

**ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA**

**Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos  
Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E.  
Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens*  
Aubl.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS  
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**João Pessoa-PB**

**2013**

**ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA**

**Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopi frutescens* Aubl.**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de Concentração: FARMACOLOGIA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva**

**João Pessoa-PB**

**2013**

C824e Correia, Ana Carolina de Carvalho.

Estudo comparativo da atividade espasmolítica de óleos essenciais de espécies da Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R. E. Fries, *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hill. & Tul. E *Xylopi frutescens* Aubl. / Ana Carolina de Carvalho Correia.- João Pessoa, 2013.

186. : il.

Orientadora: Bagnólia Araújo da Sailva

Tese (Doutorado) – UFPB/CCS

1. Produtos naturais. 2. *Rollinia leptopetala*. 3. *Xylopi*.  
4. Cálcio.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

**ANA CAROLINA DE CARVALHO CORREIA**

**Estudo Comparativo da Atividade Espasmolítica de Óleos  
Essenciais de Espécies de Annonaceae: *Rollinia leptopetala* R.E.  
Fries, *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *Xylopia frutescens*  
Aubl.**

Aprovada em 26/07/2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientadora**

---

**Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
(Universidade Federal de Alagoas)  
Examinador externo**

---

**Prof. Dr. Amilton da Cruz Santos  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador externo**

---

**Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador interno**

---

**Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinadora interna**

# ***Dedicat6ria***

Em especial aos meus pais, José Correia Filho (*in memoriam*) e Ana Regina de Carvalho Correia, a quem devo a vida e minha formação moral. Meu reconhecimento e gratidão pela paciência, pelos grandes ensinamentos e por sempre acreditarem e me apoiarem no caminho que escolhi para minha vida. E, especialmente, a minha mãe, pelo exemplo de mãe e de mulher, uma verdadeira fortaleza, sempre defendendo e apoiando seus filhos. Sem você nada seria possível.

Aos meus irmãos, Carlos Arthur de Carvalho Correia e Ana Carla de Carvalho Correia, mesmo estando a alguns quilômetros de distância, se mantiveram incansáveis em suas manifestações de apoio e carinho. Não há, nesse mundo, melhores irmãos que vocês!

Ao meu namorado, Leandro Cabanez Ferreira, por todo amor, paciência e por ser um verdadeiro amigo e companheiro em todos os momentos que passamos juntos.

# ***Agradecimentos***

Se existe uma palavra importante que aprendi nessa vida, essa palavra é gratidão. Inúmeras pessoas passaram pelo meu caminho, nessa jornada, e ajudaram de alguma maneira a concretizar esse trabalho. Algumas com um simples gesto de incentivo, outras com grandes contribuições.

Inicialmente agradeço a Deus, que sempre esteve presente em minha vida, dando-me força, sabedoria e colocando pessoas especiais em meu caminho. Sem Ele eu não teria conseguido conquistar mais essa etapa em minha vida.

A minha orientadora, Profa Dra. Bagnólia Araújo da Silva, por toda dedicação, sabedoria, amizade, por acreditar em nosso potencial e sempre nos estimular a buscar o nosso melhor. Com certeza levarei o seu exemplo de mestre para a minha vida.

Aos Professores Doutores Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares, por cederem os óleos essenciais para a realização desse estudo. E principalmente ao Professor Marcelo Sobral que me ajudou financeiramente no período em que estive na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

À Profa Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, inicialmente por ter acreditado que eu poderia ingressar nesse meio acadêmico e por todos os ensinamentos científicos, de bancada e de vida. Obrigada pela amizade e por todo o carinho a mim dispensado.

À Profa Dra. Viviane L. A. Nouailhetas do Departamento de Biofísica da UNIFESP, por permitir que eu usufrísse de seu laboratório, por todas as conversas e discussões científicas. Em tão pouco tempo aprendi a admirá-la e a reconhecer a origem do rigor científico de minha orientadora.

Aos irmãos “Joinhas” (Joelmir e Joelson Lucena) pelo inestimável apoio e acolhida em sua casa, pela amizade, pelas conversas e descontrações, fazendo os meses em São Paulo muito mais agradáveis. E, principalmente, a Joelmir por sempre estar disposto a me ajudar e por todos os ensinamentos compartilhados.

À funcionária técnica do Departamento de Biofísica da UNIFESP e amiga Vera Rigoni pela excelente convivência em São Paulo, por toda confiança

depositada em mim, pela paciência, pelas conversas e, principalmente, por ter ensinado todo o pouco que sei sobre cultura de células.

À Profa. Dra Alice Ferreira Teixeira do Departamento de Biofísica da UNIFESP por ceder vários materiais para a execução dos experimentos celulares e aos seus funcionários técnicos, Sandra Claro e Chandler Tahan, pelas dicas na cultura de células e por sempre serem tão prestativos.

Ao Prof. Dr. Edgar J. Paredes-Gamero da UNIFESP e ao seu doutorando Marcus Vinícius Buri por não hesitarem em transmitir seus conhecimentos, por toda a paciência nos experimentos celulares e também por todos os reagentes concedidos.

Ao funcionário técnico e grande amigo Vicente Carlos de Oliveira Costa, por toda a ajuda na obtenção dos óleos essenciais, pelos momentos de risadas, descontração e pelo exemplo de funcionário público que é.

À aluna de iniciação científica, Tamyris Freires Ferreira, que esteve comigo em grande parte dessa jornada, devo-lhe muito por toda a ajuda nos experimentos funcionais.

Aos Professores Emiliano de Oliveira Barreto, Demetrius Antonio Machado de Araújo, Hilzeth de Luna Freire Pessôa e Amilton da Cruz Santos por aceitarem participar da banca examinadora da defesa e a Professora Leônia Maria Batista por aceitarem participar dessa banca como suplente. Agradeço por todas as suas contribuições nessa etapa tão importante na minha formação acadêmica.

Aos amigos queridos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas: Cibério Landim Macêdo, Fabio de Souza Monteiro, Italo Rossi Roseno Martins, Polyana Cristina Barros Silva e Maria da Conceição Correia Silva pelo companheirismo, amizade e apoio científico. Com certeza levarei essa amizade para além do laboratório.

A todos os colegas e amigos que estão ou passaram pelo Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, entre eles, Aline de Freitas Brito, Ana Caroline de Lima Silva, Anne Kaliery de Abreu Alves, Cybelle de Arruda Navarro Silva, Fernando Ramos Queiroga, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira,

Gislaine Alves de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Hannah Olga Pereira Rodovalho, Iara Leão Luna de Souza, Joedna Cavalcante Pereira, Joelmir Lucena Veiga da Silva, José Rabelo, Juliana da Nóbrega Carreiro, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Luiz Henrique Agra, Luiz Henrique César Vasconcelos, Maria Alice Miranda Bezerra Medeiros, Massilon da Silva Moreira dos Santos Júnior, Núbia Melo de Sousa, Rafael de Almeida Travassos, Rosimeire Ferreira dos Santos, Sarah Rebeca Dantas Ferreira e Tamyris Freires Ferreira pela ajuda, amizade e boa convivência.

À Milena Ramos Reis, que apareceu em minha vida pelo acaso do destino, mas que se tornou uma verdadeira amiga e desde então sempre está presente, torcendo por mim.

A todos os colegas e amigos da turma do Doutorado 2009.2 do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) pelos bons momentos e aperreios passados juntos.

Aos professores deste Programa de Pós-graduação que contribuíram tanto com a minha formação acadêmica.

À Coordenação do PPgPNSB em nome dos Professores Doutores Maria de Fátima Agra e Josean Fachine Tavares pela competência com a qual coordenam este Programa.

Às secretárias da pós-graduação, Tania Maria Alves e Caroline Mangueira, por toda dedicação e eficiência.

A José Crispim Duarte, pela sua amizade, competência e auxílio técnico nos mais variados problemas no Laboratório e no Biotério.

A Luís Cordeiro e Adriano Cordeiro pela colaboração no Biotério e no laboratório, por serem sempre prestativos e dedicados aos trabalhos do PPgPNSB.

À Mônica da limpeza por sua alegria, bom humor e por manter nosso ambiente de trabalho/estudo sempre em condições salutaras para nossas tarefas diárias.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa em nome do Professor Dr. Isac Almeida de Medeiros por toda a ajuda financeira nas inúmeras viagens de congressos durante todos esses anos.

À Direção do então Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros” (LTF/UFPB), hoje Centro de Biotecnologia (CBiotec/UFPB) na pessoa do Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga pelo apoio Institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, através da concessão da bolsa de estudo e suporte técnico científico através do Portal Periódicos.

À Universidade Federal da Paraíba, instituição responsável pelo meu aperfeiçoamento profissional.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a produção desta Tese de Doutorado.

*Ana Carolina de Carvalho Correia*

***Resumo***

## RESUMO

Muitas espécies de Annonaceae são odoríferas, devido à presença de óleos essenciais e estes têm despertado um grande interesse farmacológico por apresentarem atividade sobre a musculatura lisa. Assim, decidiu-se investigar a possível atividade espasmolítica dos óleos essenciais das folhas das espécies *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (XL-OE), *Xylopia frutescens* Aubl. (XF-OE) e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE) em aorta de rato, útero rata, traqueia e íleo de cobaia, além de elucidar o mecanismo de ação do óleo essencial que apresentasse uma melhor atividade espasmolítica em um dos órgãos testados. Foram realizadas medidas de contrações isotônicas e isométricas e do cálcio citosólico. Na triagem farmacológica preliminar todos os óleos essenciais apresentam maior eficácia e potência espasmolítica em íleo de cobaia, quando comparados aos outros órgãos, sendo o RL-OE o produto natural mais promissor. Assim, passou-se a caracterizar o mecanismo de ação do RL-OE nesse órgão. O RL-OE inibiu as curvas cumulativas à histamina, desviando-as para direita, de maneira não paralela e com redução do  $E_{max}$ , descartando um antagonismo do tipo competitivo, além de relaxar o íleo pré-contraído por KCl (40 mM), carbacol ( $10^{-6}$  M) ou histamina ( $10^{-6}$  M). Como o passo comum na via de sinalização destes agentes contráteis são os canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem ( $Ca_V$ ), hipotetizou-se que o RL-OE estaria impedindo o influxo de  $Ca^{2+}$  através destes canais. Foi observado que o RL-OE antagonizou as contrações induzidas por  $CaCl_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$ , além de relaxar o íleo pré-contraído por S(-)-Bay K 8644, um agonista dos  $Ca_V-L$ , demonstrando que o subtipo de  $Ca_V$  envolvido é o  $Ca_V-L$ . Como a potência relaxante do RL-OE foi maior quando o órgão foi pré-contraído com KCl do que pelo S(-)-Bay K8644 é sugestivo de que outros mecanismos estão envolvidos no efeito espasmolítico do RL-OE. Sabendo que os  $Ca_V$  podem ser modulados pelos canais de  $K^+$ , decidiu-se investigar a participação desses canais. A ação espasmolítica do RL-OE parece envolver ativação/modulação positiva dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_V$ ) e dos ativados por  $Ca^{2+}$  de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ), uma vez que houve desvio da curva de relaxamento do RL-OE para direita na presença dos bloqueadores: 4-aminopiridina (4-AP), seletivo para os  $K_V$ ; tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) 1 mM e iberiotoxina, seletivos para os  $BK_{Ca}$ . A confirmação da participação dos  $K_V$  e  $BK_{Ca}$  foi feita através do bloqueio simultâneo ( $TEA^+$  e 4-AP) e constatada, uma vez que, a potência relaxante foi similar quando o bloqueio era realizado por um bloqueador não seletivo dos canais de  $K^+$  (CsCl). Nos experimentos celulares, a viabilidade dos miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia não foi alterada na presença do RL-OE (81  $\mu$ g/mL) e a intensidade de fluorescência nos miócitos intestinais estimulados por histamina foi reduzida em consequência da redução da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_c$ ). Assim, o mecanismo de ação espasmolítico do RL-OE em íleo de cobaia envolve bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$ , via  $Ca_V$ , além da ativação/modulação positiva dos  $K_V$  e  $BK_{Ca}$ , o que levaria a redução da  $[Ca^{2+}]_c$  e, conseqüente, relaxamento desse órgão.

**Palavras-chave:** *Rollinia leptopetala*, *Xylopia*, produtos naturais, músculo liso, cálcio.

***Abstract***

## ABSTRACT

Many Annonaceae species are odoriferous due to the presence of essential oils and these have attracted great pharmacological interest because they have action on smooth muscle. Thus, we aimed to investigate a possible spasmolytic activity of essential oils of leaves from *Xylopi*  
*langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (XL-OE), *Xylopi*  
*frutescens* Aubl. (XF-OE) e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE) species on rat aorta, rat uterus and guinea pig trachea and ileum, and so elucidate the action mechanism of the essential oil that to present the better spasmolytic effect in one of the tested organs. Isometric and isotonic contractions and cytosolic  $Ca^{2+}$  were measured. In preliminary pharmacological screening all essential oils presented a higher spasmolytic potency and efficacy on guinea pig ileum, when compared with the other organs, being RL-OE the most promising natural product. So we decided to characterize the action mechanism of RL-OE on this organ. RL-OE inhibited cumulative concentration-response curves to histamine, and these were shifted to the right, in a non-parallel manner, with  $E_{max}$  reduction, discarding thus a competitive type antagonism and relaxed the guinea pig ileum contracted by KCl (40 mM), CCh ( $10^{-6}$  M) or histamine ( $10^{-6}$  M). How the common pathway of signaling of these contractile agents are the voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels ( $Ca_V$ ), we hypothesized that RL-OE would be preventing the  $Ca^{2+}$  influx through  $Ca_V$ . it was observed that RL-OE antagonized the  $CaCl_2$ - induced contractions in a depolarizing medium namely without  $Ca^{2+}$ , in addition to relax guinea pig ileum pre-contracted by S(-)-Bay K 8644, a  $Ca_V$ -L selective agonist, demonstrating that the  $Ca_V$  subtype involved is  $Ca_V$ -L. How the relaxant potency of RL-OE was higher when the organ was pre-contracted by KCl this is suggestive that other mechanism would be involved on RL-OE spasmolytic effect. Since the  $Ca_V$  can be modulated by  $K^+$  channels, we decided to investigate these channels. The RL-OE spasmolytic action seems to involve the positive activation/modulation of valtege-gated ( $K_V$ ) and large conductance calcium-activated ( $BK_{Ca}$ )  $K^+$  channels, since there was a right-shift of RL-OE relaxation curve in the presence of the following blockers: 4-aminopyridine (4-AP), selective to  $K_V$ ; tetraethylammonium ( $TEA^+$ ) 1 mM and IbTX, selectives to  $BK_{Ca}$ . The confirmation of  $K_V$  and  $BK_{Ca}$  participation was carried out by a simultaneous blockade ( $TEA^+$  and 4-AP) and verified since the relaxant potency was similar when in the presence of non-selective blocker (CsCl). In cellular experiments, the viability of longitudinal layer myocytes from guinea pig ileum was not altered in RL-OE (81  $\mu$ g/mL) presence and the fluorescence intensity in these intestinal myocytes stimulated by histamine was reduced due to cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_c$ ). Thus the mechanism of action spasmolytic of RL-OE on guinea pig ileum involves blocking the  $Ca^{2+}$  influx, by  $Ca_V$ , in addition to positive activation/modulation of  $K_V$  and  $BK_{Ca}$ , that would lead to reduced of  $[Ca^{2+}]_c$  and consequent relaxation of this organ.

**Keywords:** *Rollinia leptopetala*, *Xylopi*, natural products, smooth muscle, calcium.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Foto de <i>Xylopia langsдорfiana</i> A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhes de suas folhas (B).....	38
<b>Figura 2</b> – Foto de <i>Xylopia frutescens</i> Aubl. (A); detalhes de suas folhas (B).....	41
<b>Figura 3</b> – Foto de <i>Rollinia leptopetala</i> R.E. Fries (A); detalhes de suas folhas (B).....	42
<b>Figura 4</b> – Estrutura dos canais de $Ca^{2+}$ dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) (A); detalhes de suas subunidades (B).....	47
<b>Figura 5</b> – Cladograma das subfamílias dos canais de $Ca^{2+}$ dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) .....	48
<b>Figura 6</b> – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC $\beta_1$ .....	49
<b>Figura 7</b> – Esquema do mecanismo de manutenção da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.. ..	51
<b>Figura 8</b> – Estrutura da subunidade padrão dos canais de $K^+$ dependentes de voltagem ( $K_v$ ) .....	53
<b>Figura 9</b> – Cladograma das subfamílias dos canais de $K^+$ dependentes de voltagem ( $K_v$ ).....	54
<b>Figura 10</b> – Estrutura dos canais de $K^+$ sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ).....	55
<b>Figura 11</b> – Cladograma das subfamílias dos canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ ( $K_{Ca}$ ).....	56
<b>Figura 12</b> – Cladograma das subfamílias dos canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ ( $K_{Ca}$ ).....	57
<b>Figura 13</b> – Estrutura dos canais de $K^+$ ativados por $Ca^{2+}$ de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ) (A); mecanismo de ativação do canal pela ligação do $Ca^{2+}$ à CaM (B) .....	58

<b>Figura 14</b> – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via $G_s$ -AC-PKA e NO- $GC_s$ -PKG.....	59
<b>Figura 15</b> – Registros típicos do efeito relaxante do XL-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com $3 \times 10^{-7}$ M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.. .....	81
<b>Figura 16</b> – Registros típicos do efeito relaxante do XF-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com $3 \times 10^{-7}$ M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.. .....	82
<b>Figura 17</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com $3 \times 10^{-7}$ M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.. .....	84
<b>Figura 18</b> – Registros típicos do efeito relaxante do XL-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com $10^{-6}$ M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....	88
<b>Figura 19</b> – Registros típicos do efeito relaxante do XF-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com $10^{-6}$ M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....	89
<b>Figura 20</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com $10^{-6}$ M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.....	90
<b>Figura 21</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (A), $10^{-6}$ M de carbacol (B) e de histamina (C) em íleo de cobaia.. .....	106
<b>Figura 22</b> – Registro típico do efeito relaxante do RL-OE em íleo de cobaia pré-contraído por 40 mM de KCl (A) e por $3 \times 10^{-7}$ M de S(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (B) .....	111
<b>Figura 23</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo de cobaia.. .....	114

<b>Figura 24</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de $10^{-5}$ M de glibenclamida em íleo de cobaia.....	117
<b>Figura 25</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 100 nM de apamina em íleo de cobaia. ....	118
<b>Figura 26</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 0,3 mM de 4-aminopiridina em íleo de cobaia.....	119
<b>Figura 27</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 1 mM de tetraetilamônio em íleo de cobaia.....	120
<b>Figura 28</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 97 nM de iberiotoxina em íleo de cobaia.....	121
<b>Figura 29</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) simultânea de 1 mM de tetraetilamônio e 0,3 mM de 4-aminopiridina em íleo de cobaia.....	124
<b>Figura 30</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 16 mM de KCl em íleo de cobaia.. ....	127
<b>Figura 31</b> – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de $10^{-4}$ M de aminofilina em íleo de cobaia.....	130
<b>Figura 32</b> – Registros representativos do controle (A), do efeito de 81 µg/mL do RL-OE (B), de 1 µM de verapamil (C) e do veículo (D) sobre o sinal de cálcio em células musculares lisas da camada longitudinal de íleo de cobaia estimuladas com $10^{-6}$ M de histamina e carregadas com fluo-4.. ....	134

**Figura 33** – Esquema representativo do mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia ..... 155

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito relaxante do XF-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (★) de endotélio funcional..... 83
- Gráfico 2** – Efeito relaxante do RL-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (▽) e na ausência (▼) de endotélio funcional..... 85
- Gráfico 3** – Efeito relaxante do RL-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de carbacol na presença (○) e na ausência (●) de epitélio funcional..... 91
- Gráfico 4** – Efeito do XL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-6}$  M de carbacol (B) em útero de rata. .... 94
- Gráfico 5** – Efeito do XF-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-6}$  M de carbacol (B) em útero de rata. .... 95
- Gráfico 6** – Efeito do RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-6}$  M de carbacol (B) em útero de rata. .... 96
- Gráfico 7** – Efeito do XL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia. .... 99
- Gráfico 8** – Efeito do XF-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia. .... 100
- Gráfico 9** – Efeito do RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia. .... 101
- Gráfico 10** – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (controle) (●) e na presença de RL-OE nas concentrações de 9 (○); 27 (■) e 81 (□) µg/mL em íleo de cobaia..... 104
- Gráfico 11** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (△),  $10^{-6}$  M de CCh (▲) e de histamina (□) em íleo de cobaia..... 107

<b>Gráfico 12</b> – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> na ausência (▲) e na presença do RL-OE nas concentrações de 3 (△), 9 (◆), 27 (◇) e 81 (▼) µg/mL, em íleo de cobaia. ...	109
<b>Gráfico 13</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (△) e 3 x 10 <sup>-7</sup> M de S-(-)-Bay K8644 (◆).....	112
<b>Gráfico 14</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de histamina na ausência (□) e na presença (●) de 5 mM de CsCl, em íleo de cobaia.....	115
<b>Gráfico 15</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de histamina na ausência (□) e na presença de 10 <sup>-5</sup> mM de glibenclamida (●, <b>A</b> ), de 100 nM apamina (◆, <b>B</b> ), de 0,3 mM de 4-aminopiridina (▲, <b>C</b> ), 1 mM de tetraetilamônio (■, <b>D</b> ) e 97 nM de iberiotoxina (✕, <b>E</b> ) .....	122
<b>Gráfico 16</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de histamina na ausência (□) e na presença simultânea de 1 mM de tetraetilamônio e 0,3 mM de 4-aminopiridina (●) e de 5 mM de CsCl (●), em íleo de cobaia. ....	125
<b>Gráfico 17</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de histamina na ausência (□), na presença de 16 mM de KCl (▲) e de 5 mM de CsCl (●), em íleo de cobaia. ....	128
<b>Gráfico 18</b> – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10 <sup>-6</sup> M de histamina na ausência (□) e na presença (■) de 10 <sup>-4</sup> M de aminofilina, em íleo de cobaia.....	131
<b>Gráfico 19</b> – Efeito do RL-OE (81 µg/mL) sobre a viabilidade celular dos miócitos da camada longitudinal de íleo isolado de cobaia, no período de 2 horas. ....	132
<b>Gráfico 20</b> – Efeito de 81 µg/mL do RL-OE e de 1 µM de verapamil sobre a fluorescência induzida por 10 <sup>-6</sup> M de histamina (controle) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia .....	135

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de $E_{max}$ (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $3 \times 10^{-7}$ M de fenilefrina em anéis de aorta de rato.....	86
<b>Tabela 2</b> – Valores de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $3 \times 10^{-7}$ M de fenilefrina em anéis de aorta de rato.....	86
<b>Tabela 3</b> – Valores de $E_{max}$ (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ de carbacol em anéis traqueia de cobaia..	92
<b>Tabela 4</b> – Valores de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por $10^{-6}$ M de carbacol em anéis traqueia de cobaia.....	92
<b>Tabela 5</b> – Valores de $E_{max}$ (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina e por $10^{-6}$ M de carbacol em útero de rata.....	97
<b>Tabela 6</b> – Valores de $Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por $10^{-2}$ UI/mL de ocitocina e por $10^{-6}$ M de carbacol em útero de rata..	97
<b>Tabela 7</b> – Valores de $E_{max}$ (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por $10^{-6}$ M de carbacol e de histamina em íleo de cobaia.....	102
<b>Tabela 8</b> – Valores de $Cl_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por $10^{-6}$ M de carbacol e de histamina em íleo de cobaia.....	102
<b>Tabela 9</b> – Valores de $E_{max}$ (%) e de $CE_{50}$ (M) da histamina na ausência (controle) e na presença do RL-OE em íleo de cobaia .....	104

<b>Tabela 10</b> – Valores de $E_{max}$ (%) e de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl, por $10^{-6}$ M de carbacol ou por $10^{-6}$ M histamina em íleo de cobaia .....	107
<b>Tabela 11</b> – Valores de $E_{max}$ (%) e de $CE_{50}$ (M) do $\text{CaCl}_2$ na ausência (controle) e na presença do RL-OE em íleo de cobaia .....	109
<b>Tabela 12</b> – Valores de $E_{max}$ (%) e de $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) do RL-OE na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de $\text{K}^+$ em íleo de cobaia .....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[(Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-CaM]</b>	complexo cálcio-calmodulina
<b>[Ca<sup>2+</sup>]</b>	concentração de Ca <sup>2+</sup>
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub></b>	concentração de Ca <sup>2+</sup> citosólico
<b>[K<sup>+</sup>]<sub>e</sub></b>	concentração extracelular de potássio
<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>AA</b>	ácido araquidônico
<b>AC</b>	ciclase de adenilil
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AMPC</b>	monosfato cíclico de adenosina
<b>ANOVA</b>	análise de variância
<b>ATP</b>	trifosfato de adenosina
<b>BK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância
<b>CaM</b>	calmodulina
<b>Ca<sub>v</sub></b>	canais de cálcio dependentes de voltagem
<b>Ca<sub>v</sub>1</b>	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo 1
<b>Ca<sub>v</sub>L</b>	canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L
<b>CCh</b>	carbacol
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentração de uma substância necessária para produzir 50% de seu efeito máximo
<b>CPI-17</b>	inibidor da fosfatase da miosina potencializado pela PKC
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>e.p.m.</b>	erro padrão da média
<b>E<sub>max</sub></b>	efeito máximo
<b>FEN</b>	fenilefrina

<b>G<sub>q/11</sub></b>	proteína G <sub>q</sub> ou proteína G <sub>11</sub>
<b>G<sub>αq</sub></b>	subunidade α da proteína G <sub>q</sub>
<b>G<sub>12/13</sub></b>	proteína G <sub>12</sub> ou proteína G <sub>13</sub>
<b>GC<sub>s</sub></b>	ciclase de guanilil solúvel
<b>GMPc</b>	monofosfato cíclico de guanosina
<b>GPCR</b>	receptor acoplado à proteína G
<b>GTP</b>	trifosfato de guanosina
<b>HVA</b>	ativação por alta voltagem
<b>IP<sub>3</sub></b>	1,4,5-trisfosfato de inositol
<b>IP<sub>3</sub> R</b>	receptor de IP <sub>3</sub>
<b>K<sub>ATP</sub></b>	canais de potássio sensíveis ao ATP
<b>K<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio ativados por cálcio
<b>K<sub>d</sub></b>	constante de dissociação
<b>K<sub>v</sub></b>	canais de potássio dependentes de voltagem
<b>LVA</b>	ativação por baixa voltagem
<b>MLC</b>	cadeia leve da miosina
<b>MLCK</b>	cinase da cadeia leve da miosina
<b>MLCP</b>	fosfatase da cadeia leve da miosina
<b>MYPT1</b>	subunidade 1 condutora da fosfatase da miosina
<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>OCI</b>	ocitocina
<b>PA</b>	ácido fosfatídico
<b>PC</b>	fosfatidilcolina
<b>PIP<sub>2</sub></b>	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
<b>PKA</b>	proteína cinase dependente de AMPc
<b>PKG</b>	proteína cinase dependente de GMPc

<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>PLD</b>	fosfolipase D
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase da membrana plasmática
<b>RhoA</b>	pequena proteína G ligante de GTP
<b>RL-OE</b>	óleo essencial de <i>Rollinia leptopetala</i>
<b>ROCK</b>	cinase dependente de RhoA
<b>RyR</b>	receptor de rianodina
<b>RS</b>	retículo sarcoplasmático
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
<b>SK<sub>Ca</sub></b>	canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância
<b>SUR</b>	receptor para sulfonilureia
<b>TEA<sup>+</sup></b>	íon tetraetilamônio
<b>XL-OE</b>	óleo essencial de <i>Xylopiya langsdorfiana</i>
<b>XF-OE</b>	óleo essencial de <i>Xylopiya frutescens</i>
<b>V<sub>m</sub></b>	potencial de membrana
<b>ZIPK</b>	proteína cinase de interação zíper

**OBS:** as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>35</b>
2.1 Produtos naturais e a fitoterapia no Brasil .....	35
2.2 A Família Annonaceae .....	36
2.3 O gênero <i>Xylopia</i> e as espécies <i>X. langsdorfiana</i> A. St.-Hil. & Tul. e <i>X. frutescens</i> Aubl. ....	37
2.4 O gênero <i>Rollinia</i> e a espécie <i>R. leptopetala</i> R.E. Fries .....	41
2.5 Óleos essenciais .....	43
2.6 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso .....	45
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
3.1 Geral .....	61
3.2 Específicos .....	61
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
4.1 MATERIAL .....	62
4.1.1 Material botânico .....	62
4.1.2 Produtos-teste .....	62
4.1.3 Animais .....	63
4.1.4 Drogas e reagentes .....	63
4.1.5 Soluções nutritivas .....	64
4.1.6 Preparação dos óleos essenciais para os ensaios farmacológicos .....	65
4.1.7 Aparelhos .....	66
4.2 MÉTODOS .....	67

4.2.1 Triagem farmacológica preliminar .....	67
4.2.1.1 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta de rato .....	67
4.2.1.2 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia de cobaia .....	68
4.2.1.3 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero de rata .....	69
4.2.1.4 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo de cobaia .....	70
4.2.2 Investigação do mecanismo de ação do RL-OE em íleo de cobaia .....	70
4.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina .....	70
4.2.2.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina .....	71
4.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) no efeito relaxante do RL-OE .....	71
4.2.2.3.1 Efeito de RL-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem $Ca^{2+}$ .....	71
4.2.2.3.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 .....	72
4.2.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do RL-OE .....	72
4.2.2.4.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de cério (CsCl) .....	72
4.2.2.4.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP) , tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) ou iberiotoxina (IbTX) .....	73

4.2.2.4.3 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença simultânea de tetraetilamônio (TEA <sup>+</sup> ) e 4-aminopiridina (4-AP) .....	73
4.2.2.4.4 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de 16 mM de KCl.....	74
4.2.2.5 Avaliação da participação da via de sinalização das PDEs/nucleotídeos cíclicos .....	74
4.2.2.5.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de aminofilina .....	74
4.2.2.6 Efeito do RL-OE sobre os miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia .....	75
4.2.2.6.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia .....	75
4.2.2.6.2 Efeito do RL-OE sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia .....	76
4.2.2.6.3 Efeito do RL-OE sobre a concentração citosólica de Ca <sup>2+</sup> ([Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> ) em miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia .....	77
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
5.1 Triagem farmacológica preliminar .....	80
5.1.1 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta de rato .....	80
5.1.2 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia de cobaia.....	87
5.1.3 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero de rata .....	93
5.1.4 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo de cobaia.....	98

5.2 Investigação do mecanismo de ação do RL-OE em íleo de cobaia .....	103
5.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina .....	103
5.2.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina.....	105
5.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) no efeito relaxante do RL-OE .....	108
5.2.3.1 Efeito de RL-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem $Ca^{2+}$ .....	108
5.2.3.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644 .....	110
5.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do RL-OE .....	113
5.2.4.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de céσιο (CsCl) .....	113
5.2.4.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) ou iberiotoxina (IbTX) .....	116
5.2.4.3 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença simultânea de tetraetilamônio ( $TEA^+$ ) e 4-aminopiridina (4-AP) .....	123
5.2.4.4 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de 16 mM de KCl .....	126
5.2.5 Avaliação da participação da via de sinalização das PDEs/nucleotídeos cíclicos.....	129
5.2.5.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de aminofilina .....	129
5.2.6 Efeito do RL-OE sobre os miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.....	132

5.2.6.1 Efeito do RL-OE sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia .....	132
5.2.6.2 Avaliação do efeito do RL-OE sobre a concentração citosólica de $Ca^{2+}$ ( $[Ca^{2+}]_c$ ) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia .....	133
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>136</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>155</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>158</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>180</b>
APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Anesthesiology ....	180
APÊNDICE B – Artigo publicado na revista Journal of Ethnopharmacology .....	181
APÊNDICE C – Artigo publicado na revista Journal of Smooth Muscle Research..	182
APÊNDICE D – Capítulos de livro publicados no livro Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins.....	183
<b>ANEXO .....</b>	<b>186</b>
ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/LTF).....	186



# 1 Introdução

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para a alimentação e a manutenção, mas por ser a principal fonte de inspiração e aprendizado. A busca incessante pela compreensão das leis naturais e o desafio de transpor barreiras à sobrevivência, como o clima e as doenças, levaram o homem ao atual estágio de desenvolvimento científico (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os produtos naturais, especialmente os de origem vegetal, continuam sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas (CALIXTO, 2005). Estima-se que das 300 mil espécies de plantas no mundo, apenas 15% delas tenham sido submetidas a algum estudo científico para avaliar suas potencialidades na preparação de novos produtos farmacêuticos (BRANDÃO et al., 2010).

Apesar dos obstáculos presentes no desenvolvimento de fármacos baseados em derivados de plantas, o interesse da indústria farmacêutica pela procura de substâncias vegetais biologicamente ativas foi reativado na década de 90. Embora avanços tecnológicos importantes tenham sido conquistados pela química sintética, muitos compostos bioativos isolados de plantas são formados por misturas de moléculas complexas, tornando sua obtenção no laboratório um processo por vezes inviável (WALSH; FISCHBACH, 2010).

Dentre os vários produtos naturais obtidos de plantas, destacam-se os óleos essenciais. Estas substâncias são constituídas, na maioria das vezes, por misturas complexas que podem ser originadas, pela biossíntese, a partir do ácido mevalônico

por duas vias biossintéticas distintas: a série terpênica e, menos frequentemente, a dos fenilpropanoides (SAAD et al., 2009).

Os óleos essenciais são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, sanitária e agrônômica devido as suas propriedades já observadas na natureza, como por exemplo, bactericida, fungicida e inseticida (BAKKALI et al., 2008). Em função da grande diversidade química de seus componentes, outras importantes funções biológicas e fisiológicas são atribuídas a estas substâncias, sendo também muito pronunciadas as ações anti-inflamatória e antiespasmódica (MAGALHÃES et al. 2004, MADEIRA et al., 2005, ASEKUN et al., 2007, DU et al., 2007).

Muitas espécies pertencentes à família Annonaceae são odoríferas, devido à presença de óleos essenciais que são constituídos principalmente por compostos mono- e sesquiterpênicos (FOURNIER; LEBOEUF; CAVÉ, 1999). Além disso, várias espécies dessa família são utilizadas popularmente para vários propósitos (LEBOEUF et al., 1982a), dentre eles como tônico pós-parto, para problemas estomacais, no tratamento de bronquite, em problemas biliares e disenteria (IWU, 1993).

Dentre os vários gêneros presentes na família Annonaceae merece destaque os gêneros *Xylopi*a e *Rollinia*, uma vez que há relatos de utilizações populares (AGRA et al., 2007, ASFAW; DEMISSEW, 1994, DUKE; VASQUEZ, 1994, TAKAHASHI et al, 1995, TAKAHASHI et al, 2006), bem como comprovações de atividades farmacológicas relacionadas à musculatura lisa, como por exemplo: atividade espasmolítica em útero de rata, nos leitos vasculares aórticos e mesentéricos de rato, em traqueia e íleo de cobaia (MACÊDO, 2008, MARTINS et al., 2013, MONTEIRO et al., 2008, NACIMENTO et al., 2006, OLIVEIRA et al., 2006, RIBEIRO, 2003 e 2007, RIBEIRO et al., 2007, SANTOS et al., 2012a,b, TRAVASSOS, 2010).

Nesse sentido, o interesse em investigar os óleos essenciais com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos, tais como: asma, hipertensão, arritmias cardíacas, angina do peito, disfunção erétil, diarreias, espasmos tanto renais como intestinais e uterinos. Além disso, como os mecanismos de contração e de relaxamento muscular envolvem mobilizações de íons  $Ca^{2+}$  e este íon medeia grande parte das ações das drogas no nosso organismo, o músculo liso se

apresenta como modelo para se investigar mecanismos de ação de substâncias que envolvem a sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  (WEBB, 2003).

Diante do exposto, investigou-se a possível atividade espasmolítica dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Xylopija langsdorfiana*, *Xylopija frutescens* e *Rollinia leptopetala* em várias preparações de músculo liso (vascular, respiratório, uterino e intestinal). Além de avaliar de qual maneira o óleo essencial de *R. leptopetala* estaria atuando sobre as vias que regulam o processo de contração e relaxamento do músculo liso intestinal para, assim, desencadear seu efeito espasmolítico nesse músculo, utilizando para tanto técnicas e ferramentas farmacológicas em nível funcional e celular.



## 2 Revisão bibliográfica

### 2.1 Produtos naturais e a fitoterapia no Brasil

As plantas medicinais são usadas em muitas culturas há milhares de anos e as informações sobre o uso dos recursos naturais desempenham um papel vital na descoberta de novos produtos a partir de plantas como agentes terapêuticos (SILVA et al., 2012). Dados da literatura indicam que cerca de 80% da população mundial ainda depende de plantas para cuidados primários de saúde e apesar dos progressos na química sintética, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos são ainda provenientes, direta ou indiretamente das plantas (FOWLER, 2006).

Apesar das plantas medicinais fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011). Os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, sendo fonte e inspiração para uma grande fração da atual farmacopeia (KINGSTON, 2011). É importante ressaltar que alguns estados e municípios brasileiros vêm realizando nas últimas décadas a implantação de programas de fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades. Atualmente, 12 medicamentos fitoterápicos estão disponibilizados na rede pública de saúde para o tratamento da dor, de inflamações e de disfunções, além de outras doenças de baixa gravidade (BRASIL, 2013).

Os medicamentos fitoterápicos são definidos, segundo a resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010, como aqueles obtidos com emprego exclusivo

de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de sua utilização, de documentações tecnocientíficas ou de evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não sendo considerado medicamento fitoterápico aquele que inclui na sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais. Esta resolução possui como objetivo, estabelecer os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos e revoga a RDC nº 48 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2010).

Quanto à comercialização de medicamentos fitoterápicos, as principais classes terapêuticas comercializadas no Brasil são indicadas como psicoléticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, antiespasmódicos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais e para auxiliar na circulação cerebral (VALEZE; BRENZAN, 2011). No Brasil, as especialidades farmacêuticas mais comercializadas são o Tebonin<sup>®</sup> e o Tanakan<sup>®</sup> (*Gingko biloba*) indicados para distúrbios vestibulares e cerebrais, o Laitan<sup>®</sup> (*Piper methysticum*) indicado como ansiolítico (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e o Acheflan<sup>®</sup> (*Cordia verbenacea* DC.) indicado como anti-inflamatório de uso tópico (HENRIQUE et al., 2009).

Nesse sentido, a biodiversidade brasileira revela uma grande oportunidade para a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos. Embora apenas uma pequena parte de seus componentes tenha sido adequadamente estudada e seus benefícios futuros ainda não sejam totalmente conhecidos (FERRO; BONACELLI; ASSAD, 2006). Visando contribuir com a pesquisa envolvendo plantas medicinais da flora brasileira, foram escolhidas três espécies pertencentes à família Annonaceae, uma vez que esta família possui muitas plantas medicinais com conhecidas importâncias química, econômica e farmacológica.

## 2.2 A Família Annonaceae

A família Annonaceae foi descrita em 1789, por Jussieu (HUTCHINSON, 1973), apresenta uma distribuição pantropical com cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2.300 espécies (MASS et al., 2001), constituída por plantas

arbóreas ou arbustivas, sendo as trepadeiras também muito frequentes (HEGNAUER, 1964).

No Brasil essa família apresenta 26 gêneros e 260 espécies (MASS et al., 2001) distribuídas nas florestas atlântica e amazônica, sendo que todos os gêneros têm ocorrência registrada na Amazônia (BARROSO, 1978). No estado da Paraíba, segundo levantamento realizado no Herbário JPB sobre as Annonaceae, registraram-se sete gêneros e 12 espécies (PONTES; BARBOSA; MASS, 2004).

A família Annonaceae é conhecida principalmente por seus frutos comestíveis, tais como a pinha ou fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) (LEBOEUF et al., 1982a). Os frutos das espécies *Xylopia aethiopica* A. Rich. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart., são utilizados como condimento (EKUNDAYO, 1989; SILVA; ROCHA, 1981). Muitas espécies desta família são empregadas na produção de álcool, na perfumaria e no tratamento de várias enfermidades (LEBOEUF et al., 1982a).

Essa família é muito rica na diversidade de substâncias químicas, sendo caracterizada pela presença de terpenoides (especialmente diterpenos), alcaloides (um grande número são derivados isoquinolínicos), além de óleos essenciais cuja composição é predominantemente de monoterpenos e sesquiterpenos (LEBOEUF et al., 1982a; SILVA et al., 2009).

Dentre os vários gêneros presentes nesta família selecionamos os gêneros *Xylopia* e *Rollinia* para investigar se estes apresentam alguma propriedade farmacológica em modelos de musculatura lisa.

### **2.3 O gênero *Xylopia* e as espécies *X. langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. e *X. frutescens* Aubl.**

O gênero *Xylopia* possui aproximadamente 160 espécies (MAAS et al., 2001). Algumas espécies desse gênero são utilizadas popularmente, como por exemplo, os frutos de *X. aethiopica* (Dunal) A. Rich que são usados como carminativo, tônico pós-parto, para distúrbios estomacais, no tratamento de bronquite, em distúrbios biliares e disenteria (ASFAW; DEMISSEW, 1994). *X. brasiliensis* Spreng. é usada como analgésico e sedativo (MOREIRA et al., 2003) e *X. aromatica* é utilizada para tratamento de doenças de pele e como diurético (TAKAHASHI et al., 2006).

Além das várias utilizações populares, algumas espécies desse gênero foram submetidas a testes farmacológicos e apresentaram várias atividades como: antioxidante e antifúngica observada por alguns alcaloides isolados de *X. championii* Hook.f. & Thoms. (PUVANENDRAN et al., 2008), leishmanicida e tripanossomicida induzida pelo vários extratos obtido de *X. aromatica* (Lam.) Mart. (OSORIO et al., 2007), hipotensora induzida pelo extrato hidroalcoólico do caule de *X. cayennensis* (NASCIMENTO et al., 2006). Efeito cardiovascular e diurético evidenciado pelos diterpenos isolados de *X. aethiopica* (SOMOVA et al., 2001).

Nesse contexto, selecionou-se a espécie *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (Figura 1) que é uma árvore medindo de 5 a 7 metros de altura (MAAS et al., 2001), sendo popularmente conhecida como “pimenteira-da-terra” no Nordeste do Brasil (CORRÊA, 1984).

**Figura 1** – Foto de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (A); detalhes de suas folhas (B).



Fonte: Fernando A. C. Viana, 2007.

Dessa espécie já foram isolados e identificados uma variedade de classes de metabólitos secundários, como: alcaloides (TAVARES et al., 2004), terpenoides (TAVARES et al., 2006; TAVARES et al., 2007a, SILVA et al., 2009; DUARTE, 2009), feoforbídeo e flavonoide glicosilado (SILVA et al, 2009). Além disso, o óleo essencial obtido das folhas já foi estudado quanto a sua composição química, onde os constituintes majoritários são germacreno D (22,9%), trans- $\beta$ -guaieno (22,6%),  $\beta$ -cariofileno (15,7%) e  $\alpha$ -pineno (7,3%) (TAVARES et al., 2007b).

Apesar de não haver relatos da utilização popular dessa espécie (CORRÊA, 1984), alguns estudos farmacológicos foram realizados, utilizando os critérios quimiotaxonômicos, e observou-se que o extrato etanólico bruto (EEtOH) das partes aéreas de *X. langsdorfiana* apresentou atividade antidiarreica em camundongos (SILVA, 2010) e que o EEtOH e a fase hexânica (FaHex) das partes aéreas de *X. langsdorfiana* mostraram atividade gastroprotetora em ratos (MONTENEGRO et al., 2011).

