do que pelo mecanismo de CICR com a liberação do cálcio do RS, característica da fase fásica. Em relação ao β -CAR foi possível observar que a contração fásica e a tônica

foram diferentes significativamente em relação as EC_{50} em veia porta (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,001$) e bexiga (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,05$), o íleo não mostrou diferença significativa. Essa diferença entre a contração fásica e tônica nos dois tecidos deve ter ocorrido pelo mesmo motivo da ação do OECa, com o β -CAR tendo uma maior ação sobre a contração depende do cálcio do meio extracelular do que do meio intracelular.

Os resultados mostram que tanto o OECa como o β -CAR possuem um efeito sobre o acoplamento eletromecânico, e que esse efeito ocorre nas duas fases da contração, mas com uma predominância maior sobre a fase tônica do que a fásica.

Em relação à contração induzida por ACh que dispara o acoplamento farmacomecânico, assim como o acoplamento eletromecânico, podemos observar um bloqueio da contração fásica tanto com o OECa como com o β -CAR. Sendo esse efeito maior no OECa do que com o β -CAR. A EC_{50} encontrada na presença do OECa foi de $38,53 \pm 14,83 \mu\text{g/ml}$, $125,93 \pm 10,91 \mu\text{g/ml}$ e $122,19 \pm 57,33 \mu\text{g/ml}$ respectivamente para veia porta, íleo e bexiga na contração fásica. Essa EC_{50} foi diferentemente significativa entre bexiga e veia porta, bexiga e íleo (ANOVA seguido de t-test com $p < 0,001$). Entre veia porta e íleo, não foi encontrada diferença significativa. Em relação ao bloqueio da contração tônica com o OECa, as EC_{50} encontradas foram de $16,81 \pm 2,70 \mu\text{g/ml}$, $47,97 \pm 8,09 \mu\text{g/ml}$ e $115,71 \pm 20,51 \mu\text{g/ml}$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. A comparação entre as EC_{50} do OECa nos três tecidos na fase tônica, mostrou ser significativamente diferente entre bexiga e veia porta, bexiga e íleo, mas não entre veia porta e íleo (One way ANOVA com $p < 0,001$).

Quando comparada as EC_{50} da fase fásica com a tônica nos três tecidos ocorreu diferença significativa somente entre a fase fásica e tônica do íleo (One way ANOVA com $p < 0,001$). Esse resultado indica que o OECa possui efeito em bloquear a contração induzida por ACh nos três tecidos.

Em relação ao β -CAR, a EC_{50} da fase fásica foi de $101,59 \pm 2,81 \mu\text{g/ml}$, $86,73 \pm 12,12 \mu\text{g/ml}$ e $560,20 \pm 61,88 \mu\text{g/ml}$, respectivamente para veia porta, íleo e bexiga. Comparando com a EC_{50} dessa mesma fase com o OECa, podemos observar um efeito maior do OECa em relação ao β -CAR nos três tecidos, com uma diferença significativa menor entre o músculo liso do íleo. Na fase tônica, na presença do β -CAR, a EC_{50} encontrada foi respectivamente para veia porta, íleo e

bexiga de $41,45 \pm 12,89 \mu\text{g/ml}$, $105,09 \pm 4,09 \mu\text{g/ml}$ e $461,06 \pm 7,13 \mu\text{g/ml}$. Comparando novamente essa mesma fase na presença do OECa, também notamos um efeito maior do OECa em relação ao β -CAR. Quando comparamos a fase fásica com a tônica na presença do β -CAR, observamos uma ação um pouco maior na fase tônica. Com isso podemos afirmar que tanto o OECa como o β -CAR possuem efeito no acomplamento farmacomecânico, efeito esse que é mais evidente no OECa.

Comparando as EC_{50} da contração induzida por K^+ com o da ACh podemos vê que o efeito do OECa e do β -CAR é maior na contração induzida por K^+ do que a induzida por ACh, o que pode ter ocorrido provavelmente pela maior ação do OECa e β -CAR na contração depende do acomplamento eletromecânico do que no fármacomecânico.