Além disso, várias evidências de atividades farmacológicas apresentadas por essa espécie foram atribuídas a substâncias da classe dos terpenoides (diterpenos). O ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302) mostrou efeito espasmolítico em útero isolado de rata e íleo isolado de cobaia, bem como efeito relaxante em traqueia isolada de cobaia e aorta isolada de rato (RIBEIRO, 2003). Em aorta de rato, esse efeito relaxante envolve a ativação dos canais de potássio sensíveis a voltagem e retificadores de entrada ( $K_V$  e  $K_{ir}$ , respectivamente), além da ativação da via de sinalização AMPc-PKA e bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L ( $Ca_V-L$ ) (RIBEIRO, 2007). Em traqueia de cobaia, esse efeito relaxante envolve a ativação dos canais de  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ) e da proteína cinase dependente de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), a PKA (RIBEIRO et al., 2007). Em íleo de cobaia, envolve a modulação positiva dos canais de  $K^+$ , o que indiretamente bloqueia o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem ( $Ca_V$ ) (MACÊDO, 2008). Em útero isolado de rata, esse efeito tocolítico envolve a modulação positiva dos canais de  $K^+$  ativados pelo  $Ca^{2+}$  de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ), além da participação de fosfodiesterases (PDEs) (TRAVASSOS, 2010). Além disso, possui atividade hipotensora e taquicárdica reflexa em ratos normotensos não anestesiados e efeito vasorrelaxante em artéria mesentérica superior de ratos (OLIVEIRA et al., 2006).

Também foi isolado dessa espécie o ácido *ent-7 $\alpha$* -acetoxitraquiloban-18-oico (traquilobano-360), um diterpeno do tipo traquilobano. Tendo relatos de seu efeito antitumoral em células leucêmicas (SILVA et al., 2005), atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* (QUEIROGA et al., 2006), atividade antinociceptiva no modelo de contorção abdominal em camundongos *Swiss* (CUPERTINO-SILVA et al., 2006), bem como, atividade antitumoral em células de sarcoma 180 (PITA et al., 2009). Além de apresentar efeito espasmolítico em íleo de

cobaia (SANTOS et al., 2012a), sendo seu mecanismo de ação a modulação positiva dos canais de  $K^+$  e negativa dos  $Ca_v$ , eventos que culminam com a redução da concentração de cálcio citosólica ( $[Ca^{2+}]_c$ ) e consequente relaxamento deste músculo liso (SANTOS et al., 2012b).

Outro diterpeno da classe dos traquilobanos isolado dessa espécie foi o ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxitraquiloban-18-oico* (traquilobano-318). Sendo relatada a atividade antitumoral em células de sarcoma 180 (PITA et al., 2009). Assim como o efeito espasmolítico em íleo de cobaia (SANTOS et al., 2012a), sendo seu mecanismo de ação semelhante ao observado para o traquilobano-360 (SANTOS et al., 2012b) e em traqueia de cobaia, o traquilobano-318 relaxou os anéis traqueais de maneira independente de epitélio funcional (SANTOS et al., 2012a) e o seu mecanismo envolve a modulação positiva dos canais de  $K^+$  (MARTINS et al., 2013).

A outra espécie desse gênero selecionada para estudo foi a espécie *Xylopia frutescens* Aubl. (Figura 2) que é uma árvore medindo de 8 a 10 metros de altura, conhecida popularmente por “embira”, “semente-de-embira” e “embira-vermelha”. Há relatos da utilização popular dessa espécie como estimulante da bexiga, agente antimicrobiano, contra reumatismo (TAKAHASHI et al., 1995), anti-inflamatória (BRAGA et al., 2000) e como antidiarreica (DUKE; VASQUEZ, 1994). Além disso, seus frutos são utilizados popularmente como condimento substitutivo da pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), por possuir a mesma composição de monoterpenos da *P. nigrum*, a espécie *X. frutescens* pode ser usada como sucedâneo desta (ROCHA et al., 1980). *P. nigrum* é amplamente utilizada pela população para várias indicações dentre elas para diarreia, rouquidão, indigestão, problemas de fígado e doença pulmonar (RAO et al., 2011).

Há relatos na literatura de alguns estudos fitoquímicos para essa espécie, onde foram isolados das cascas da raiz vários alcaloides (LEBOEUF et al., 1982b), seis diterpenos do tipo caureno foram isolados dos frutos verdes, das cascas da raiz e das folhas (TAKAHASHI et al., 1995) e foi identificado a composição química dos óleos essenciais das folhas, sendo os constituintes majoritários o cariofileno (23,91%),  $\gamma$ -cadineno (12,48%),  $\beta$ -ocimeno (8,19%), cadin-4-en-10-ol (5,78%), viridiflorol (4,83%) e  $\gamma$ -elemeno (4,55%) (LUNGUINHO, 2012).

Figura 2 – Foto de *Xylopia frutescens* Aubl. (A); detalhes de suas folhas (B).



Fonte: Alex Popovkin, 2008. [http://www.flickr.com/photos/plants\\_of\\_russian\\_in\\_brazil/](http://www.flickr.com/photos/plants_of_russian_in_brazil/) (acessado em: 29 de julho de 2012)

O extrato hexânico das sementes de *X. frutescens* apresentou atividade inibitória da 5-lipoxigenase, além disso, o ácido caurenico, um diterpeno do tipo caureno, abundante nas sementes dessa espécie apresentou atividade anti-inflamatória, justificando seu uso popular para processos inflamatórios (BRAGA et al., 2000; JENNET-SIEMS et al., 1999). O ácido caurenico também apresentou atividade parcial *in vitro* contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas e também contra cepas de *Plasmodium falciparum*, que causam a malária, resistentes à cloroquina (MELO et al., 2001). O extrato das cascas dessa espécie apresentou moderada atividade antiviral, inibindo a protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV-PR) (MATSUSE et al., 1999). O óleo essencial das folhas apresentou atividade antitumoral frente às células da linhagem sarcoma 180 e toxicidade aguda moderada, porém as alterações são reversíveis, que não representa um fator limitante para sua possível aplicabilidade terapêutica (LUNGUINHO, 2012).

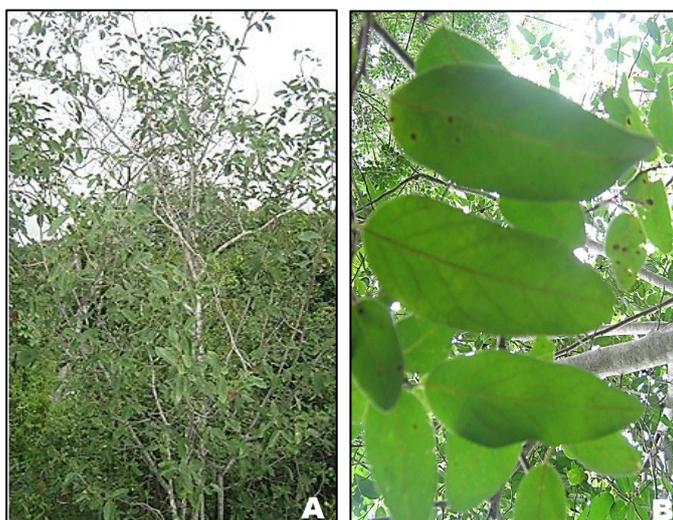
#### 2.4 O gênero *Rollinia* e a espécie *R. leptopetala* R. E. Fries

O gênero *Rollinia* é constituído por 65 espécies, que ocorrem, principalmente, na América do Sul e com poucas espécies no México, Caribe e América Central (LEBOEUF et al., 1982a). Várias atividades farmacológicas foram evidenciadas para espécies desse gênero como: antitumoral e citotóxica observada

pelo extrato etanólico obtido das raízes de *R. papilionella* Diels (DABRAH; SNEDEN, 1983), inibidora da proteína cinase C (PKC) evidenciada pelo extrato etanólico obtido das cascas das raízes de *R. sericea* R. E. Fries (BARNES; SCHANEBERG; SNEDEN, 1995), inibidora da interleucina II e da proteína fosfatase observada por três alcaloides obtidos das espécies *R. ulei* Diels (MISKI et al., 1995), antiplasmodial contra cepas de *Plasmodium falciparum*, sensíveis e resistentes à cloroquina (OSORIO et al., 2006), antimicrobiana e antifúngica observada pelo extrato etanólico obtido das cascas de *R. mucosa* Baill. (CAETANO; DADOUN, 1987) e os alcaloides obtidos dessa mesma espécie demonstraram atividade antiagregante plaquetária (KUO et al., 2001). Além disso, o extrato metanólico obtidos das folhas *R. exsua* apresentou atividade espasmolítica em íleo isolado de cobaia (MONTEIRO et al., 2008).

Desse gênero selecionou-se a espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (Figura 3) que é uma árvore ou arbusto, endêmica do Brasil com nome popular de “pinha-brava”, “bananinha” e “pereiro” (MAAS; VESTRA, 1992). É usada popularmente, na região do cariri Paraibano, como digestiva (AGRA et al., 2007).

**Figura 3** – Foto de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries (A); detalhes de suas folhas (B).



Fonte: Josean Fachine Tavares, 2007.

Na literatura há alguns relatos de estudos fitoquímicos para essa espécie, onde foram isolados os alcaloides tetrahidroprotoberberínico (SETTE et al., 2000a,b), (-)-3-hidroxinornuciferina e (+)-norisocoridina; o derivado cafeico, cafeato de  $\alpha$ -terpineol; os sesquiterpenos espatulenol,  $\beta$ -cariofileno e

4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -aromadendrano-diol (COSTA et al., 2012) e identificada a composição química do óleo essencial obtido das folhas, possuindo 22 componentes, sendo os constituintes majoritários o biciclogermacreno (22,47%), cis-4-tujanol (17,37%),  $\alpha$ -terpineol (8,42%), germacreno D (7,72%), trans-cariofileno (6,63%) e guaiol (4,61%) (COSTA et al., 2008).

Quanto aos estudos com atividades farmacológicas para essa espécie, há evidências de atividade tóxica do extrato metanólico contra o microcrustáceo *Artemia salina* (DAVID et al., 2007), de atividade larvicida dos óleos essenciais obtidos das folhas e do caule, do extrato metanólico das raízes e do alcaloide oxoaporfinico, liriodenina, frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti* (FEITOSA et al., 2009), de atividade espamolítica do extrato metanólico obtido das folhas, em íleo isolado de cobaia (MONTEIRO et al., 2008). O extrato etanólico bruto das folhas de *R. leptopetala* apresentou baixa citotoxicidade em células sarcoma 180 (COSTA et al., 2012) e o óleo essencial obtido das folhas também apresentou atividade moduladora da ação do antibiótico norfloxacino contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a este antimicrobiano (COSTA et al., 2008). Além disso, apresentou baixa toxicidade e efeito antitumoral em células leucêmicas (MOREIRA; CASTELO-BRANCO, 2011).

## 2.5 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos, naturais e voláteis, lípidos, raramente coloridos, caracterizados por um forte odor e são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Eles podem ser sintetizados por todos os órgãos da planta, ou seja, broto, flor, folha, caule, ramo, semente, fruto, raiz e casca, sendo armazenados em células secretoras, canais, células da epiderme ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008).

Eles são solúveis em lipídios e em solventes orgânicos, com uma densidade geralmente menor do que a da água. São extraídos de diversas plantas aromáticas, geralmente localizadas em países de clima temperado à quente como do Mediterrâneo e dos países tropicais, onde eles representam uma parte importante da farmacopeia tradicional (BAKKALI et al., 2008).

É importante salientar que há variações na composição quanti e qualitativa destes produtos naturais a depender da composição química do solo (SANTOS et

al., 2012c); fase de crescimento e maturação da planta (TAVARES et al., 2005); sazonalidade da coleta (CERQUEIRA et al., 2009); temperatura do ar de secagem do material vegetal (RADÜNZ et al., 2002), dentre outras variáveis.

Os óleos essenciais são compostos basicamente por dois grupos de origem biossintética distintas: o principal grupo é constituído por terpenos e o outro é constituído por componentes alifáticos e aromáticos. Ambos os grupos são caracterizados por moléculas com baixo peso molecular. Geralmente, o componente majoritário é o responsável pela atividade biológica apresentada pelo óleo essencial, porém o complexo não pode ser desprezado, uma vez que pode haver sinergismo entre as substâncias constituintes do óleo (BAKKALI et al., 2008).

Estima-se que cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, alimentar, agronômica, sanitária, cosmética e de perfumes. Os óleos essenciais ou algum de seus componentes são muito usados em perfumarias, produtos sanitários, produtos ortodônticos, agronômicos e indústria alimentícia (HENRIQUE et al., 2009). Ademais, os óleos essenciais parecem apresentar propriedades medicinais para curar uma ou outra disfunção orgânica ou doença sistêmica (SILVA et al., 2003; HAJHASHEMI et al., 2003; PERRY et al., 2003).

Diante desse contexto, o Brasil tem lugar de destaque na produção de óleo essencial, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais (BIZZO et al., 2009) e parece ser evidente o potencial que os óleos essenciais vêm adquirindo no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (HENRIQUE et al., 2009).

Nessa crescente busca por produtos com atividades biológicas os óleos essenciais merecem destaque, onde várias ações já foram relatadas como: antileishmania e imunomoduladora do óleo essencial de *Xylopiya discreta* (LÓPEZ; CUCA; DELGADO, 2009), antioxidante na eliminação do radical ânion superóxido do óleo essencial de *Xylopiya aethiopica* (Dun) A. Rich. (KARIOTI et al., 2004), atividade moduladora da resistência bacteriana do *Staphylococcus aureus* ao antibiótico norfloxacino do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (COSTA et al., 2008) e atividade hipotensora do metileugenol, constituinte comum em plantas produtoras de óleos essenciais (LAHLOU et al. 2004).

Além dessas atividades, muitos óleos essenciais também apresentaram atividade espasmolítica, como por exemplo os obtidos de *Casimiroa pringlei* em

útero de rata (ZAVALA et al., 2008), *Zingiber roseum* e *Satureja obovata* em duodeno de rato (PRAKASH et al., 2006, CRUZ et al., 1990), *Ocimum gratissimum* e de espécies do gênero *Pelargoniums* (Geraniaceae) em íleo de cobaia (MADEIRA et al., 2005; MAGALHÃES; LAHLOU; LEAL-CARDOSO, 2004, LIS-BALCHIN; HART; ROTH, 1997) e *Pterodon polygalaeflorus* em traqueia de rato (EVANGELISTA et al., 2007).

Os produtos naturais do Brasil, especialmente os de óleos essenciais, vêm sendo fontes de substâncias potencialmente aplicáveis com propriedades biológicas, farmacológicas ou terapêuticas e já existem resultados promissores indicando o uso de produtos a base de óleos essenciais com indicação terapêutica. São exemplos de produtos recentemente lançados no mercado, o Acheflan<sup>®</sup> produzido com óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira), contendo  $\alpha$ -humuleno, com indicação anti-inflamatória de uso tópico para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais e o Rowachol<sup>®</sup>, indicado para cálculos biliares e como colerético e colagogo, contém borneol,  $\alpha$ -pineno, cafeno, 1,8-cineol, mentona e mentol (HENRIQUE et al., 2009).

## 2.6 Regulação da contração e do relaxamento do músculo liso

O interesse em investigar os óleos essenciais com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de que substâncias espasmolíticas têm uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos. Anormalidades no processo de contratilidade do músculo liso acarretam em várias desordens e doenças como hipertensão, asma, dispepsia, diarreia, cólicas intestinais e uterinas e disfunção erétil (KIM et al., 2008). Dessa forma, os ensaios farmacológicos, utilizando como modelo experimental a musculatura lisa, contribuem para o desenvolvimento de futuros fármacos para serem utilizados no tratamento das diversas patologias que acometem esse músculo.

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um segundo mensageiro importante que desempenha um papel essencial em uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a regulação enzimática, expressão gênica, tráfego de proteína, proliferação celular, apoptose e a coordenação do acoplamento excitação-contração dos músculos esquelético, cardíaco e liso (CARAFOLI; BRINI, 2007). Em geral, existem duas fontes deste íon sinalizador na célula: uma extracelular que permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o

citoplasma, através dos canais na membrana plasmática e outra intracelular representada pelos estoques internos, principalmente o retículo sarcoplasmático (RS) que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol (MA; PAN, 2003).

O  $\text{Ca}^{2+}$  é responsável por muitos processos intracelulares ligando-se a sítios específicos em proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . A calmodulina (CaM) é a mais conhecida destas proteínas, com alta afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . As proteínas da família S100 (S100A1, S100A4, S100A6 e S100A10) que são pequenas proteínas ácidas com peso molecular de 11 kDa (HEIZMANN, 1991) também tem afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo liso e estão envolvidas na regulação de diferentes mecanismos de sinalização intracelular dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (DONATO, 1999 e 2001).

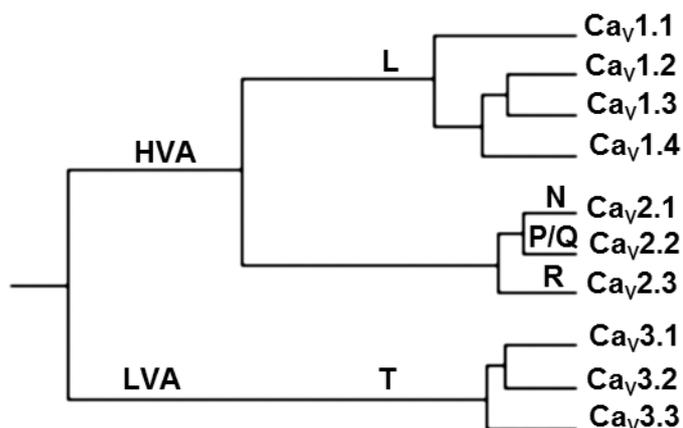
No músculo liso um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  é a causa primária para a produção da contração. Esta elevação no conteúdo citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  também está envolvido na proliferação celular do músculo liso (HILL-EUBANKS et al., 2011) . A regulação funcional da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , para dar início a uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o acoplamento eletromecânico, que está envolvido com a mudança do potencial de membrana ( $V_m$ ) e o acoplamento fármaco-mecânico, que acontece quando a contração promovida por um agonista é maior que a observada só com a mudança do  $V_m$  (REMBOLD, 1992).

Os mecanismos que levam a uma resposta contrátil a partir do acoplamento eletromecânico são devido a uma despolarização de membrana diretamente associada ao aumento da concentração extracelular de potássio ( $[\text{K}^+]_e$ ) ou indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores levando à abertura de  $\text{Ca}_v$ , na membrana plasmática, causando aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol e, conseqüentemente, a contração (REMBOLD, 1996).

Os  $\text{Ca}_v$  (Figura 4) são complexos proteicos formados por 5 subunidades distintas: a subunidade  $\alpha_1$ , que é a maior delas e constitui o poro do canal, além de possuir o sensor de voltagem que controla sua abertura; as subunidades  $\alpha_2$  e  $\delta$  estão ligadas por uma ponte de dissulfeto, formando um dímero, a subunidade  $\beta$  é intracelular e a subunidade  $\gamma$  é transmembranar. Essa família de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  possui 10 membros, classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas (CATTERALL, 2011).



**Figura 5** – Cladograma das subfamílias dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_V$ ).



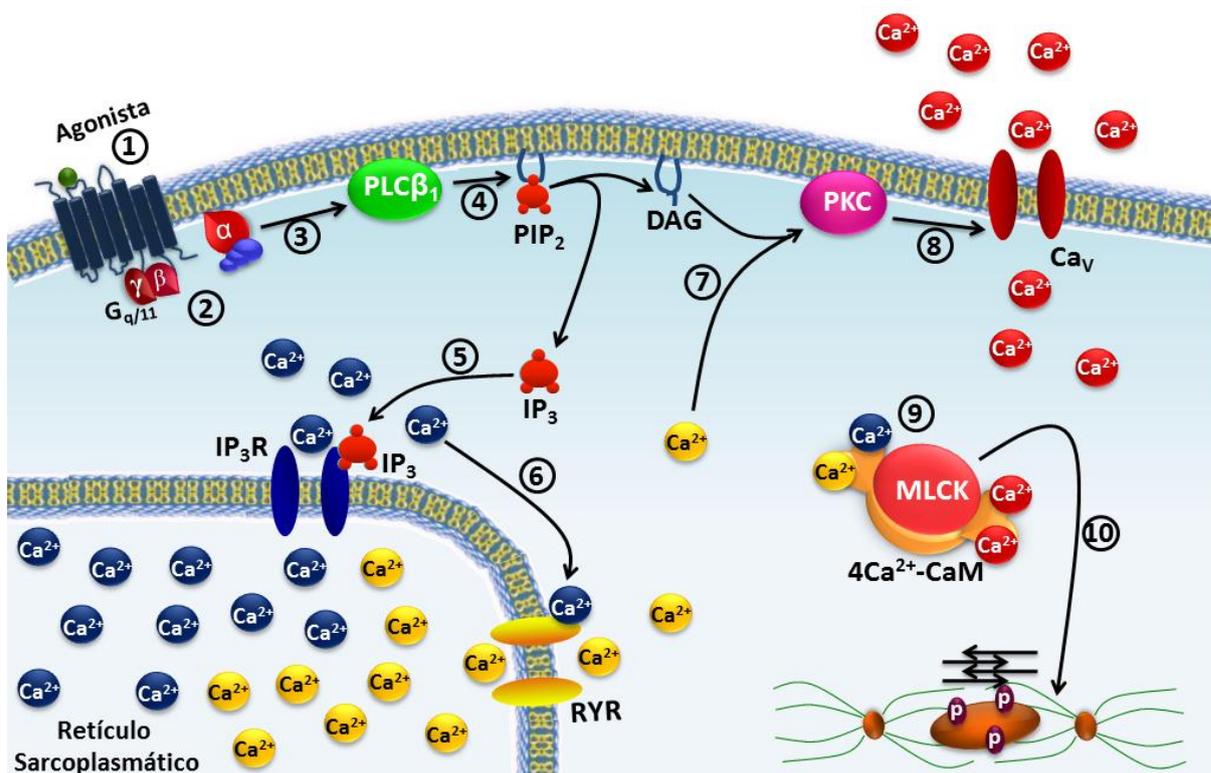
Fonte: adaptado de CATTERALL et al., 2005.

Uma importante localização da subfamília dos  $\text{Ca}_V1$ , que são alvos de bloqueadores de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  usados na terapêutica, são as células musculares cardíacas e lisas (WATERMAN, 2000). Esses canais possuem como sítio de ligação para seus bloqueadores a subunidade  $\alpha_1$ , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2  $\alpha$ , 1  $\beta$  e 1  $\gamma$ ) (KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995).

Os mecanismos fármaco-mecânicos da contração (Figura 6) ocorrem quando um agonista como carbacol, histamina entre outros, se ligam a seus receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através da proteína  $G_q$  ou  $G_{11}$ , cujas suas subunidades  $\alpha$  ativam a fosfolipase C  $\beta_1$  ( $\text{PLC}\beta_1$ ) e, conseqüentemente, promovem hidrólise de fosfolípidios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ), produzindo o 1,4,5-trisfosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG) (BERRIDGE, 2008; BILLINGTON; PENN, 2003). O RS representa a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. O  $\text{IP}_3$  estimula a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS por sua ligação aos receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), que são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados pelo  $\text{IP}_3$ . Além disso, no RS há os receptores de rianodina ( $\text{RyR}$ ), que são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados pelo próprio  $\text{Ca}^{2+}$  e são sensíveis à cafeína, eles são ativados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  previamente liberado via  $\text{IP}_3\text{R}$  num processo denominado de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR). Ambos os receptores permitem a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS para o citosol aumentando a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (MCHALE et al., 2006; DELLIS et al., 2006). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS induz a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde é ativada quando entra em contato com o DAG. Várias isoformas de PKC já foram encontradas no músculo liso,

onde a ativação dessa cinase leva a fosforilação de proteínas-alvo específicas, como os  $Ca_v$  presentes na membrana plasmática ativando-os, promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  (BERRIDGE, 2009a).

**Figura 6** – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico da contração no músculo liso pela ativação da via  $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$ .



Fonte: Autor, 2013.

① O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; ② As proteínas  $G_{q/11}$  troca GDP por GTP na sua subunidade  $\alpha$  (não mostrado na figura), tornando-se ativa; ③ A subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima  $PLC\beta_1$ ; ④ A  $PLC\beta_1$  cliva o lipídio de membrana  $PIP_2$  em  $IP_3$  e DAG; ⑤ O  $IP_3$  migra pelo citoplasma e ativa o  $IP_3R$  presente na membrana do RS, liberando o  $Ca^{2+}$  dos estoques; ⑥ O  $Ca^{2+}$  liberado ativa o  $RyR$ , fazendo com que mais  $Ca^{2+}$  seja liberado para o citoplasma; ⑦ O  $Ca^{2+}$  que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; ⑧ A PKC ativada fosforila os  $Ca_v1$  promovendo o influxo de  $Ca^{2+}$  através dos mesmos; ⑨ O aumento da  $[Ca^{2+}]_c$  aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo  $4Ca^{2+} - CaM$  e ativando a MLCK; ⑩ A MLCK ativada fosforila a MLC e esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Não importando a fonte, o  $Ca^{2+}$  quando em quantidades elevadas no meio citoplasmático liga-se a CaM formando um complexo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$  que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK). O complexo  $[(Ca^{2+})_4-CaM-MLCK]$  constitui a forma ativa da MLCK, que tem como função fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC) e esta fosforilação permite o desencadeamento do mecanismo de ciclicização

das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina favorecendo um deslizamento entre estes filamentos, com o consequente desenvolvimento da contração (SOMLYO; SOMLYO, 1994 e 2003).

A diminuição dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmáticos para os níveis basais desativa a MLCK. O relaxamento do músculo liso ocorre através da ação da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), que desfosforila a MLC. Esta reação é relativamente lenta, por isso as contrações do músculo liso são tipicamente mais sustentadas e se dissipam mais lentamente que as do músculo estriado (GARRET; GRISHAM, 1995).

A diferença fundamental entre a contração do músculo liso inicial e a manutenção dessa contração é o equilíbrio entre MLCK e a atividade da MLCP, esse balanço age como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que integra a contração no músculo liso (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A MLCP consiste em 3 subunidades: uma catalítica, PP1c; uma regulatória, MYPT1 e outra de 20 kDa de função ainda desconhecida (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK, uma cinase de serina/treonina, fosforila a subunidade de ligação da miosina da MLCP, inibindo a sua atividade e, assim, promovendo o estado fosforilado da MLC. Inibidores farmacológicos da ROCK, como o Y-27632, bloqueiam a sua atividade por competir com o sítio de ligação do nucleotídeo trifosfato de guanosina (GTP) na enzima (CHITALEY; WEBER; WEBB, 2001; UEHATA et al., 1997).

Os mecanismos que levam a inibição da MLCP (Figura 7) são iniciados pela ativação da pequena proteína G ligante de GTP (RhoA), dependente das proteínas G heterotriméricas  $G_{12/13}$  e  $G_{q/11}$ , via uma pequena proteína G associada a um fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEFs). A RhoGEFs faz com que a RhoA troque nucleotídeos difosfato de guanosina (GDP) por GTP, sendo translocada para a membrana, e uma vez RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase associada (ROCK) (EXTON, 1997; MURTHY, 2006). Embora a ROCK fosforile diretamente a MLC (TOTSUKAWA et al., 2000), sua ação principal na sensibilização ao cálcio parece ser a inibição da MLCP, esta ação se dá pela fosforilação direta dos resíduos de Thr<sup>696</sup> e Thr<sup>853</sup> da MYPT1, causando a sua dissociação e inibição da PP1c da MLCP (MURTHY, 2006; SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mais conhecida como proteína cinase de interação zíper (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu



hidrólise do PIP<sub>2</sub>. A PKC pode fosforilar o resíduo de Thr<sup>38</sup> da proteína inibitória endógena da MLCP (CPI-17), aumentando assim sua potência inibitória sobre a PP1c por mais de 1000 vezes, inibindo assim a ação da MLCP (MURTHY, 2006; SOMLYO; SOMLYO, 2003).

Sendo o aumento na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> o sinal que leva à contração, consequentemente o relaxamento ocorre por diminuição dos níveis deste íon no citosol do músculo (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Esta diminuição na [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, caracterizado pela repolarização (ou hiperpolarização) da membrana, ou pelo mecanismo fármaco-mecânico, que se dá pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento também envolve a abertura de canais de K<sup>+</sup>, que desempenham um papel chave na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular, sendo que a contração no músculo liso depende do balanço entre o aumento da condutância ao K<sup>+</sup>, levando a uma repolarização/hiperpolarização, enquanto a diminuição de sua condutância levaria a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Os canais de K<sup>+</sup> conduzem íons K<sup>+</sup> através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico, que normalmente constitui uma corrente de saída, no sentido do meio intracelular para o meio extracelular (MACKINNON, 2003). Estas correntes são produzidas porque a concentração de K<sup>+</sup> no interior da célula (140 mM) é maior do que no meio extracelular (2-5 mM), havendo o efluxo desse íon pelos canais seletivos ao K<sup>+</sup>. Portanto, mantendo o potencial de membrana das células no estado de repouso para valores mais negativos, aproximando-se do potencial de equilíbrio de K<sup>+</sup> (cerca de 90 mV) (VOGALIS, 2000).

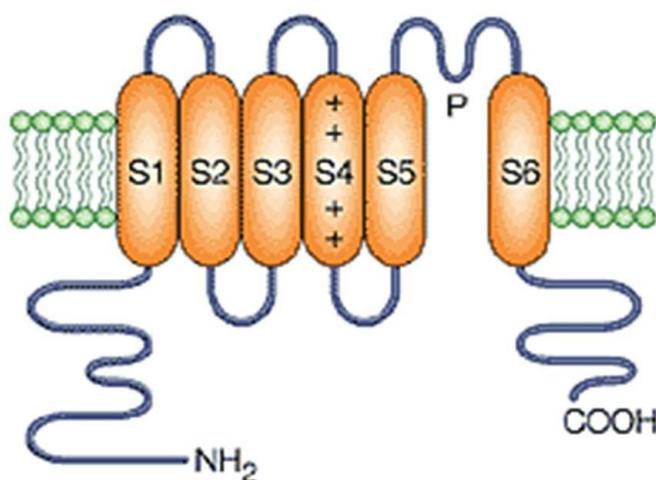
Dessa forma, a abertura dos canais de K<sup>+</sup> está associada com a manutenção do potencial de repouso e de inibição da atividade contrátil (VOGALIS, 2000). Além de vários outros processos celulares incluindo controle do volume celular, secreção hormonal e controle da formação e propagação de sinais elétricos em células excitáveis (MACKINNON, 2003). Sua atividade pode ser regulada por voltagem, Ca<sup>2+</sup> ou por neurotransmissores e, consequentemente, as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

O músculo liso gastrintestinal pode ser regulado por vários subtipos de canais de K<sup>+</sup>, entre eles: os canais de K<sup>+</sup> dependentes de voltagem (K<sub>V</sub>); os canais

de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) (VOGALIS, 2000).

Os  $K_V$  (Figura 8) são o protótipo dos canais dependentes de voltagem, sendo de maneira simplificada, um homotetrâmero com cada subunidade contendo um sensor de voltagem e contribuindo para a formação do poro central. Cada subunidade padrão formadora do  $K_V$  contém seis regiões transmembranares (S1-S6), onde as regiões amino e carboxiterminal encontram-se no lado intracelular da membrana (YELLEN, 2002) e sendo a porção S4 identificada como o sensor de voltagem por possuir um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos (JAN; JAN, 1992).

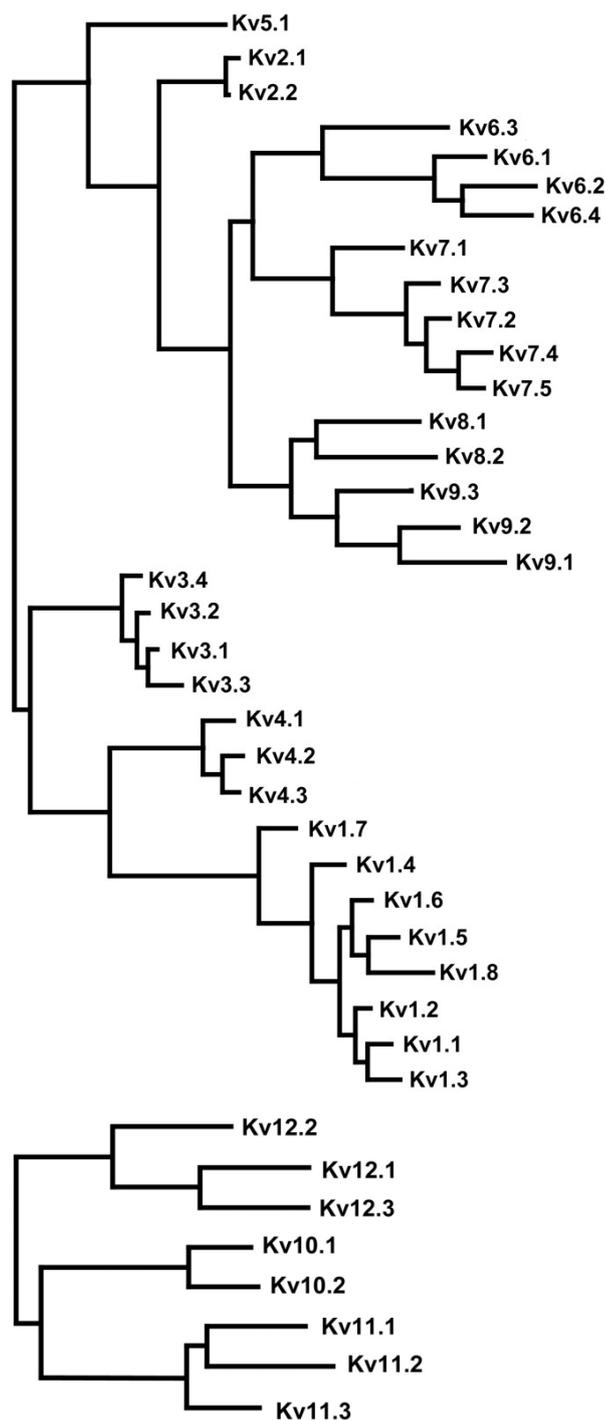
**Figura 8** – Estrutura da subunidade padrão dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_V$ ).



Fonte: adaptado de CHOE, 2002.

Segundo Gutman et al. (2005), já foram identificados 12 tipos de canais  $K_V$  (1.1-1.8; 2.1, 2.2; 3.1-3.4; 4.1-4.3; 5.1; 6.1-6.4; 7.1-7.5; 8.1, 8.2; 9.1-9.3; 10.1, 10.2; 11.1-11.3; 12.1-12.3) (Figura 9). Esses canais são amplamente expressos na maioria das células musculares lisas, são ativados por despolarização de membrana e promovem efluxo de  $K^+$ , o qual em parte, é responsável por repolarização de membrana e manutenção do potencial de repouso (KO et al., 2010).

Figura 9 – Cladograma das subfamílias dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ).

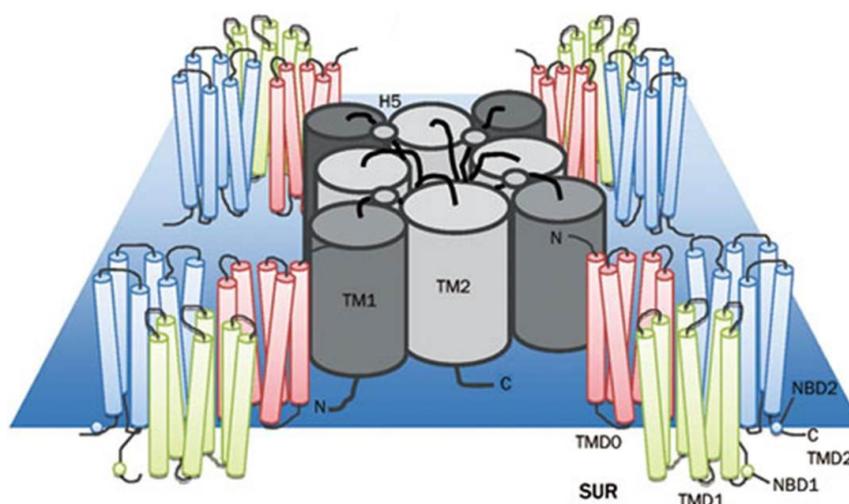


Fonte: adaptado de GUTMAN et al., 2005.

Os  $K_{ATP}$  (Figura 10) são complexos proteicos que existem na forma de octâmeros contendo dois tipos distintos de subunidades proteicas. Os canais consistem de quatro subunidades dos canais de  $K^+$  retificadores de entrada ( $K_{ir}$ ),  $K_{ir}$  6.1 ou  $K_{ir}$  6.2, cada uma contendo dois domínios (TM1 e TM2), ligados a uma região

de formação do poros extracelular (H5). Cada subunidade de  $K_{ir}$  está associada com uma porção regulatória que é um receptor para sulfonilureia (SUR) (BABENKO; AGUILAR-BRYAN; BRYAN, 1998, QUAN, et al., 2011). Cada subunidade SUR tem 17 regiões transmembranares agrupados em três domínios: TMD0 (TM1-5), TMD1 (TM 6-11), e TMD2 (TM 12-17). Cada subunidade SUR também tem dois domínios de ligação ao ATP (NBD) (QUAN, et al., 2011). A diversidade molecular dos  $K_{ATP}$  nos diversos tecidos e espécies é decorrente da presença de múltiplas isoformas do SUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) (BRAYDEN, 2002).

**Figura 10** – Estrutura dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ).



Fonte: adaptado de QUAN, et al., 2011.

Uma característica primária deste canal é ser inativado pelo aumento de ATP intracelular, sulfonilureias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de  $Ba^{2+}$  extracelular (FLAGG et al., 2010; SANBORN, 2000; STANDEN et al., 1989). No entanto, hoje se sabe que existem subtipos de  $K_{ATP}$  que são relativamente insensíveis aos níveis basais de ATP, mas são bloqueados seletivamente pela glibenclamida do mesmo modo que os demais (FLAGG et al., 2010).

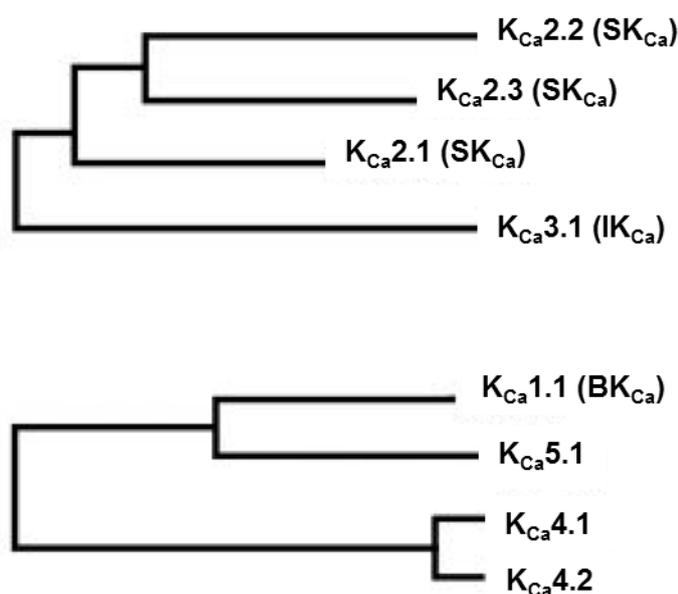
Outra família de canais de  $K^+$  existente é a dos  $K_{Ca}$ , a qual é vastamente expressa em tecidos neuronais e não neuronais, como epitélios, células sensoriais e músculos lisos onde podem responder a estímulos vindos de alterações do potencial de membrana, bem como de modificações da  $[Ca^{2+}]_c$ , além de contribuir para a

repolarização do potencial de ação (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010; PETERSEN; MARUYAMA, 1984; VERGARA et al., 1998).

Esta família é dividida em três grandes grupos com base em sua condutância, cinética e farmacologia (Figura 11) (SAH; FABER, 2002): 1) canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ), bloqueados pela apamina; 2) canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de condutância intermediária ( $IK_{Ca}$ ), bloqueados pelo clotrimazol e 3) canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de grande condutância ( $BK_{Ca}$ ) que são bloqueados por toxinas, como caribdotoxina e iberiotoxina, ou por baixas concentrações do íon tetraetilamônio ( $TEA^+$ ). Os canais do tipo  $SK_{Ca}$  e  $IK_{Ca}$  são insensíveis à voltagem e ativados por baixa concentração de  $Ca^{2+}$  citoplasmático ( $< 1,0 \mu M$ ), em contraste aos  $BK_{Ca}$  que são ativados tanto por voltagem como por  $Ca^{2+}$  (WEI et al., 2005).

Os canais  $K_{Ca}$  foram subdivididos da seguinte forma: no grupo dos  $BK_{Ca}$  são chamados de  $K_{Ca}1.1$ , enquanto que no grupo dos  $SK_{Ca}$  estão incluídos os  $K_{Ca}2.1$ , 2.2 e 2.3, e os  $IK_{Ca}$  passaram a ser chamados de  $K_{Ca}3.1$ . Três outros membros deste grupo,  $K_{Ca}4.1$ , 4.2 e 5.2, foram incluídos no grupo dos  $K_{Ca}$ , uma vez que todos apresentam uma semelhança estrutural, apesar de não serem ativados por  $Ca^{2+}$ . Os canais  $K_{Ca}4.1$  e  $K_{Ca}4.2$  são ativados por  $Na^+$  e  $Cl^-$  intracelular, enquanto o  $K_{Ca}5.1$  é sensível ao pH (ALDRICH et al., 2009).

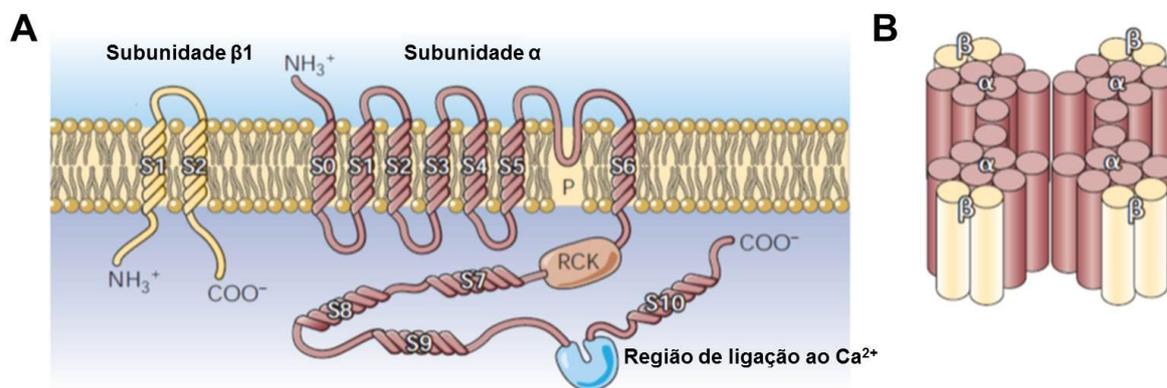
**Figura 11** – Cladograma das subfamílias dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ).



Fonte: adaptado de ALDRICH et al., 2009.

Estruturalmente, os BK<sub>Ca</sub> (Figura 12) são compostos por quatro subunidades formadoras de poro, onde cada uma dessas é formada por 7 segmentos transmembranares (S0-S6) e uma grande região citoplasmática carboxiterminal (SALKOFF et al., 2006). S1-S4 formam o domínio sensor de voltagem primário e S5 e S6 juntos formam o principal domínio de permeação para os íons (JIANG et al., 2002). A subunidade β é composta por dois domínios transmembranares com uma grande alça extracelular, e as caudas NH<sub>2</sub> e COOH terminais localizadas no citoplasma (BOYLE; TOMASIC; KOTLIKOFF, 1992; FLEISCHMANN; WASHABAU; KOTLIKOFF 1993; LEE; CUI, 2010). As propriedades fisiológicas dos BK<sub>Ca</sub>, incluindo a sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup>, são moduladas pelas subunidades β acessórias. As estimativas da sua densidade média, em músculo liso variam entre 1 a 4 canais/μm<sup>2</sup> (BENHAM; BOLTON, 1986; SINGER; WALSH, 1987).

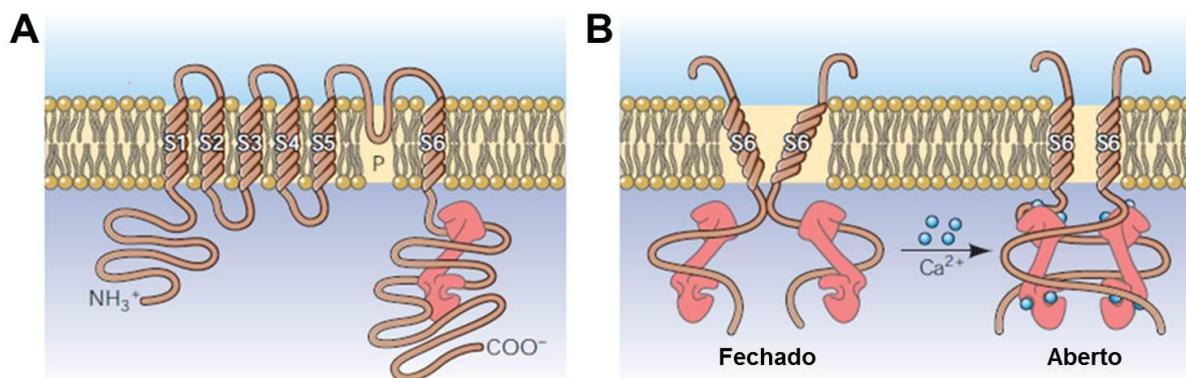
**Figura 12** – Estrutura das subunidades α e β1 dos canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de grande condutância (BK<sub>Ca</sub>) (A); associação das quatro subunidades dos BK<sub>Ca</sub> (B).



Fonte: adaptado de LEDOUX et al., 2006.

Os SK<sub>Ca</sub> (Figura 13) são formados por quatro subunidades, cada uma delas constituídas por seis domínios transmembranares (S1-S6), com caudas NH<sub>2</sub> e COOH terminais intracelulares. A região do poro (S5-S6) é a única região homóloga das outras famílias de canais de K<sup>+</sup>. A CaM está presa a região COOH terminal de cada subunidade do canal e a sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> citoplasmático depende da CaM. A ligação do Ca<sup>2+</sup> à CaM induz a alteração conformacional do complexo proteico levando à abertura do poro do canal (LEDOUX, et al., 2006).

**Figura 13** – Estrutura dos canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ) (A); mecanismo de ativação do canal pela ligação do  $Ca^{2+}$  à CaM (B).

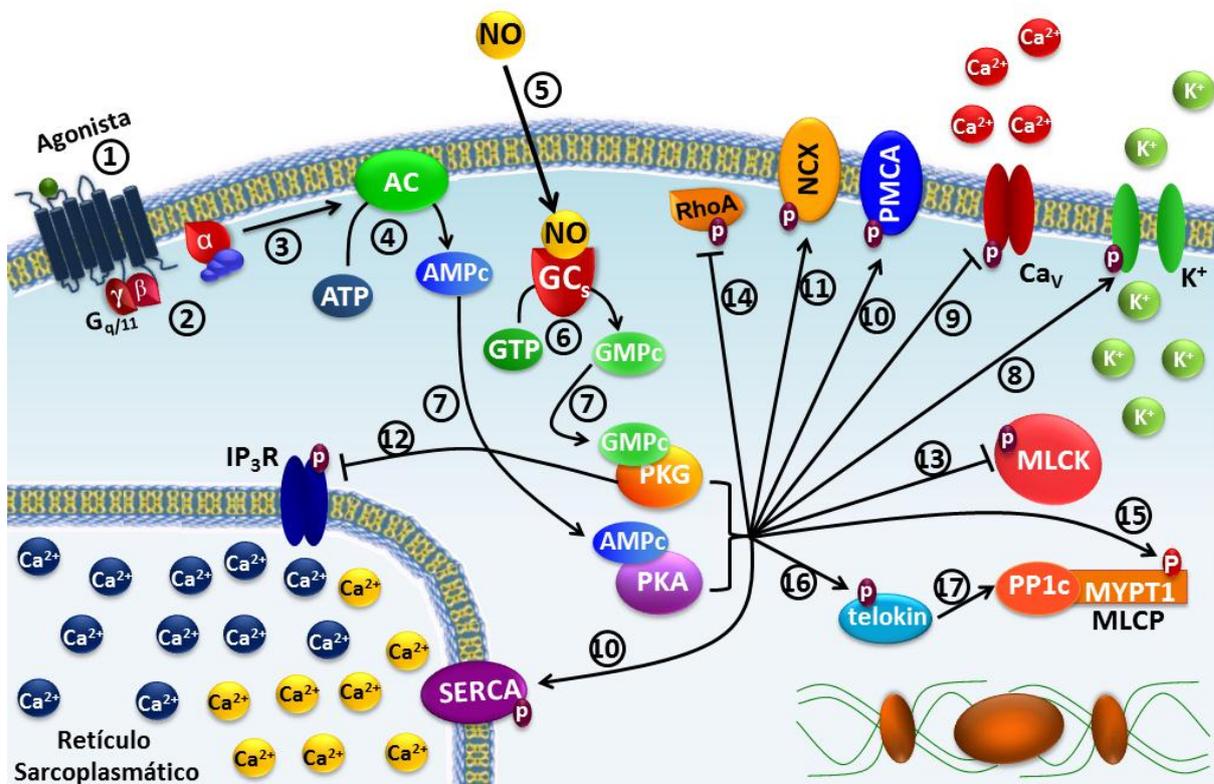


Fonte: adaptado de LEDOUX et al., 2006.

Os mecanismos de relaxamento no músculo liso via acoplamento fármaco-mecânico (Figura 14) podem ocorrer via GPCR acoplado à proteína  $G_s$ , cuja subunidade  $\alpha$  ativa a ciclase de adenilil (AC) e, conseqüentemente, geração de AMPc. Além disso, a geração de óxido nítrico (NO) tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da ciclase de guanilil solúvel ( $GC_s$ ) que induz a formação de monosfato cíclico de guanosina (GMPc) (MURTHY, 2006). O aumento nos níveis citosólicos de AMPc e GMPc nas células musculares lisas é considerado um dos mais importantes mecanismos que medeiam seu relaxamento sob condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

No músculo liso intestinal há uma maior produção de AMPc do que de GMPc. O GMPc ativa seletivamente a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), enquanto que o AMPc ativa seletivamente a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), em baixas concentrações de AMPc. No entanto, quando as concentrações citoplasmáticas de AMPc estão elevadas pode haver ativação cruzada da proteína cinase e, conseqüentemente, AMPc ativa a PKG. Além disso, a ativação da PKG pelo GMPc gradualmente aumenta a afinidade do AMPc pela PKG (MURTHY, 2006).

**Figura 14** – Esquema do mecanismo fármaco-mecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via  $G_s$ -AC-PKA e NO-GC<sub>s</sub>-PKG.



Fonte: Autor, 2013.

① O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; ② A proteína  $G_s$  troca GDP por GTP na sua subunidade  $\alpha$  (não mostrado na figura), tornando-se ativa; ③ A subunidade  $\alpha_s$ -GTP ativa a AC; ④ A AC converte o ATP em AMPc; ⑤ O NO gerado tanto dos nervos como das células musculares lisas, estimula a atividade da GC<sub>s</sub>; ⑥ A GC<sub>s</sub> converte o GTP em GMPc; ⑦ Os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: ⑧ Ativam os canais de  $K^+$ ; ⑨ Inibem os  $Ca_v$ ; ⑩ Aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; ⑪ Ativam do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; ⑫ Fosforilação do  $IP_3R$  pela PKG, mas não pela PKA. Todos esses mecanismos diminuem a  $[Ca^{2+}]_c$ ; ⑬ Inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo  $[(Ca^{2+})_4-CaM]$ ; ⑭ Inibem a RhoA; ⑮ Ativam a MYPT1; ⑯ Ativam o telokin; ⑰ O telokin ativa a MLCP. Todos esses mecanismos impedem a ativação da MLC e, conseqüentemente, sua interação com os filamentos de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Assim, ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos, levando a:

- 1) ativação de canais de  $K^+$ , que indiretamente, por repolarização ou hiperpolarização, causam a desativação dos  $Ca_v$ ;
- 2) inibição dos  $Ca_v$ , causando uma redução da  $[Ca^{2+}]_c$  por diminuir o influxo de  $Ca^{2+}$  (MAKHLouF; MURTHY, 1997; REMBOLD, 1996);
- 3) um aumento na atividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA), aumentando assim o sequestro e a extrusão de  $Ca^{2+}$ , respectivamente, diminuindo a  $[Ca^{2+}]_c$ ;
- 4) diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$  por ativação do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  (BLAUSTEIN, 1989);
- 5) redução da liberação de

Ca<sup>2+</sup> do RS pela PKG, mas não pela PKA através da fosforilação dos IP<sub>3</sub>R (BERRIDGE, 2009a, MURTHY, 2006); 6) inibição da MLCK, reduzindo sua afinidade pelo [(Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-CaM], causando uma redução nos níveis de MLC fosforilada e assim do processo contrátil (REMBOLD, 1992); 7) inativação da RhoA por fosforilação do resíduo Ser<sup>188</sup>, translocando-a para o citosol; 8) fosforilação do resíduo de Ser<sup>695</sup> da MYPT1 impedindo a fosforilação do resíduo de Thr<sup>695</sup> pela ROCK; 9) fosforilação do telokin (ativador endógeno da MLCP), sendo esse um mecanismo independente da RhoA (MURTHY, 2006).



### 3.1 Geral

- Contribuir com o estudo farmacológico da família Annonaceae, em particular dos óleos essenciais das folhas de *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (XL-OE), de *Xylopi frutescens* Aubl. (XF-OE) e de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE).

### 3.2 Específicos

- Investigar uma possível atividade espasmolítica dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE em músculos lisos (aorta isolada de rato; útero isolado de rata; traqueia e íleo isolados de cobaia).
- Elucidar o mecanismo de ação espasmolítica do óleo essencial que apresentar maior potência e eficácia em um dos quatro órgãos testados, avaliando:
  - o tipo de antagonismo com os receptores histaminérgicos;
  - o envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ), caracterizando o subtipo de  $Ca_v$  envolvido;
  - a modulação dos canais de potássio e determinando quais os subtipos desses canais estão envolvidos;
  - a via de sinalização das fosfodiesterases/nucleotídeos cíclicos;
  - o efeito citotóxico do óleo essencial sobre os miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia;
  - a interferência do óleo essencial sobre a concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_c$ ) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.



## 4 Material e Métodos

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Material botânico

As espécies *Xylopi*a *langsdo*r*fiana* A. St.-Hil. & Tul., *Xylopi*a *frutescens* Aubl. e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries foram coletadas nos municípios de Cruz do Espírito Santo-PB, em julho de 2002, de João Pessoa-PB, em abril de 2010 e de Serra Branca-PB, em agosto de 2007, respectivamente. Os materiais botânicos foram identificados pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As exsiccatas de *X. langsdo*r*fiana* A. St.-Hil. & Tul., (Agra 5541), *X. frutescens* Aubl. (Agra 7249) e *R. leptopetala* R.E. Fries (Agra 3567) estão depositadas no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) da UFPB.

#### 4.1.2 Produtos-teste

Os óleos essenciais das folhas obtidos das espécies *X. langsdo*r*fiana* (XL-OE), *X. frutescens* (XF-OE) e *R. leptopetala* (RL-OE) foram gentilmente cedidos pelo grupo dos Profs. Drs. Marcelo Sobral da Silva e Josean Fachine Tavares do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF)/CCS/UFPB e membros do Setor de Fitoquímica do PPgPNSB do CCS/UFPB. A composição química dos óleos

essenciais foi realizada, onde os componentes majoritários são: germacreno D (22,9%), trans- $\beta$ -guaiano (22,6%),  $\beta$ -cariofileno (15,7%) e  $\alpha$ -pineno (7,3%) para o XL-OE (TAVARES et al., 2007b), cariofileno (23,91%),  $\gamma$ -cadineno (12,48%),  $\beta$ -ocimeno (8,19%), cadin-4-en-10-ol (5,78%), viridiflorol (4,83%),  $\gamma$ -elemeno (4,55%) para o XF-OE (LUNGUINHO, 2012) e biciclogermacreno (22,47%), cis-4-tujanol (17,37%),  $\alpha$ -terpineol (8,42%), germacreno D (7,72%), trans-cariofileno (6,63%) e guaicol (4,61%) para o RL-OE (COSTA et al., 2008).

#### 4.1.3 Animais

Eram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 250-350 g, ratas Wistar virgens pesando entre 150-250 g e cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos, pesando entre 300-500 g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Centro de Biotecnologia (CBiotec)/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada à base de ração tipo *pellets* (Labina<sup>®</sup>) com acesso à água *ad libitum*, com ventilação e temperatura ( $21 \pm 1$  °C) controladas e constantes. Os experimentos eram realizados no período entre 08h00 e 20h00, sendo todos os procedimentos experimentais realizados seguindo os princípios de cuidados com animais “Guidelines for the ethical use animals in applied etiology studies” (SHERWIN et al., 2003) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (CEPA/LTF), atualmente conhecido como Comissão de Ética no Uso Animal do CBiotec (CEUA/CBiotec), certidão número 0103/10 (ANEXO A).

#### 4.1.4 Drogas e reagentes

O sulfato de magnésio hepta-hidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), o cloreto de magnésio hexa-hidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), o cloreto de cálcio di-hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ), o cloreto de sódio (NaCl) e a glicose foram obtidos da Vetec (Brasil). O bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ), o cloreto de potássio (KCl) foram obtidos da Fmaia (Brasil). O fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), o fosfato de sódio monobásico anidro ( $NaH_2PO_4$ ) e o ácido clorídrico (HCl) P.A. foram obtidos da Nuclear (Brasil).

O cloridrato de carbamilcolina (CCh), o cloridrato de acetilcolina (ACh) e o di-hidrocloridrato de histamina foram obtidos da Merck (Brasil). A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil). O cloridrato de L(-)-fenilefrina (FEN) foi obtido da Pfizer (EUA). Estas substâncias eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque,  $10^{-2}$  M para as soluções de CCh, ACh, histamina e FEN e 1 UI/mL para a solução de ocitocina, que eram mantidas à temperatura de  $-20$  °C, quando necessário, essas soluções-estoque eram diluídas em água destilada para obtenção de concentrações apropriadas a cada protocolo experimental.

O S(-)-Bay K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster), o cloreto de cézio (CsCl), o cloreto de tetraetilamônio ( $\text{TEA}^+$ ), a iberiotoxina (IbTx), a glibenclamida, a apamina, a 4-aminopiridina (4-AP), o dietilestilbestrol, o ácido araquidônico (AA), o óleo de castor (Cremophor<sup>®</sup>), a penicilina-estreptomicina, o ácido [etilenodinitrilo] tetracético (EDTA), o ácido (N-[2-hidroxietilpiperazina-N'-[2-etanosulfônico]) (HEPES), o brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e o dimetilsufóxido (DMSO) foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA).

Estas substâncias eram mantidas em um *freezer* à temperatura de  $-20$  °C, dissolvidas e diluídas em água destilada, exceto o ácido araquidônico, dietilestilbestrol, S(-)-Bay K8644 e a glibenclamida que eram dissolvidos em etanol absoluto e diluídos em água destilada, e o MTT que era dissolvido na solução de PBS (descrita no próximo item).

O Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), o soro fetal bovino, a L-glutamina e a solução de tripsina/EDTA (1:250) foram obtidos da Cultilab (Brasil). Fluo-4 NW dye mix foi obtido da Invitrogen (EUA).

A mistura carbogênica (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) foi adquirida da White Martins (Brasil).

#### 4.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados foram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4 com HCl ou NaOH 1 N, exceto o meio de cultura dos miócitos que foi ajustado ao pH 7,2), todas as soluções utilizadas nos experimentos funcionais foram aeradas com carbogênio (95% de  $\text{O}_2$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ) e mantidas a

37 °C para aorta de rato, traqueia e íleo de cobaia e a 32 °C para útero de rata. As composições estão descritas abaixo:

**Solução de Krebs Normal (mM):** NaCl (118,0); KCl (4,6); MgSO<sub>4</sub> (5,7); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1); CaCl<sub>2</sub> (2,5); glicose (11,0); NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

**Solução de Locke Ringer (mM):** NaCl (154,0); KCl (5,6); CaCl<sub>2</sub> (2,2); MgCl<sub>2</sub> (2,1); Glicose (5,6); NaHCO<sub>3</sub> (6,0).

**Solução de Krebs modificado (mM):** NaCl (117,0); KCl (4,7); MgSO<sub>4</sub> (1,3); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2); CaCl<sub>2</sub> (2,5); Glicose (11,0); NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

**Solução de Krebs modificado despolarizante 70 mM sem Ca<sup>2+</sup> (mM):** NaCl (51,7); KCl (70,0); MgSO<sub>4</sub> (1,3); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,2); Glicose (11,0); NaHCO<sub>3</sub> (25,0).

**PSS (Solução Fisiológica Salina) sem Ca<sup>2+</sup> (mM):** NaCl (132,4); KCl (5,9); MgCl<sub>2</sub> (1,2); Glicose (11,5).

**PBS (Solução Tampão Fisiológica) (mM):** NaCl (140,0); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,9); NaHPO<sub>4</sub> (1,7); NaHCO<sub>3</sub> (4,2); EDTA (0,2).

**HBSS (Solução Salina Balanceada de Hank) (mM):** NaCl (137,9); KCl (5,33); MgCl<sub>2</sub> (0,49); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,44); MgSO<sub>4</sub> (0,41); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,34); CaCl<sub>2</sub> (1,3); NaHCO<sub>3</sub> (4,2); Glicose (5,6); HEPES (10,0).

**Composição do meio para cultura de miócitos:** o DMEM foi suplementado com soro fetal bovino (10%), glutamina (20,0 mM) e penicilina-estreptomicina (100 U/mL-10 µg/mL), NaHCO<sub>3</sub> (25,0 mM); HEPES (11,0 mM).

#### **4.1.6 Preparação dos óleos essenciais para os ensaios farmacológicos**

Os óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE eram solubilizados em Cremophor<sup>®</sup> (3% v/v) e diluídos em água destilada até a concentração de 10 mg/mL. Estas soluções eram feitas diariamente, uma vez que óleos essenciais caracterizam-se pela presença de compostos voláteis. De acordo com a necessidade de cada protocolo experimental as soluções eram novamente diluídas em água destilada. A concentração final de Cremophor<sup>®</sup> nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v). Nesta concentração o Cremophor<sup>®</sup> é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo nos órgãos estudados (dados não mostrados). As concentrações dos óleos essenciais eram utilizadas sempre em múltiplos de 3. Na triagem farmacológica eram testadas as concentrações 243 e 729 µg/mL, quando esse efeito era superior a 50 e 70%, respectivamente, diminuía-se as

concentrações até aquela de efeito 0% a fim de se obter uma curva concentração-efeito.

#### **4.1.7 Aparelhos**

Para o registro das contrações isotônicas os órgãos eram suspensos em cubas de 5 mL e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). As contrações isométricas eram registradas utilizando transdutores de força isométricos FORT-10 conectados a um amplificador modelo TMB4M, ambos da World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA), os quais estavam conectados a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador contendo o programa BioMed<sup>®</sup> versão Rv2 (BioData, João Pessoa, PB, Brasil). A temperatura das cubas era controlada com bombas termostáticas modelos (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil) ou (POLYSTAT 12002 - Cole-Palmer, EUA).

Os valores de pH eram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG 200 e os animais em balanças semianalítica (ambas da GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

A manipulação de células em cultura era realizada em uma capela de fluxo laminar (GermFree Laboratories, EUA). As culturas de células eram mantidas em estufa úmida de CO<sub>2</sub> a 37 °C (Forma Scientific, EUA).

As células em cultura eram observadas em microscópio óptico invertido (Nikon, Japão). As imagens das células eram captadas por microscópio óptico invertido (Nikon, Japão) acoplado à câmera de vídeo (Nikon – DS Camera Head DSFil/DS-5M, Japão).

As medidas de fluorescência e de intensidade de absorbância eram realizadas em um leitor óptico de microplaca de alta eficiência, FlexStation 3 - Molecular Devices e analisadas no programa SoftMax<sup>®</sup> Pro versão 5.4 (SoftMax Pro Software, MDS Analytical Technologies Inc., Califórnia, EUA).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Triagem farmacológica preliminar

#### 4.2.1.1 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta de rato

Os ratos eram eutanasiados por descolamento cervical seguido pela secção dos vasos cervicais. A aorta era retirada e limpa de todo o tecido conectivo e adiposo, em seguida dividida em anéis de 3-5 mm. Os anéis aórticos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (5 mL) contendo solução nutritiva de Krebs normal e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C, aerados com carbogênio, e mantidos em repouso durante no mínimo 60 minutos. Durante esse período, a solução nutritiva era renovada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina (FEN). A integridade do endotélio aórtico era verificada pela adição de acetilcolina (ACh) à cuba na concentração de  $10^{-6}$  M (FURCHGOTT; ZAWDZKI, 1980) durante a fase tônica da primeira resposta induzida por FEN, onde anéis que apresentaram relaxamentos iguais ou superiores a 50% (em relação a força de contração inicial) eram considerados com endotélio funcional (AJAYA et al., 2003). Os anéis aórticos sem endotélio eram obtidos através da retirada do mesmo, por uma leve fricção da camada endotelial que se encontra voltada para a luz do órgão utilizando-se uma haste de aço inoxidável e embebida com solução de Krebs normal. A retirada do endotélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de ACh ( $10^{-6}$  M) à cuba ou quando este relaxamento era igual ou inferior a 10%, sendo este anel considerado sem endotélio funcional. Após a verificação da funcionalidade do endotélio, a solução de banho era trocada, sendo as preparações lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs normal durante um período total de 30 minutos, e durante o componente tônico de uma segunda resposta induzida por FEN, os óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE eram adicionados, de maneira cumulativa à cuba, em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelos óleos essenciais foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por FEN. Os valores da concentração dos óleos essenciais que produzem 50% do seu efeito máximo ( $CE_{50}$ ) foram obtidos por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta obtidas para os óleos essenciais em anéis com e sem endotélio funcional.

#### **4.2.1.2 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia de cobaia**

Os cobaias eram eutanasiados por descolamento cervical seguido pela secção dos vasos cervicais. A traqueia era retirada e limpa de todo o tecido conectivo e adiposo, em seguida dividido em segmentos, contendo 3-4 anéis de cartilagem cada. Esses segmentos eram suspensos individualmente por hastes de aço inoxidável em cubas de vidro (5 mL) contendo solução nutritiva de Krebs normal e sob tensão de 1 g. Estes tecidos eram mantidos a uma temperatura de 37 °C, aerados com carbogênio, e mantidos em repouso durante no mínimo 60 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, uma primeira contração era induzida pela adição de  $10^{-6}$  M de carbacol (CCh) à cuba.

A integridade do epitélio da traqueia era verificada pela adição de AA à cuba na concentração de  $10^{-4}$  M durante a fase tônica da primeira resposta induzida por CCh, onde anéis que apresentaram relaxamentos iguais ou superiores a 50% (em relação a contração inicial) eram considerados com epitélio funcional (TSCHIRHART et al., 1987). Os anéis de traqueia sem epitélio eram obtidos através da retirada do mesmo, por uma leve fricção da camada epitelial que se encontra voltada para a luz do órgão, utilizando-se uma haste de aço inoxidável envolta em algodão e embebida com solução de Krebs normal. A retirada do epitélio era confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à adição de AA à cuba ou quando este relaxamento era igual ou inferior a 10%, sendo este anel considerado sem epitélio funcional. Após a verificação da funcionalidade do epitélio, a solução de banho era trocada, sendo as preparações lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs normal durante um período total de 30 minutos, e durante o componente tônico de uma segunda resposta induzida por CCh, os óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE eram adicionados, de maneira cumulativa à cuba, em preparações diferentes.

O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por carbacol e os valores de  $CE_{50}$  foram calculados como descrito no item 4.2.1.1.

#### **4.2.1.3 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero de rata**

O útero de rata era montado de acordo com Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (2000). As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) via subcutânea, para indução do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. Após aberta a cavidade abdominal, era feita a dissecação do útero colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C sob aeração com carbogênio. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (5 mL), sob tensão de 1 g e mantidos em repouso durante no mínimo 40 minutos, sendo a solução trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isotônica com KCl 60 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, eram induzidas duas contrações isotônicas de magnitude similares com  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (OCI) ou com  $10^{-5}$  M de CCh. Os óleos essenciais eram incubados por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença do óleo essencial era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas. A inibição da resposta submáxima de OCI e de CCh era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição dos compostos à cuba. Os valores da concentração dos óleos essenciais que inibem 50% do efeito máximo produzido por um agonista ( $CI_{50}$ ) foram obtidos por regressão não linear.

#### **4.2.1.4 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo de cobaia**

O íleo de cobaia era preparado de acordo com Daniel et al. (2001). Os cobaias eram mantidos em jejum por um período de 18 horas (dando-lhe somente água nesse período). Após este período os animais eram eutanasiados por deslocamento cervical seguido de secção dos vasos cervicais. O abdômen era aberto e um segmento do íleo de aproximadamente 15 cm de comprimento era retirado e colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs modificado a 37 °C sob aeração com carbogênio. Após a dissecação, o segmento do íleo era seccionado em fragmentos de 2-3 cm de comprimento, suspensos individualmente em cubas de vidro (5 mL) e deixados em repouso por 30 minutos, durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 15 minutos. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isotônica com KCl 40 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, eram induzidas duas contrações isotônicas de magnitude similares com  $10^{-6}$  M de CCh ou de histamina. Os óleos essenciais eram incubados por 15 minutos em preparações diferentes, e na presença do óleo essencial era induzida uma terceira contração utilizando um dos agonistas. A inibição da resposta submáxima de CCh e de histamina era avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição dos compostos à cuba. Os valores de  $CI_{50}$  eram obtidos como descrito anteriormente.

#### **4.2.2 Investigação do mecanismo de ação do RL-OE em íleo de cobaia**

##### **4.2.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina**

O íleo era montado como descrito anteriormente. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isotônica com KCl 40 mM para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativas similares à histamina ( $10^{-9}$  -  $10^{-4}$  M). Em seguida, na ausência da histamina, RL-OE era incubado por 15 minutos em diferentes concentrações e em experimentos independentes. Após este período, na presença do óleo essencial, uma nova curva concentração-resposta

cumulativa à histamina era obtida. Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do óleo essencial com aquela obtida pela média das amplitudes máximas obtidas das curvas controle (100%), na ausência do RL-OE. O tipo de antagonismo exercido pelo RL-OE foi avaliado com base na análise dos valores da  $CE_{50}$  e dos valores do efeito máximo ( $E_{max}$ ) da histamina calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do RL-OE.

#### **4.2.2.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por CCh ou por histamina**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada utilizando transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital era obtida com 40 mM de KCl,  $10^{-6}$  M de CCh ou de histamina e durante a fase tônica sustentada o RL-OE era adicionado de maneira cumulativa à cuba e em preparações diferentes. O relaxamento produzido pelo óleo essencial foi expresso como a percentagem reversa da contração produzida pelos agentes contráteis. Os valores de  $CE_{50}$  foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais da  $CE_{50}$ , calculados pelo uso da regressão não linear.

#### **4.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) no efeito relaxante do RL-OE**

##### **4.2.2.3.1 Efeito do RL-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem $Ca^{2+}$**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização do órgão por 30 minutos a solução de Krebs modificado era substituída pela solução despolarizante (70 mM de KCl) nominalmente sem  $Ca^{2+}$ , por um período de 45 minutos. Eram induzidas duas curvas similares de maneira concentração-resposta cumulativa ao  $CaCl_2$ , em seguida o RL-OE era incubado na ausência de  $CaCl_2$  por 15 minutos e após esse período uma terceira curva cumulativa ao  $CaCl_2$  era obtida na presença do RL-OE (VAN, ROSSUM, 1963). Os

resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do óleo essencial com aquela obtida pela média das amplitudes máximas obtidas das curvas controle (100%), na ausência do RL-OE. O tipo de antagonismo exercido pelo RL-OE foi avaliado com base na análise dos valores de  $CE_{50}$  e do  $E_{max}$  do  $CaCl_2$  calculado a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência (controle) e na presença do RL-OE.

#### **4.2.2.3.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644**

Após a estabilização por 30 minutos em solução de Krebs modificado, o íleo era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos e em sua presença era induzida uma contração com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos  $Ca_v$  do tipo L ou  $Ca_v1$  (FERRANTE et al., 1989). Durante a estabilização da fase tônica dessa contração o RL-OE era adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644. A  $CE_{50}$  foi obtida por análise de regressão não linear.

#### **4.2.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do RL-OE**

##### **4.2.2.4.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de cloreto de céσιο (CsCl)**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, o tecido era adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de  $K^+$  (CECCHI et al., 1987), após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o RL-OE de forma cumulativa. O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do bloqueador e comparados com os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE na ausência do bloqueador.

#### **4.2.2.4.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA<sup>+</sup>) ou iberiotoxina (IbTX)**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, era adicionado à cuba  $10^{-5}$  M de glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) (SUN; BENISHN, 1994), 100 nM de apamina, um bloqueador seletivo de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de pequena condutância (SK<sub>Ca</sub>) (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; VAN DER STAAY et al., 1999), 1 mM de TEA<sup>+</sup>, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais de K<sup>+</sup> ativados pelo Ca<sup>2+</sup> de grande condutância (BK<sub>Ca</sub>) (KNOT, BRAYDEN, NELSON, 1996), 97 nM de iberiotoxina, bloqueador seletivo dos BK<sub>Ca</sub> (CANDIA; GARCIA; LATORRE, 1992; ABOULAFIA et al., 2002) ou 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador não seletivo dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis à voltagem (K<sub>V</sub>) (ROBERTSON; NELSON, 1994), após 20 minutos na presença dos bloqueadores, em preparações diferentes, uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina era obtida. Em seguida o RL-OE era adicionado cumulativamente sob o componente tônico da contração. O relaxamento produzido pelo RL-OE e os valores de CE<sub>50</sub> do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença dos bloqueadores e comparados com os valores de CE<sub>50</sub> do RL-OE na ausência do bloqueador.

#### **4.2.2.4.3 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença simultânea de tetraetilamônio (TEA<sup>+</sup>) e 4-aminopiridina (4-AP)**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, era incubado por 20 minutos com 1 mM de TEA<sup>+</sup>, que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK<sub>Ca</sub> (KNOT, BRAYDEN, NELSON, 1996) e 0,3 mM de 4-AP, um bloqueador não seletivo dos K<sub>V</sub> (ROBERTSON; NELSON, 1994), na mesma preparação e ainda na presença simultânea dos bloqueadores, uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina era obtida para verificar se há somação de efeito de ativação dos canais de K<sup>+</sup> no relaxamento produzido pelo RL-OE. Em seguida o RL-OE era adicionado cumulativamente sob o componente tônico da contração. O relaxamento produzido pelo RL-OE e os valores de CE<sub>50</sub> do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença

simultânea dos bloqueadores e comparados com os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE na ausência dos bloqueadores e na presença do bloqueador não seletivo dos canais de  $K^+$  (CsCl).

#### **4.2.2.4.4 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de 16 mM de KCl**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, uma contração tônica era obtida com  $10^{-6}$  M de histamina. Após 2 minutos da contração obtida com histamina, adicionava-se 16 mM de KCl, uma manobra utilizada para dificultar o efluxo de  $K^+$  (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999). Sob o componente tônico dessa contração o RL-OE era adicionado cumulativamente. O relaxamento produzido pelo RL-OE e os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença de 16 mM de KCl e comparados com os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE na ausência de 16 mM de KCl.

#### **4.2.2.5 Avaliação da participação da via de sinalização das PDEs/nucleotídeos cíclicos**

##### **4.2.2.5.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de aminofilina**

O íleo era montado como descrito no item 4.2.1.4. Após o período de estabilização, era adicionada à cuba  $10^{-4}$  M de aminofilina, um inibidor não-seletivo das enzimas fosfodiesterases (PDEs) (KAŽIĆ, 1977) e após 20 minutos na presença do inibidor era induzida uma contração com  $10^{-6}$  M de histamina e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o RL-OE de forma cumulativa. O relaxamento produzido pelo RL-OE foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na presença do inibidor e comparados com os valores de  $CE_{50}$  do RL-OE na ausência do inibidor.

#### 4.2.2.6 Efeito do RL-OE sobre os miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia

##### 4.2.2.6.1 Cultura de miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia

O íleo era retirado segundo o descrito no item 4.2.1.4. Após os procedimentos iniciais, o íleo era seccionado em fragmentos de 2-3 cm e a camada longitudinal do íleo era retirada com o auxílio de um bastão de vidro (8 mm), lâmina e algodão embebido com a solução nutritiva. Após a retirada da camada longitudinal, estas eram lavadas sucessivas vezes em solução estéril de PSS sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Em seguida, essas amostras eram fragmentadas em pedaços menores com o auxílio de tesoura e pinça (adaptado de SHIMUTA et al., 1990). Posteriormente, com uma pipeta *Pasteur* esses fragmentos menores da camada longitudinal eram transferidos e distribuídos uniformemente em garrafas estéreis de cultura primária (25 cm<sup>2</sup>) (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA). Após a observação de que os tecidos se encontravam aderidos à parede das garrafas, adicionava-se 5 mL do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20,0 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina e as garrafas eram levadas à estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (CLARO et al., 2007). A cada 48-72 horas o meio de cultura das garrafas era trocado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril conectada a uma bomba a vácuo, a garrafa era inclinada em um ângulo de 45 ° para a realização da aspiração do meio de cultura. Sempre se deixava um pouco do meio de cultura antigo, uma vez que há liberação de fatores de crescimento das próprias células em cultura, facilitando o crescimento das células. Após a confluência das células em monocamada eram feitos os subcultivos em garrafas de cultura (75 cm<sup>2</sup>) (Corning® Flask, NY, EUA).

Para a realização do subcultivo, o meio de cultura era completamente aspirado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* estéril conectada a uma bomba a vácuo, com o cuidado de não tocar a pipeta na parede da garrafa onde as células estão aderidas, em seguida as garrafas eram lavadas com 2 mL de PBS enriquecido com penicilina-estreptomicina, posteriormente com 2 mL de PBS enriquecido com EDTA. Após essas lavagens, adicionava-se 2 mL de tripsina/EDTA (1:250) por aproximadamente 2 minutos, seguida da adição do meio de cultura DMEM, para neutralizar a ação da tripsina. Essa suspensão de células era transferida para

garrafas de cultura (75 cm<sup>2</sup>) com a correção do volume do meio de cultura para aproximadamente 12 mL e levadas à estufa de CO<sub>2</sub> e após a confluência das células em monocamada eram preparados os *pellets* (contendo as células).

Para a preparação dos *pellets*, repetia-se todo o procedimento da preparação do subcultivo, agora utilizando o dobro do volume de PBS enriquecido com penicilina-estreptomicina, PBS enriquecido com EDTA e tripsina, devido ao maior volume das garrafas para cultura. Em seguida, transferia-se toda a suspensão de células para tubos Falcons (Corning® Flask, NY, EUA), seguido de centrifugação (500 g) por 5 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes eram aspirados, os *pellets* eram ressuspensos em 5 mL de solução HBSS e novamente eram centrifugados por 5 minutos. Os sobrenadantes eram desprezados e os *pellets* eram utilizados para os protocolos experimentais descritos posteriormente.

Para se tornarem estéreis, as soluções utilizadas nos experimentos celulares eram filtradas em membranas de filtro 0,22 µm (Milipore), seguida da adição de penicilina/estreptomicina (1%). As soluções finais eram acondicionadas em garrafas estéreis de 100 mL e mantidas a 0 °C e descongeladas em banho aquecido a 37 °C. Todos esses procedimentos eram realizados em ambiente asséptico com a utilização de uma capela de fluxo laminar.

#### **4.2.2.6.2 Efeito do RL-OE sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia**

Os *pellets* eram homogeneizados em 5 mL do meio de cultura DMEM e uma alíquota de 10 µL da suspensão de células era levada a uma câmara de *Neubauer* para a contagem das células. Essa suspensão de células era diluída para que 100 µL dessa suspensão tivesse aproximadamente 5 x 10<sup>3</sup> células/mL. Em seguida, a suspensão de células era semeada (100 µL) em microplacas estéreis de 96 poços (Corning® Flask, NY, EUA) e estas eram levadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão das células.

Após o período de aderência das células o meio de cultura de cada poço era desprezado, em seguida eram adicionados 100 µL de solução do RL-OE na concentração de 81 µg/mL, diluídos em meio de cultura DMEM. Após a incubação por 2 horas, a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>, adicionava-se 10 µL de MTT (1-brometo de

(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio]) na concentração de 5 mg/mL em cada poço e esperava-se 6 horas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por células que mantêm a integridade mitocondrial para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. Apenas as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), portanto a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986). Após o período de incubação de 6 horas, a microplaca de 96 poços era centrifugada, o sobrenadante era desprezado e ressuspensão em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), e deixado por um período de 30 minutos, a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>, para solubilizar o formazan produzido. Em seguida, a microplaca era levada ao FlexStation 3 e lida no comprimento de onda de 540 nm. A intensidade de absorbância dos poços da microplaca correlaciona-se ao número de células viáveis. O controle foi determinado apenas com o meio de cultura DMEM, sem a incubação dos óleos essenciais, apresentando 75,2 ± 1,3% de células viáveis. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

#### **4.2.2.6.3 Avaliação do efeito do RL-OE sobre a concentração citosólica de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia**

Os *pellets* eram homogeneizados em 5 mL do meio de cultura DMEM e uma alíquota de 10 µL da suspensão de células era levada a uma câmara de *Neubauer* para a contagem das células. Essa suspensão de células era diluída para que 100 µL dessa suspensão tivesse aproximadamente 10<sup>4</sup> células/mL. Em seguida, a suspensão de células era semeada (100 µL) em microplacas pretas estéreis de 96 poços (Corning® Flask, NY, USA), deixadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão das células.

Após o período de aderência das células, o meio de cultura de cada poço era desprezado e adicionados 50 µL de solução de Fluo-4 NW e deixados em repouso por 40 minutos em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, para a incorporação do fluoróforo. O Fluo-4 é um indicador de cálcio de alta afinidade (K<sub>d</sub> ~ 345 nM) que fluoresce quando excitado a 488 nm e, mesmo em baixas concentrações, tem quase o dobro da fluorescência de outros corantes, o que é valioso em baixa densidade celular (PAREDES et al., 2008). Após a incorporação do

fluoróforo, a microplaca era levada ao FlexStation 3 para a quantificação da fluorescência. O Fluo-4 era excitado a 490 nm, e a emissão da luz era detectada a 524 nm, com um filtro de 515 nm. Os registros eram obtidos sem interrupção por 240 segundos. As células eram estimuladas com  $10^{-6}$  M de histamina (controle) e subsequente administração de 81 µg/mL de RL-OE, de 1 µM de verapamil, um bloqueador dos  $Ca_v$ -L (STANEVA-STOYTCHIEVA; VENKOVA, 1992), ou de HBSS (veículo) em diferentes poços da microplaca.

As porcentagens de intensidade de fluorescência foram calculadas utilizando como parâmetro a diferença entre as intensidades de fluorescências nos tempos de 20 s (tempo de aplicação da histamina) e 110 s (tempo da administração das substâncias teste (controle = 100%)) e nos tempo de 20 s e 240 s (tempo final de observação).

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* (não-pareado) ou análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni e as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando os valores de  $p < 0,05$ .

Como parâmetro de eficácia foi utilizado o efeito máximo ( $E_{max}$ ) e como parâmetro de potência foram utilizados as  $CE_{50}$  ou  $CI_{50}$ . Os valores de  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  (NEUBIG et al., 2003) foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados, usando a seguinte equação:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogCE_{50} - X) \cdot HillSlope}}$$

Onde:

Y = resposta da substância testada em porcentagem.

X = Logaritmo na base 10 da concentração do agonista.

Bottom = menor efeito assumido para “Y”.

Top = maior efeito assumido para “Y”.

$LogCE_{50}$  = logaritmo na base 10 da concentração da substância teste que produz 50% do seu efeito máximo.

HillSlope = valor da constante de Hill.

Todos os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).



## 5.1 Triagem farmacológica preliminar

### 5.1.1 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta de rato

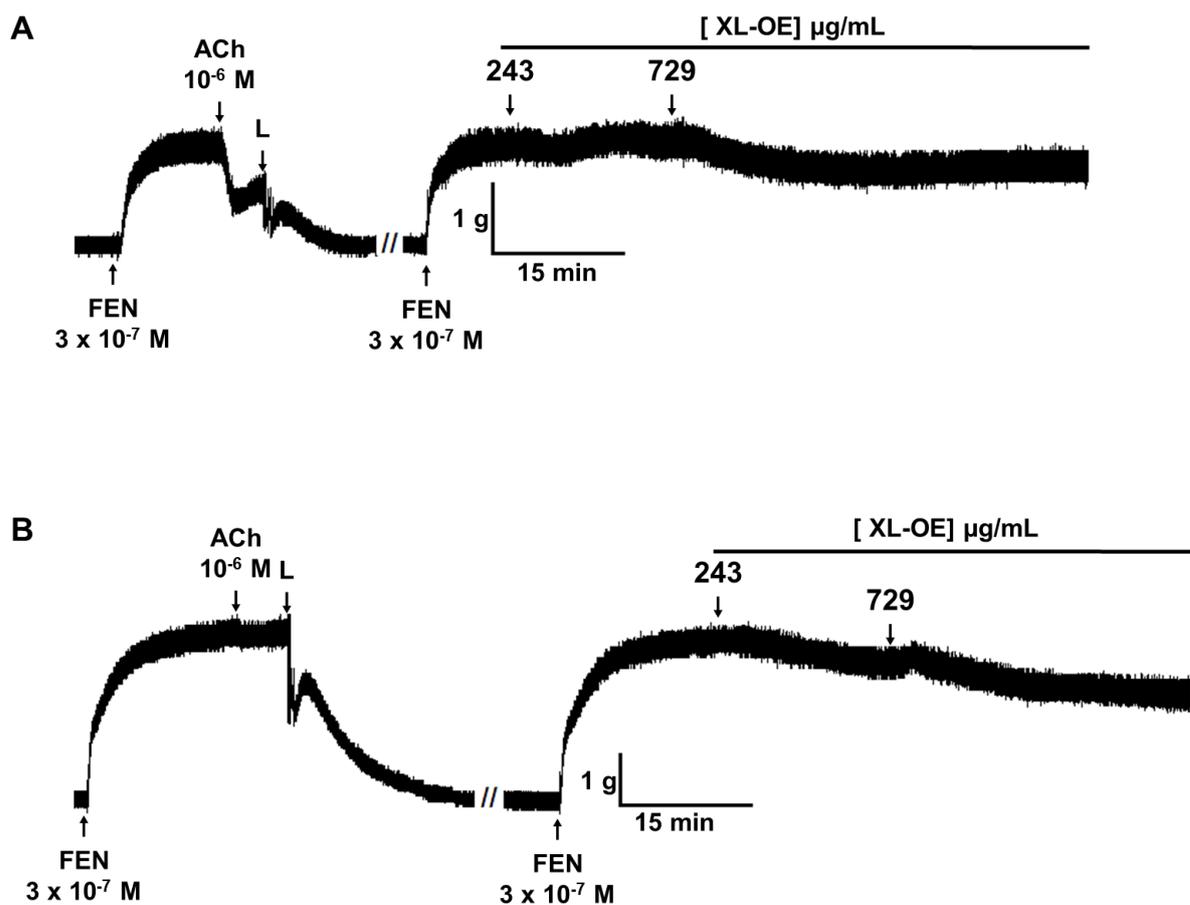
O XL-OE (243 e 729  $\mu\text{g/mL}$ ) foi equieficaz em relaxar os anéis de aorta pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença ( $9,9 \pm 2,4$  e  $31,7 \pm 6,1\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) e na ausência ( $4,8 \pm 1,0$  e  $37,0 \pm 2,0\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) de endotélio funcional (Figura 15 e Tabela 1).