Na observação da contração induzida por CaCl_2 em tecido pré-tratado com K^+ , contração essa que depende tanto do cálcio proveniente do meio extracelular quando do meio intracelular, foi verificado que o OECa bloqueia a contração nos três tecidos com redução para $7,88 \pm 2,62 \%$, $9,88 \pm 3,19\%$ e $10,66 \pm 4,39 \%$ da contração controle, respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa redução não foi diferente em relação aos três tecidos. Com β -CAR a redução da contração foi menos expressiva que a do OECa, com redução de $39,59 \pm 5,01 \%$, $23,39 \pm 4,98 \%$ e $58,27 \pm 11,10 \%$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga em relação a contração controle. Não ocorreu diferença significativa entre os três tecidos.

Quando comparado a ação do OECa com o β -CAR, podemos verificar que o β -CAR desenvolve um efeito menor do que o OECa. Esse efeito pode ter ocorrido pela presença de outros constituintes, que tenham um maior efeito que o β -CAR, e com isso abolido quase a zero a contração induzida por cálcio na presença do OECa.

Em relação à contração induzida por BaCl_2 , contração essa que ocorre exclusivamente via entrada do Ba^{2+} do meio extracelular sem a participação do RS. O OECa bloqueou quase que totalmente a contração nos três tecidos, com redução da contração de $4,87 \pm 1,99 \%$, $7,15 \pm 2,41 \%$ e $19,13 \pm 4,81 \%$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga em relação a contração controle. A redução da contração foi maior em veia porta e menor em bexiga, com diferença estatística entre os dois tecidos (One way ANOVA com $p < 0,05$). Observando esse efeito pode se afirmar

que o OECa possa ter uma ação importante sobre a contração dependente do cálcio do meio extracelular, e que esse efeito ocorra devido o bloqueio dos canais para cálcio do tipo VOC, mas não exclusivamente por esses canais.

Em relação ao β -CAR, o mesmo também bloqueou a contração em relação ao controle, mas com percentual menor quando comparado com a redução do OECa. Estes percentuais foram de $67,23 \pm 10,13 \%$, $53,48 \pm 5,09 \%$ e $72,22 \pm 7,91 \%$ respectivamente em veia porta, íleo e bexiga. Essa redução não foi significativa entre os três tecidos. A ação maior do OECa em relação ao β -CAR, pode ter ocorrido pelo efeito de um outro constituinte que tenha somado ao efeito do β -CAR em relação ao bloqueio da entrada do Ba^{2+} para o meio citosólico.

Quando foi investigado a ação do OECa e do β -CAR sobre a contração dependente da entrada de cálcio do meio extracelular para o citosol, por meio dos canais do tipo ROC (McCARRON *et al.*, 2004) de membrana nos três tecidos pré-tratado com ACh, a veia porta não respondeu a essa contração, o que pode ter ocorrido pela pouca contribuição desses canais de membrana para a contração na veia porta. O efeito do OECa em bloquear a contração dependente de ROC de membrana foi maior do que com o β -CAR, com redução da contração em relação ao controle para $30,00 \pm 10,19 \%$ e $44,09 \pm 5,20 \%$ respectivamente em íleo e bexiga com o OECa e $64,63 \pm 9,93 \%$ e $78,03 \pm 7,63 \%$ respectivamente em íleo e bexiga com o β -CAR. A redução não foi significativa entre íleo e bexiga na presença do OECa e nem em relação ao β -CAR. O efeito em bloquear a contração induzida por $CaCl_2$ em meio pré-tratado com ACh na presença do OECa e do β -CAR não foi tão significativo quanto na contração induzida por $CaCl_2$ e $BaCl_2$ em meio pré-tratado com K^+ . O que pode vir a confirmar que o mecanismo principal encontrado para a ação tanto do OECa como do β -CAR pode ser devido ao efeito sobre canais de membrana diferentes dos tipos ROC, como os VOC e outros canais como os NSCC que permitem a entrada de cálcio do meio extracelular (GUIBERT *et al.*, 2008)

Quando foi investigado o efeito do OECa e do β -CAR na contração dependente do cálcio intracelular sobre os três tecidos, observou se, que mais uma vez a resposta da veia porta não foi possível ser mesurada, pois o protocolo somente fez com que ocorresse um aumento da atividade espontânea do tecido. O efeito do OECa sobre esse mecanismo foi significativo somente para íleo com redução de $57,30 \pm 10,65 \%$ em relação ao controle. No β -CAR a redução, assim como a do OECa, foi significativa somente para o íleo, com redução de $65,27 \pm$

9,23% em relação ao controle. A resposta obtido com OECa e β -CAR foram semelhantes, o que mostrou que nem o OECa e nem β -CAR possuem uma atividade muito expressiva em reduzir a contração induzida pelo cálcio proveniente do meio intracelular.