O XF-OE (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) relaxou de maneira significativa e dependente de concentração os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina na presença de endotélio funcional ( $\text{CE}_{50} = 266,0 \pm 32,2$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ , Figura 16A, Gráfico 1 e Tabela 2), com  $E_{\text{max}}$  de  $96,8 \pm 1,9\%$  (Tabela 1), já na ausência de endotélio, o XF-OE relaxou os anéis aórticos pré-contraídos com fenilefrina apenas nas concentrações de 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$  ( $6,7 \pm 4,4$  e  $58,9 \pm 13,2\%$ , respectivamente,  $n = 3$ , Figura 16B e Tabela 1).

O RL-OE (9-729  $\mu\text{g/mL}$ ) relaxou de maneira significativa, dependente de concentração e equipotente os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina tanto na presença ( $\text{CE}_{50} = 95,5 \pm 14,4$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) como na ausência ( $\text{CE}_{50} = 108,1 \pm 21,9$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) de endotélio funcional (Figura 17, Gráfico 2 e Tabela 2), com  $E_{\text{max}}$  de  $95,6 \pm 1,8$  e  $100\%$ , respectivamente (Tabela 1).

Comparando os valores de  $\text{CE}_{50}$  dos óleos essenciais XF-OE e RL-OE na presença de endotélio funcional, observou-se que RL-OE foi cerca de 3 vezes mais potente que XF-OE (Tabela 2).

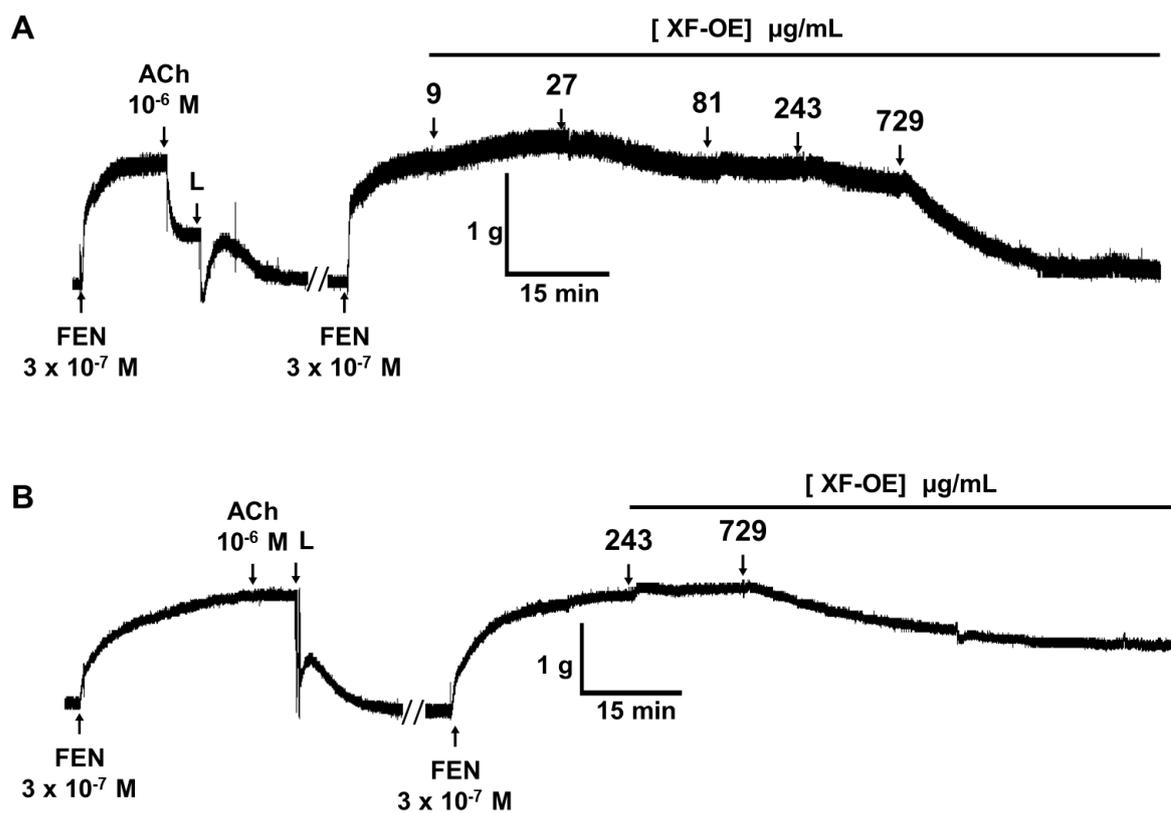
**Figura 15** – Registros típicos do efeito relaxante do XL-OE em anéis de aorta de rato pré-contráidos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

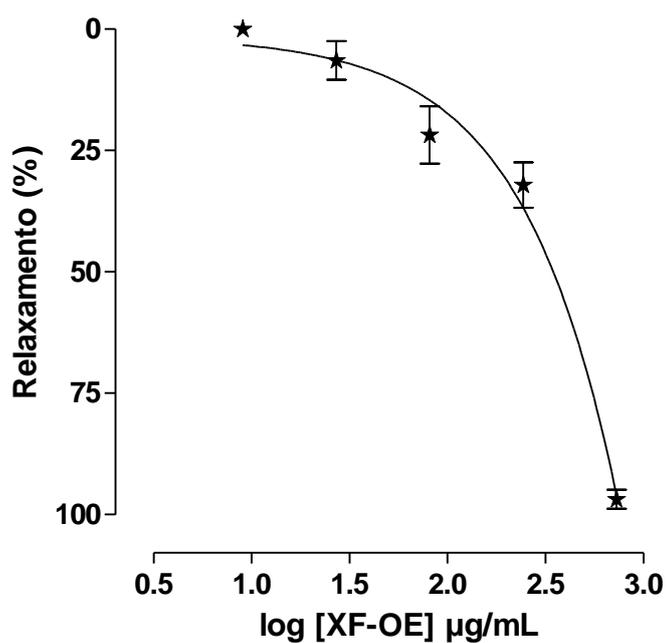
**Figura 16** – Registros típicos do efeito relaxante do XF-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

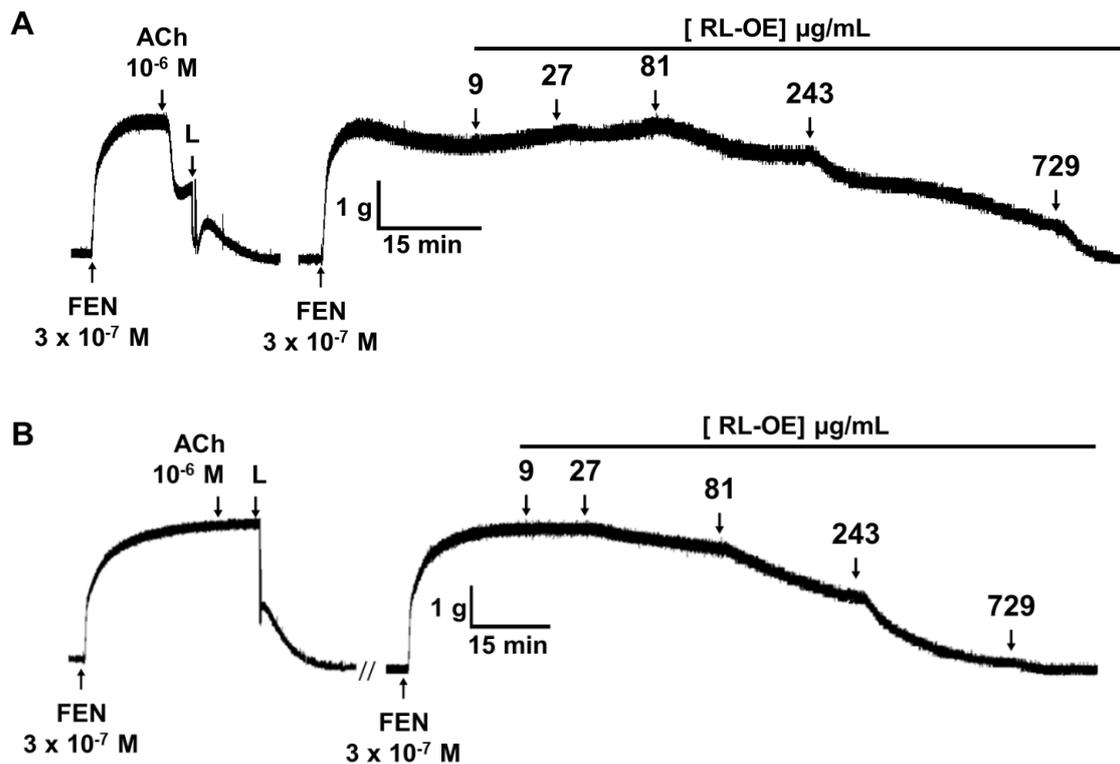
**Gráfico 1** – Efeito relaxante do XF-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (★) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .

Fonte: Autor, 2013.

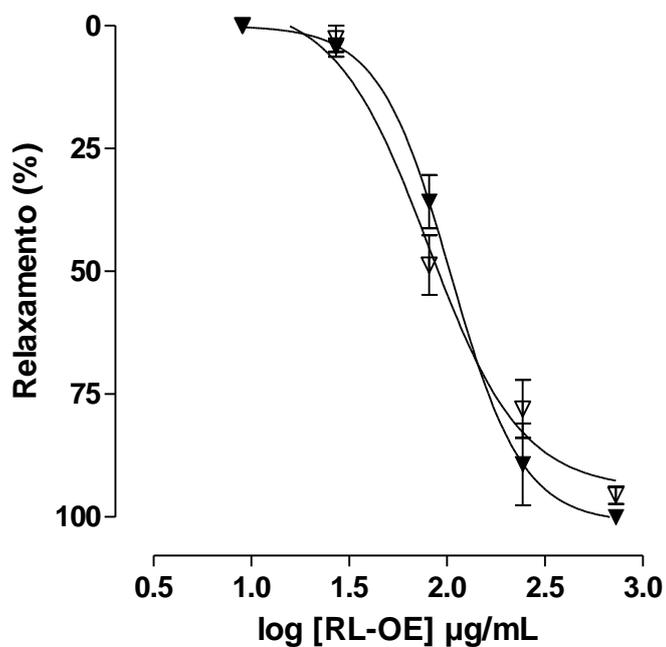
**Figura 17** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença (A) e na ausência (B) de endotélio funcional.



FEN = fenilefrina, ACh = acetilcolina, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 2** – Efeito relaxante do RL-OE em anéis de aorta de rato pré-contraídos com  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina na presença ( $\nabla$ ) e na ausência ( $\blacktriangledown$ ) de endotélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 1** – Valores de  $E_{max}$  (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina em anéis de aorta de rato.

Óleo essencial	$E_{max}$ (%)			
	[OE] $\mu\text{g/mL}$	E+ (n)	[OE] $\mu\text{g/mL}$	E- (n)
XL-OE	729	$31,7 \pm 6,1$ (3)	729	$37,0 \pm 2,0$ (3)
XF-OE	729	$96,8 \pm 1,9$ (5) <sup>a,b</sup>	729	$58,9 \pm 13,2$ (3)
RL-OE	729	$95,6 \pm 1,8$ (5) <sup>c</sup>	729	$100$ (5) <sup>d,e,f</sup>

Teste  $t$ ; <sup>a</sup> $p < 0,01$  [XF-OE (E+) vs. XF-OE (E-)]; <sup>b</sup> $p < 0,001$  [XF-OE (E+) vs. XL-OE (E+)]; <sup>c</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E+) vs. XL-OE (E+)]; <sup>d</sup> $p < 0,05$  [RL-OE (E-) vs. RL-OE (E+)]; <sup>e</sup> $p < 0,01$  [RL-OE (E-) vs. XF-OE (E-)]; <sup>f</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E-) vs. XL-OE (E-)]; OE = óleo essencial; E+ = presença de endotélio; E- = ausência de endotélio; n = nº de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 2** – Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $3 \times 10^{-7}$  M de fenilefrina em anéis de aorta de rato.

Óleo essencial	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	E+ (n)	E- (n)
XL-OE	Nd	Nd
XF-OE	$266,0 \pm 32,2$ (5)	Nd
RL-OE	$95,5 \pm 14,4^{**}$ (5)	$108,1 \pm 21,9$ (5)

Teste  $t$ ; <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$  [XF-OE (E+) vs. RL-OE (E+)]. E+ = presença de endotélio; E- = ausência de endotélio; Nd = não determinado, n = nº de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

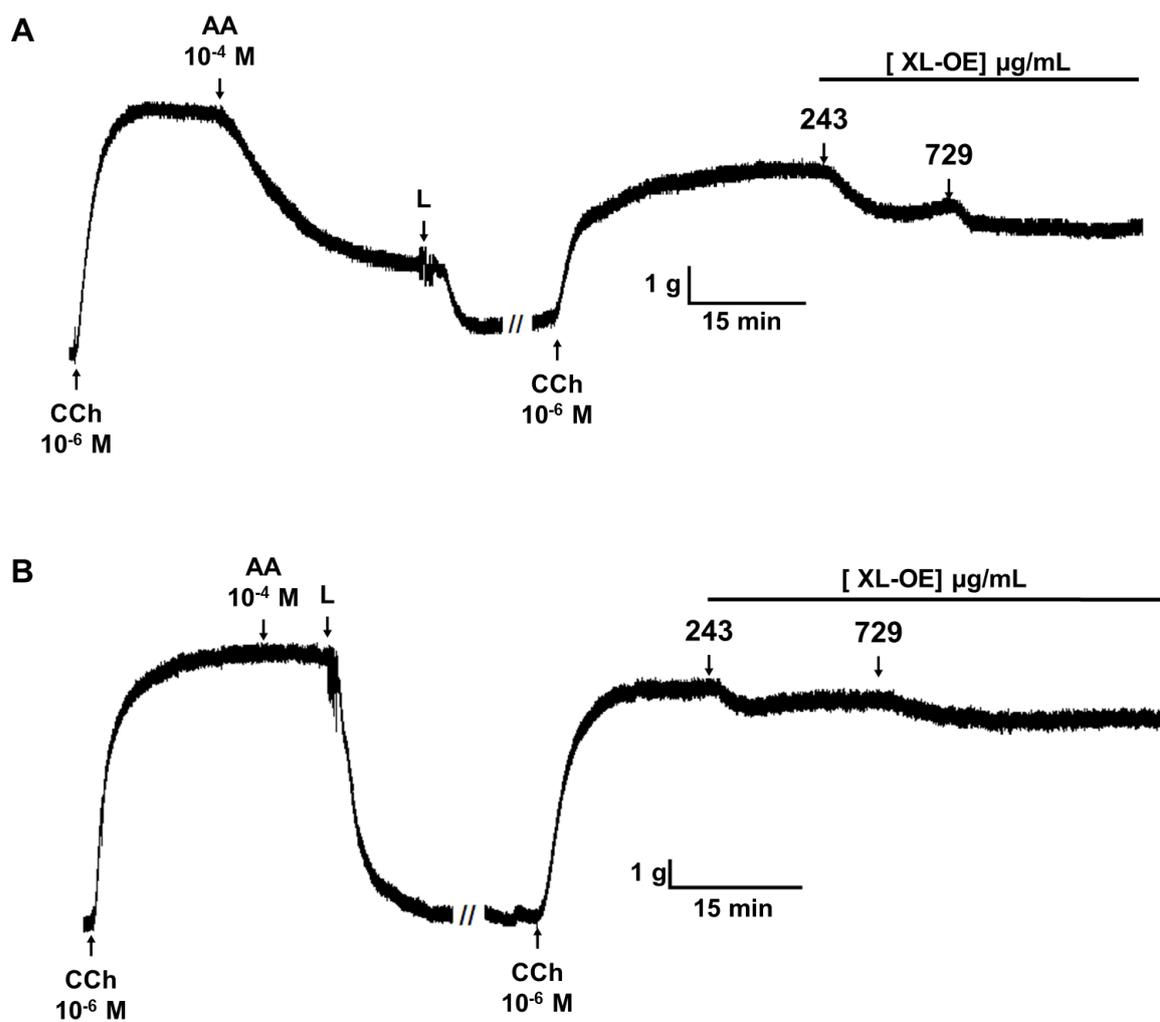
### 5.1.2 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia de cobaia

O XL-OE (243 e 729  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi equieficaz em relaxar os anéis de traqueia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de CCh na presença ( $24,9 \pm 9,8$  e  $32,8 \pm 6,7\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) e na ausência ( $2,4 \pm 1,7$  e  $15,3 \pm 2,5\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) de epitélio funcional (Figura 18 e Tabela 3).

O XF-OE (243 e 729  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi equieficaz em relaxar os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh na presença ( $37,4 \pm 7,4$  e  $30,8 \pm 1,6\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) e na ausência ( $11,9 \pm 2,1$  e  $33,6 \pm 3,9\%$ , respectivamente,  $n = 3$ ) de epitélio funcional (Figura 19 e Tabela 3).

O RL-OE (0,1-729  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) relaxou de maneira significativa, dependente de concentração, equieficaz e equipotente os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh tanto na presença ( $\text{CE}_{50} = 125,7 \pm 27,2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $n = 5$ ) como na ausência ( $\text{CE}_{50} = 101,7 \pm 22,6$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $n = 5$ ) de epitélio funcional (Figura 20, Gráfico 3 e Tabela 4) e atingindo o  $E_{\text{max}}$  de  $97,8 \pm 2,2$  e  $100\%$ , respectivamente (Tabela 3).

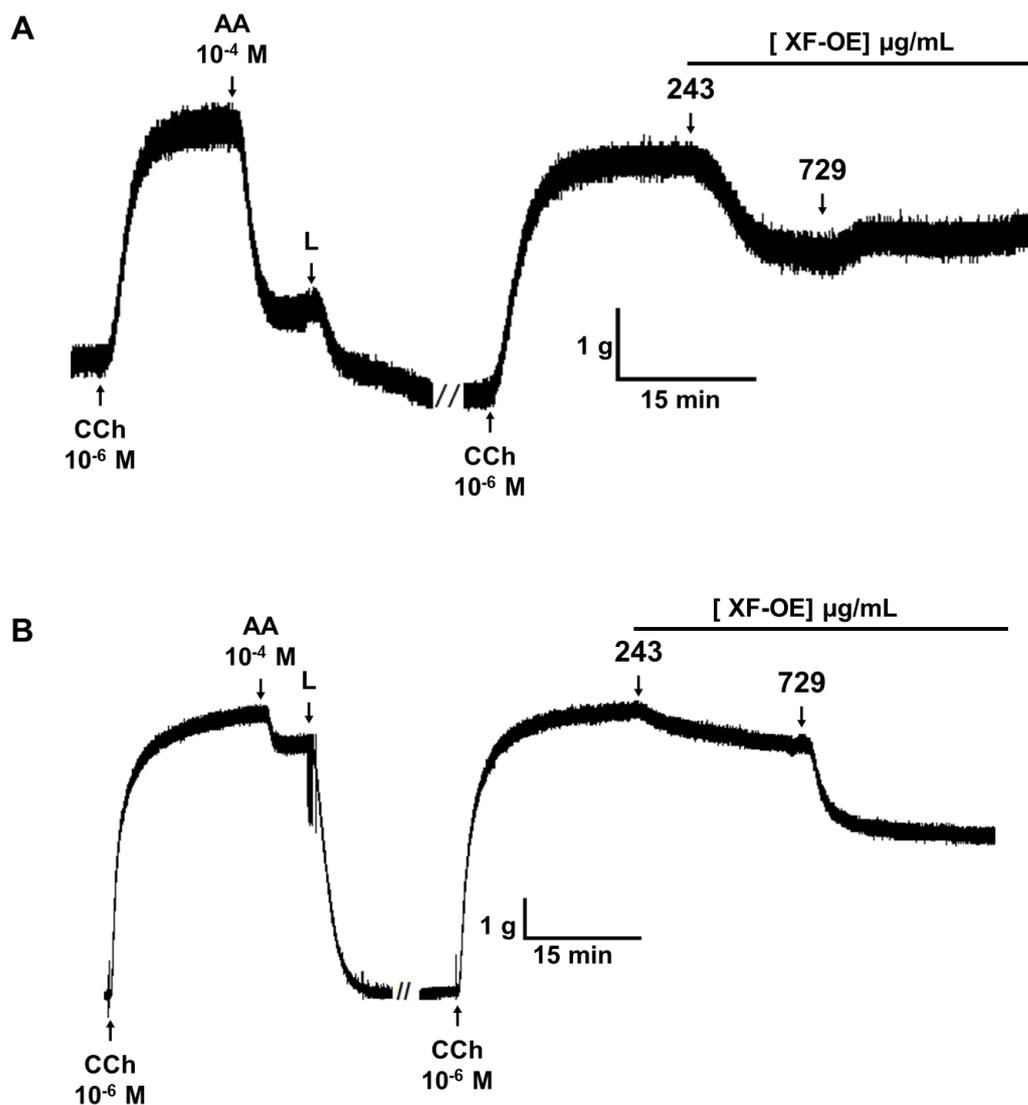
**Figura 18** – Registros típicos do efeito relaxante do XL-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

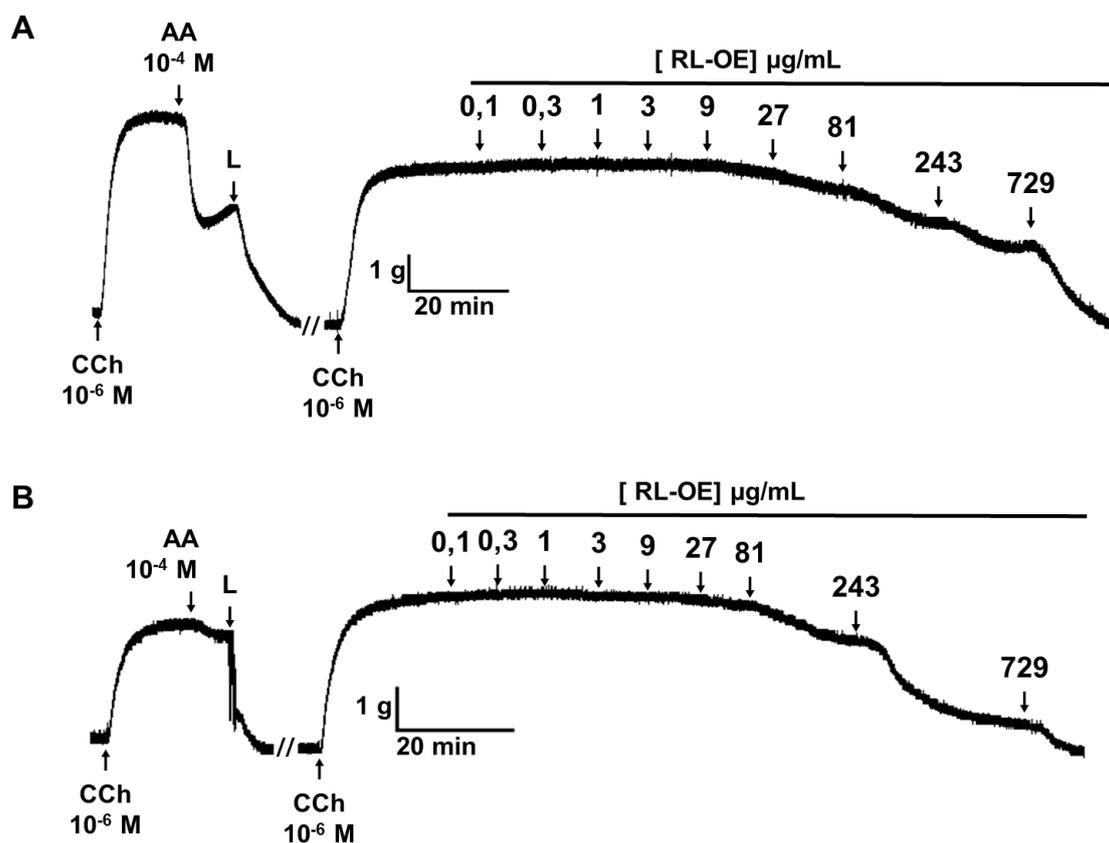
**Figura 19** – Registros típicos do efeito relaxante do XF-OE em anéis de traqueia de cobraia pré-contráidos com  $10^{-6}$  M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

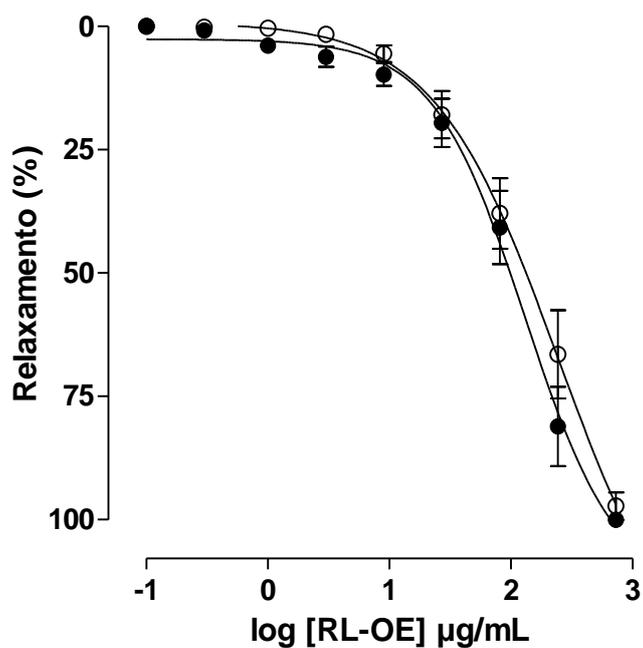
**Figura 20** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE em anéis de traqueia de cobraia pré-contráidos com  $10^{-6}$  M de carbacol na presença (A) e na ausência (B) de epitélio funcional.



CCh = carbacol, AA = ácido araquidônico, L = lavagem.

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 3** – Efeito relaxante do RL-OE em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com  $10^{-6}$  M de carbacol na presença (○) e na ausência (●) de epitélio funcional.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 3** – Valores de  $E_{max}$  (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol em anéis de traqueia de cobaia.

Óleo essencial	[OE] $\mu\text{g/mL}$	$E_{max}$ (%)		
		E+ (n)	[OE] $\mu\text{g/mL}$	E- (n)
XL-OE	729	32,8 $\pm$ 6,7 (3)	729	15,3 $\pm$ 2,5 (3)
XF-OE	243	37,4 $\pm$ 7,4 (3)	729	33,6 $\pm$ 3,9 (3) <sup>c</sup>
RL-OE	729	97,8 $\pm$ 2,2 (5) <sup>a,b</sup>	729	100 (5) <sup>d,e</sup>

Teste *t*, <sup>a</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E+) vs. XL-OE (E+)]; <sup>b</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E+) vs. XF-OE (E+)]; <sup>c</sup> $p < 0,01$  [XF-OE (E-) vs. XL-OE (E-)]; <sup>d</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E-) vs. XL-OE (E-)]; <sup>e</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (E-) vs. XF-OE (E-)]; OE = óleo essencial; E+ = presença de epitélio; E- = ausência de epitélio; n = n<sup>o</sup> de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 4** – Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol em anéis de traqueia de cobaia.

Óleo essencial	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	E+ (n)	E- (n)
XL-OE	Nd	Nd
XF-OE	Nd	Nd
RL-OE	125,7 $\pm$ 27,2 (5)	101,7 $\pm$ 22,6 (5)

E+ = presença de epitélio; E- = ausência de epitélio; Nd = não determinado; n = n<sup>o</sup> de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

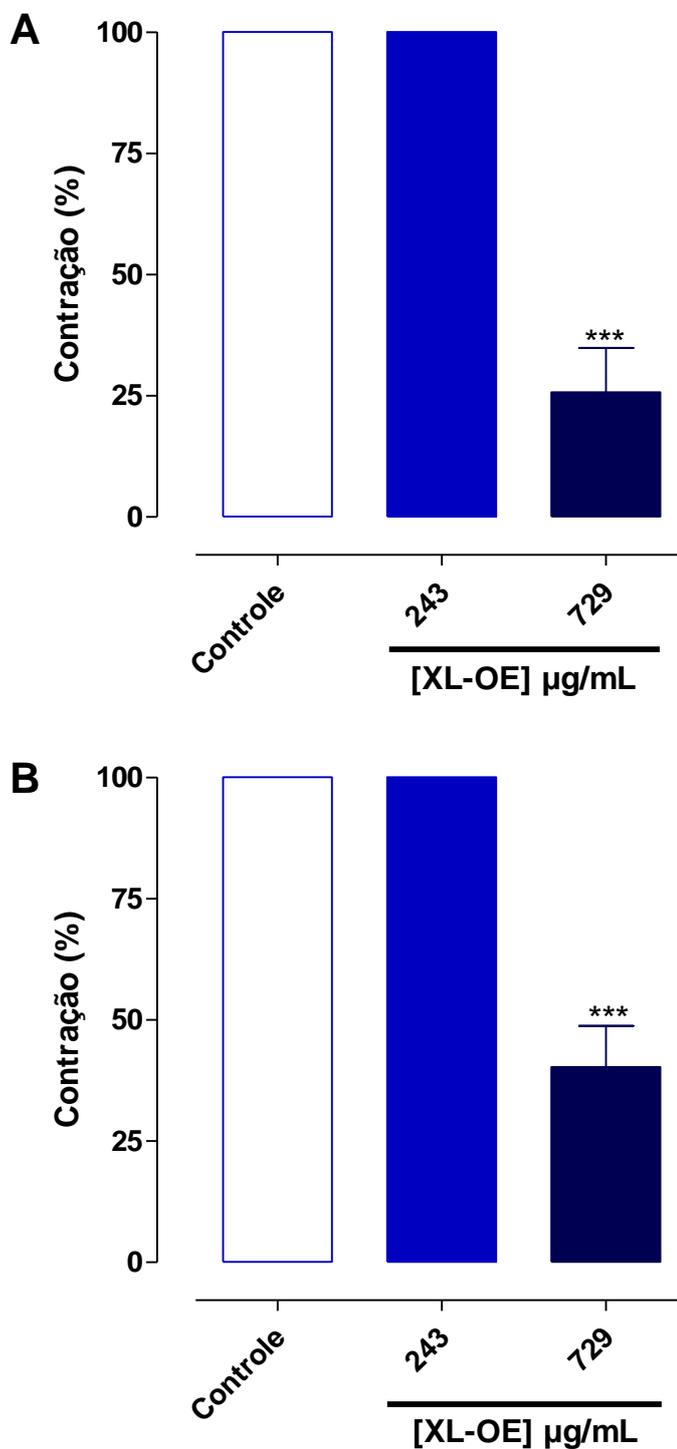
### 5.1.3 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero de rata

O XL-OE apresentou efeito tocolítico apenas na concentração de 729  $\mu\text{g/mL}$ , antagonizando de maneira significativa e equieficaz as contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina ( $E_{\text{max}} = 74,3 \pm 9,1\%$ ,  $n = 3$ ) e por  $10^{-5}$  M de CCh ( $E_{\text{max}} = 59,7 \pm 8,5\%$ ,  $n = 3$ ) (Gráfico 4 e Tabela 5) em útero de rata.

Os óleos essenciais XF-OE (27-729  $\mu\text{g/mL}$ ) e RL-OE (3-249  $\mu\text{g/mL}$ ) antagonizaram as contrações fásicas induzidas por ocitocina e por CCh em útero de rata (Gráfico 5 e 6) de maneira significativa, equieficazes e dependente de concentração. Os valores de  $E_{\text{max}}$  para o XF-OE e o RL-OE foram de  $97,2 \pm 1,3\%$  ( $n = 5$ ) e  $100\%$  ( $n = 5$ ), respectivamente, frente à ocitocina e  $94,6 \pm 3,0\%$  ( $n = 5$ ) e  $99,9 \pm 0,1\%$  ( $n = 5$ ), respectivamente, frente ao CCh (Tabela 5) e os valores de  $CI_{50}$  para o XF-OE e o RL-OE foram de  $189,3 \pm 18,2$  e de  $20,6 \pm 3,3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente à ocitocina e  $370,3 \pm 33,1$  ( $n = 3$ ) e  $87,1 \pm 1,0$   $\mu\text{g/mL}$  ( $n = 5$ ), respectivamente, frente ao CCh (Tabela 6).

Analisando os valores de  $E_{\text{max}}$  e  $CI_{50}$  entre os três óleos essenciais, observou-se que o XL-OE foi o menos eficaz. Quanto aos valores de  $CI_{50}$  dos óleos XF-OE e RL-OE, frente aos agonistas testados, observou-se que ambos os óleos essenciais apresentaram uma maior potência (aproximadamente 2 e 4 vezes, respectivamente) em antagonizar as contrações induzidas por ocitocina que por CCh. O RL-OE foi o óleo essencial mais potente para ambos os agonistas testados.

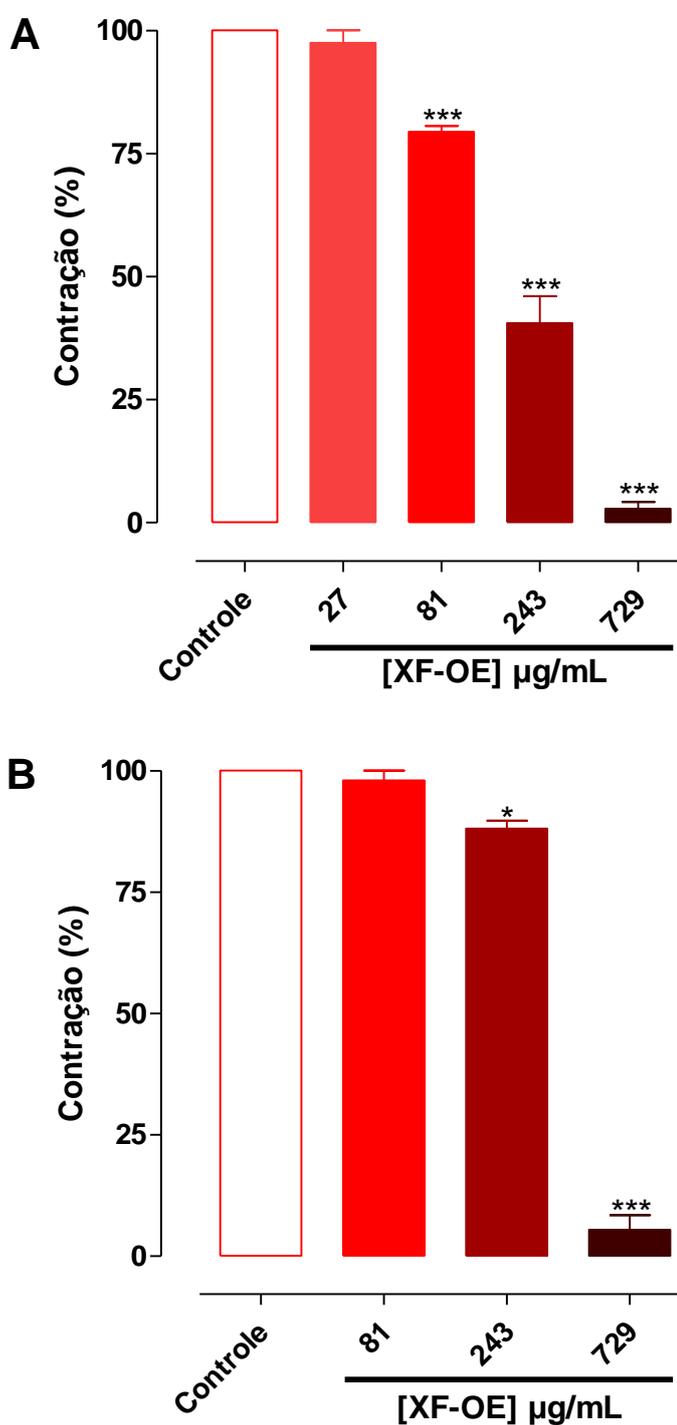
**Gráfico 4** – Efeito do XL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-5}$  M de carbacol (B) em útero de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 3$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. XL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

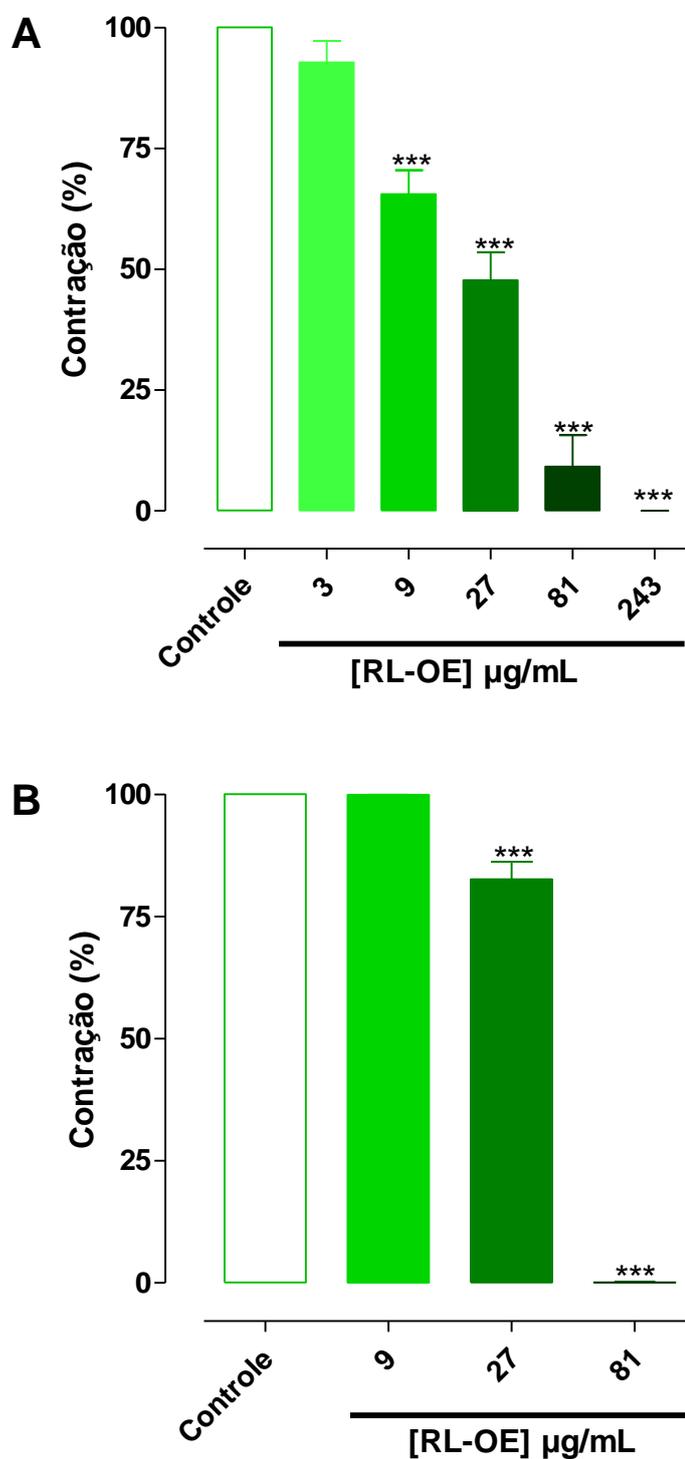
**Gráfico 5** – Efeito do XF-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-5}$  M de carbacol (B) em útero de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$  (A) e  $n = 3$  (B). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. XF-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 6** – Efeito do RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina (A) e por  $10^{-5}$  M de carbacol (B) em útero de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. RL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 5** – Valores de  $E_{max}$  (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina e por  $10^{-5}$  M de carbacol em útero de rata.

Óleo essencial	$E_{max}$ (%)			
	[OE] $\mu\text{g/mL}$	OCI (n)	[OE] $\mu\text{g/mL}$	CCh (n)
XL-OE	729	74,3 $\pm$ 9,1 (3)	729	59,7 $\pm$ 8,5 (3)
XF-OE	729	97,2 $\pm$ 1,3 (5) <sup>a</sup>	729	94,6 $\pm$ 3,0 (5) <sup>c</sup>
RL-OE	243	100 (5) <sup>b</sup>	81	99,9 $\pm$ 0,1 (5) <sup>d</sup>

Teste  $t$ ; <sup>a</sup> $p < 0,01$  [XF-OE (OCI) vs. XL-OE (OCI)]; <sup>b</sup> $p < 0,01$  [RL-OE (OCI) vs. XL-OE (OCI)]; <sup>c</sup> $p < 0,001$  [XF-OE (CCh) vs. XL-OE (CCh)]; <sup>d</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (CCh) vs. XL-OE (CCh)]; OE = óleo essencial; n = nº de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 6** – Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-2}$  UI/mL de ocitocina e por  $10^{-5}$  M de carbacol em útero de rata.

Óleo essencial	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	OCI (n)	CCh (n)
XL-OE	Nd	Nd
XF-OE	189,3 $\pm$ 18,2 <sup>a,c</sup> (5)	370,3 $\pm$ 33,1 <sup>b,c</sup> (5)
RL-OE	20,6 $\pm$ 3,3 <sup>a,d</sup> (5)	87,1 $\pm$ 1,0 <sup>b,d</sup> (5)

Teste  $t$ ; <sup>a</sup> $p < 0,001$  [XF-OE (OCI) vs. RL-OE (OCI)]; <sup>b</sup> $p < 0,001$  [XF-OE (CCh) vs. RL-OE (CCh)]; <sup>c</sup> $p < 0,001$  [XF-OE (OCI) vs. XF-OE (CCh)]; <sup>d</sup> $p < 0,001$  [RL-OE (OCI) vs. RL-OE (CCh)]; Nd = não determinado; n = nº de experimentos (animais).

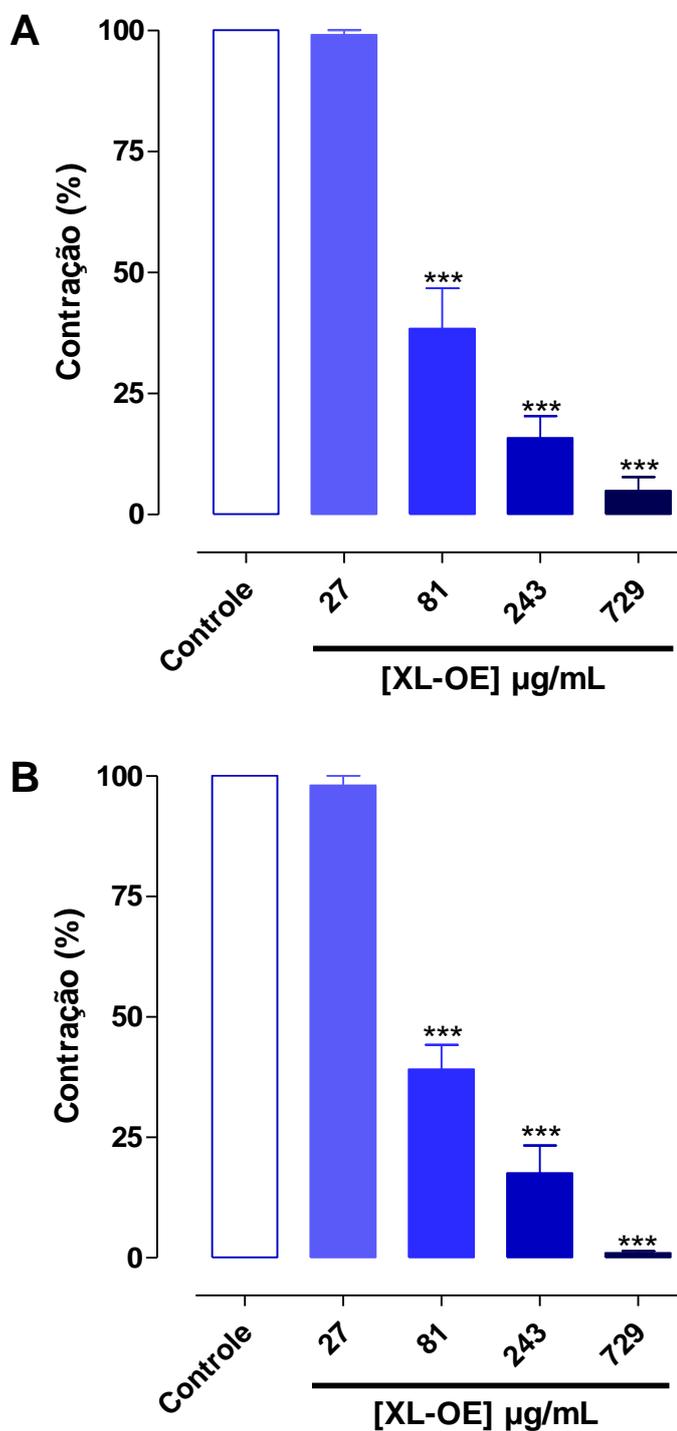
Fonte: Autor, 2013.