Os achados obtidos nesse trabalho corroboraram com estudos que já foram feitos tanto com o β -CAR como com OECa em outros tecidos, estudos esse que mostram que tanto o OECa como o β -CAR possuem uma ação maior sobre a contração dependente do cálcio do meio extracelular. Esse efeito pode ocorrer pela ação do β -CAR e do OECa sobre os canais que permitem a entrada do cálcio do meio extracelular para o meio intracelular, como os canais do tipo VOC, NSCC e outros canais, com um efeito menor sobre os canais do tipo ROC de membrana. A ação um pouco mais potente do OECa em relação ao β -CAR, pode ter ocorrido devido existência de outro constituinte que seria o principal responsável pelos efeitos observados nessa amostra do OECa.

7 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos chegar a conclusão de que tanto o OECa quanto o β -CAR tem efeito nos três tecidos, com uma pequena especificidade em relação a veia porta na presença do OECa e que esta especificidade é quase a mesma entre os três tecidos em relação ao β -CAR.

Tanto o OECa quanto o β -CAR possuem um maior efeito no acoplamento eletromecânico do que o farmacomecânico nos três tecidos, com uma pequena predominância sobre o bloqueio da fase tônica da contração.

Existe efeito tanto do OECa como do β -CAR sobre o bloqueio da contração dependente do cálcio proveniente do meio extracelular e que esse efeito não se deve somente ao β -CAR, mas a outro constituinte que potencializa o efeito do óleo em inibir essa contração.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDON, A. P. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; MORAIS, S. M.; SANTOS, C. F. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaeifolius* on mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, In. 35, p. 1215 - 1219, 2002.

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

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

ALBERT, A.P.; SALEH, S. N.; PEPPIATT-WILDMAN , C. M. ;LARGE , W. A. Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells. **J Physiol** 583.1. p. 25–36 25, 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; Uso de recursos vegetais da caatinga; o caso do agreste de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciências**, v. 27, n. 007, p. 336-346, 2002.

ALBUQUERQUE, M. M.; LYRA, F. D.; MELLO, J. F.; LIMA, O. G.; MONACHE, F. D.; DIU, M. B.; COSTA, M. B. Antimicrobial substances of superior plants. Isolation of diterpene acid from *Croton aff. Argyrophyloides* Muell. Arg. Euphorbiaceae. **Revista do Instituto de Antibiótico**, v.44, 1974.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Constituintes químicos do óleo essencial do marmeleiro vermelho (*Croton*-sp 33). In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 16, 1993,Caxambu, MG. **Resumos**.São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1993.

ALLEN, B. G & WALSH, M. P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **TIBS**. v. 19, p. 362-368, 1994.

ALMEIDA, A.B.A.; MIOTTO, A.M.; NUNES, D.S.; SPADARI-BRATIFI, S.C.H. R.C.;SOUZA-BRITO, A.R.M. Mechanism of antiulcerogenic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **Rev Bras Farmacogn** 12(Supl. 1): 105-110, 2002.

ANDERSSON, K. E.; ARNER, A. Urinary bladder contraction and relaxation: Physiology and Pathophysiology. **Physiol Rev.** 84: 935-986, 2004.

AYDIN, S., DEMIR, T., OZTURK, Y., BASER, K. H. Analgesic activity of *Nepeta italica* L. **Phytother Res.**, v.13, n.1. p. 20-30, 1999.

BEECH, D. J.; MURAKI, K.; FLEMMING, R. Non-selective cationic channel of smooth muscle and the mammalian homologues of *Drosophila* TRP. **J Physiol** 559.3. pp 685-706, 2004.

BEGHETTI, E. J; HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSO, J. S.; BRITO, A. R. Anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents of the essential oil of *Croton cajucara* Benth. **J. Pharm. Pharmacol**; 51 (12): 1447-1453, 1999.

BERNE, R. M e LEVY, M.N. (Ed). **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

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

BOLTON, T. B., PRESTWICH, S. A., ZHOLOS, A. V., GORDIENKO, D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscle. **Annu. Rev. Physiol.** 61:85-115, 1999.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 606-718, 1979.

BORON, W. F e BOULPAEP, E. L. Medical Physiology, **Updated edition**, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2005.