#### 5.1.4 Efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por histamina em íleo de cobaia

Todos os óleos essenciais, o XL-OE (27-729  $\mu\text{g/mL}$ ), o XF-OE (3-729  $\mu\text{g/mL}$ ) e o RL-OE (0,3-243  $\mu\text{g/mL}$ ), antagonizaram as contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol e de histamina em íleo de cobaia (Gráficos 7, 8 e 9,  $n = 5$ ) de maneira significativa e dependente de concentração. Os valores de  $E_{\text{max}}$  foram  $95,1 \pm 2,8$ ;  $97,2 \pm 1,3$  e  $100\%$ , respectivamente, frente ao carbacol e  $99,0 \pm 0,4$ ;  $94,6 \pm 3,0$  e  $99,9 \pm 0,1\%$ , respectivamente, frente à histamina (Tabela 7) e os valores de  $CI_{50}$  foram  $83,3 \pm 15,6$ ;  $74,0 \pm 8,1$  e  $49,4 \pm 5,1$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente ao carbacol e  $81,8 \pm 11,2$ ;  $38,1 \pm 2,6$  e  $3,1 \pm 0,4$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente à histamina (Tabela 8).

Analisando os valores de  $E_{\text{max}}$  e  $CI_{50}$  dos três óleos essenciais, observou-se que foram equieficazes em antagonizar as contrações induzidas pelos dois agonistas testados. Quanto ao parâmetro de potência, o XL-OE foi equipotente em antagonizar as contrações induzidas pelos dois agonistas testados. Por outro lado, o XF-OE e o RL-OE apresentaram maior potência em antagonizar as contrações induzidas por histamina quando comparadas com carbacol, em aproximadamente 2 vezes e 16 vezes, respectivamente. Quando os três óleos essenciais foram comparados em relação às contrações induzidas por carbacol se mostraram equipotentes. No entanto, em relação às contrações induzidas por histamina, o RL-OE foi o mais potente, aproximadamente 26 vezes quando comparado ao XL-OE e 12 vezes quando comparado ao XF-OE.

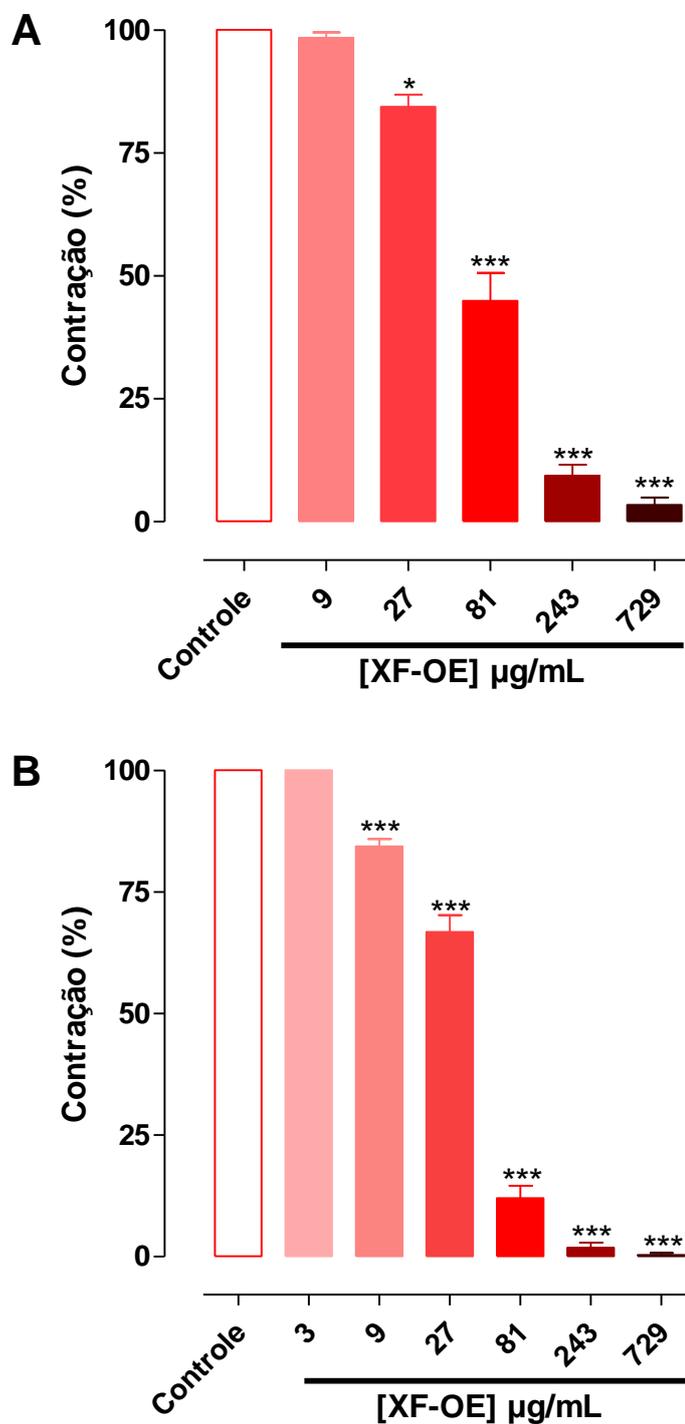
**Gráfico 7** – Efeito do XL-OE frente às contrações físicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. XL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

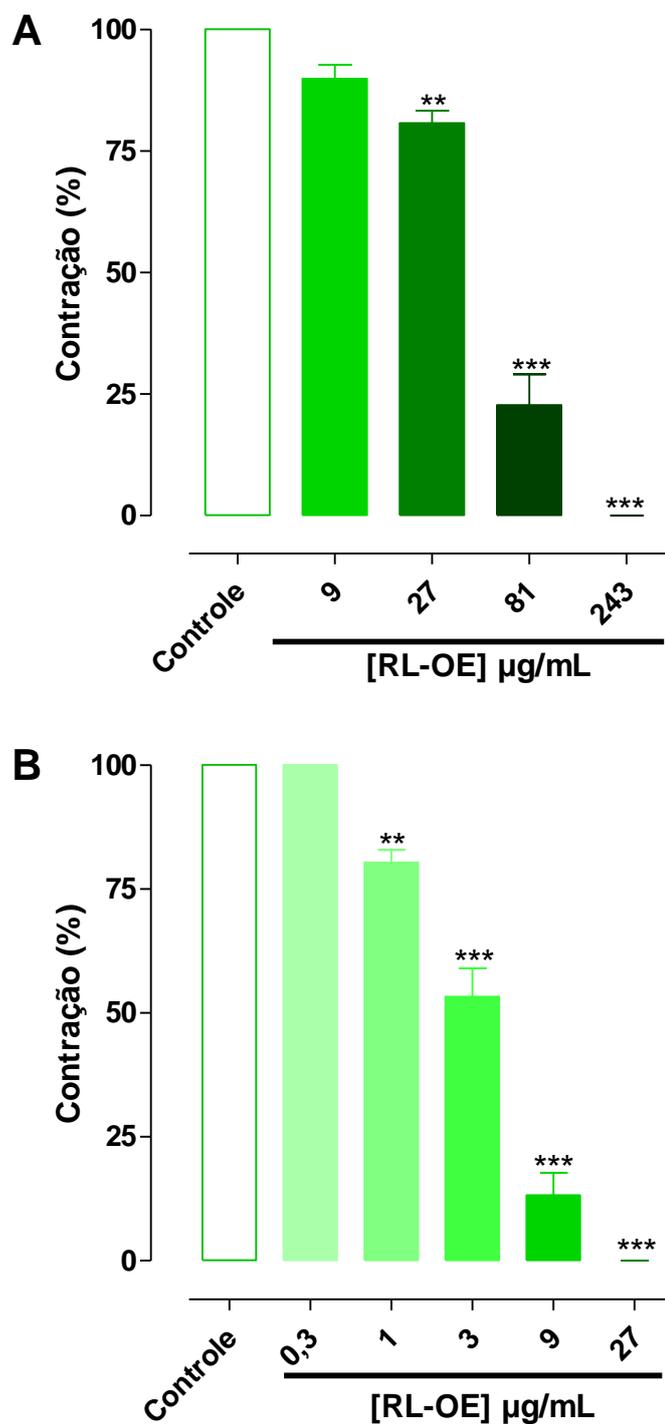
**Gráfico 8** – Efeito do XF-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. XF-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 9** – Efeito do RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol (A) e de histamina (B) em íleo de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. RL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 7** – Valores de  $E_{max}$  (%) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol e de histamina em íleo de cobaia.

Óleo essencial	$E_{max}$ (%)			
	[OE] $\mu\text{g/mL}$	CCh (n)	[OE] $\mu\text{g/mL}$	Histamina (n)
XL-OE	729	95,1 $\pm$ 2,8 (5)	729	99,0 $\pm$ 0,4 (5)
XF-OE	729	97,2 $\pm$ 1,3 (5)	729	94,6 $\pm$ 3,0 (5)
RL-OE	243	100 (5)	27	99,9 $\pm$ 0,1 (5)

OE = óleo essencial; n = nº de experimentos (animais).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 8** – Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por  $10^{-6}$  M de carbacol e de histamina em íleo de cobaia.

Óleo essencial	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	CCh (n)	Histamina (n)
XL-OE	83,3 $\pm$ 15,6 (5)	81,8 $\pm$ 11,2 <sup>c,d</sup> (5)
XF-OE	74,0 $\pm$ 8,1 <sup>a</sup> (5)	38,0 $\pm$ 2,4 <sup>a,c,e</sup> (5)
RL-OE	49,4 $\pm$ 5,1 <sup>b,c</sup> (5)	3,1 $\pm$ 0,4 <sup>b,d,e</sup> (5)

Teste  $t$ , <sup>a</sup>  $p < 0,001$  [XF-OE (CCh) vs. XF-OE (histamina)]; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  [RL-OE (CCh) vs. RL-OE (histamina)]; <sup>c</sup>  $p < 0,01$  [XL-OE (histamina) vs. XF-OE (histamina)]; <sup>d</sup>  $p < 0,001$  [XL-OE (histamina) vs. RL-OE (histamina)]; <sup>e</sup>  $p < 0,001$  [XF-OE (histamina) vs. RL-OE (histamina)]; CCh = carbacol; n = nº de experimentos (animais).

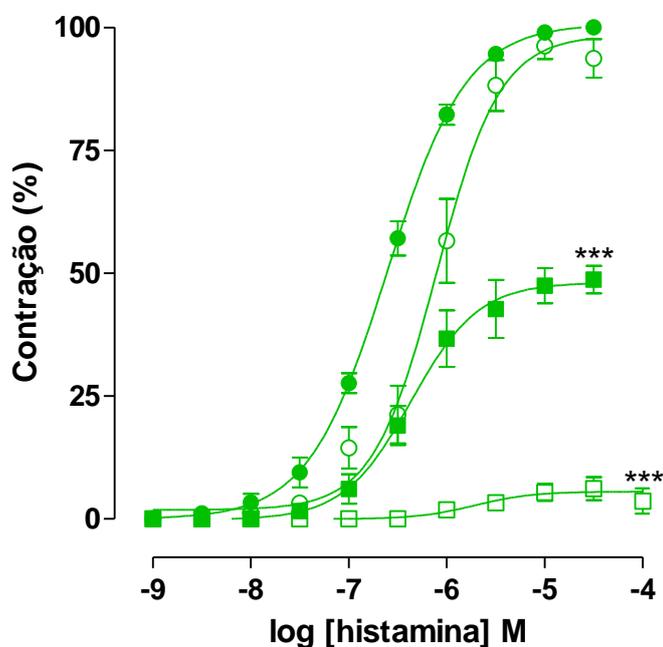
Fonte: Autor, 2013.

## 5.2 Investigação do mecanismo de ação do RL-OE em íleo de cobaia

### 5.2.1 Caracterização do bloqueio da contração induzida por histamina

O RL-OE (9, 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) inibiu de maneira significativa e dependente de concentração as contrações induzidas por histamina (Gráfico 10). As curvas cumulativas à histamina foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do  $E_{\text{max}}$  de 100% (controle) para  $96,2 \pm 2,6$ ;  $48,7 \pm 2,8$  e  $6,8 \pm 2,3\%$ , respectivamente (Gráfico 10 e Tabela 9). Os valores de  $CE_{50}$  da histamina passaram de  $2,5 \pm 0,2 \times 10^{-7}$  M (controle) para  $7,9 \pm 1,8$  e  $6,9 \pm 3,4 \times 10^{-7}$  M, nas concentrações de 9 e 27  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabela 9).

**Gráfico 10** – Curvas concentrações-resposta cumulativas à histamina na ausência (controle) (●) e na presença de RL-OE nas concentrações de 9 (○); 27 (■) e 81 (□) µg/mL em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni,  $***p < 0,001$  (controle vs. RL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 9** – Valores de  $E_{max}$  (%) e de  $CE_{50}$  (M) da histamina na ausência (controle) e na presença do RL-OE em íleo de cobaia ( $n = 5$ ).

RL-OE (µg/mL)	$E_{max}$ (%)	$CE_{50}$ (M)
Controle	100	$2,5 \pm 0,2 \times 10^{-7}$
9	$96,2 \pm 2,6$	$7,9 \pm 1,8 \times 10^{-7} *$
27	$48,7 \pm 2,8 ***$	$6,9 \pm 3,4 \times 10^{-7}$
81	$6,8 \pm 2,3 ***$	Nd

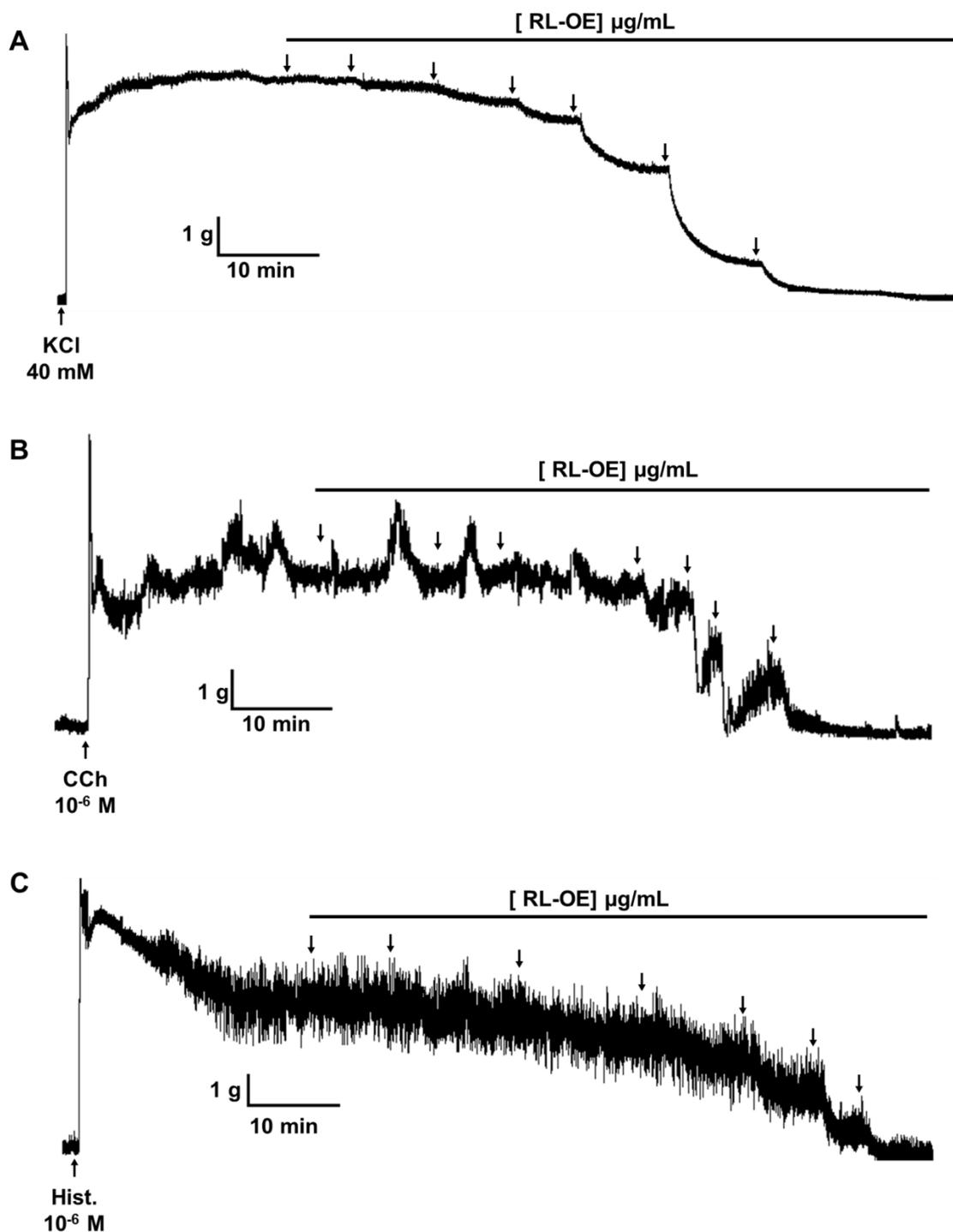
Teste *t*,  $*p < 0,05$  e  $***p < 0,001$  (controle vs. RL-OE); Nd = não determinado.

Fonte: Autor, 2013.

### 5.2.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, por carbacol ou por histamina

O RL-OE (0,1-243 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração e significativa o íleo de cobaia (Figura 21) pré-contraído por 40 mM de KCl ( $CE_{50} = 10,1 \pm 1,1$  µg/mL) e por  $10^{-6}$  M de CCh ( $CE_{50} = 11,6 \pm 2,1$  µg/mL) ou de histamina ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3$  µg/mL). Analisando os valores de  $CE_{50}$  pode ser observado que o RL-OE foi 1,5 e 1,75 vezes mais potente em relaxar as contrações tônicas induzidas por histamina quando comparadas ao KCl e ao CCh, respectivamente (Tabela 10). Os valores de  $E_{max}$  (100%) do RL-OE foram atingidos na concentração de 81 µg/mL para as contrações induzidas por histamina e de 243 µg/mL para as contrações induzidas por KCl ou CCh (Gráfico 11 e Tabela 10).

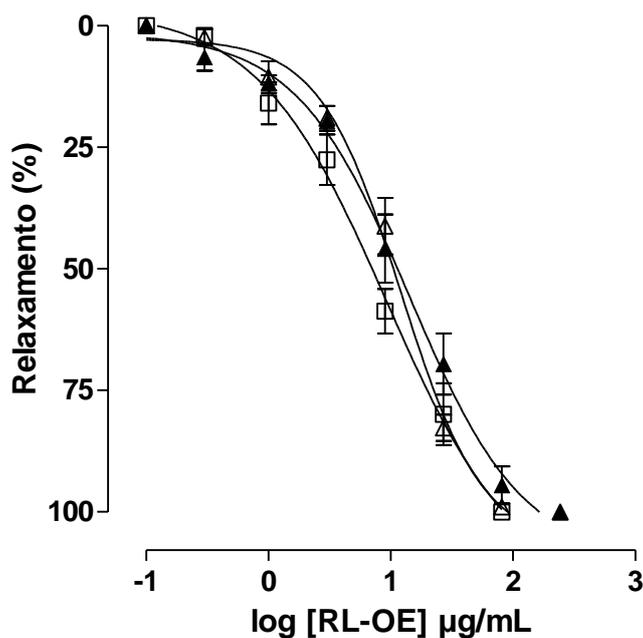
**Figura 21** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl (**A**),  $10^{-6}$  M de carbacol (**B**) e de histamina (**C**) em íleo de cobaia.



CCh = carbacol, Hist. = histamina e as setas para baixo representam as concentrações cumulativas de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL do RL-OE, respectivamente.

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 11** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl ( $\Delta$ ),  $10^{-6}$  M de CCh ( $\blacktriangle$ ) e de histamina ( $\square$ ) em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 10** – Valores de  $E_{max}$  (%) e de  $CE_{50}$  (µg/mL) do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl, por  $10^{-6}$  M de carbachol ou por  $10^{-6}$  M histamina em íleo de cobaia ( $n = 5$ ).

Agentes contráteis	$E_{max}$ (%)	$CE_{50}$ (µg/mL)
KCl	100	$10,1 \pm 1,1$
CCh	100	$11,6 \pm 2,1$
histamina	100	$6,6 \pm 0,3^*$

Teste  $t$ ,  $*p < 0,05$  (histamina vs. KCl/CCh).

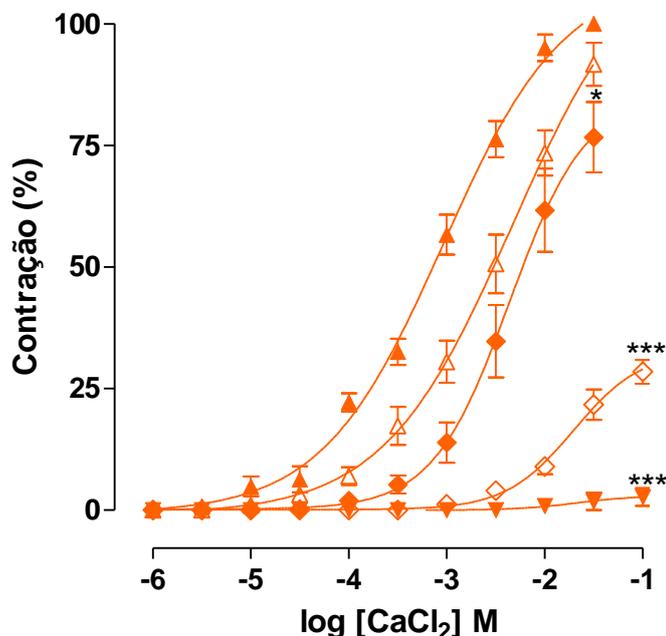
Fonte: Autor, 2013.

### 5.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem ( $Ca_v$ ) no efeito relaxante do RL-OE

#### 5.2.3.1 Efeito do RL-OE frente às contrações induzidas por $CaCl_2$ em meio despolarizante (KCl 70 mM) nominalmente sem $Ca^{2+}$

O RL-OE (3, 9, 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) inibiu de maneira dependente de concentração e significativa as contrações cumulativas induzidas pelo aumento na concentração extracelular de  $CaCl_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $Ca^{2+}$ . As curvas cumulativas ao  $CaCl_2$  foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do  $E_{\text{max}}$  de 100% (controle) para  $91,7 \pm 4,4$ ;  $76,7 \pm 7,3$ ;  $21,7 \pm 3,1$  e  $2,7 \pm 1,8\%$ , respectivamente (Gráfico 12). Os valores de  $CE_{50}$  do  $CaCl_2$  passaram de  $0,7 \pm 0,1 \times 10^{-3}$  M (controle) para  $2,2 \pm 0,3$ ;  $3,9 \pm 0,7$  e  $10,3 \pm 1,3 \times 10^{-3}$  M, respectivamente (Tabela 11).

**Gráfico 12** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência ( $\blacktriangle$ ) e na presença do RL-OE nas concentrações de 3 ( $\triangle$ ), 9 ( $\blacklozenge$ ), 27 ( $\diamond$ ) e 81 ( $\blacktriangledown$ )  $\mu\text{g/mL}$ , em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ . ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. RL-OE).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 11** – Valores de  $E_{\max}$  (%) e de  $CE_{50}$  (M) do  $\text{CaCl}_2$  na ausência (controle) e na presença do RL-OE em íleo de cobaia.

RL-OE ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{\max}$ (%)	$CE_{50}$ (M)
Controle	100	$0,7 \pm 0,1 \times 10^{-3}$
3	$91,7 \pm 4,4$	$2,2 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ **
9	$76,7 \pm 7,3^*$	$3,9 \pm 0,7 \times 10^{-3}$ **
27	$21,7 \pm 3,1^{***}$	$10,3 \pm 1,3 \times 10^{-3}$ ***
81	$2,7 \pm 1,8^{***}$	Nd

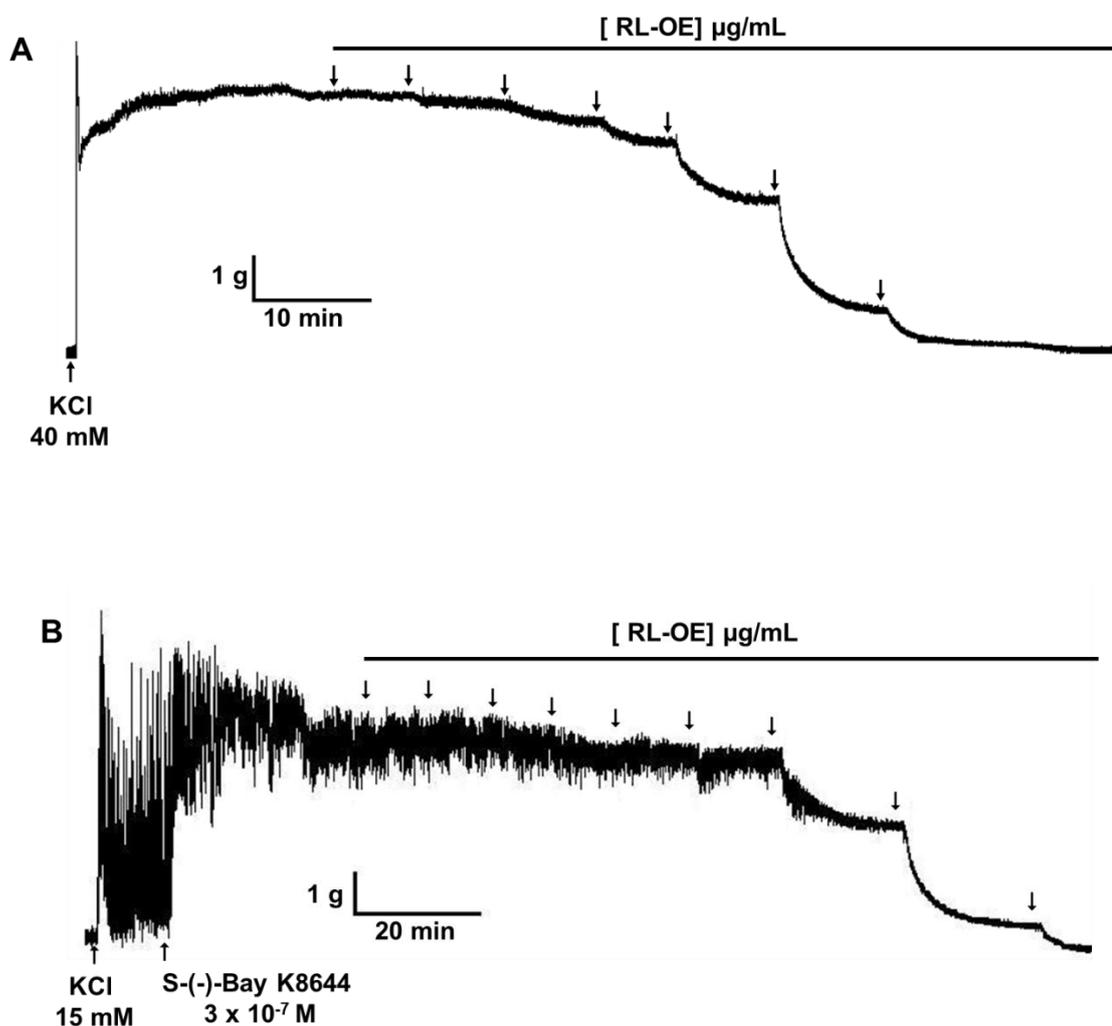
Teste *t*; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (controle vs. RL-OE); Nd = não determinado.

Fonte: Autor, 2013.

### **5.2.3.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644**

A potência relaxante do RL-OE sobre o íleo de cobaia pré-contraído com  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 ( $CE_{50} = 20,4 \pm 4,2$  µg/mL, n = 5), um agonista dos  $Ca_v$ , em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl, foi reduzida em cerca de 2 vezes quando comparado ao íleo pré-contraído por 40 mM de KCl ( $CE_{50} = 10,1 \pm 1,1$  µg/mL, n = 5) (Figura 22 e Gráfico 13).

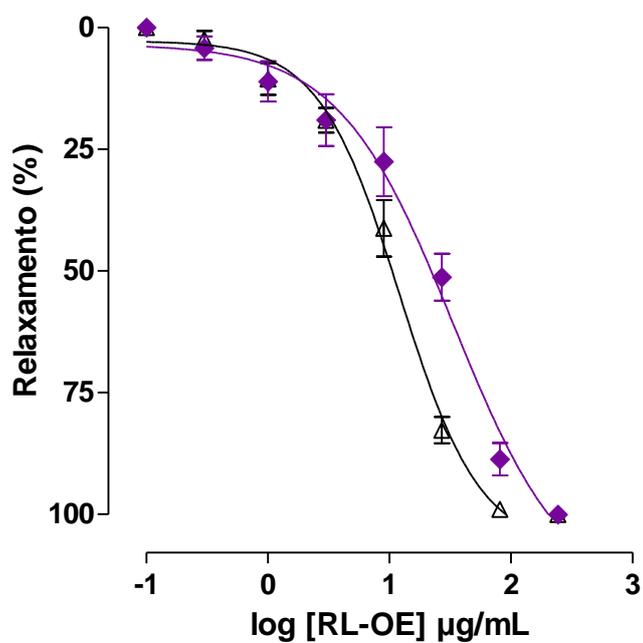
**Figura 22** – Registro típico do efeito relaxante do RL-OE em íleo de cobaia pré-contraído por 40 mM de KCl (**A**) e por  $3 \times 10^{-7}$  M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl (**B**).



As setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (**A**) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729  $\mu\text{g/mL}$  (**B**).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 13** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl ( $\Delta$ ) e por  $3 \times 10^{-7}$  M de S(-)-Bay K8644 ( $\blacklozenge$ ).



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$ .

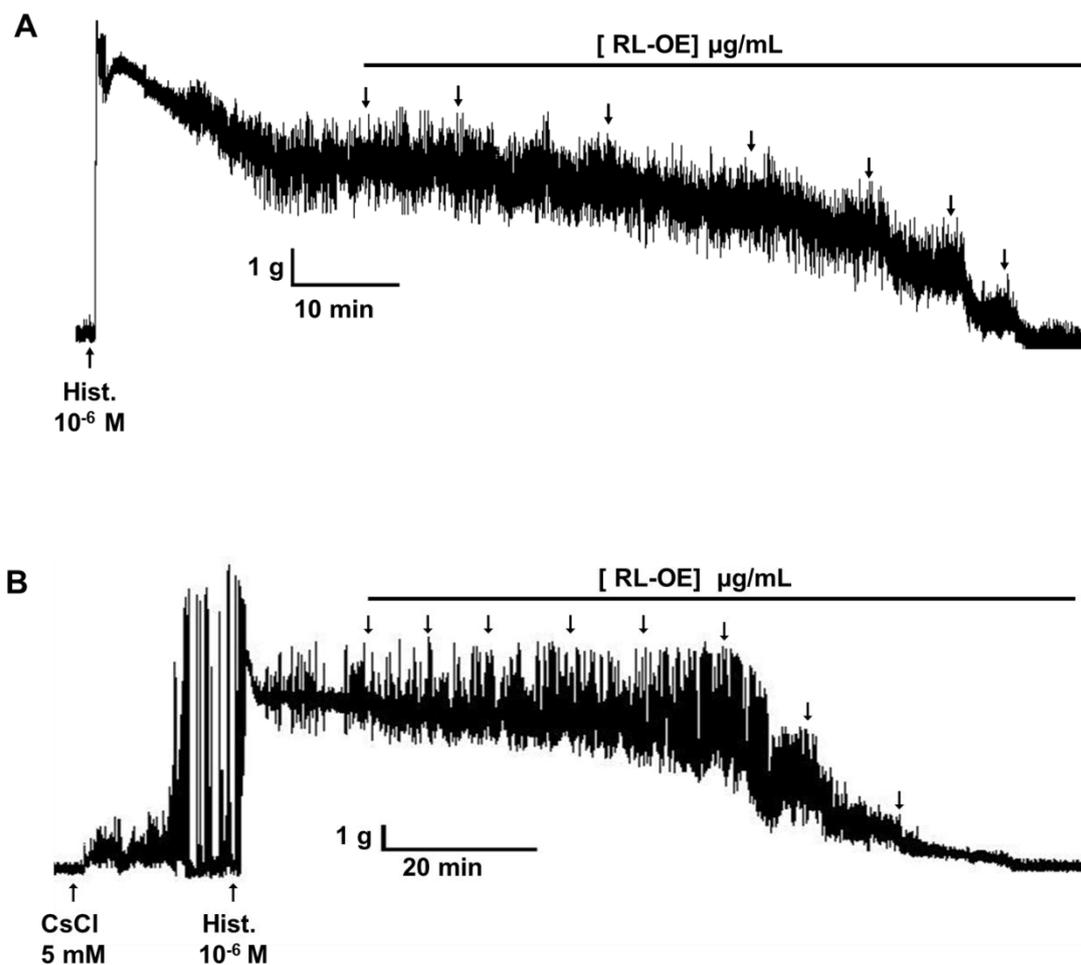
Fonte: Autor, 2013.

#### **5.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do RL-OE**

##### **5.2.4.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na ausência e na presença de cloreto de céσιο (CsCl)**

O RL-OE relaxou o íleo de cobaia pré-contraído por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (0,1-81  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) e na presença (0,1-243  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (Figura 23). A potência relaxante do RL-OE ( $CE_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ) foi reduzida em 3,4 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na ausência de CsCl ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 14 e Tabela 12).

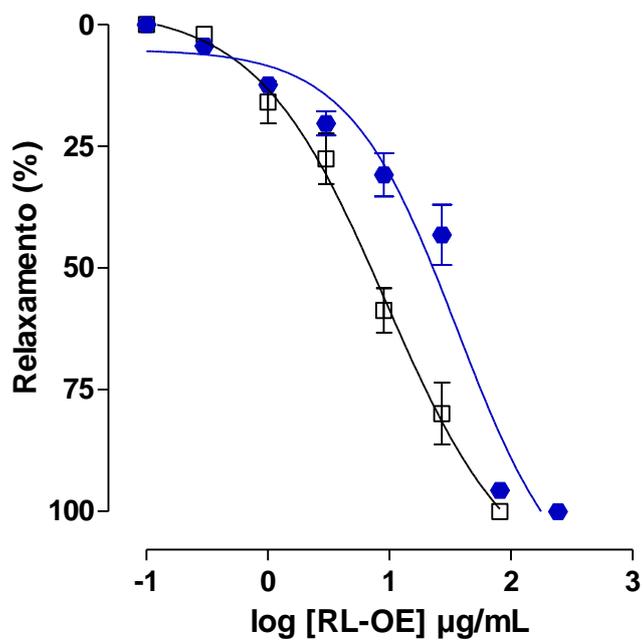
**Figura 23** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em íleo de cobaia.



Hist. = histamina e as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243  $\mu\text{g/mL}$  (B).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 14** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência ( $\square$ ) e na presença ( $\bullet$ ) de 5 mM de CsCl, em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, (n = 5).

Fonte: Autor, 2013.

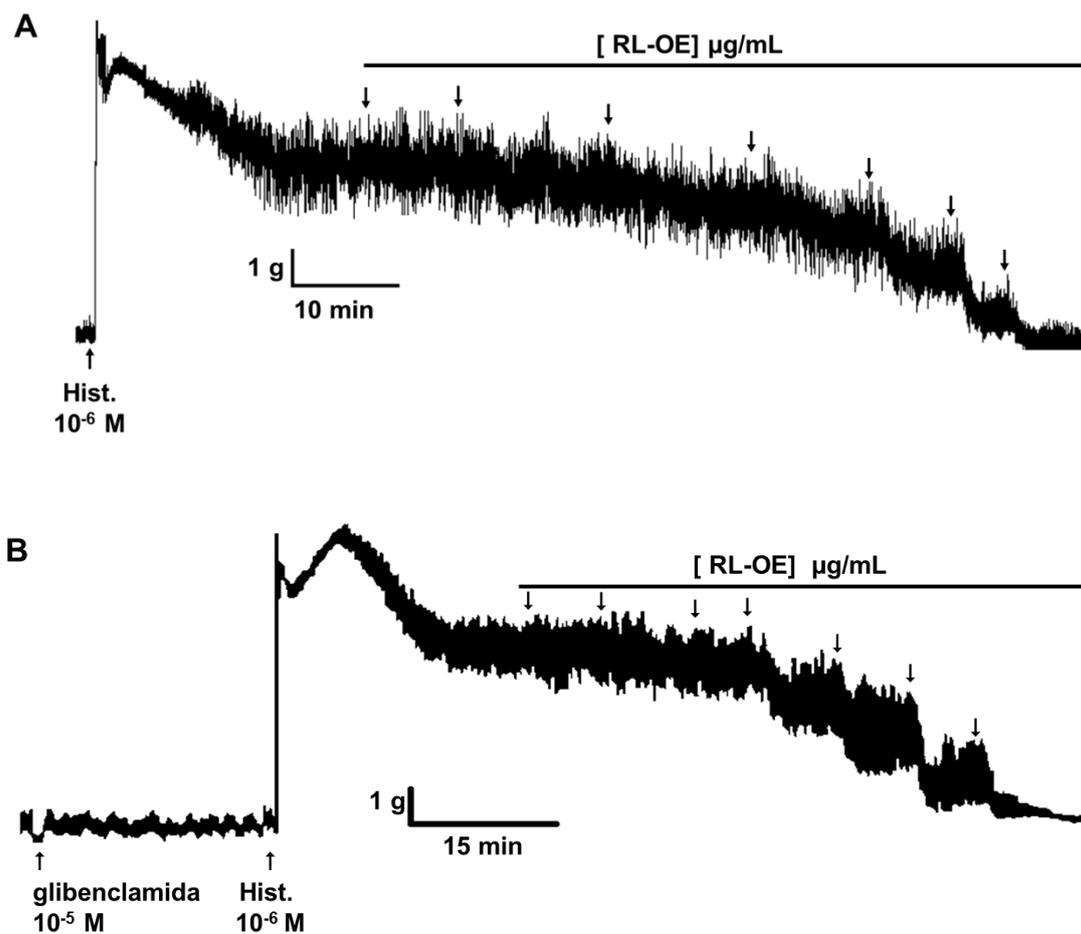
#### 5.2.4.2 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de glibenclamida, apamina, 4-aminopiridina (4-AP), tetraetilamônio (TEA<sup>+</sup>) ou iberiotoxina (IbTX)

O RL-OE (0,1-81 µg/mL) relaxou o íleo de cobaia pré-contraído por 10<sup>-6</sup> M de histamina de maneira significativa e dependente de concentração tanto na ausência (controle) como na presença (0,1-243 µg/mL) de diferentes bloqueadores seletivos de canais de potássio incubados separadamente (Figuras 24-28).

Na presença de 10<sup>-5</sup> M de glibenclamida (bloqueador seletivo dos K<sub>ATP</sub>) e de 100 nM de apamina (bloqueador seletivo dos SK<sub>Ca</sub>) as curvas de relaxamento não foram alteradas quando comparadas as curvas controle (Gráficos 15A e B, respectivamente), enquanto que, na presença de 0,3 mM de 4-AP (bloqueador seletivo dos K<sub>V</sub>), 1 mM de TEA<sup>+</sup> (nessa concentração é um bloqueador seletivo dos BK<sub>Ca</sub>) e 97 nM de IbTX (bloqueador seletivo dos BK<sub>Ca</sub>) as curvas controle foram desviadas para a direita de maneira significativa (Gráficos 15C, D e E, respectivamente).

Além disso, observa-se que a potência relaxante do RL-OE (CE<sub>50</sub> = 6,6 ± 0,3 µg/mL, n = 5) não foi reduzida na presença de 10<sup>-5</sup> M de glibenclamida (CE<sub>50</sub> = 8,0 ± 1,1 µg/mL, n = 5) ou 100 nM de apamina (CE<sub>50</sub> = 6,9 ± 0,5 µg/mL, n = 5), enquanto que, na presença de 0,3 mM de 4-AP (CE<sub>50</sub> = 13,9 ± 0,9 µg/mL, n = 5), 1 mM de TEA<sup>+</sup> (CE<sub>50</sub> = 13,0 ± 1,9 µg/mL, n = 5) ou 97 nM de IbTX (CE<sub>50</sub> = 19,0 ± 0,8 µg/mL, n = 4), a potência relaxante foi reduzida cerca de 2 vezes na presença de 4-AP e 1 mM de TEA<sup>+</sup> e cerca de 3 vezes na presença de IbTX (Tabela 12).

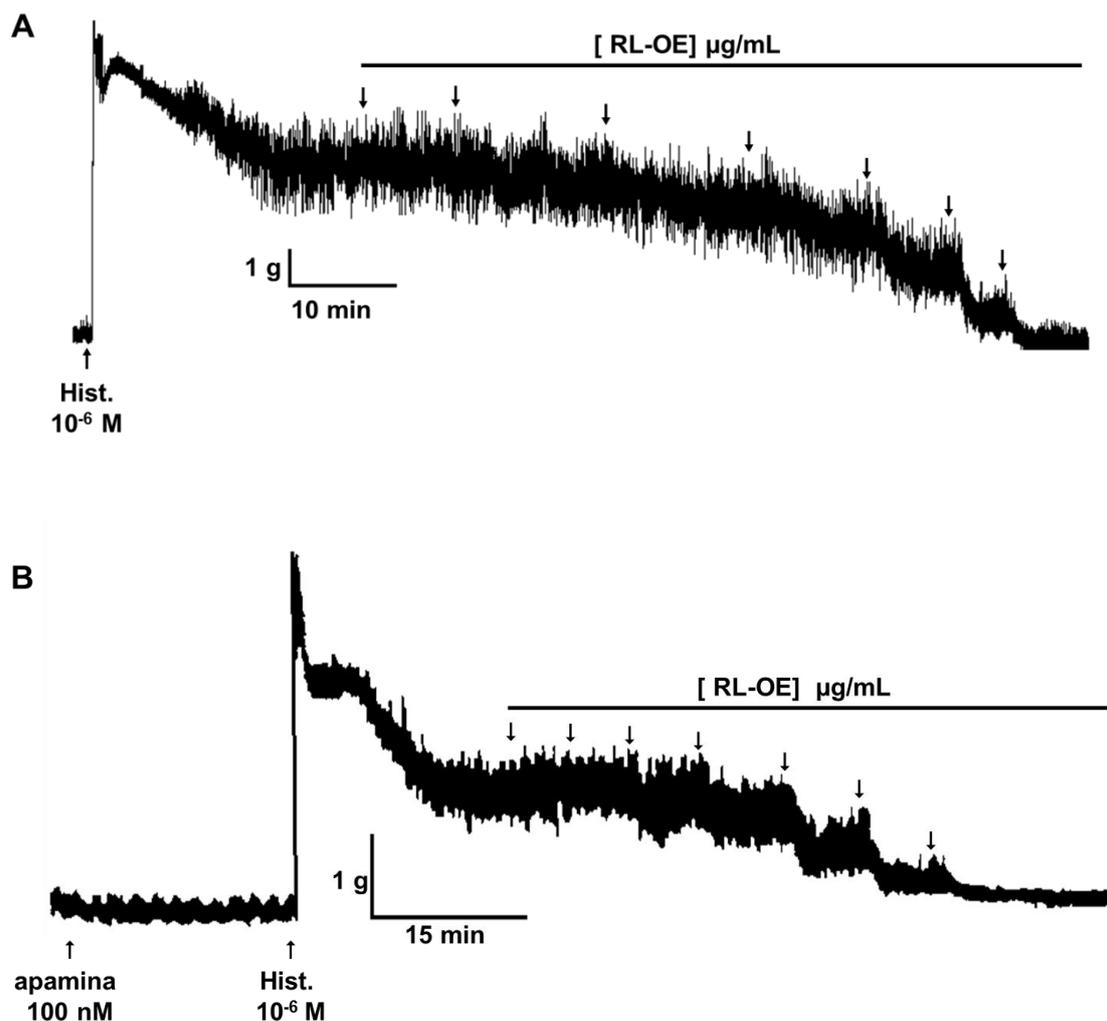
**Figura 24** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de  $10^{-5}$  M de glibenclamida em íleo de cobaia.