BORYSENKO, M.; BERINGER, T. Functional histology. Boston: Little, **Brown and Company**, pp. 195 -208. 1984

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

BURT, R. P. Phasic contractions of the rat portal vein depend on intracellular Ca^{2+} release stimulated by depolarization. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 284: H1808-H1817, 2003.

BYRNE, N. G.; LARGE, W. A. Membrane ionic mechanisms activated by noradrenaline in cells isolated from the rabbit portal vein. **Journal of Physiology**, 404. Pp. 557-573, 1988.

CACHOFEIRO, V.; MAIANA, M., LAS HERAS, N.; FERNÁNDEZ, B. M.; BALLESTEROS, S.; TRESGUERRES, J. F.; LAHERA, V. Aldosterone and the vascular system. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**. 109, 331-335, 2008.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Eds: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B. Argos-Ed. Universitária UNOESC, Santa Catarina: Campus Chapecó. p. 297-315, 2001.

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

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annu Rev Biochem** 64: 493-531, 1995.

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

CHALMERS, S.; OLSON, M. L.; MacMILLAN, D.; RAINBOW, R. D.; McCARRON, J. G. Ion channels in smooth muscle: Regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria. **Cell Calcium** 42. 447-466, 2007.

CHANG, H. J.; KIM, H. J.; CHUN, H. S. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Sciences**. 80, 835-841, 2007.

CHARLES, D. J., SIMON, J. E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n.3, p.458-462, 1990.

CHRISTENSEN, J. The controls of gastrointestinal movements: some old and new views. **N. Engl. J. Med.** v. 285, p. 85-98, 1971.

CIMANGA, K., KAMBU, K., TONA, L., APERS, S., DE BRUYNE, T., HERMANS, N., TOTTE, J., PIETERS, L., VLIETNICK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the democratic republic of Congo. **J Ethnopharmacol.** v. 79, n.2 p. 213-220, 2002.

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

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

COOLSAET, B. L. Bladder compliance and detrusor activity during the collection phase. **Neurol Urodyn** 4: 263–273, 1985.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. de A., ALENCAR, J. W. de. **Óleos essenciais de plantas do nordeste.** Fortaleza: UFC- Departamento de Química Orgânica e Inorgânica. p. 210, 1981.

CRIBBS, L. L. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: Multiple Functions. **Cell Calcium**. 40, 221-230, 2006.

CRONQUIST, D.C. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University Press**, 1981.

D'ANGELO, E. K., SINGER, H. A., REMBOLD, C. M. Magnesium relaxes arterial smooth muscle by decreasing intracellular calcium without changing intracellular magnesium. **J. Clin. Invest.** v. 89, p. 1988-1994, 1992.

DENG, J. T.; LIEROP, J. E. V.; SUTHERLAND, C.; WALSH, M. P. Ca^{2+} -independent Smooth Muscle Contraction. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol.276, No. 19, pp. 16365-16373, 2001.

DOURADO, R.C.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do noderste do Brasil: cróton sonderianus – euphobiaceae**. Fortaleza, 2003. Tese (doutorado em química orgânica). Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará.

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** 25, 533-535, 2000.

EVANGELISTA, G. L., COELHO-DE-SOUZA, A. N., SANTOS, C. F., LEAL-CARDOSO, J. H., LOPES, E. A. B., DOS SANTOS, M. V. Essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**. 109(2007) 515-522.

EVANS, W. C., **Farmacognosia**. 13 ed. Mexico, D. F; Nueva Editorial Interamericana. p. 453, 1991.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I.O.; SANTOS, V.L.; DANTAS, H.F.; DINIZ, M.F.F.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 15: 381-391, 2005.

FARIAS, M. S. Q. **Efeitos do óleo essencial do *Croton argyrophyloides* Muell. Arg. e do β -cariofileno sobre a contratilidade de anéis de aorta de ratos**. Dissertação (Mestrado acadêmico em ciências fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza, 2006.

FARNSWORTH, N. R. Screening plants for new medicines. In : WILSON, E. O (Ed). **Biodiversity**. Washington DC: Nac. Acad. Press. P. 521, 1988.

FARRUGIA, G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. **Annu. Rev. Physiol**. 61: 45-85, 1999.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signaling in smooth muscles. **Cell Calcium** 42, 467-476, 2007.

FOSKETT, J. K.; WHITE, C.; CHEUNG, KING-HO.; MAK, DON-ON. D. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. **Physiol Rev** 87: 593-658, 2007.

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

GABELLA, G.; UVELIUS, B. Urinary bladder of rat: fine structure of normal and hypertrophic musculature. **Cell and Tissue Research**. Vol 262, no 1/ October, 1990.

GANITKEVICH, V.; HASSE, V.; PFITZER, G. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent regulation of smooth muscle contraction. **Journal of Muscle Research and Cell Motility** 23: 47-52, 2002.

GEVER, J. R.; COCKAYNE, D. A.; DILLON, M. P.; BURNSTOCK, G.; FORD, A. P. D. W. Pharmacology of P2X channels. **Eur J Physiol**, 452: 513-537 2006.

GORDIENKO, D. V.; HARHUN, M. I.; KUSTOV, M. V.; PUCOVSKY, V.; BOLTON, T. B. Sub-plasmalemmal $[Ca^{2+}]_i$ upstroke in myocytes of the guinea-pig small intestine evoke by muscarinic stimulation: IP_3R -mediated Ca^{2+} release induced by voltage-gated Ca^{2+} entry. **Cell Calcium** 43, 122-141, 2008.

GOUINGUENÉ, S. P. & TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1296-1307, 2002.

Grupo Español de Urodinámica y de SINUG .Consenso sobre terminología y conceptos de la función del tracto urinario inferior.**Actas Urol Esp**; 29 (1): 16-30, 2005.

GUIBERT, C.; DUCRET, T.; SAVINEAU, J. P. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 1-14, 2008.

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

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

HARHUN, M. I.; PUCOVSKY, V.; POVSTYAN, O.V.; GORDIENKO, D. V.; BOLTON, T. B. Interstitial cells in the vasculature. **J. Cell. Mol. Med.** Vol 9. No 2, pp. 232-243, 2005.

HARNET, K. M.; BIANCANI, P. Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. **The American Journal of Medicine.** Vol 115 (3A), 2003.

HOTTA, S.; MPRIMURA, K.; OHYA, S.; MURAKI, K.; TAKESHIMA, H.; IMAIZUMI, Y. Ryanodine receptor type 2 deficiency changes excitation-contraction coupling and membrane potential in urinary bladder smooth muscle. **J Physiol** 582.2, pp 489-506, 2007.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: **EDUFSCar.** p. 152, 2003.

IACOVOU, J. W.; HILL, S. J.; BIRMINGHAM, A. T. Agonist-induced contraction and accumulation of inositol phosphates in the guinea-pig detrusor: evidence that muscarinic and purinergic receptors raise intracellular calcium by different mechanisms. **J. Urol.** **144**, p. 775, 1990.

JAGGAR, J. H.; PORTER, V. A.; LEDERER, W. J.; NELSON, M. T. Calcium sparks in smooth muscle. **Am J. Physiol. Cell Physiol.** 278: C235-C256, 2000.

JIANG, H., STEPHENS, N. L. Calcium and smooth muscle contraction. **Mol . Cell. Bio. Chem.** v. 135, p. 1-9, 1994.

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

KAMISHINA, T.; McCARRON, J. C. Despolarization-evoked increases in cytosolic calcium concentration in isolated smooth muscle cells of rat portal vein. **J Physiol (Lond)** 492, 61-74, 1996.

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

KUNZE W. A. A., FURNESS J. B. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. **Annu. Rev. Physiol.** 1999. 61:117–42.

KUO, K-H., SEOW, Y. C. Contractile filament architecture and force transmission in swine airway smooth muscle. **Journal of Cell Science.** 117, 1503-1511, 2004.

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

LARCHER, W. Ecologia vegetal, São Carlos: **RiMa Artes e Textos.** P. 33-40, 2000.

LEONHARDT, V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S.; ALBUQUERQUE, A. A.C.; PORTO, R. S.; CELEDÔNIO, N. R.; OLIVEIRA, A. C.; PEREIRA, R. F.; SILVA, L. P.; GARCIA-TEÓFILO, T. M.N.; SILVA, A. P.F.S.; MAGALHÃES, P. J.C.; DUARTE, G. P.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental & Clinical Pharmacology.** 9999, 1472-8206, 2009.

LIMA, M. G. A.; MAIA, I. C. C.; SOUSA, B. D.; MORAIS, S. M.; FREITAS, S. M. Efeito dos extratos de caule e folha de espécies de Euphorbiaceae sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culiadae). **Ver. Inst. Med. Trop.** São Paulo vol. 48 no. 4 July/Aug. 2006.