Hist. = histamina e as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$ .

Fonte: Autor, 2013.

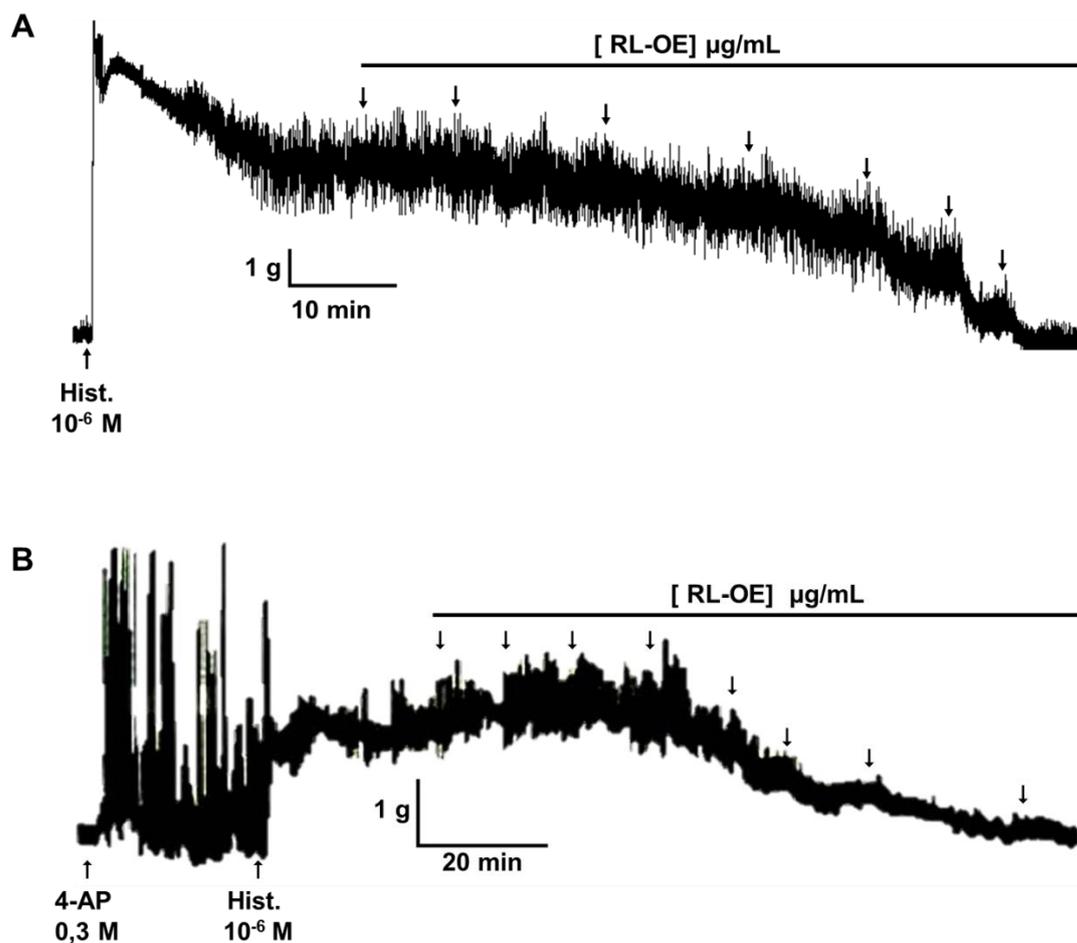
**Figura 25** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 100 nM de apamina em íleo de cobaia.



Hist. = histamina e as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$ .

Fonte: Autor, 2013.

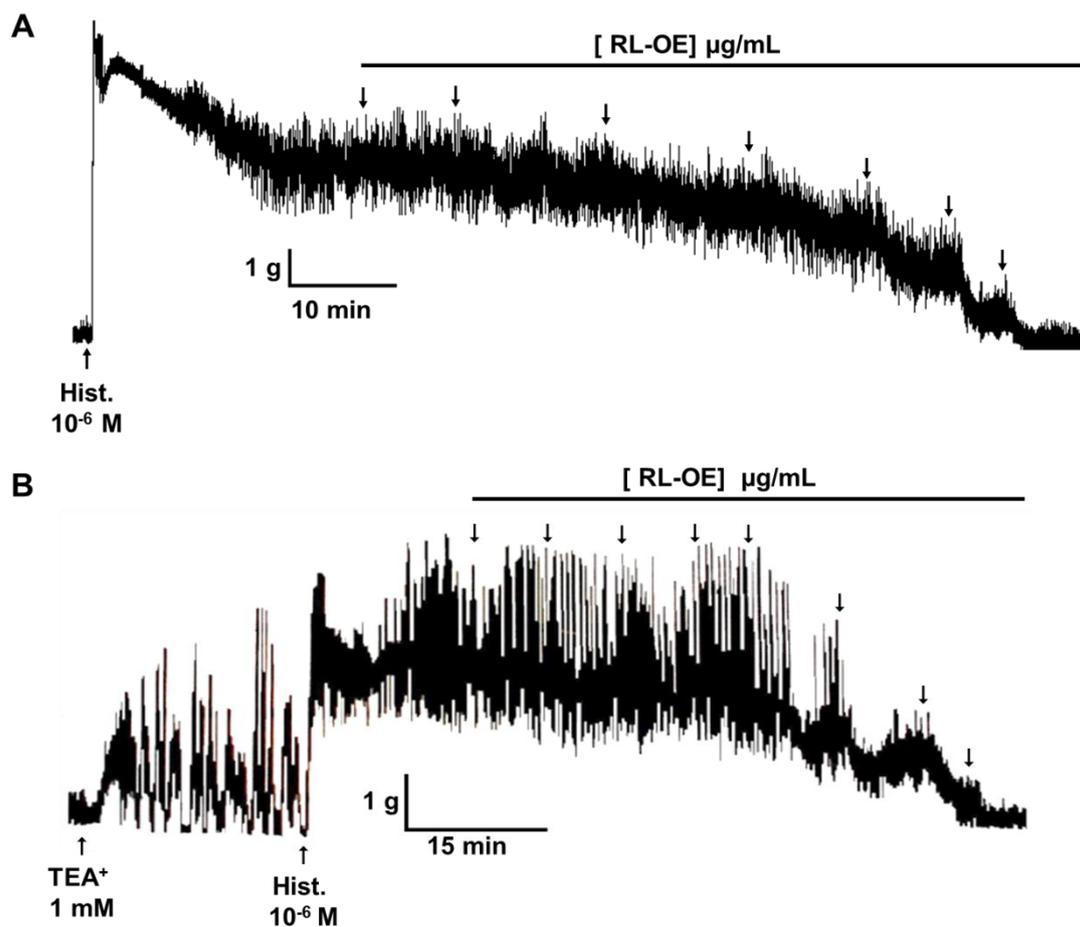
**Figura 26** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 0,3 mM de 4-aminopiridina em íleo de cobaia.



Hist. = histamina, 4-AP = 4-aminopiridina, as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243  $\mu\text{g/mL}$  (B)

Fonte: Autor, 2013.

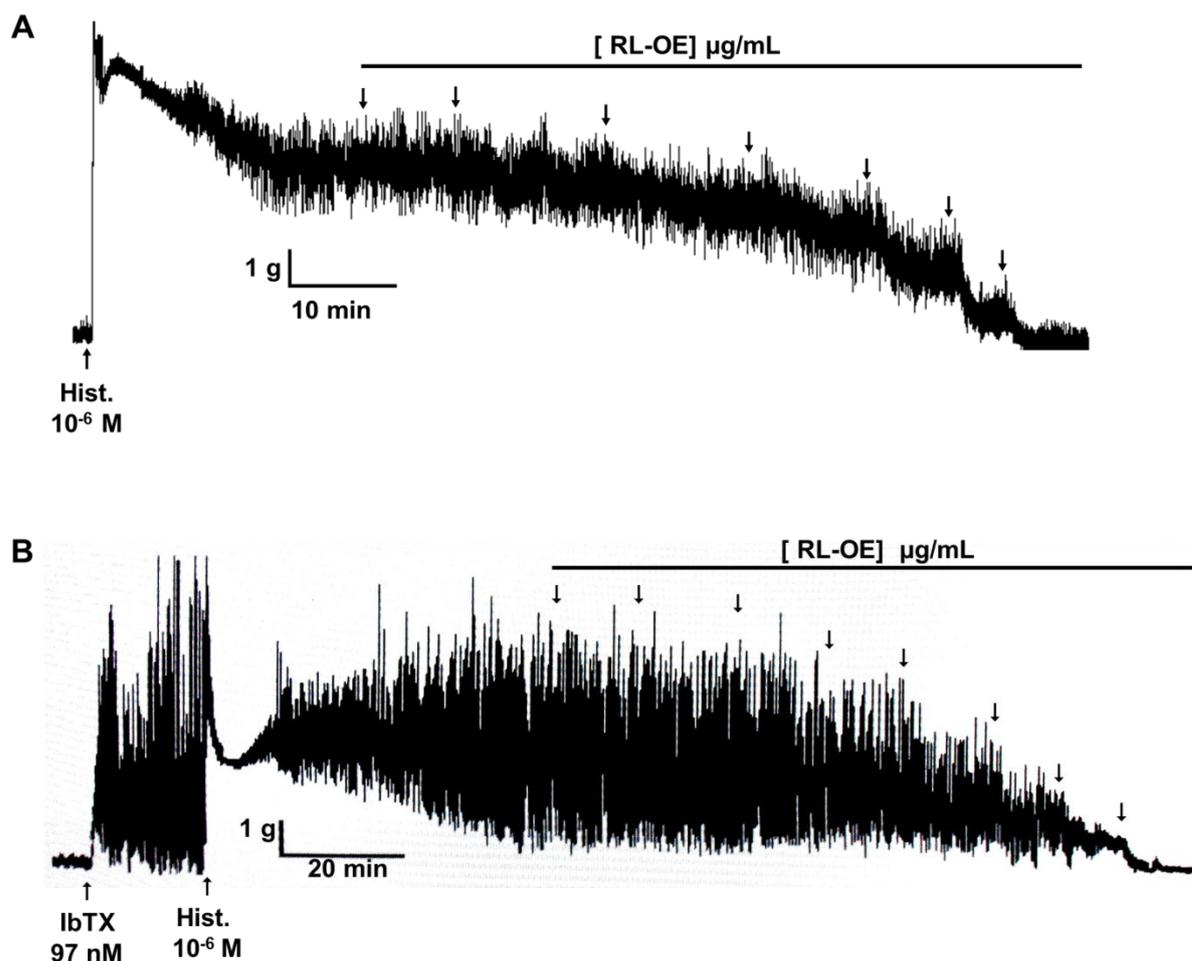
**Figura 27** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 1 mM de tetraetilamônio em íleo de cobaia.



Hist. = histamina, TEA<sup>+</sup> = íon tetraetilamônio, as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (B)

Fonte: Autor, 2013.

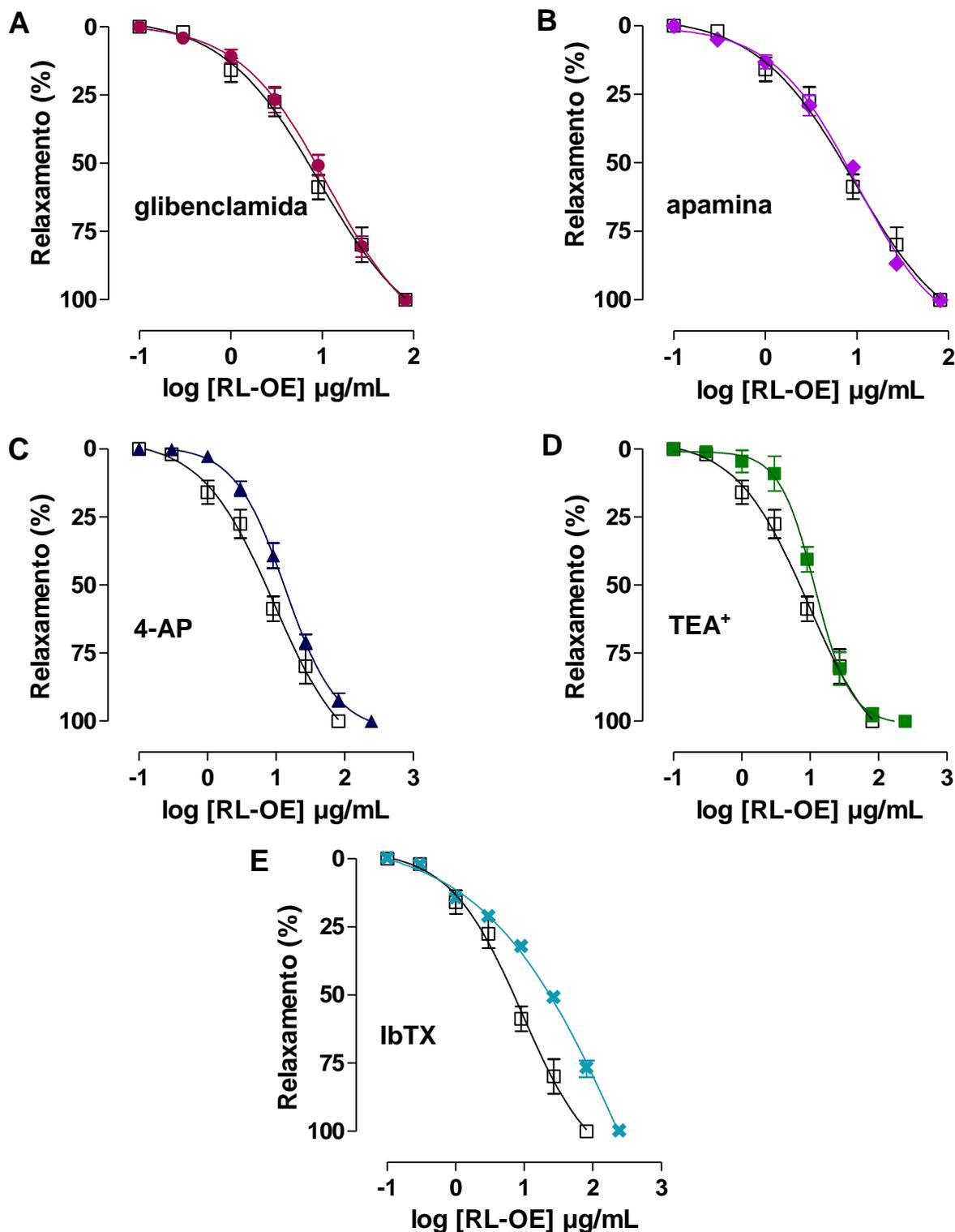
**Figura 28** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 97 nM de iberiotoxina em íleo de cobaia.



Hist. = histamina, IbTX = iberiotoxina, as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243  $\mu\text{g/mL}$  (B)

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 15** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência ( $\square$ ) e na presença de  $10^{-5}$  M de glibenclamida ( $\bullet$ , **A**), de 100 nM apamina ( $\blacklozenge$ , **B**), de 0,3 mM de 4-aminopiridina ( $\blacktriangle$ , **C**), 1 mM de tetraetilamônio ( $\blacksquare$ , **D**) e 97 nM de iberiotoxina ( $\times$ , **E**) em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente,  $n = 5$  (A, B, C e D) e  $n = 4$  (E).

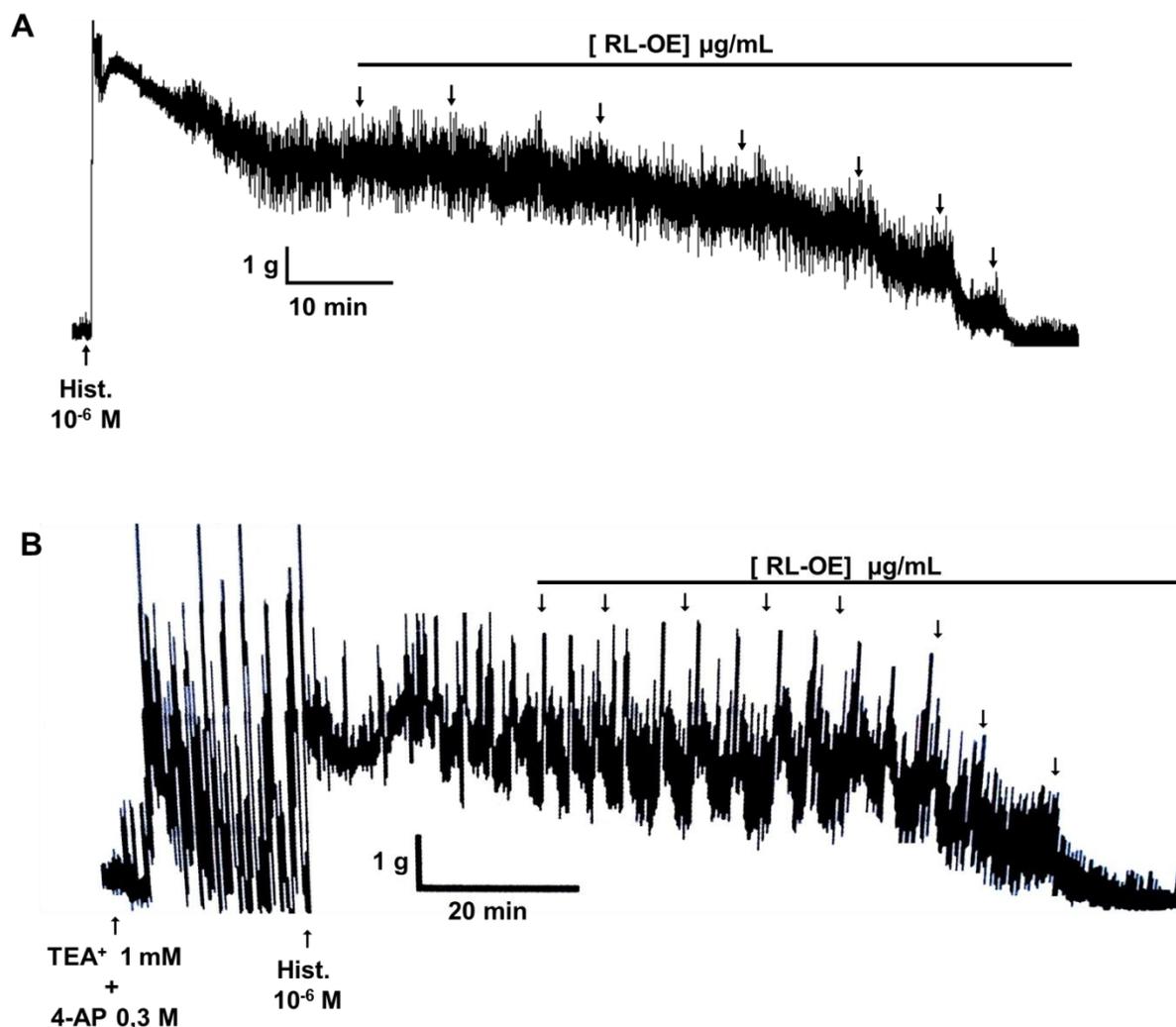
Fonte: Autor, 2013.

#### 5.2.4.3 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença simultânea de tetraetilamônio (TEA<sup>+</sup>) e 4-aminopiridina (4-AP)

A potência relaxante do RL-OE sobre o íleo de cobaia pré-contraído por  $10^{-6}$  M de histamina ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) foi reduzida em cerca de 3,7 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na presença simultânea dos bloqueadores TEA<sup>+</sup> e 4-AP ( $CE_{50} = 24,1 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) (Figura 29 e Gráfico 16).

Além disso, na presença do bloqueio simultâneo (TEA<sup>+</sup> + 4-AP) a potência do RL-OE foi similar à observada na presença de 5 mM de CsCl ( $CE_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 16 e Tabela 12).

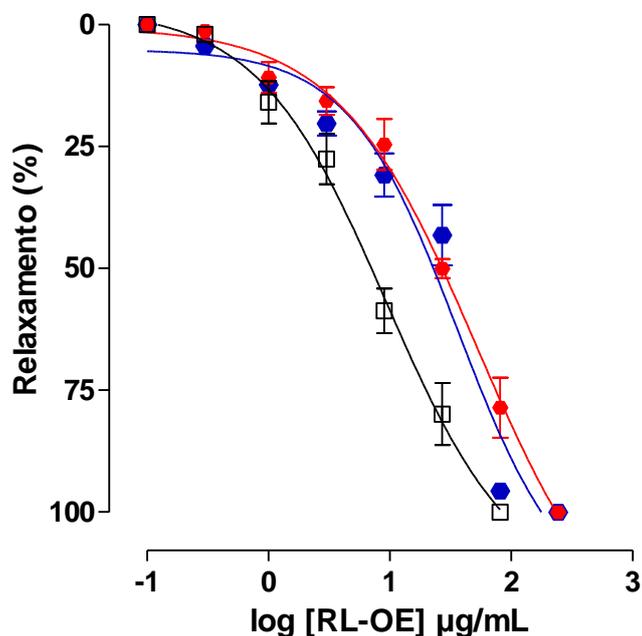
**Figura 29** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) simultânea de 1 mM de tetraetilamônio e 0,3 mM de 4-aminopiridina em íleo de cobaia.



Hist. = histamina, TEA<sup>+</sup> = íon tetraetilamônio, 4-AP = 4-aminopiridina, as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243  $\mu\text{g/mL}$  (B).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 16** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência ( $\square$ ) e na presença simultânea de 1 mM de tetraetilamônio e 0,3 mM de 4-aminopiridina ( $\bullet$ ) e de 5 mM de CsCl ( $\bullet$ ), em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, ( $n = 5$ ).

Fonte: Autor, 2013.

**Tabela 12** – Valores de  $E_{max}$  (%) e de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) do RL-OE na ausência (controle) e na presença de bloqueadores de canais de  $K^+$  em íleo de cobaia.

RL-OE ( $\mu\text{g/mL}$ )	$E_{max}$ (%)	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Controle</b>	100	$6,6 \pm 0,3$
CsCl	100	$22,1 \pm 4,8^*$
glibenclamida	100	$8,0 \pm 1,1$
apamina	100	$6,9 \pm 0,5$
4-AP	100	$13,9 \pm 0,9^{***,\#}$
TEA <sup>+</sup>	100	$13,0 \pm 1,9^{*,\#}$
IbTX	100	$19,0 \pm 0,8^{***}$
TEA <sup>+</sup> + 4-AP	100	$24,1 \pm 3,9^{**}$

4-AP = 4-aminopiridina, TEA<sup>+</sup> = íon tetraetilamônio, IbTX = iberiotoxina. Teste  $t$ ,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$  (controle vs. presença de bloqueadores individuais);  $\#p < 0,01$  (bloqueio simultâneo vs. presença de bloqueadores individuais).

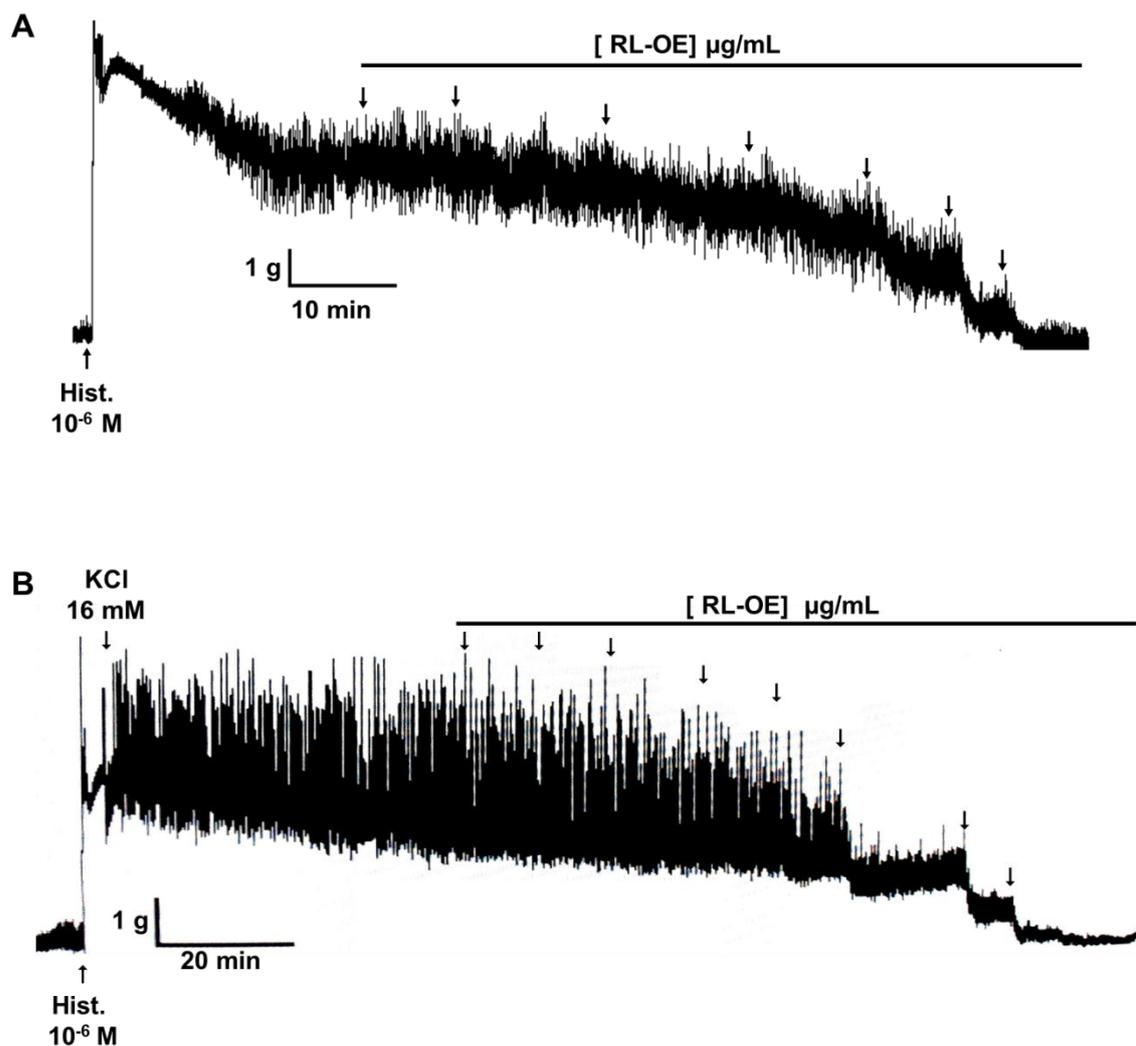
Fonte: Autor, 2013.

**5.2.4.4 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de 16 mM de KCl**

A potência relaxante do RL-OE sobre o íleo de cobaia pré-contraído por  $10^{-6}$  M de histamina ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) foi reduzida em cerca de 2,6 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo RL-OE na presença de 16 mM de KCl, aplicado 2 minutos após a exposição do íleo a  $10^{-6}$  M de histamina ( $CE_{50} = 17,0 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) (Figura 30 e Gráfico 17).

Além disso, na presença de 16 mM de KCl a potência do RL-OE foi similar à observada na presença de 5 mM de CsCl ( $CE_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 17).

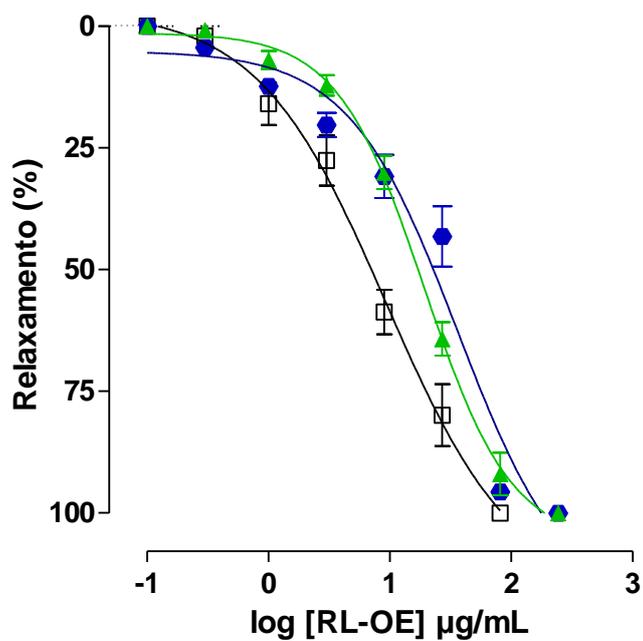
**Figura 30** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de 16 mM de KCl em íleo de cobaia.



Hist. = histamina e as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243  $\mu\text{g/mL}$  (B).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 17** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência ( $\square$ ) e na presença de 16 mM de KCl ( $\blacktriangle$ ) e de 5 mM de CsCl ( $\bullet$ ), em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, ( $n = 5$ ).

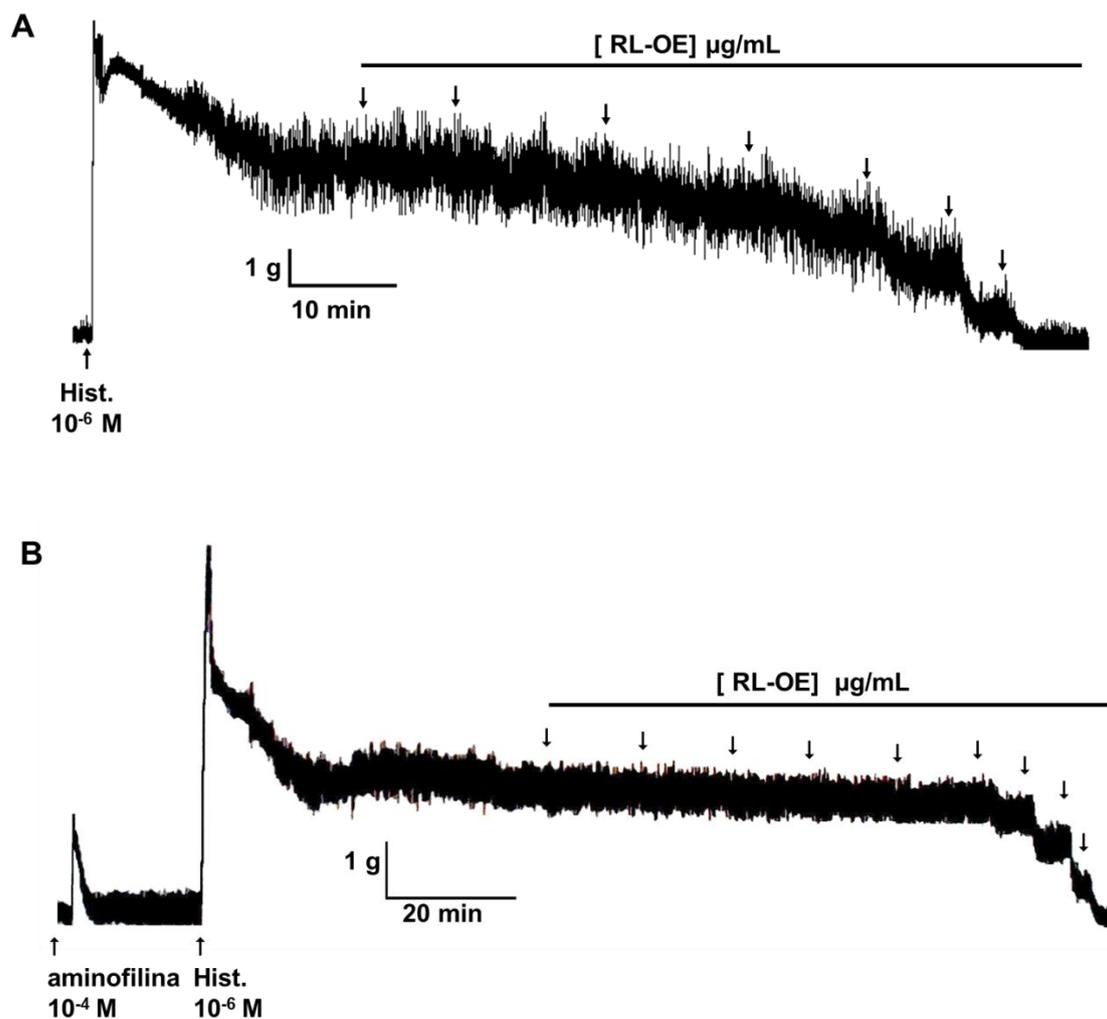
Fonte: Autor, 2013.

### **5.2.5 Avaliação da participação da via de sinalização das PDEs/nucleotídeos cíclicos**

#### **5.2.5.1 Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por histamina na presença de aminofilina**

A potência relaxante do RL-OE sobre o íleo isolado de cobaia pré-contraído com  $10^{-6}$  M de histamina ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) não foi alterada na presença  $10^{-4}$  M de aminofilina, um inibidor não seletivo das fosfodiesterases (PDEs) ( $CE_{50} = 6,5 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ) (Figura 31 e Gráfico 18).

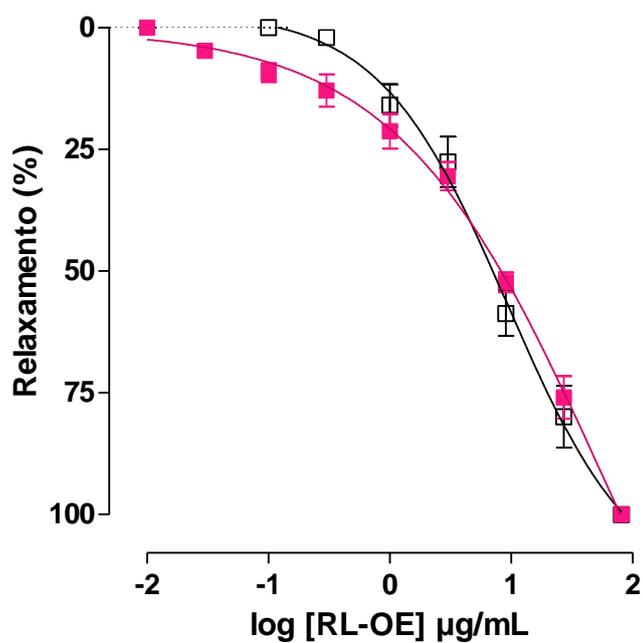
**Figura 31** – Registros típicos do efeito relaxante do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência (A) e na presença (B) de  $10^{-4}$  M de aminofilina em íleo de cobaia.



Hist. = histamina e as setas para baixo representam a adição cumulativa do RL-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (A) e 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81  $\mu\text{g/mL}$  (B).

Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 18** – Efeito do RL-OE sobre as contrações tônicas induzidas por  $10^{-6}$  M de histamina na ausência ( $\square$ ) e na presença ( $\blacksquare$ ) de  $10^{-4}$  M de aminofilina, em íleo de cobaia.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, ( $n = 5$ ).

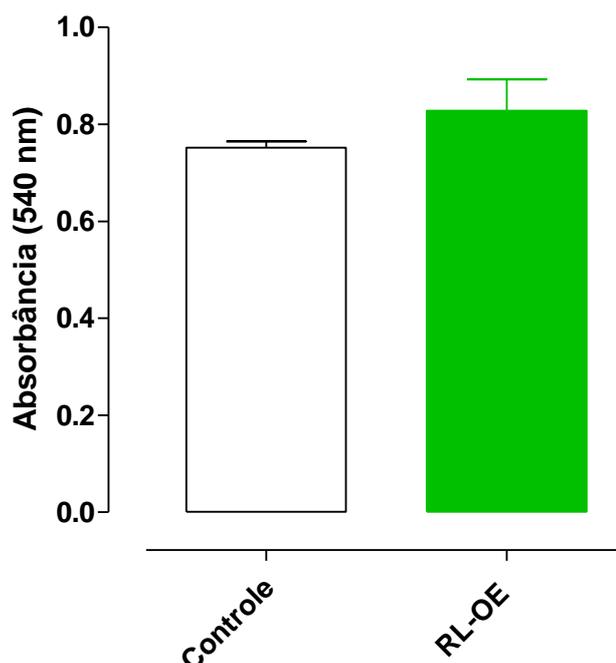
Fonte: Autor, 2013.

## 5.2.6 Efeito do RL-OE sobre os miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia

### 5.2.6.1 Efeito do RL-OE sobre a viabilidade celular de miócitos da camada longitudinal do íleo de cobaia

A exposição do RL-OE (81  $\mu\text{g/mL}$ ), no período de 2 horas, tempo aproximado de contato entre o órgão e o RL-OE nos experimentos funcionais, não induziu morte celular dos miócitos da camada longitudinal de íleo isolado de cobaia (Gráfico 19,  $n = 3$ ).

**Gráfico 19** – Efeito do RL–OE (81  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre a viabilidade celular dos miócitos da camada longitudinal de íleo isolado de cobaia, no período de 2 horas.



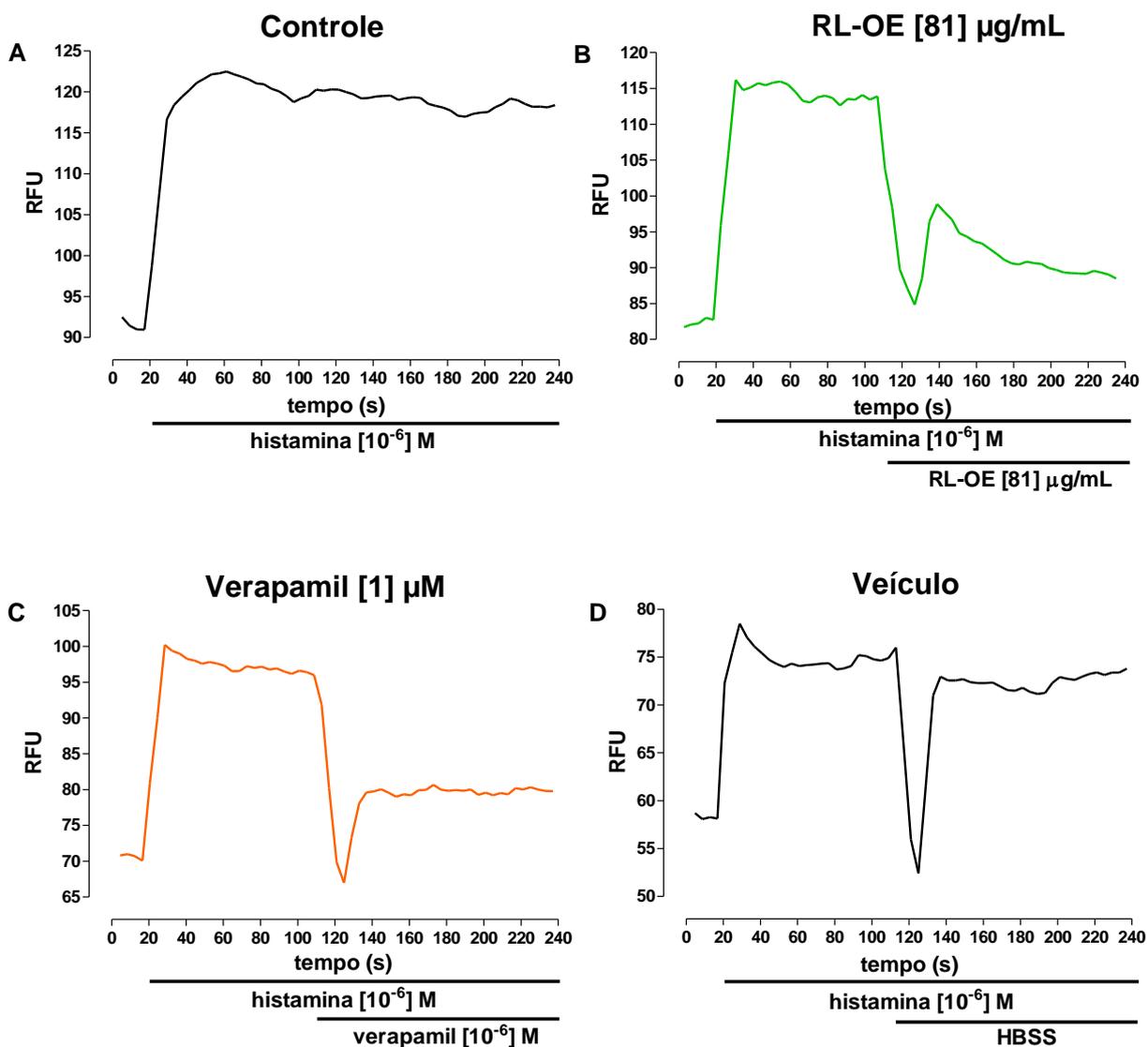
As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, ( $n = 3$ ).

Fonte: Autor, 2013.

### 5.2.6.2 Avaliação do efeito do RL-OE sobre a concentração citosólica de $\text{Ca}^{2+}$ ( $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia

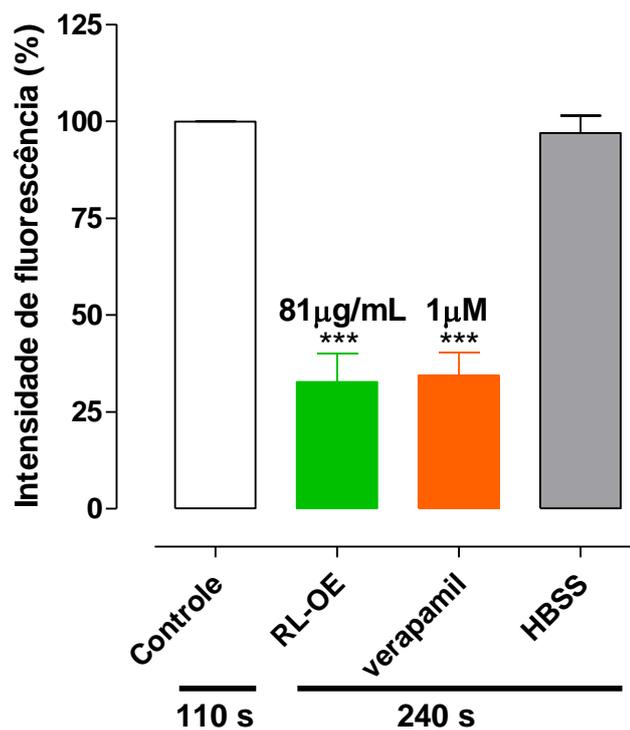
A Figura 32 mostra a intensidade de fluorescência do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico marcado com fluo-4 em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia na ausência (Figuras 32A e 32D) e na presença do RL-OE (Figura 32B) ou do verapamil (Figura 32C). O controle de fluorescência foi obtido através da estimulação das células com  $10^{-6}$  M de histamina. Após o período de 20 s de exposição das células à histamina o pico de fluorescência foi obtido, mantendo-se elevada durante todo o tempo de duração da estimulação (220 s) (Figura 32A). Após a estimulação do aumento da fluorescência induzida por  $10^{-6}$  M de histamina (100% de fluorescência), no período de 110 s o RL-OE (81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionado e observou-se a diminuição da intensidade de fluorescência, mantendo essa redução durante todo o tempo de observação, até o período de 240 s quando a redução da intensidade de fluorescência foi de  $32,7 \pm 7,3\%$ , indicando assim uma diminuição significativa na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia (Figura 32B e Gráfico 20). Resultados semelhantes foram observados após a exposição das células ao verapamil (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador dos  $\text{Ca}_v\text{-L}$  ( $34,5 \pm 5,9\%$ ) (Figura 32C e Gráfico 20), não havendo diferença significativa entre os valores de porcentagem de intensidade de fluorescência na presença do RL-OE e do verapamil (Gráfico 20). O declínio de fluorescência observado durante os primeiros 20 s de exposição das células ao óleo ou ao verapamil é um artefato, visto que na presença do HBSS (veículo, Figura 32D) o mesmo perfil de queda da fluorescência foi observado, porém após esse tempo a fluorescência se manteve.