LOZOYA, X.; REYES-MORALES H.; CHÁVEZ-SOTO M. A.; MARTÍNEZGARCÍA M. DEL C.; SOTO-GONZÁLEZ Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 83, n. 1/2, p. 19-24, Nov. 2002.

LUNDGREN, O., SVANVIK, J., JIVEGARD, L. Enteric nervous system, physiology and pathophysiology of the intestinal tract. **Digestive Diseases and Science**, v. 34, n. 2, p. 264-283, 1989.

LUTTERODT, G. D. Inhibition of gastrointestinal release of acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 25, n. 3, p. 235-247, May 1989.

MANI, R. S.; KAY, C. M. **Calcium binding proteins.** In: Biochemistry os smooth muscle contraction. Michael Bárány (Ed). San Diego: Academic Press, 1996.

MARTINELLI, A. L. C. Hipertensão portal. **Medicina, Ribeirão Preto**, 37: 253-261, jul./dez. 2004.

MARTÍNEZ, F. C. P.; PÉREZ, J.; SÁNCHEZ, A. I. de las H.; ORTIZ, G. P. El envejecimiento de la vejiga: cambios en la dinámica de la continencia y la micción. **Archivos de Medicina**, Julio-agosto, año/vol. 1, número 004. Asociación Española de Médicos Internos Residentes, Madrid, España, 2005.

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

MARTINS, E.R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J. E. Plantas medicinais. Viçosa, **MG:UFV**. P.220, 1994.

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

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle, **Br. J. Pharmacol.** 135, 1-13, 2002.

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

MENEZES, A. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; RAO, V. S.; MATOS, M. E. O. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Vanillosperma arborea*. **Fitoterapia LXI** (3): 252-254, 1990.

MIKKELSEN, E. comparison of effects of a new dihydropyridine, Bay K 8644, and nifedipine on spontaneous mechanical activity in rat portal vein. **Br. J. Pharmacol.** 383-385, 1985.

MING, L. C. **Estudo e pesquisa de plantas medicinais na agronomia**. Horticultura Brasileira, 12, p.3-9, 1994.

MINO, T., YUASA, U., NAKAMURA, F., NAKA, M., TANAKA, T. Two distinct actin-binding sites of smooth muscle calponin. **Eur. J. Biochem.** 251, 262-268, 1998.

MISSIAEN, L., DE SMEDT, H., DROOGMANS, G., HIMPENS, B., CASTEELS, R. Calcium ion homeostasis in smooth muscle. **Pharmacol. Ther.** v. 56, n.2, p.191-231, 1992.

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

MORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleo essencial de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Quim. Nova**, São Paulo. Vol. 29, No. 5, 907-910, 2006.

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

MOSTWIN, J.L. The action potential of guinea pig bladder smooth muscle. **J Urol** 135: 1299–1303, 1986.

MURAKUNO, M.; USHIKI, T.; ABE, K.; MATSUMURA, K.; SHINNO, Y.; KOYANAGI, T. Three-dimensional arrangement of collagen and elastin fibers in the human urinary bladder: a scanning electron microscopic study. **The Journal of Urology**. Vol. 154, 251-266, 1995.

MURAKAMI, A.; TANAKA, T.; LEE, J.-Y.; SURH, Y.-J.; KIM, H.W.; KAWABATA, K.; NAKAMURA, Y.; JIWAJINDA, S.; OHIGASHI, H. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. **International Journal of Cancer** 110, 481–490, 2004.

MURTHY, K, S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annu. Rev. Physiol.** 68: 345-74, 2006.

MURPHY, R. A. What is special about smooth muscle? The significance of covalent crossbridge regulation. **Faseb J.** v.8. p. 311-318, 1994.

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.

NIIRO, N.; IKEBE, M. Zipper-interacting Protein kinase induces Ca^{2+} -free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol.276, No. 31, pp. 29567-29574, 2001.

NILSSON, H. Interactions between membrane potential and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. **Acta Physiol Scand**. 164, 559-566, 1998.

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

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

PAIVA, L. F. A.; RAO, V. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oil-resin on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 62: 73-78, 1998.

PAIVA, T. B.; FARIAS, N. C. Vascular smooth muscle contraction mechanisms. **Rev Bras Hipertens** vol.12(2): 89-92, 2005.

PARKER, I.; YAO, Y. Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. **Proc R Soc Lond B Bio Sci** 246: 269-274, 1991.

PASSOS, G. F., FERNANDES, E. S., DA CUNHA, F. M., FERREIRA, J., PIANOWSKI, L. F., CAMPOS, M. M., CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. 10.1016/j.jep.09.032, 2006.

PETROVICK, P. R.; GONZÁLEZ OETEGA, B.; BASSANI, V. L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. **Ciência e Cultura**, v. 49, p. 364-369, 1997.

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** 2: 17-22.1995.

PIRES, V.S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Ball. **Rev Bras Farmacogn** 11: 89-93, 2001.

PITAROKILI, D., TZAKOU, O., LOUKIS, A., HARVACA, C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in Soilborne pathogens. **J. Agric Food Chem**, v. 51, n.11, p.3294-301, 2003.

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

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system an overview of structure and function. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** 44. 333± 340, 2000.

PUTNEY, J.W. Jr.; RIBEIRO, C.M. Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores. **Cell Mol Life Sci** 57: 1272-1286, 2000.

RAMAGE, A. G.; VILLALÓN, C. M. 5-Hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. **Trends in Pharmacological Sciences** Vol.29 No.9, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. p. 906, 2001.

REMBOLD, C.M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány, M Biochemistry of smooth muscle contraction. **Academic Press**, San Diego 1996.

RIOS, M. Y., CASTREJON, F., ROBLEDO, N., LEÓN, I., ROJAS, G., NAVARRO, V. Activity composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae). **Journal of the Mexican Chemical Society**. v. 47. n.002, p. 139-142, 2003.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** Vol. 18. No.1 São Paulo 2007.

SANDERS, K. M. Signal transduction in smooth muscle invited review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **J Appl Physiol** 91: 1438-1449, 2001.

SANDERS, K. M.; KOH, S. D.; ORDOG, T. e WARD, S. M. Ionic conductance involved in generation and propagation of electrical slow waves in phasic gastrointestinal muscle. **Neurogastroenterol Motil** 16(suppl. 1), 100-105, 2004.

SANDERS, K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. **Neurogastroenterol Motil**. 20 (Suppl. 1), 39-53, 2008.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill.(Euphorbiaceae). **Rev Bras Farmacognosia** 15: 321-325, 2005.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. e SILVEIRA, E. R. The leaf Essential Oil of *Psidium guyanensis* Offers Protection Against Pentylentetrazole-Induced Seizures. **Planta médica**, 63: 133-135, 1997.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico de origem dos metabólitos secundário. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Eds. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 821, 1999

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Eds. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R.. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 301-332, 2001.

SHIMIZU, H., ITO, M., MIYAHARA, M., ICHIKAWA, K., OKUBO, S., KONISHI, T., NAKA, M., TANAKA, T., HIRANO, K., HARTSHORNE, D. J., NAKANO, T. Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 48. p. 30407-30411, 1994.

SHIRAZI, A., IIZUDA, K., FADDEN, P., MOSSE, C., SOMLYO, A. P., SOMLYO, A. V., HAYSTEAD, T. A. J. Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effect of the holoenzyme and its subunits muscle. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 50. p. 31598-31606, 1994.

SIANI, A. C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos- **Plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio. p. 97, 2003

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Eds. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 821, 1999.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Eds. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 387-415, 1999.

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

SOMLYO, A. P.; WU, X.; WALKER, L.A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, Kinases, and phosphatases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**; 134:201-234, 1999.

SPEEDING, M., PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol Rev.** v. 44, n. 3, p. 363-76, 1992

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In : SPERELAKIS, N., BANKS, R. O. (Eds). **Physiology**. Boston: Little-Brown, cap. 15, p. 223-241, 1993.

SUI, G. P.; WU, C.; FRY, C. H. Inward calcium currents in cultured and freshly isolated detrusor muscle cells: evidence of a T-type calcium current. **The Journal of Urology**, vol. 165, 621-626, February 2001.

SUI, G. P.; WU, C.; FRY, C. H. A description of Ca²⁺ channels in human detrusor smooth muscle. **BJU** 92, 476-482, 2003.

TAKAHASHI, R.; NISHIMURA, J.; HIRANO, K.; SEKI, N.; NAITO, S.; KANAIDE, H.; Ca²⁺ sensitization in contraction of human bladder smooth muscle. **The Journal of Urology**. Vol. 172, Issue 2, August, pag 748-752, 2004.