**Figura 32** – Registros representativos do controle (A), do efeito de 81  $\mu\text{g/mL}$  do RL-OE (B), de 1  $\mu\text{M}$  de verapamil (C) e do veículo (D) sobre o sinal de cálcio em células musculares lisas da camada longitudinal de íleo de cobaia estimuladas com  $10^{-6}$  M de histamina e carregadas com fluo-4.



Fonte: Autor, 2013.

**Gráfico 20** – Efeito de 81 µg/mL do RL-OE e de 1 µM de verapamil (controle positivo) sobre a fluorescência induzida por  $10^{-6}$  M de histamina (controle negativo) em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, (n = 3). Test *t*, \*\*\**p* < 0,001 (controle vs. RL-OE ou verapamil).

Fonte: Autor, 2013.



## 6 Discussão

Neste trabalho investigou-se o efeito espasmolítico dos óleos essenciais das folhas das espécies de Annonaceae: *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (XL-OE), *Xylopia frutescens* Aubl. (XF-OE) e *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (RL-OE), em modelos de musculatura lisa (vascular, respiratória, uterina e intestinal). E foi demonstrado que esses óleos essenciais apresentaram uma maior eficácia e potência espasmolítica em íleo de cobaia. O resultado mais relevante deste estudo foi a caracterização, pelo menos em parte, do mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia, que envolve bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , via  $\text{Ca}_V\text{-L}$ , além da ativação/modulação positiva dos canais  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_V$ , o que levaria a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  e consequente relaxamento desse órgão.

Recentemente, um crescente interesse na composição química dos óleos essenciais de plantas e os seus efeitos sobre o músculo liso tem surgido, procurando-se substâncias ou produtos biologicamente promissores (ASEKUN; GRIERSON; AFOLAYAN, 2007, SADRAEI; GHANNADI; MALEKSHAHI, 2003, MAGALHÃES et al., 2004, SILVA et al., 2010).

Usualmente, os óleos essenciais têm como componentes majoritários os terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) (BAKKALI et al., 2008). Em estudos anteriores foi relatado que compostos da classe dos terpenos (diterpenos) do tipo labdano (labdano-302) e traquilobano (traquilobano-360 e traquilobano-318), isolados da espécie *X. langsdorfiana* apresentaram atividade espasmolítica em vários modelos de músculo liso (RIBEIRO, 2003 e 2007, OLIVEIRA et al., 2006, RIBEIRO et al., 2007, MACÊDO, 2008, TRAVASSOS, 2010, MARTINS et al.; 2013). No entanto, até o presente momento, nenhum estudo para tal atividade foi

evidenciado para as espécies *X. frutescens* e *R. leptopetala*, apesar de haver relatos na literatura de suas utilizações populares para desordens intestinais (DUKE; VASQUEZ, 1994; AGRA et al., 2007). Nesse sentido, resolveu-se realizar uma triagem farmacológica preliminar com os óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE visando determinar suas potenciais atividades espasmolíticas.

A pressão arterial é definida como o produto do débito cardíaco pela resistência vascular periférica total. A resistência ao fluxo sanguíneo na circulação é regulado principalmente pelo tônus vascular (SANTOS et al., 2007), que portanto irá regular a pressão arterial e distribuição do fluxo sanguíneo entre os tecidos e órgãos do corpo. O tônus vascular, por sua vez, é regulado por hormônios circulantes, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio, sinais elétricos e/ou mecânicos, como a própria pressão sanguínea, além dos canais iônicos (JACKSON, 2000). Tendo-se em vista que o aumento do tônus vascular pode ter repercussões graves no organismo, como o surgimento de hipertensão arterial, substâncias que venham a regular o tônus basal ou que relaxem a musculatura lisa dos vasos seriam drogas com potencial utilização terapêutica. Como descrito anteriormente, foi evidenciado que o diterpeno labdano-302 apresentou efeito vasorrelaxante nos leitos vasculares aórticos (RIBEIRO, 2003) e mesentéricos de rato (OLIVEIRA et al., 2007), dessa forma esse estudo foi direcionado a investigar uma possível ação vasorrelaxante dos óleos essenciais de Annonaceae sobre o músculo liso vascular.

Com base nessa premissa, foi-se investigar se os óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE apresentariam alguma atividade vasorrelaxante em aorta isolada de rato pré-contráida com fenilefrina. Observou-se que o XL-OE apresentou efeito espasmolítico apenas em altas concentrações, sendo esse efeito de baixa eficácia, não ultrapassando 50% de relaxamento (Figura 15 e Tabela 1). O diterpeno labdano-302 isolado de *X. langsdorfiana* apresentou efeito espasmolítico com alta eficácia e de maneira não seletiva. O fato do XL-OE apresentar uma baixa eficácia vasorrelaxante em aorta de rato indica que, se este produto natural vier a ser utilizado, possivelmente os efeitos secundários relacionados com o sistema circulatório serão reduzidos.

O XF-OE apresentou efeito relaxante pouco eficaz na ausência de endotélio funcional, semelhante ao observado com o XL-OE. No entanto, quando o endotélio aórtico foi preservado o XF-OE relaxou esses anéis de maneira significativa e

dependente de concentração (Figura 16A), apresentando uma potência relaxante de  $266,0 \pm 32,2 \mu\text{g/mL}$  (Gráfico 1).

O endotélio apresenta uma função importante no processo de regulação do tônus do músculo liso vascular através da liberação de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) (TÖRÖK, 2000), incluindo o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FHDE), o óxido nítrico (NO), as prostaciclinas e os ácidos epxieicosatrienoicos (EDWARDS; FÉLÉTOU; WESTON, 2010). Diante disso, pode-se inferir que, possivelmente os fatores relaxantes derivados do endotélio podem estar envolvidos no efeito vasorrelaxante observados pelo XF-OE em aorta de rato, distintamente do observado com o diterpeno labdano-302, uma vez que seu efeito vasorrelaxante independe dos fatores relaxantes derivados do endotélio (RIBEIRO, 2003). Por outro lado, o RL-OE apresentou efeito espasmolítico significativo e equipotente quando os anéis aórticos foram pré-contraídos com fenilefrina tanto na presença ( $CE_{50} = 95,5 \pm 14,4 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) como na ausência ( $CE_{50} = 108,1 \pm 21,9 \mu\text{g/mL}$ ,  $n = 5$ ) de endotélio funcional (Figura 17, Gráfico 2). Esse fato sugere que o efeito espasmolítico do RL-OE não envolve as vias de sinalização dependente do endotélio funcional e indica que o mecanismo de ação do RL-OE para promover o efeito vasorrelaxante ocorre diretamente nas células do músculo liso vascular, semelhante ao evidenciado com o diterpeno labdano-302 (RIBEIRO, 2003).

Um dos mais importantes tipos celulares envolvidos em doenças das vias aéreas são as células musculares lisas. Uma característica importante destas células é sua habilidade em alterar seu fenótipo em resposta a diferentes estímulos, como o aumento da expressão de proteínas contráteis, tais como a  $\alpha$ -actina, calponina e cadeia pesada da miosina (HIRST; TWORT; LEE, 2000). Em condições patológicas, como na asma brônquica, há uma liberação aumentada de mediadores broncoconstritores como a histamina e a acetilcolina (ACh) (GROSS, 1988; HOLGATE, 1994). Ademais, as células epiteliais modulam o tônus basal e a reatividade do músculo liso por liberação de fatores relaxantes derivados do epitélio (FRDEp) (HASHIBA et al., 1999), tais como óxido nítrico (NO) (NIJKAMP et al., 1993) e as prostaglandinas ( $PGI_2$ ) (FARMER et al., 1987). Nesse sentido, substâncias que venham a regular o tônus basal ou que relaxem a musculatura lisa das vias aéreas seriam drogas com potencial utilização terapêutica. Ribeiro et al. (2007) e Santos et al. (2011a) evidenciaram que os efeitos relaxantes dos diterpenos

labdano-302 e traquilobano-318, respectivamente, no músculo liso da traqueia de cobaia ocorreram de maneira independente dos fatores relaxantes derivados do epitélio, assim, decidimos investigar uma possível ação relaxante dos óleos essenciais de Annonaceae sobre essa musculatura.

Com o intuito de se investigar uma possível atividade relaxante dos óleos essenciais das espécies de Annonaceae em estudos sobre a musculatura das vias aéreas, avaliaram-se seus efeitos sobre a traqueia isolada de cobaia. O XL-OE e o XF-OE apresentaram efeito espasmolítico significativo, porém com baixa eficácia, uma vez que seus efeitos não ultrapassaram 50% de relaxamento da traqueia pré-contraída por CCh, mesmo em altas concentrações (Figuras 18 e 19). Os diterpenos labdano-302 e traquilobano-318 isolados de *X. langsdorfiana* apresentaram efeitos espasmolíticos com altas eficácias e de maneira não seletiva. O fato dos óleos essenciais do gênero *Xylopi*a, XL-OE e XF-OE apresentarem baixas eficácias relaxante em traqueia de cobaia indica que, se estes produtos naturais vierem a ser utilizados, possivelmente os efeitos secundários relacionados com o sistema respiratório serão reduzidos.

Diferentemente do observado com os óleos essenciais do gênero *Xylopi*a, o RL-OE apresentou efeito espasmolítico significativo, dependente de concentração e equipotente quando os anéis de traqueia foram pré-contraídos com CCh, tanto na presença ( $CE_{50} = 125,7 \pm 27,2 \mu\text{g/mL}$ ) como na ausência ( $CE_{50} = 101,7 \pm 22,6 \mu\text{g/mL}$ ) de epitélio funcional (Figura 20, Gráfico 3). Como o epitélio das vias aéreas está envolvido na regulação da reatividade dos brônquios através da liberação de substâncias relaxantes tais como:  $\text{PGI}_2$  e NO (NIJKAMP et al., 1993; FARMER et al., 1987) e que o efeito espasmolítico do RL-OE independe da presença do epitélio traqueal, pode-se sugerir que, semelhante ao observado em aorta de rato, o mecanismo de ação relaxante do RL-OE parece ocorrer diretamente no músculo liso traqueal, não envolvendo a liberação de substâncias relaxantes derivadas do epitélio.

O útero é um órgão oco, revestido de musculatura lisa bem diferenciada, possuindo três camadas: endométrio, miométrio (camada muscular espessa) e serosa (camada externa). A função do miométrio é de vital importância em processos fisiológicos como implantação do embrião e na manifestação de distúrbios como dismenorreia e interrupção da gravidez por aborto espontâneo (AGUILLAR; MITCHELL, 2010). Acredita-se que cerca de 50 a 90% das mulheres

apresentem cólica uterina em algum momento de suas vidas, sendo que 10% das pacientes tornam-se incapazes de desenvolver suas atividades habituais em decorrência da dor (MOTTA; SALOMÃO; RAMOS, 2002). A dor geralmente é mais intensa no primeiro dia da menstruação e, em mais de 50% dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA et al., 2000). Ribeiro (2003) evidenciou que o efeito tocolítico do diterpeno labdano-302, possivelmente, ocorre em um passo comum à via de sinalização dos agonistas (ocitocina e CCh), uma vez que não houve diferença estatística entre os valores de  $CI_{50}$ . Assim, decidimos investigar uma possível ação espasmolítica dos óleos essenciais de Annonaceae sobre essa musculatura.

Diante do exposto, foi-se investigar uma possível atividade tocolítica dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE sobre a musculatura lisa uterina de rata. Observou-se que independente da contração ser induzida por ocitocina ou por CCh, o efeito tocolítico produzido pelo XL-OE ocorreu apenas na concentração máxima utilizada nos experimentos funcionais (729  $\mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 4). XL-OE bem como os diterpenos traquilobano-360 e traquilobanos-318 (SANTOS et al., 2011a) isolados de *X. langsdorfiana* demonstraram efeitos similares nesse órgão com baixa eficácia tocolítica.

Distintamente do observado com o XL-OE, bem como com o diterpeno labdano-302 (RIBEIRO, 2003), os óleos essenciais XF-OE e RL-OE antagonizaram as contrações fásicas induzidas por ocitocina ( $CI_{50} = 189,3 \pm 18,2$  e  $20,6 \pm 3,3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, Gráficos 5A e 6A) e por CCh ( $CI_{50} = 370,3 \pm 33,1$  e  $87,1 \pm 1,0$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, Gráficos 5B e 6B). Tanto XF-OE quanto RL-OE apresentaram uma maior potência frente ao agonista ocitocina, porém o RL-OE foi o que apresentou maior potência frente aos agonistas testados quando comparados aos óleos essenciais do gênero *Xylopi*a. Esses resultados são sugestivos de que os efeitos espasmolíticos dos óleos essenciais XF-OE e RL-OE em útero de rata podem estar acontecendo, pelo menos em parte, por bloqueio dos receptores de ocitocina, mas outros experimentos são necessários para confirmar ou descartar essa hipótese.

Há relatos da utilização popular de espécies do gênero *Xylopi*a para desordens intestinais (ASFAW; DEMISSEW, 1994; DUKE; VASQUEZ, 1994), bem como da espécie *Rollinia leptopetala* (AGRA et al., 2007). Além do fato da própria

espécie *X. frutescens* ser relatada na literatura como sucedânea da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), que também é utilizada popularmente com a mesma finalidade (RAO et al., 2011). Diante disso, o modelo do músculo liso intestinal é um meio importante para se investigar novos fármacos que sejam potentes, eficazes e com menos efeitos colaterais ou que sirvam como ferramenta farmacológica para o entendimento de processos fisiopatológicos, a exemplo da diarreia, cólica intestinal e constipação.

A cólica intestinal é comumente causada por fortes contrações dessa musculatura lisa, por meio da ação do sistema nervoso entérico. Clinicamente, a dor causada pelos espasmos gastrintestinais é geralmente tratada com drogas que induzem relaxamento dessa musculatura lisa (SATO et al., 2007). Como descrito anteriormente, Ribeiro (2003) evidenciou que o efeito espasmolítico do diterpeno labdano-302, possivelmente, ocorre em um passo comum à via de sinalização dos agonistas (CCh e histamina), uma vez que não houve diferença estatística entre os valores de  $CI_{50}$ . Com a finalidade de se investigar uma possível atividade espasmolítica dos óleos essenciais de Annonaceae em íleo de cobaia, avaliou-se o efeito dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE frente às contrações fásicas induzidas por CCh ou por histamina e o que foi observado foi que esses óleos essenciais de Annonaceae apresentaram efeito espasmolítico nesse órgão de maneira significativa e dependente de concentração (Gráficos 7, 8 e 9), comprovando, pelo menos, em parte a utilização popular dessas espécies de Annonaceae para desordens intestinais.

Comparando as potências espasmolíticas dos óleos essenciais, observou-se que XL-OE foi equipotente em antagonizar as contrações induzidas pelos dois agonistas testados, semelhante ao observado com o diterpeno labdano-302 (RIBEIRO, 2003). No entanto, os óleos essenciais XF-OE e RL-OE apresentaram maior potência em antagonizar as contrações induzidas por histamina quando comparadas com o CCh. Quando se comparou as potências dos três óleos essenciais observou-se que eles foram equipotentes em relação às contrações induzidas por CCh ( $CI_{50} = 83,3 \pm 15,6$ ;  $74,0 \pm 8,1$  e  $49,4 \pm 5,1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) (Tabela 8). No entanto, em relação às contrações induzidas por histamina ( $CI_{50} = 81,8 \pm 11,2$ ;  $38,1 \pm 2,6$  e  $3,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) (Tabela 8), observou-se que o RL-OE foi aproximadamente 26 e 12 vezes mais potente que os óleos essenciais de *Xylopi*a, XL-OE e XF-OE, respectivamente.

A grande variabilidade nas respostas espasmolíticas entre os óleos essenciais de Annonaceae pode ser explicada pelas variações observadas nas suas composições químicas. O XL-OE: germacreno D (22,9%), trans- $\beta$ -guaieno (22,6%),  $\beta$ -cariofileno (15,7%) e  $\alpha$ -pineno (7,3%) (TAVARES et al., 2007b), o XF-OE: constituintes majoritários o cariofileno (23,91%),  $\gamma$ -cadineno (12,48%),  $\beta$ -ocimeno (8,19%), cadin-4-en-10-ol (5,78%), viridiflorol (4,83%),  $\gamma$ -elemeno (4,55%) (LUNGUINHO, 2012) e o RL-OE: biciclogermacreno (22,47%), cis-4-tujanol (17,37%),  $\alpha$ -terpineol (8,42%), germacreno D (7,72%), trans-cariofileno (6,63%) e guaíol (4,61%) (COSTA et al., 2008).

O procedimento recomendável para testar a hipótese de que algum componente específico do óleo essencial seja o responsável pelo aparecimento dessa atividade espasmolítica seria testando-o isoladamente. Porém, houve uma impossibilidade técnica de testar essa teoria, uma vez que os componentes majoritários dos óleos de Annonaceae não são disponibilizados comercialmente. Além do mais, a possibilidade do isolamento desses compostos também foi inviabilizada, visto que, mesmo sendo os componentes majoritários, estes ainda se encontram em pequenas porcentagens nos óleos essenciais, caso tenta-se isolá-los, os rendimentos desses compostos seriam demasiadamente pequenos.

Por outro lado, não podemos descartar a hipótese de que os efeitos espasmolíticos apresentados pelos óleos essenciais de Annonaceae sejam efeitos sinérgicos entre os seus componentes como um todo. Segundo Bakkali et al (2008), não se pode descartar a possibilidade do componente majoritário ser modulado por outros componentes do óleo essencial em menor proporção.

Quanto ao XL-OE, embora ele seja constituído majoritariamente por compostos terpenoides e tenha relatos na literatura que diterpenos do tipo labdano (labdano-302) e traquilobano (traquilobano-360 e traquilobano-318), já identificados na espécie *X. langsdorfiana*, apresentam efeitos espasmolíticos nos leitos vasculares aórticos e mesentéricos de rato, em útero de rata e em traqueia e íleo de cobaia (RIBEIRO, 2003 e 2007, OLIVEIRA et al., 2006, RIBEIRO et al., 2007, MACÊDO, 2008, TRAVASSOS, 2010, MARTINS et al.; 2013). Os compostos terpenoides presentes no XL-OE são mono e sesquiterpenos, sugere-se que as variações do número de unidades isoprênicas dos terpenos identificados no XL-OE podem ter sido as responsáveis pelos efeitos espasmolítico distintos observado para essa espécie.

Uma vez que um dos objetivos desse estudo foi comparar as eficácias e potências dos óleos essenciais XL-OE, XF-OE e RL-OE em modelos de músculo liso (vascular, respiratório, uterino e intestinal), bem como caracterizar o mecanismo de ação espasmolítica de um dos óleos essenciais de Annonaceae no órgão que apresentasse maior eficácia e potência. Decidiu-se prosseguir com o estudo em íleo de cobaia para se tentar elucidar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade espasmolítica do RL-OE, com a finalidade ulterior de descobrir drogas com um maior potencial terapêutico ou que sirvam como ferramenta farmacológica para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos fisiopatológicos envolvendo a musculatura lisa intestinal.

Como na triagem farmacológica foi verificado, em íleo de cobaia, que RL-OE inibiu as contrações fásicas induzidas por CCh ou por histamina, apresentando uma maior potência em inibir as contrações induzidas pela histamina, levantou-se a hipótese do RL-OE estar agindo nos receptores histaminérgicos para promover sua ação espasmolítica. Para verificar essa proposição, decidiu-se caracterizar o tipo de antagonismo exercido pelo RL-OE frente às curvas concentrações-resposta cumulativas induzidas por histamina. Nesse protocolo experimental, observou-se um desvio para direita das curvas controles cumulativas à histamina, de forma não paralela e com redução do  $E_{max}$  (Gráfico 10 e Tabela 9), descartando, dessa forma, um antagonismo do tipo competitivo.

O antagonismo do tipo não competitivo pode ocorrer quando há ligação do antagonista ao mesmo sítio de ligação do agonista (antagonismo pseudo-irreversível) ou em um sítio distinto (antagonismo alostérico) (BLUMENTHAL, GARRISON, 2011). O perfil do Gráfico 10 representa um antagonismo pseudo-irreversível, uma vez que não houve saturação do efeito, ou seja, a inibição da resposta contrátil da histamina na presença do RL-OE não atingiu um valor limitante, característica observada no antagonismo alostérico.

Resultados semelhantes foram observados por Macêdo (2008) com o diterpeno labdano-302 e por Santos et al. (2011b) com os diterpenos traquilobano-360 e traquilobano-318, diterpenos isolados de *X. langsdorfiana*, que demonstraram efeitos espasmolíticos em músculo liso gastrintestinal também através de antagonismo do tipo não competitivo.

Uma característica notável da via de sinalização do  $Ca^{2+}$  é que esse íon participa do controle de um grande número de processos celulares, tais como:

sinapse neuronal, secreção de fluidos, agregação plaquetária, diferenciação e proliferação celular, metabolismo, excitose, fertilização e contração muscular (BERRIDGE, 2009b). O  $\text{Ca}^{2+}$ , um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), é um sinal primário responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980).

O músculo liso é o principal tipo de músculo que controla a maioria dos sistemas de órgãos ocos do corpo (WATTERSON; RATZ; SPIEGEL, 2005). A contração do músculo liso é disparada principalmente pelo aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , e pode ser alcançada tanto via despolarização de membrana, levando ao aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  através dos  $\text{Ca}_v$ , como pela ligação do agonista ao receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), originalmente designados por acoplamentos eletromecânico e fármaco-mecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Agonistas como serotonina, CCh e histamina ligam-se a GPCRs e ativam a cascata de fosfoinositídeos, usualmente através da produção de  $\text{IP}_3$  mediada pelas proteínas  $\text{G}_{q/11}$ , estimulando assim a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS (FUKATA; AMANO; KAIBUCHI, 2001). Os agonistas contráteis podem também elevar a  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  através de receptores de rianodina e estimular a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos múltiplos tipos de canais, incluindo canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por estoque, por receptor ou por voltagem (SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002).

Em íleo de cobaia, vários agentes contráteis, como os agonistas muscarínicos (TRIGGLE et al., 1989) e o KCl (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976), causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 minutos e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976; VAN BREEMEN; AARONSON; LOUZENHISER, 1979; BOLTON, 1979). Em músculos lisos bifásicos, esta resposta é devido à fonte dual de  $\text{Ca}^{2+}$  e é sugerido que a contração fásica é causada por liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares mediados por  $\text{IP}_3$  (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), enquanto que a contração tônica é atribuída ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_v$ , uma vez que, demonstrou-se em estudos a supressão dessa contração pelo bloqueador dos  $\text{Ca}_v$ , verapamil (JIM et al., 1981).

No entanto, particularmente, em músculo liso de íleo de cobaia, tanto a contração fásica como a tônica são dependentes do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, uma vez que ambas as contrações foram inibidas na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996). A remoção de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do meio externo bloqueia totalmente a resposta contrátil tanto a agentes despolarizantes como a agonistas em poucos segundos, sugerindo que as fontes intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  não contribuem significativamente para o nível de tensão atingido (NOUAILHETAS et al., 1985). No entanto, a influência do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é relativamente maior na resposta contrátil tônica comparado com a fásica (TRIGGLE et al., 1979).

Assim, passou-se a avaliar o efeito do RL-OE sobre a fase tônica da contração induzida por KCl (acoplamento eletromecânico) e por CCh ou por histamina, que agem por acoplamento misto (BOLTON et al., 1981) em íleo de cobaia. E o observado foi que o RL-OE inibiu de maneira dependente de concentração as contrações tônicas induzidas por todos os agentes contráteis utilizados (Gráficos 11). Como o íleo é um órgão totalmente dependente de variação do potencial de membrana (NOUAILHETAS et al., 1985) e como o componente tônico da contração induzida por agonistas de acoplamento misto (UNNO; KOMORI; OHASHI, 1995; BOLTON et al., 1981) ou por um agente despolarizante (KCl) é mantido quase que exclusivamente por influxo de cálcio através dos  $\text{Ca}_V$  (BOLTON, 1979; REMBOLD, 1996; BOLTON et al., 2006), levantou-se a hipótese de que o RL-OE poderia estar agindo por bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_V$ .

Caso o RL-OE estivesse realmente bloqueando os  $\text{Ca}_V$ , era esperado que o mesmo antagonizasse as contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$ . Este protocolo baseia-se no fato de que a contração ocorre, quase que exclusivamente, pelo  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pela elevada  $[\text{K}^+]_e$  induz a abertura dos  $\text{Ca}_V$  (REMBOLD, 1996). Observou-se que as curvas cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$  foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do  $E_{\text{max}}$  (Gráfico 12 e Tabela 11). Esses resultados reforçam a hipótese de que o RL-OE estaria interferindo com o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_V$  para exercer seu efeito espasmolítico.

Os  $\text{Ca}_V$  estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis, eles são formados por um complexo hetero-oligomérico. Existem dez membros de  $\text{Ca}_V$ , que são divididos em dois grupos: ativados por alta voltagem e os

ativados por baixa voltagem. Os  $Ca_V$  de baixa voltagem são os canais do tipo T, compreendendo três membros:  $Ca_V3.1$ , 3.2 e 3.3. Os outros sete membros dos  $Ca_V$  são canais ativados por alta voltagem e subdivididos em tipo L ( $Ca_V1.1$ , 1.2, 1.3 e 1.4), tipo P/Q ( $Ca_V2.1$ ), tipo N ( $Ca_V2.2$ ) e tipo R ( $Ca_V2.3$ ). A sua subunidade  $\alpha_1$  é a formadora de poros e fornece o sítio de ligação extracelular para praticamente todos os agonistas e antagonistas (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011).

No músculo liso, a subfamília dos  $Ca_V1$  são melhores caracterizados e são os maiores responsáveis pelo influxo de  $Ca^{2+}$ , cujo sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade  $\alpha_1$ , embora nele existam quatro outras unidades complexadas (2  $\alpha$ , 1  $\beta$  e 1  $\gamma$ ) (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). No músculo liso intestinal de cobaia, os  $Ca_V$  mais expressos são os do tipo L (BOLTON, 1979; TOMITA, 1981), atualmente conhecidos como  $Ca_V1.2$ . Estes canais são amplamente expressos no corpo humano (músculo cardíaco, músculo liso, células endócrinas e neurônios) (CATTERALL et al., 2005).

Para avaliar se o tipo de  $Ca_V$  envolvido na ação espasmolítica do RL-OE em íleo isolado de cobaia seria os  $Ca_V$ -L, avaliou-se o seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado di-hidropiridínico S(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos  $Ca_V$ -L, que age por ligação direta na sua subunidade  $\alpha_1$  e não por despolarização (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). Estudos anteriores foi demonstrado que as respostas contráteis aos ativadores de  $Ca_V$ -L, S(-)-Bay K8644 e FPL 64176, são potencializadas pelo aumento moderado (8-20 mM) da  $[K]_e$ , concentrações estas superiores àquelas da solução de Krebs modificado (WEI et al., 1986; CONTE-CAMERINO et al., 1987; ZHENG; RAMPE; TRIGGLE, 1991).

Portanto, observou-se que o RL-OE relaxou o íleo de maneira significativa e dependente de concentração quando este era pré-contraído com  $3 \times 10^{-7}$  M de S(-)-Bay K8644 (Figura 22 e Gráfico 13). Esses dados sugerem que o RL-OE esteja agindo, majoritariamente, por bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$  via os  $Ca_V$ -L. No entanto, quando estes dados foram comparados com o valor de potência relaxante do RL-OE pré-contraído com KCl, observa-se que este foi cerca de 2 vezes mais potente em relaxar o íleo pré-contraído com KCl ( $CE_{50} = 10,1 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$ ) do que com o S(-)-Bay K8644 ( $CE_{50} = 20,4 \pm 4,2 \mu\text{g/mL}$ ). Esses dados podem ser explicados pelo fato de que na contração induzida por KCl existe, além da despolarização, outros

mecanismos de manutenção da contração tônica como a sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  envolvendo a translocação e ativação da RhoA cinase, bem como a ativação da proteína cinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (CaMKII) ou a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) (RATZ et al., 2005). No entanto, não se descarta outros mecanismos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia, como por exemplo, a modulação positiva dos canais de  $\text{K}^+$ .

É relatado na literatura que os canais de  $\text{K}^+$  desempenham um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon  $\text{K}^+$ , levando a uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição da condutância ao  $\text{K}^+$ , levando a uma despolarização (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Eles estão envolvidos em várias funções fisiológicas, tais como, potencial de membrana celular e secreção de hormônios e de neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem,  $\text{Ca}^{2+}$  ou por neurotransmissores e, conseqüentemente, as vias de sinalização que eles estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011), sendo o fluxo dos íons  $\text{K}^+$  por canais presentes na membrana plasmática que regula o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos  $\text{Ca}_v$  (THORNELOE; NELSON, 2005). Diante dos resultados com o S(-)-Bay K 8644, hipotetizou-se que o RL-OE estaria ativando os canais de  $\text{K}^+$  e bloqueando, assim, indiretamente os  $\text{Ca}_v$ .

Para comprovar se RL-OE estaria ativando/modulando positivamente os canais de  $\text{K}^+$  para exercer seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia, utilizou-se como ferramenta farmacológica um bloqueador não seletivo desses canais, o CsCl (CECCHI et al., 1987). Observou-se que a curva de relaxamento obtida para o RL-OE ( $\text{CE}_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) foi deslocada para a direita na presença de 5 mM de CsCl ( $\text{CE}_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ), com redução da potência relaxante em cerca de 3 vezes (Gráficos 14). Sugerindo assim, a participação desses canais na atividade espasmolítica do RL-OE.

No músculo liso gastrintestinal pode ser regulado por vários subtipos de canais de  $\text{K}^+$ , entre eles: os  $\text{K}_{\text{ATP}}$ , os  $\text{K}_v$  e os  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (VOGALIS, 2000). Além disso, vários compostos terpenoides obtidos de espécies da família Annonaceae vêm sendo estudados em vários modelos de músculo liso, e observou-se a associação entre o aumento da atividade dos canais de  $\text{K}^+$  e o seus efeitos espasmolíticos

(RIBEIRO, 2003 e 2007, OLIVEIRA et al., 2006, RIBEIRO et al., 2007, MACÊDO, 2008, TRAVASSOS, 2010, MARTINS et al.; 2013).

Os  $K_{ATP}$ , que são seletivos para  $K^+$  e ativados por uma diminuição na concentração intercelular de ATP, foram inicialmente identificados em miócitos ventriculares (NOMA, 1983). Posteriormente, os  $K_{ATP}$  com características semelhantes foram demonstrados em muitos outros tecidos, tais como, células  $\beta$ -pancreáticas, músculo esquelético, neurônios e músculos lisos (TERAMOTO, 2006).

Vários agonistas endógenos (como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, adenosina, entre outros) ativam os  $K_{ATP}$  produzindo hiperpolarização e relaxamento. Em contrapartida, vários neurotransmissores (noradrenalina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), neuropeptídeo Y, entre outros) e vasoconstritores (como angiotensina II e endotelina-1) inibem os  $K_{ATP}$  levando a despolarização e contração (QUAYLE; NELSON; STANDEN, 1997). Esse canal tanto pode ser inibido por ATP intracelular como por sulfonilureias como, por exemplo, a glibenclamida e a tolbutamida, e por baixa concentração de  $Ba^{2+}$  extracelular (STANDEN et al., 1989; SANBORN, 2000). Sun e Benishin (1994) mostraram que os  $K_{ATP}$  estão presentes em músculo longitudinal de íleo de cobaia, pois a cromacalina, nicorandil e pinacidil, ativadores desses canais, foram capazes de inibir as contrações tônicas induzidas por histamina (0,5  $\mu$ M) ou por KCl (30 mM).

Para verificar a hipótese de que o RL-OE poderia estar ativando os canais  $K_{ATP}$  para exercer seu efeito relaxante em íleo de cobaia, avaliou-se a atividade espasmolítica desse óleo essencial na ausência e na presença de glibenclamida, um bloqueador seletivo desses canais (SUN; BENISHIN, 1994). Como a curva de relaxamento do RL-OE não foi alterada na presença desse bloqueador (Gráfico 15A) essa hipótese foi descartada.

Os  $K_{Ca}$  estão presentes no músculo liso gastrointestinal. Uma vez ativados, pelo aumento da  $[Ca^{2+}]_c$ , dão início ao efluxo dos íons  $K^+$  que via repolarização/hiperpolarização do potencial de membrana restabelece as  $[Ca^{2+}]_c$  através da limitação do influxo do íon  $Ca^{2+}$  seja pela desativação dos  $Ca_v$  ou pelo aumento da atividade do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ . Portanto, os  $K_{Ca}$  regulam a amplitude e duração das modificações de  $[Ca^{2+}]_c$  e assim afetam as vias de sinalização que são disparadas pelo íon  $Ca^{2+}$  (FAKLER; ADELMAN, 2008).

Os canais  $K_{Ca1.1}$  ou  $BK_{Ca}$  são encontrados em cérebro, cóclea, músculo esquelético e músculo liso. Já os  $K_{Ca2.1}$ ; 2.2 e 2.3 ou  $SK_{Ca}$  são largamente encontrados em cérebro, coração e alguns tipos de músculo liso. Enquanto que os  $K_{Ca3.1}$  ou  $IK_{Ca}$  estão presentes na placenta, próstata, linfócitos, pâncreas e endotélio vascular (WEI et al., 2005). Os  $SK_{Ca}$  estão constitutivamente associados a CaM, que medeia a abertura do canal através da ligação com o  $Ca^{2+}$  (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010). Os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de pequena condutância ( $SK_{Ca}$ ) geram uma corrente hiperpolarizante em células excitáveis após a geração do potencial de ação, e assim levam ao relaxamento do músculo liso (BERKEFELD; FAKLER; SCHULTE, 2010; BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007).

A possível participação dos  $SK_{Ca}$  no efeito relaxante do RL-OE em íleo de cobaia foi refutada, uma vez que na presença de apamina, um inibidor seletivo dos  $SK_{Ca}$  (ISHII; MAYLIE; ADELMAN, 1997; VAN DER STAAY et al., 1999), a curva de relaxamento do óleo essencial não foi alterada (Gráfico 15B), sugerindo que, assim como os  $K_{ATP}$ , os  $SK_{Ca}$  também não estão envolvidos no mecanismo de ação espasmolítico do RL-OE.

Resultados divergentes foram observados por Macêdo (2008) com o diterpeno labdano-302 e por Santos et al. (2011b) com o diterpeno traquilobano-318, ambos diterpenos isolados de *X. langsdorfiana*, em músculo liso gastrointestinal que têm como alvos farmacológicos, em nível funcional, os canais para  $K^+$ , dos subtipos  $K_{ATP}$  e  $SK_{Ca}$ , para exercer seus efeitos espasmolíticos.

Fisiologicamente, a ativação dos  $BK_{Ca}$  provê um mecanismo de *feedback* que limita a contração por causar hiperpolarização e redução da duração do potencial de ação no músculo liso, limitando assim a entrada de  $Ca^{2+}$  através dos  $Ca_v$  (PONTE et al., 2012). Romero et al. (1998) utilizando a técnica de *patch-clamp* caracterizaram uma população de canais  $BK_{Ca}$  que são indiretamente ativados pela angiotensina II, um agonista contrátil que induz dessensibilização do componente tônico da contração em íleo de cobaia. Posteriormente Silva, Nouailhetas e Aboulafia (1999) demonstraram que a dessensibilização do componente tônico induzida pela angiotensina II era devido à abertura dos  $BK_{Ca}$  levando a uma repolarização e, conseqüentemente, fechando os  $Ca_v$  responsáveis pelo influxo de  $Ca^{2+}$  que sustenta o componente tônico no íleo de cobaia.

Dessa forma, passou-se a investigar se o RL-OE estaria agindo sobre os canais  $BK_{Ca}$ , ativando-os e, conseqüentemente, levando a uma repolarização de

membrana que levaria a um bloqueio indireto dos  $Ca_v$ . Em presença de 1 mM de TEA<sup>+</sup>, que nessa concentração torna-se específico em bloquear os BK<sub>Ca</sub> (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), a curva de relaxamento do RL-OE foi desviada para a direita fornecendo uma CE<sub>50</sub> de  $13,0 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$  (Gráfico 15D) cerca de 2 vezes maior que na ausência deste bloqueador (CE<sub>50</sub> =  $6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ). Esses dados sugerem que a modulação positiva dos BK<sub>Ca</sub> está envolvida no mecanismo de ação relaxante do RL-OE em íleo de cobaia.

A contribuição dos BK<sub>Ca</sub> no mecanismo de ação relaxante do RL-OE em íleo de cobaia foi confirmada através da utilização da ferramenta farmacológica IbTx, uma toxina isolada do escorpião *Buthus tamulus* (GALVEZ et al., 1990), capaz de bloquear especificamente os BK<sub>Ca</sub>. Na presença desta toxina, o efeito relaxante do RL-OE foi atenuado de maneira significativa, apresentando uma CE<sub>50</sub> de  $19,0 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$  (Gráfico 15E), com redução da potência relaxante em cerca de 3 vezes, evidenciando a participação deste canal.

Distintamente do observado, a participação dos BK<sub>Ca</sub> no mecanismo de ação espasmolítica em íleo de cobaia não foi evidenciado para os diterpenos, labdano-302 (MACÊDO, 2008) e traquilobanos 360 e 318 (SANTOS et al., 2011b).

Os K<sub>v</sub> possuem uma grande importância na manutenção do potencial de repouso no íleo de cobaia e é bastante distribuído neste órgão (GORDIENKO; ZHOLOS; BOLTON, 1999). Até hoje, pelo menos doze diferentes subfamílias de subunidades- $\alpha$  de K<sub>v</sub> são relatadas e os genes que codificam essas subunidades funcionais dos K<sub>v</sub> já foram identificados tanto no genoma humano como de outros animais (CHANDY et al., 2012). Isso demonstra a grande diversidade e complexidade de ações que podem ser esperadas da ativação destes canais de K<sup>+</sup> na célula.

Apesar da grande diversidade dos K<sub>v</sub>, uma ferramenta farmacológica muito importante no estudo desses canais é a 4-AP, que é conhecida por bloquear os K<sub>v</sub> (ou pelo menos sua maioria), sendo assim usada para o estudo do mecanismo de ação de várias substâncias com atividade relaxante da musculatura lisa (SATAKE; SHIBATA; SHIBATA, 1997; HUANG et al., 1998; LI et al., 1999; PELAIA et al., 2002).

Como ficou demonstrado pelo Gráfico 15C, o RL-OE (CE<sub>50</sub> =  $6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) teve sua potência relaxante reduzida cerca de 2 vezes na

presença da 4-AP ( $CE_{50} = 13,9 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que, assim como os  $BK_{Ca}$ , os  $K_V$  também estão envolvidos no mecanismo de ação espasmolítico do RL-OE.

Com o intuito de verificar se há somação do efeito de ativação/modulação dos canais de  $K^+$  ( $BK_{Ca}$  e  $K_V$ ) no relaxamento produzido pelo RL-OE. Resolveu-se adicionar, na mesma preparação, ambos os bloqueadores desses canais. Como foi evidenciado no Gráfico 16, houve somação do efeito relaxante do RL-OE ( $CE_{50} = 6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) na presença simultânea dos bloqueadores  $TEA^+$  (1 mM) e 4-AP (0,3 mM) ( $CE_{50} = 24,1 \pm 3,9 \mu\text{g/mL}$ ), pois a curva de relaxamento do RL-OE foi descolada para a direita mais eficientemente na presença do bloqueio simultâneo ( $TEA^+ + 4-AP$ ) (Gráfico 16) do que quando era utilizado esses bloqueadores individualmente (Gráficos 15C e 15D). Além disso, na presença do bloqueio simultâneo ( $TEA^+ + 4-AP$ ) a potência do RL-OE foi similar à observada na presença de 5 mM de CsCl, bloqueador inespecífico dos canais de  $K^+$  ( $CE_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráficos 16). Confirmando assim que o mecanismo de ação espasmolítico do RL-OE em íleo de cobaia envolve a ativação/modulação dos canais de  $K^+$ , e em especial, parece envolver apenas os subtipos  $BK_{Ca}$  e  $K_V$ .

Se esta interpretação estivesse correta, então qualquer manobra utilizada para dificultar o efluxo de  $K^+$  deveria impedir este relaxamento. Silva; Nouailhetas; Aboulafia (1999) utilizaram diferentes concentrações de  $K^+$  extracelular, aplicados 2 minutos após o íleo de cobaia ser contraído por  $10^{-7}$  M de angiotensina II ou por  $10^{-6}$  M de ACh. Observou-se que em concentrações inferiores a 4 mM de KCl não alteravam o padrão de resposta dos agonistas testados. No entanto, nas concentrações de 8 e 16 mM de KCl houve alteração do padrão de resposta desses agonistas. Essa concentração de KCl não é suficiente para provocar uma resposta sustentada no íleo de cobaia, no entanto, a adição de 8 ou 16 mM de KCl aplicados 2 minutos após a contração induzida por esses agonistas causa uma depolarização de membrana suficiente para impedir o efluxo de  $K^+$  pelos  $BK_{Ca}$ .

De fato, a adição de 16 mM de KCl sobre o componente tônico da contração produzida pela histamina reduziu a potência relaxante do RL-OE de  $6,6 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$  para  $17,0 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$  (Figura 30 e Gráfico 17). E ainda, na presença de 16 mM de KCl a potência relaxante do RL-OE não diferiu estatisticamente da  $CE_{50}$  observada na presença de 5 mM de CsCl ( $CE_{50} = 22,1 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$ ) (Gráfico 17). Confirmando, mais uma vez, que os canais de  $K^+$  estão envolvidos no mecanismo de ação espasmolítico do RL-OE em íleo de cobaia.

Existem evidências de que substâncias capazes de modular indiretamente a abertura dos canais de  $K^+$  (BOLOTINA et al., 1994; DENSON et al., 2005; FINN; GRUNWALD; YAU, 1996; GRIBKOFF; STARRETT; DWORETZKY, 2001; LIU et al., 2003), algumas delas, como a forskolina (FSK) que é um diterpeno do tipo labdano isolado de *Coleus forskohlii* (Laminaceae), são capazes de modular positivamente a abertura de canais de  $K^+$  por fosforilação via PKA (MASON et al., 2002; WINKLHOFER et al., 2003). Em nosso grupo de estudo foi demonstrado que o labdano-302, diterpeno isolado da espécie *X. langsdorfiana*, parece exercer seu efeito espasmolítico sobre traqueia de cobaia, aorta de rato e útero de rata através da via de sinalização AMPc-PKA (RIBEIRO et al., 2007; RIBEIRO, 2007; TRAVASSOS, 2010).