TANSEY, M. G., HORI, M., KARAKI, H., KAMM, K. E., STULL, J. T. Okadaic acid uncouples myosin light chain phosphorylation and tension in smooth muscle. **Febs Lett.** v. 270. p. 219-221, 1990.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M.T. Properties of a tonically active, sodium permeable current in mouse urinary bladder smooth muscle. **Am J Physiol** 286:C1246-1257, 2004.

TOIGO, L., DE OLIVEIRA, R. F., DE OLIVEIRA, F., MARQUES, M. O. M. Caracterização farmacobotânica, estudo do óleo essencial e atividade antimicrobiana da erva de São Simão *Vernonia scorpioides* (Lam) Pers. **Ver. Brás. Farm.** 85(2): 49-55, 2004.

TOUYZ, R. M., Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure. Implications in the pathogenesis of hypertension. **Can J Cardiol**, 16:1137-1146, 2000.

UEHARA, Y e BURNSTOCK, G. Demonstration of “gap junctions” between smooth muscle cells. **J. Cell. Biol.**, v. 44, p. 215-217, 1970.

UNNO, T.;MATSUYAMA, H.;SAKAMOTO, T.;UCHIYAMA,M.;IZUMI,Y.; OKAMOTO, H.;YAMADA, H.;WESS, J.;KOMORI, S. M2 and M3 muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. **British Journal of Pharmacology** (2005) 146, 98–108.

VAN DER AA, F.; ROSKAMS, T.; BLYWEERT, W.; OST, D.; BOGAERT, G.; DE RIDDER, D. Identification of kit positive cells in the human urinary tract. **J Urol.** 171(6 Pt 1): 2492-6, 2004.

VERPOORTE, R. e MARASCHIN, M. Engenharia do Metabolismo de Plantas Medicinais. In: **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Eds: YUNES, R. A. & CALIXTO, J. B.Argos-Ed. Universitária UNOESC, Santa Catarina: Campus Chapecó. p. 381-432, 2001.

VITTI, A. M. e BRITO, J. O. Produção de óleo essencial de ucalipto. **IPEF NOTÍCIAS**, v. 23, n. 146, p.11, 1999.

VOGALIS, F.; ZHANG, Y.; GOYAL, R. K. An intermediate conductance K⁺ channel in the cell membrane of mouse intestinal smooth muscle. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1371, 309-316, 1998.

WATERMAN, M. A., COSTA, M., TONINI, M. Accommodation mediated by enteric inhibitory reflexes in the isolated guinea-pig small intestine. **J. Physiol.**, v. 474, n.3, p.539-546, 1994.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

WEBSTER, G.L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon** **42**: 793-823,1993.

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**. 34, 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**. 38, 397-407, 2005.

WU, C.; SUI, G.; FRY, C. H. the role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. **Journal of Physiology**. 538.2, pp. 357-369, 2002.

YANAI, Y.; HASHITANI, HIKARU.; KUBOTA, Y.; SASAKI, S.; KOHRI, K.; SUZUKI, H. The role of Ni^{2+} -sensitive T-type Ca^{2+} channels in the regulation of spontaneous excitation in detrusor smooth muscles of the guinea-pig bladder. **BJU INTERNATIONAL**, 97, 182-189, 2006.

ZEVALLOS-POLLITO, P. A.; FILHO, M. T. Espécies lenhosas do gênero *Croton* L.(Euphorbiaceae) no Estado do Acre. **Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre**, v. 5, supl. 2,p. 177-179, jul. 2007.

ZHOLOS, A. V. regulation of TRP-like muscarinic cation current in gastrointestinal smooth muscle with special reference to PLC/InsP₃/ Ca^{2+} system. **Acta Pharmacologica Sinica**. Jul; 27 (7): 833-842, 2006.

ZHONG, J.; DESSAUER, C. W.; KEEF, K. D.; HUME, J. R. Regulation of L-type Ca^{2+} channels in rabbit portal vein by G protein α_s and β_γ subunits. **Journal of Physiology**, 517. 1, pp. 109-120, 1999.

ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E. H. A., SANTOS, A. S., SILVA, M. H. L., MAIA, J. G. S. Volatile constituents of the resins from *Protium subserratum* (Engl.) Engl. and *Tetragastris panamensis* (Engl.) Kuntz. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10. p. 325-326. 1998.

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](#)