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) estão amplamente distribuídas em vários tecidos de mamíferos, incluindo o músculo liso, sendo distribuídas em 11 famílias distintas (PDE1-11) e tendo como função a hidrólise do AMPc e do GMPc resultando em seus produtos inativos, o 5'-AMP e o 5'-GMP, que não são capazes de ativar, respectivamente, a PKA e a PKG, cessando assim a sinalização celular dependente do aumento destes nucleotídeos cíclicos (LUGNIER, 2006).

Substâncias capazes de aumentar o conteúdo intracelular de AMPc ou GMPc tem seu efeito relaxante potencializado pela inibição das PDEs em vários tecidos devido ao acúmulo do conteúdo total desses nucleotídeos (BENDER; BEAVO, 2006; LUGNIER, 2006). Uma maneira indireta para se investigar a participação de nucleotídeos cíclicos (AMPc e/ou GMPc), em nível funcional, no efeito relaxante do RL-OE é a utilização de inibidores de PDEs, como a aminofilina (JENNE, 1992; LIU et al., 2003). No entanto, a hipótese da participação da via dos nucleotídeos cíclicos no efeito espasmolítico do RL-OE foi descartada, uma vez que, o efeito relaxante do RL-OE, em íleo de cobaia, não foi alterado na presença de  $10^{-4}$  M de aminofilina, um inibidor não seletivo das PDEs (KAŽIĆ, 1977) (Figura 31 e Gráfico 18).

Até aqui, evidenciou-se que o mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia dá-se através do bloqueio dos  $Ca_v$ , em especial dos  $Ca_v-L$ , além da ativação/modulação positiva dos canais de  $K^+$ , em especial dos subtipos  $BK_{Ca}$  e  $K_v$ , o que possivelmente acarretaria uma hiperpolarização de membrana com consequente fechamento dos  $Ca_v$ .

Uma vez que, todos os resultados obtidos até aqui apontam que o RL-OE interfere na sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  para assim exercer seu efeito espasmolítico em íleo de cobaia. Decidiu-se corroborar esses achados em âmbito celular, averiguando se o RL-OE reduziria os níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  e para isso utilizou-se culturas de miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia.

Inicialmente, nos estudos celulares, avaliou-se a viabilidade dos miócitos na presença e na ausência do RL-OE (81  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) no período de 2 h (Gráfico 19,  $n = 3$ ) utilizando o ensaio de redução do MTT. O ensaio de MTT, usado para medir a atividade metabólica de células viáveis, é quantitativo e sensível. Por causa da relação linear entre atividade celular e absorvância, o crescimento ou taxa de morte de células pode ser mensurado (ATCC, 2013). Observou-se que não houve morte celular, no período de 2 horas, tempo necessário para a reversibilidade do efeito depois da retirada do RL-OE da cuba, nos experimentos funcionais. No entanto, mais testes relacionados à citotoxicidade do óleo essencial não devem ser desconsiderados para atestar a sua segurança.

Para ocorrer o relaxamento da musculatura lisa faz-se necessário a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$ , uma vez que o desencadeamento da contração e parte da manutenção desta contração depende do aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Com o advento das técnicas de medida de íons  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando como ferramentas indicadores fluorescentes sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , as mudanças na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  são realizadas em vários tipos de músculos lisos. E recentes avanços direcionados na tecnologia de imagem, com a microscopia confocal, facilitaram a observação das características espaciais dos eventos e suas relações entre organelas e microdomínios de membrana (WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

Visto que as células musculares lisas da camada longitudinal do íleo de cobaia mostraram-se viáveis na presença do óleo essencial, passou-se a avaliar se a redução da  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  seria o meio pelo qual RL-OE estaria relaxando as preparações de músculo liso nos experimentos funcionais. A concentração de 81  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi escolhida, pois foi a máxima concentração necessária para o íleo relaxar, quando o agonista utilizado foi a histamina. Para se comprovar uma possível redução na  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  por parte do RL-OE, o efeito do mesmo foi observado sobre a intensidade de fluorescência do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático marcado com a sonda fluorescente fluo-4 e quantificado em miócitos de íleo de cobaia.

Os registros mostram que a concentração de 81 µg/mL do RL-OE reduziu a intensidade de fluorescência, refletindo assim a diminuição da  $[Ca^{2+}]_c$  (Figura 32B), a redução da fluorescência foi em torno de 70%. Resultados semelhantes foram observados após a exposição dos miócitos à concentração de 1 µM do verapamil, um bloqueador dos  $Ca_v-L$  (STANEVA-STOYTCHIEVA; VENKOVA, 1992) (Figura 32C), não havendo diferença significativa entre os valores de porcentagem de intensidade de fluorescência na presença do RL-OE e do verapamil (Gráfico 20).

Resultados similares foram evidenciados com o XL-OE, que reduziu a intensidade de fluorescência em aproximadamente 80%, no entanto, o XF-OE apresentou uma maior redução da intensidade de fluorescência, com 97% de redução (CORREIA et al., 2013). Sugerindo assim, que a redução da  $[Ca^{2+}]_c$  não é o único mecanismo envolvido no efeito espasmolítico do RL-OE, uma vez que este foi mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas por histamina nos experimentos funcionais (Tabela 8), mas contraditoriamente, o XF-OE reduziu mais eficientemente a  $[Ca^{2+}]_c$  nos experimentos celulares com miócitos intestinais. Semelhantemente, o óleo essencial das folhas de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae), assim como os diterpenos (traquilobano-360 e traquilobano-318), obtidos da espécie *X. langsdorfiana*, também reduziram a  $[Ca^{2+}]_c$  dos miócitos intestinal para exercer seu mecanismo de ação espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA, 2013; SANTOS et al., 2012b).

Assim, demonstra-se nesse trabalho que o mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia envolve bloqueio do influxo de  $Ca^{2+}$ , via  $Ca_v-L$ , além da ativação/modulação positiva dos canais  $BK_{Ca}$  e  $K_v$ , o que levaria a redução da  $[Ca^{2+}]_c$  e conseqüente relaxamento desse órgão.



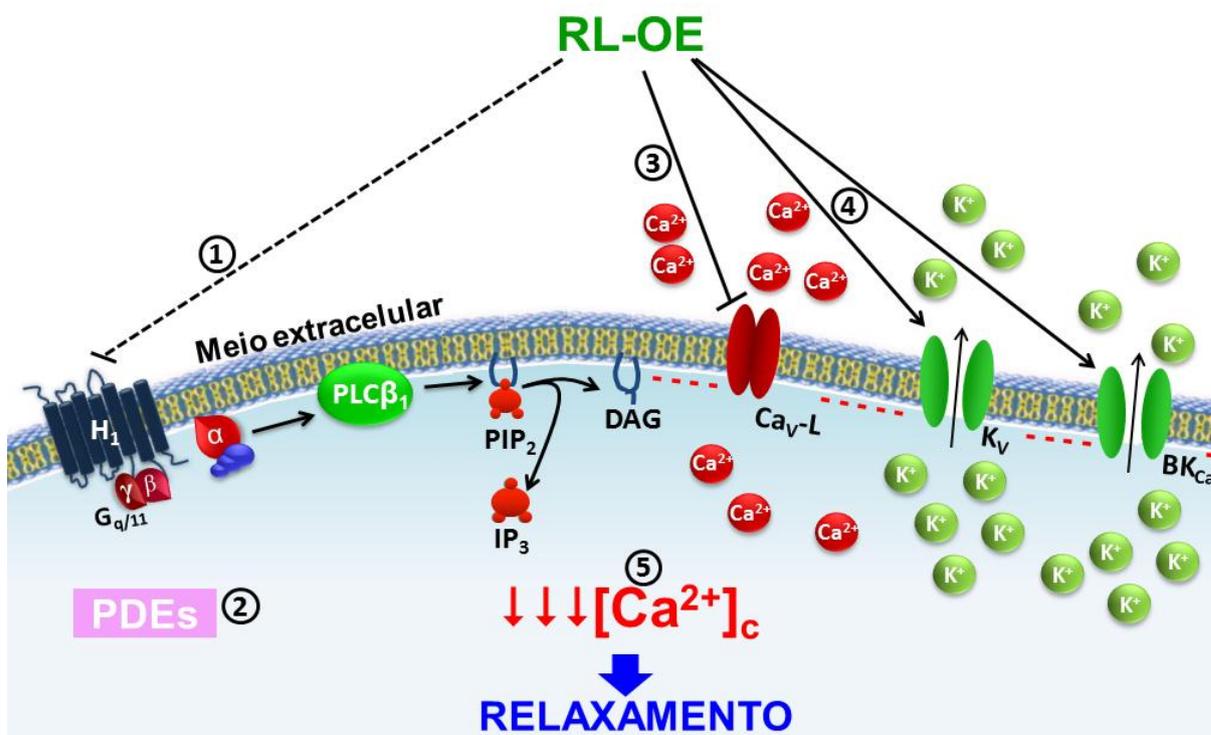
## 7 Conclusões

Na investigação do efeito espasmolítico dos óleos essenciais das folhas de espécies de Annonaceae: *Xylopi langsdorfiana* A. St.-Hil. & Tul. (XL-OE), *Xylopi frutescens* Aubl. (XF-OE) e *Rollinia leptopetala* R.E. Fries (RL-OE) em modelos de musculatura lisa pode-se concluir que:

- Aorta de rato
  - O XL-OE apresenta uma baixa eficácia vasorrelaxante, enquanto que o efeito vasorrelaxante do XF-OE depende dos fatores relaxantes derivados do endotélio e o efeito do RL-OE independe desses fatores relaxantes.
  
- Traqueia de cobaia
  - Os XL-OE e XF-OE apresentam uma baixa eficácia espasmolítica nesse órgão;
  - O RL-OE foi o óleo essencial mais eficaz nesse órgão e seu mecanismo de ação espasmolítico parece independer dos fatores relaxantes derivados do epitélio.
  
- Útero de rata
  - O XL-OE apresenta baixa eficácia tocolítica, enquanto que o XF-OE e o RL-OE apresentam atividade tocolítica não seletiva, sendo mais potente frente à ocitocina.

- Íleo de cobaia
  - Todos os óleos essenciais apresentam maior eficácia e potência espasmolítica na musculatura lisa intestinal;
  - Os XL-OE, XF-OE e RL-OE apresentam efeito espasmolítico não seletivo, sendo o último mais potente frente à histamina.
  
- Mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia
  - Não envolve antagonismo competitivo dos receptores histaminérgicos;
  - Envolve o bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem ( $\text{Ca}_V$ ), em especial os do tipo L;
  - Envolve a modulação positiva dos canais de  $\text{K}^+$ , particularmente os dos subtipos  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  e  $\text{K}_V$ ;
  - Não há a participação da via dos nucleotídeos cíclicos;
  - Não é citotóxico sobre os miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia;
  - Reduz o conteúdo citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  em miócitos intestinais de cobaia.

**Figura 33** – Esquema representativo do mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia



Fonte: Autor, 2013.

O mecanismo de ação espasmolítica do RL-OE em íleo de cobaia, (1) não envolve antagonismo competitivo dos receptores histaminérgicos, (2) independe da participação da via dos nucleotídeos cíclicos, (3) envolve o bloqueio do influxo de Ca<sup>2+</sup>, via os Ca<sub>V</sub>-L e a (4) ativação/modulação positiva dos canais de K<sup>+</sup>, particularmente os dos subtipos K<sub>V</sub> e BK<sub>Ca</sub>, hiperpolarizando as células intestinais, além de não ser citotóxico (não mostrado na figura), (5) reduzir a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> em miócitos da camada longitudinal e conseqüentemente relaxamento desse órgão. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.



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

ABOULAFIA, J; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A. Protein kinase C modulators enhance angiotensin II desensitization of guinea pig ileum via maxi-K<sup>+</sup> channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 442, p. 29-36, 2002.

AGUILAR, H. N.; MITHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, p. 725-744, 2010.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114-140, 2007.

AJAYA, M.; GILANIB, A. H.; MUSTAFAA, M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 74, p. 603–612, 2003.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5rd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 Suppl 1, p. S142-143, 2011.

ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; GUTMAN, G. A.; WEI, A. D.; WULFF, H. Calcium-activated potassium channels, introductory chapter. Lastmodified on 15/10/2009. Acesso em 22/05/2013. IUPHAR database(IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=69>.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.

ASEKUN, O. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. Capensis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 995-998, 2007.

ASFAW, N.; DEMISSEW, S. Handbook of African medicinal plants. **Economic Botany**, v. 48, n. 1, p. 64-64, 1994.

ATCC (American Type Culture Collection). **MTT Cell Proliferation Assay Instruction Guide**. Disponível em: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>. Acesso em: 16/04/2013.

BABENKO, A. P.; AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. A view of sur/KIR6.X, KATP channels. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 667-687, 1998.

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

BARNES, J.N.; SCHANEBERG, B. T.; SNEDEN, AT. Bistetrahydrofuranoid Acetogenins From *Rollinia sericea*. **Planta Médica**, v. 61, n. 5. p. 486-487, 1995.

BARROSO, G. M. **Em Sistemática de Angiosperma do Brasil**; LTC-Livros Técnicos e Científicos Ed S.A./Ed da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.1, p. 28-33,1978.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BENHAM, C. D.; BOLTON, T. B. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 381, p. 385-406, 1986.

BERKEFELD, H.; FAKLER, B.; SCHULTE, U. Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels: From Protein Complexes to Function. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1437-1459, 2010.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited , p. 1-118, 2009a.

BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 933-940, 2009b.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, n. 1, p. 2, 2003.

BIZZO, H. R.; HOVELI, A. M. C.; REZENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLAUSTEIN, M. P. Sodium/Calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289-330, 1989.

- BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, Inc. 2011.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.
- BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth-muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.
- BOLTON, T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. **The Journal of Physiology**, v. 570, p. 5-11, 2006.
- BOLTON, T. B.; CLARK, J. P.; KITAMURA, K.; LANG, R. J. Evidence that histamine and carbachol may open the same ion channels in longitudinal smooth muscle of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 320, p. 363-379, 1981.
- BOYLE, J. P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M. I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 447, p. 329-350, 1992.
- BRAGA, F. C.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J. A.; OLIVEIRA, A. B. Screening Brazilian plant species for in vitro inhibition of 5-lipoxygenase. **Phytomedicine**, v. 6, n. 6, p. 447-452, 2000.
- BRAINARD, A. M.; KOROVIKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.
- BRASIL. Anvisa. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 14/2010**. Brasília, DF, março, 2010.
- BRASIL. Portal Saúde. **Fitoterápicos são alternativa de tratamento no SUS**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8061/162/sus-oferece-fitoterapicos-como-alternativa-de-tratamento.html>> Acesso em: 21/03/2013
- BRANDÃO, M. G. L.; PAULA-SOUZA, J.; GRAEL, C. F. F.; SCALON, V.; SANTOS, A. C. P.; SALIMENHA, M. F.; MONTE-MOR, R. L. M. Biodiversidade, uso tradicional de plantas medicinais e produção de fitoterápicos em minas gerais. Belo Horizonte. **Anais do XIV Seminário de Economia Mineira**, p. 1-10, 2010.
- BRAYDEN, J. E. Functional Roles Of KATP Channels In Vascular Smooth Muscle. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 29, n. 4, p. 312-316, 2002.
- CAETANO, L. C.; DADOUN, H. Pallidine and aporphinoid alkaloids from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 330-330, 1987.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

- CAMPBELL A. K. **Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator**. Chichester, UK: Wiley, 1983.
- CANDIA, S.; GARCIA, M. L.; LATORRE, L. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel. **Biophysical Journal**, v. 63, p. 583–590, 1992.
- CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; GUTMAN, G. A.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L. A.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M. C.; STÜHMER, W.; WANG, X. Voltage-gated potassium channels. Last modified on 11/10/2012. Acesso em 06/04/2013. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyMenuForward?familyId=81&familyType=IC>.
- CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.
- CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 411-425, 2005.
- CECCHI, X.; WOLFF, D.; ALVAREZ, O; LATORRE, R. Mechanisms of  $\text{Cs}^+$  blockade in a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.
- CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.
- CHITALEY, K.; WEBER, D.; WEBB, R. C. RhoA/Rho-kinase, vascular changes, and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 3, n. 2, p. 139-144, 2001.
- CHOE, S. Potassium channel structures. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, p. 115-121, 2002.
- CLARO, S.; KANASHIRO, C. A.; OSHIRO, M. E. M.; FERREIRA, A. T.; KHALIL, R. A.  $\alpha$ - and  $\epsilon$ -protein kinase C activity during smooth muscle apoptosis in response to  $\gamma$ -radiation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p. 964–972, 2007.
- CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K-8644, on guinea-pig ileum ant rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954-957, 1987.
- CORRÊA, P. M. In: **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e Exóticas Cultivadas** p.479, Brasil, IBDF, Ministério da Agricultura, v.5, 1984.

- CORREIA, A. C. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; BURI, M. V.; RIGONI, V. L. S.; NOUAILHETAS, V. L. A.; SILVA, B. A. Óleos essenciais do gênero *Xylopi*a reduzem a  $[Ca^{2+}]_c$  em miócitos da camada longitudinal de íleo de cobaia. **IX Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, Goiânia, 2013.
- COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, C. S.; CASTELLO-BRANCO, M. V. S.; DINIZ, M. F. F. M.; LIMA, C. U. G. B.; SANTOS, B. V. O.; PITA, J. C. L. R.; SILVA, M. S. Constituintes Químicos das folhas re *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 138-142, 2012.
- COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; AGRA, M. F.; FALCÃO-SILVA, V. S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SILVA, M. S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 245-248, 2008.
- CRUZ, T. CABO, M. M.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Composition and pharmaceutical activity of the essential oil of *Satureja obovata*. II. Spasmolytic activity. **Journal Fitoterapia**, v. 61, n. 3, p. 247-251, 1990.
- CUPERTINO-SILVA, Y. K.; DIAS, T. L. M. F.; MUNIZ, G.; SANTOS, M. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ARAUJO JUNIOR, J. X.; ALEXANDRE MOREIRA, M. S. Atividade antinoceptiva de diterpenos isolados de *Xylopi*a *langg*sдорffiana (ANNONACEAE) **Anais 38º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Ribeirão Preto-SP, 2006.
- DABRAH, T. T.; SNEDEN, A. T. Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia papilionella*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 436-436, 1983.
- DANIEL, E. E.; KWAN, C.Y.; JANSSEN, L. Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscle. **Journal Pharmacological Toxicology**, v. 45, p.141-159, 2001.
- DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S.J.; TAYLOR, C.W.  $Ca^{2+}$  entry through plasma membrane  $IP_3$  receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROS, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.
- DENSON, D. D.; LI, J.; WANG, X.; EATON, D. C. Activation of BK channels in GH3 cells by a c-PLA2-dependent G-protein signaling pathway. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 6, p. 3146-3156, 2005.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological. Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo, UNESP, 604p., 2002.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1450, n. 3, p.191-231, 1999.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DU, J.; YU, Y.; KE, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z. M. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 211–214, 2007.

DUARTE, M. C. Novos Diterpenos dos Frutos de *Xylopia langsdorffiana*. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2009.

DUKE, J. A., VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1994.

EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; WESTON, A. H. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiological**, v. 459, p. 863-879, 2010.

EKUNDAYO, O. A Review of the Volatiles of the Annonaceae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 1, p. 223-245, 1989.

ERTEL, E. A.; CAMPBELL, K. P.; HARPOLD, M. M.; HOFMANN, F.; MORI, Y.; PEREZ-REYES, E.; SCHWARTZ, A.; SNUTCH, T. P.; TANABE, T.; BIRNBAUMER, L.; TSIEN, R. W.; CATTERALL, W. A. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, v. 25, p. 533–535, 2000.

EVANGELISTA, G. L.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; LOPES, E. A. B.; SANTOS, M. V.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 515-522, 2007.

EXTON, J. H. New developments in phospholipase D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 25, p. 15579-15582, 1997.

FAKLER, B.; ADELMAN, J. P. Control of K(Ca) channels by calcium nano/microdomains. **Neuron**, v. 59, n. 6, p. 873-881, 2008.

FARMER, S, G.; HAY, D. W.; RAEBURN D.; FEDAN, J. S. Relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle to arachidonate is converted to contraction following epithelium removal. **British Journal of Pharmacology**, v. 92, p. 231-236, 1987.

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, J. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 375-378, 2009.

- FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D.J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p. 149-154, 1989.
- FERRO, A. F. P.; BONACELLI, M. B. M. ; ASSAD, A. L. D. Oportunidades tecnológicas e estratégias concorrenciais de gestão ambiental: O uso sustentável da biodiversidade brasileira. **Gestão & Produção**, v. 13, n. 3, p. 489-501, 2006.
- FINN, J. T.; GRUNWALD, M. E.; YAU, K. W. Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels: An Extended Family With Diverse Functions. **Annual Review of Physiology**, v. 58, n. 1, p. 395-426, 1996.
- FLAGG, T. P.; ENKVETCHAKUL, D.; KOSTER, J. C.; NICHOLS, C. G. Muscle KATP Channels: Recent Insights to Energy Sensing and Myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 799-829, 2010.
- FLEISCHMANN, B. K.; WASHABAU, R. J.; KOTLIKOFF, M. I. Control of resting membrane potential by delayed rectifier potassium currents in ferret airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 469, p. 625-638, 1993.
- FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; DIEGOLI, M. S.; ARIE, W. M. Y. **Dismenorréia**. In: HALBE, H. W., editor. Tratado de Ginecologia. 3ª. ed., São Paulo, Roca, p. 748-54, 2000.
- FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae Essential Oil: Review. **Journal Essential Oil Research**, v. 11, p. 131-142, 1999.
- FOWLER, M. W. Review Plants, medicines and man. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1797-1804, 2006.
- FUKATA, Y.; AMANO, M.; KAIBUCHI, K. Rho-Kaibuchi, K-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 32-39, 2001.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelium cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.
- GALVEZ, A.; GIMENEZ-GALLEGO, G.; REUBEN, J. P.; ROY-CONTANCIN, L.; FEIGENBAUM, P.; KACZOROWSKI, G. J.; GARCIA, M. L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11083-11090, 1990.
- GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In: **Molecular Aspects of Cell Biology**. Phyladelphia, Saunders, p. 1156-1179, 1995.
- GORDIENKO, D. V.; ZHOLOS, A. V.; BOLTON, T. B. Membrane ion channels as physiological targets for local Ca<sup>2+</sup> signalling. **Journal of Microscopy**, v. 196, p. 305-316, 1999.

GRIBKOFF, V. K.; STARRETT, J. E.; DWORETZKY, S. I. Maxi-K Potassium Channels: Form, Function, and Modulation of a Class of Endogenous Regulators of Intracellular Calcium. **The Neuroscientist**, v. 7, n. 2, p. 166-177, 2001.

GROSS, N. J. Ipratropium bromide. **New England Journal of Medicine**. v. 319, p. 486-494, 1988.

GUTMAN, G. A.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; LAZDUNSKI, M.; MCKINNON, D.; PARDO, L. A.; ROBERTSON, G. A.; RUDY, B., SANGUINETTI, M. C.; STUHMER, W.; WANG, X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B.; Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 67-71, 2003.

HASHIBA, K. M.; SATO, T.; HIROTA, K., HASHIMOTO, Y.; MATSUKI, A. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and beta-adrenoceptor activity. **Anesthesia & Analgesia**, v. 89, p. 191-196, 1999.

HEGNAUER, R. **Chemotaxonomie der Pflazen**. Basileia e Suttgart, Birkhause Verlag, v.3, p. 116, 1964.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: Importância e perspectiva terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**: 2. Ed. – Itajaí: Universidade do vale do Itajaí, 2009. Cap. IX, p. 221-256.

HEIZMANN, C.W. (Ed.) **Novel Calcium-Binding Proteins**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 65–99, 1991

HILL-EUBANKS, D. C.; WERNER, M. E.; HEPPNER, T. J.; NELSON, M. T. Calcium Signaling in Smooth Muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 27, p. 1-21, 2011.

HIRST, S. J.; TWORT, C. H.; LEE, T. H. Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 23, p. 335-344, 2000.

HOLGATE, S. T. Antihistamines in the treatment of asthma. **Clinical Reviews in Allergy Immunology**, v. 12, p. 65-78, 1994.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

HUANG, Y. Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K<sup>+</sup> channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

- HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**, Oxford, Clarendon Press, p. 22-168, 1973.
- ISHII, T. M.; MAYLIE, J.; ADELMAN, J. P. Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 37, p. 23195-23200, 1997.
- IWU, M. In: **Handbook of African medicinal plants**. Boca Raton, CRC Press, 1993.
- JACKSON, W. F. Ion channel and vascular tone. **Hypertension**, v. 35, p. 173-178, 2000.
- JAN, L. Y.; JAN, Y. N. Structural elements involved in specific K<sup>+</sup> channel functions. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 537-555, 1992.
- JENNE, J. Theophylline produces over-additive relaxation of canine tracheal smooth muscle when combined with beta-agonists: The dose-response relationship. **Pulmonary Pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 239-249, 1992.
- JENETT-SIEMS, K.; MOCKENHAUPT, F. P.; BIENZLE, U.; GUPTA, M. P.; EICH, E. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical Medicine & International Health**, v. 4, n. 9, p. 611-615, 1999.
- JIANG, Y.; LEE, A.; CHEN, J.; CADENE, M.; CHAIT, B. T.; MACKINNON, R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. **Nature**, v. 417, n. 6888, p. 515-522, 2002.
- JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 67-72, 1981.
- KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopica* (Dun) S. Rich. (ANNONACEAE) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8094-8098, 2004.
- KAŽIĆ, T. Action of methylxanthines and imidazole on the contractility of the terminal ileum of the guinea pig. **European Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 103-111, 1977.
- KIM, H. R.; APPEL, S.; VETTERKIND, S.; GANGOPADHYAY, S. S.; MORGAN, K. G. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165-2180, 2008.
- KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

- KO, E. A.; PARK, W. S.; FIRTH, A. L.; KIM, N.; YUAN, J. X.-J.; HAN, J. Pathophysiology of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells: Modulation by protein kinases. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 103, p. 95-101, 2010.
- KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic Ca<sup>2+</sup>-release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997-18004, 1989.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego, Academic Press, 203-219, 1996.
- KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421-425, 2001.
- KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.
- LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHÃES, P. J. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; PINTO, D. G. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats **Life Sciences**, v. 74, p. 2401-2412, 2004.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783-2813, 1982a.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of the Annonaceae. XLIII. Alkaloids of *Xylopiya frutescens* Aubl. **Plantes Medicinales et Phytothérapie**, v. 16, p. 253-259, 1982b.
- LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-78, 2006.
- LEE, U. S.; CUI, J. BK channel activation: structural and functional insights. **Trends in Neurosciences**, v. 33, n. 9, p. 415-423, 2010.
- LI, L.; VAALI, K.; VAPAATALO, H.; KANKAANRANTA, H. Effects of K<sup>+</sup> channel inhibitors on relaxation induced by flufenamic and tolfenamic acids in guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 383, n. 2, p. 169-176, 1999.
- LIU, X.S.; XU, Y.J.; ZHANG, Z.X.; LI, C.Q.; YANG, D.L.; ZHANG, N.; NI, W. Isoprenaline and aminophylline relax bronchial smooth muscle by cAMP-induced stimulation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 5, p. 408-414, 2003.
- LIS-BALCHIN, M.; HART, S.; ROTH, G. The spasmolytic activity of the essential oils of scented *Pelargonium* (Geraniaceae). **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 8, p. 583-584, 1997.

- LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiya discreta*. **Parasite Immunology**, v. 3, n.10, p. 623-30, 2009.
- LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.
- LUNGUINHO, D. M. Estudo dos Efeitos Antitumorais e Toxicológicos do Óleo Essencial das Folhas de *Xylopiya frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2012.
- MA, J.; PAN, Z. Retrograde activation of store-operated calcium channel. **Cell Calcium**, v. 33, n. 5-6, p. 375-384, 2003.
- MAAS, P. J. M; MAAS-VAN DE KAMER, H.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.
- MAAS, P. J. M.; VESTRA, L. Y. T. Flora Neotrópica Monograph. **Organization for Flora Neotropica**, The New York Botanical Garden, v. 57, p.121-123, 1992.
- MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de K<sup>+</sup> na ação espasmolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopiya langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em óleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.
- MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.
- MADEIRA, S. V. F.; RABELO, M.; SOARES, P. M. G.; SOUZA, P. M. G.; MEIRELES, A. V. P.; MONTENEGRO, C.; LIMA, R. F.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomedicine**, v. 12, p. 506-509, 2005.
- MAGALHÃES, P. J. C.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Spasmolytic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, p. 539-546, 2004.
- MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal Transduction in Gastrointestinal Smooth Muscle. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 3, p. 269-276, 1997.
- MARTINS, I. R. R.; SANTOS, R. F.; CORREIA, A. C. C.; OLIVEIRA, G. A.; MACÊDO, C. L.; MONTEIRO, F. S.; SANTOS, P. F.; CAVALCANTE, F. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, B. A. Relaxant effect of Ent 7 $\alpha$  hydroxytrachyloban 18-oic acid, a trachylobane diterpene from *Xylopiya langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul., on tracheal smooth muscle, *J. Smooth Muscle Res.*, **xx,xx-xx**, (2013) *in press*.

- MASON, H. S.; LATTEN, M. J.; GODOY, L. D.; HOROWITZ, B.; KENYON, J. L. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 285-293, 2002.
- MATSUSE, I.T.; LIM, Y. A.; HATTORI, M.; CORREA, M.; GUPTA, M. P. A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 15-22, 1999.
- McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.
- MCHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.
- MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B. DE; BRAGA, F. C. HPLC quantitation of kaurane diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 1, p. 40-45, 2001.
- MISKI, M.; SHEN, X.; COOPER, R.; GILLUM, A. M.; FISHER, D.; K.; MILLER, R. W.; HIGGINS, T.; J. Alkaloids, CD45 Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitors, from *Rollinia ulei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 14, p. 1519-1522, 1995.
- MONTEIRO, F. S.; COSTA, V. C. O.; QUEIROGA, K. F.; TAVARES, J. F.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A Comparação do efeito antiespasmódico de *Rollinia leptopetala* R.E. Fries e *Rollinia exsucca* A. DC. em íleo isolado de cobaia. **XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, São Paulo, 2008.
- MONTENEGRO, C. A., LIMA, G. R. M., JESUS, N. Z. T., LEITE, T. J. A., GOMES, I. F., TAVARES, J. F., BATISTA, L. M. Investigation of the gastroprotective action mechanism of *Xylopi*a *langsdo*rffiana A. St.-Hil & Tul. (ANNONACEAE). **XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; ROQUE, N. F. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves of *Xylopi*a *brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 828-831, 2003.
- MOREIRA, M. M. B.; CASTELO-BRANCO, M. V. S. Avaliação da toxicidade do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **XIX Encontro de Iniciação Científica**, João Pessoa, Paraíba, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOTTA, E. V.; SALOMÃO, A. J.; RAMOS, L. O. Dismenorréia. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, p. 369-386, 2002.

- MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.
- NASCIMENTO, A. A.; RIBEIRO, Ê. A. N.; OLIVEIRA, J. M.; MEDEIROS, F. A.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopiya cayennensis* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 17-21, 2006.
- NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585-587, 1980.
- NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.
- NIJKAMP, F. P.; VAN DER LINDE, H. J.; FOLKERTS, G. Nitric oxide synthesis inhibitors induce airway hyperresponsiveness in the guinea-pig in vivo and in vitro. Role of the epithelium. **American Review of Respiratory Disease**, v. 148, p. 727-734, 1993.
- NOMA, A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, n. 5930, p. 147-148, 1983.
- NOUAILHETAS, V. L. A.; SHIMUTA, S. I.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Calcium and sodium dependence of the biphasic response of the guinea-pig ileum agonists. **European Journal of Pharmacology**, v. 116, p. 41-47, 1985.
- OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; MAFRA, R. A.; ARAÚJO, D. A.; CRUZ, J.S.; MEDEIROS, I. A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 338-344, 2006.
- OLIVEIRA, G. A. O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) relaxa o íleo de cobaia através do bloqueio dos canais de cálcio dependentes de voltagem e reduz o cálcio intracelular. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.
- OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.
- OSORIO, E. J.; MONTOYA, G. L.; ARANGO, G. J. Actividad Antiplasmodial de Alcaloides Aporfínicos de *Rollinia pittieri* y *Pseudomalmea boyacana* (ANNONACEAE). **Vitae**, v. 13, n. 1, p. 49-54, 2006.
- PAREDES, R. M., ETZLER, J. C., WATTS, L. T., ZHENG, W., LECHLEITER, J. D. Chemical calcium indicators. **Methods**, v. 46, p. 143-151, 2008.

- PELAIA, G.; GALLELLI, L.; VATRELLA, A.; GREMBIALE, R. D.; MASELLI, R.; DE SARRO, G. B.; MARSICO, S. A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 977-990, 2002.
- PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 651-659, 2003.
- PETERSEN, O. H.; MARUYAMA, Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. **Nature**, v. 307, n. 5953, p. 693-696, 1984.
- PITA, J. C. L. R.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. J.; MORELI, S.; RODRIGUES, V. M.; TAVARES, J. F.; CASTELLO BRANCO, M. V. S.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M. Antitumor activity of constituents from *Xylopiá langsdorffiana* against sarcoma 180 cells. **Anais, 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.
- PONTE, C. G.; MCMANUS, O. B.; SCHMALHOFER, W. A.; SHEN, D.-M.; DAI, G.; STEVENSON, A.; SUR, S.; SHAH, T.; KISS, L.; SHU, M.; DOHERTY, J. B.; NARGUND, R.; KACZOROWSKI, G. J.; SUAREZ-KURTZ, G.; GARCIA, M. L. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. **Molecular Pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 567-77, 2012.
- PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281-293, 2004.
- PRAKASH, O.; KASANA, V. K.; PANT, A. K.; ZAFAR, A.; HORE, S. K.; MATHELA, C. S. Phytochemical composition of essential oil from seeds of *Zingiber roseum* Rosc. and its antispasmodic activity in rat duodenum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 344-347, 2006.
- PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 24, p. 342-356, 2009.
- PUVANENDRAN, S.; WICKRAMASINGHE, A.; KARUNARATNE, D. N.; CARR, G.; WIJESUNDARA, D. S. A.; ANDERSEN, R.; KARUNARATNE, V. Antioxidant Constituents from *Xylopiá championii*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 352-355, 2008.
- QUAN, Y.; BARSZCZYK, A.; FENG, Z. P.; SUN, H. S. Current Understanding of K<sub>ATP</sub> Channels in Neonatal Diseases: Focus on Insulin Secretion Disorders. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 765-780, 2011.
- QUAYLE, J. M.; NELSON, M. T.; STANDEN, N. B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1165-1232, 1997.

- QUEIROGA, K. F.; TAVARES, J. F.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M. S.; SILVA, M. S. Atividade Moluscicida de diterpenos isolados de *Xylopi Langsdorffiana* A.St.; Hil & Tul ( Annonaceae). In: **29ª Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química**, Águas de Lindóia, 2006.
- RADÜNZ, L. L. Efeitos da temperatura do ar de secagem sobre a qualidade do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.). **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 27, n. 3, p. 9-13, 2002.
- RAO, V. R.; RAJU, S. S.; SARMA, V. U.; SABINE, F.; BABU, K. H.; BABU, K. S.; RAO, J. M. Simultaneous determination of bioactive compounds in *Piper nigrum* L. and a species comparison study using HPLC-PDA. **Natural Product Research**, v. 25, n. 13, p. 1288-1294, 2011.
- RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 288, p. C769-C783, 2005.
- REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.
- REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárány; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego, Academic Press, p. 227-239, 1996.
- REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 67, p. 251 – 259, 2000.
- RIBEIRO, L. A. A. A ação relaxante do ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-oico, diterpeno isolado de *Xylopi Langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae), envolve canais de potássio. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2003.
- RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil? 2007. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2007.
- RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopi Langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, 2007.
- ROBERTSON, B. E.; NELSON, M. T. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. C1589-C1597, 1994.
- ROCHA, A. B.; SILVA, J. B.; PANIZZA, S. Anatomia e óleo essencial das folhas de *Xylopi frutescens* Aublet. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 2, p. 101-108, 1980.

- ROMERO, F.; SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  (maxi- $\text{K}^+$ ) channel by angiotensin II in myocytes of the guinea-pig ileum. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. C983-C991, 1998.
- ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.
- SAAD, G. A.; LÉDA, P. H. O.; SÁ, I. M.; SEIXLACK, A. C. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, p.29-59.
- SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions, **Fitoterapia**, v. 74, p. 445-452, 2003.
- SAH, P.; FABER, E. S. L. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 5, p. 345-353, 2002.
- SALKOFF, LAWRENCE; BUTLER, A.; FERREIRA, G.; SANTI, C.; WEI, AGUAN. High-conductance potassium channels of the SLO family. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 921-931, 2006.
- SANBORN, B. M. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1, p. 4-11, 2000.
- SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.
- SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186-191, 2007.
- SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R. R.; MONTEIRO, F. S.; TRAVASSOS, R. A.; JANEIRO, D. I.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of trachylobanes *ent-7 $\alpha$ -acetoxyltrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* isolated from *Xylopija langsdorfiana* A. St Hil. & Tul (Annonaceae). **Natural Products Research**, v. 26, p. 2335-2339, 2012a.
- SANTOS, R. F.; MARTINS, I. R. R.; TRAVASSOS, R. A.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; PAREDES-GAMERO, E. J.; FERREIRA, A. T.; NOUAILHETAS, V. L.; ABOULAFIA, J.; RIGONI, V. L.; SILVA, B. A. *Ent-7 $\alpha$ -acetoxyltrachyloban-18-oic acid* and *ent-7 $\alpha$ -hydroxytrachyloban-18-oic acid* from *Xylopija langsdorfiana* A. St-Hil. & Tul. modulate  $\text{K}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels to reduce cytosolic calcium concentration on guinea pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 678, p. 39-47, 2012b.
- SANTOS, R. F.; ISOBE, M. T. C.; LALLA, J. G.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; MING, L. C. Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 224-234, 2012c.

- SATAKE, N.; SHIBATA, M.; SHIBATA, S. The involvement of  $K_{Ca}$ ,  $K_{ATP}$  and  $K_v$  channels in vasorelaxing responses to acetylcholine in rat aortic rings. **General Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 453-457, 1997.
- SATO, Y.; HE, J. X.; NAGAI, H.; TANI, T.; AKAO, T. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145-49, 2007.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional**. 1 ed. Editora: Manole, São Paulo, 2002.
- SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; SILVA, M. S. The first tetrahydroprotoberberine alkaloid from the genus *Rollinia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 393-394. 2000a.
- SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Tetrahydroprotoberberine and aporphine alkaloids from *Rollinia leptopetala*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 318-320. 2000b.
- SHERWIN, C. M., CHRISTIANSEN, S. B., DUNCAN, I. J. H., ERHARD, H. W., LAY, D. C., MENCH, J. A., O'CONNOR, C. E., PETHERICK, C. J. Guidelines for the ethical use of animals in applied animal behaviour research. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 81, p. 291-305, 2003
- SHIMUTA, S. I., KANASHIRO, C. A., OSHIRO, M. E. M., PAIVA, T. B., PAIVA, A. C. M. Angiotensin II desensitization and  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$  fluxes in cultured intestinal smooth muscle cells. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapeutics**, v. 253, p. 1215-1221, 1990.
- SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi- $K^{+}$  channel. **American Journal of Physiology**, v. 277, p C739-C745, 1999.
- SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A.; Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 277-283. 2003.
- SILVA, J. B.; ROCHA, A. B. Oleorresina do fruto de *Xylopiá aromática* (Lamarck) Martius. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 3, p. 33-40, 1981.
- SILVA, K. M. Investigação das atividades tóxica e antidiarréica de *Xylopiá langsdorffiana* (Annoaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso**. Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 2010.
- SILVA, M. I. G.; MELO, C. T. V.; VASCONCELOS, L. F.; CARVALHO, A. M. R.; SOUSA, F. C. F. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 193-207, 2012.

- SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, S. A. S. Alcalóides e outros constituintes de *Xylopi langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.
- SILVA, M. V. B.; ANAZETTI, M. C.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; DINIZ, M. F. F. M.; MELO, P. S.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of diterpenes isolated from *Xylopi langsdorffiana* on human leukaemia cells. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 41, p. 481, 2005.
- SILVA, P. S.; VICCINI, L. F.; SINGULANI, J. L.; SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 843-849, 2010.
- SINGER, J. J.; WALSH JR., J. V. Characterization of calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells using the patch-clamp technique. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 408, n. 2, p. 98-111, 1987.
- SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129-145, 1968.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca<sup>2+</sup> Sensitivity of Smooth Muscle and Nonmuscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases, and Myosin Phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SOMOVA, L. I.; SHODE, F. O.; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopi aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 165-174, 2001.
- SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacology Reviews**, v. 44, p. 363- 376, 1992.
- STANEVA-STOYTICHEVA, D.; VENKOVA, K. Effects of the Calcium Antagonists Diltiazem, Verapamil and Nitrendipine on the Contractile Responses of Guinea-pig Isolated Ileum to Electrical Stimulation or Carbachol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 44, p. 321-325, 1992.
- STANDEN, N.; QUAYLE, J.; DAVIES, N.; BRAYDEN, J. E; HUANG, Y.; NELSON, M. T. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. **Science**, v. 245, n. 4914, p. 177-180, 1989.
- SUN, Y. -D.; BENISHIN, C. G. K<sup>+</sup> channel openers relax longitudinal muscle of guinea-pig ileum. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 453-459, 1994.

- TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; BAYMA, J. C.; OLIVEIRA, A. B. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopiya frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607-609, 1995.
- TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2006.
- TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.
- TAVARES, J. F.; OLIVEIRA, A. L. F.; PIRES, V. C. F.; SILVA, M. S. Alcalóides de *Xylopiya langsdorffiana* A. St. Hil & Tul. (Annonaceae). **XXVI Congresso Latinoamericano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004.
- TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V.; SIMONE, C. A.; ARAÚJO-JR J. X., MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. *ent*-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopiya langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 960-962, 2006.
- TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; HAUN, M.; MELO, P. S.; SILVA, M. S. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopiya langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **Journal of Cheminformatics**, v. 38, p. 743-745, 2007a.
- TAVARES, J. F.; SILVA, M. V. B.; QUEIROGA, K. F.; MARTINS, R. M.; SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; MARQUES, M. O. M. Composition and Molluscicidal Properties of Essential Oils from Leaves of *Xylopiya langsdorffiana* A. St. Hil. et Tul. (Annonaceae), **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 282-284, 2007b.
- TERAMOTO, N. Physiological roles of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in smooth muscle. **The Journal of Physiology**, v. 572, n. Pt 3, p. 617-624, 2006.
- THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215-242, 2005.
- TOMITA, T. Electrical activity (spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles. **Smooth Muscle: An assessment of current knowledge**, p. 127-156, 1981.
- TÖRÖK, J. Histamine-induced relaxation in pulmonary artery of normotensive and hypertensive rats: relative contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. **Physiological Research**, v. 49, p. 107-114, 2000.

TOTSUKAWA, G.; YAMAKITA, Y.; YAMASHIRO, S.; HARTSHORNE, D.J.; SASAKI, Y.; MATSUMURA, F. Distinct Roles of Rock (Rho-Kinase) and Mlck in Spatial Regulation of Mlc Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3t3 Fibroblasts. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 4, p. 797-806, 2000.

TRAVASSOS, R. A. Caracterização do mecanismo de ação tocolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopia langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em útero isolado de rata. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2010.

TRIGGLE, C. R.; SWAMY, V. C.; TRIGGLE, D. J. Calcium antagonists and contractile responses in rat vas deferens and guinea pig ileal smooth muscle. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 804-818, 1979.

TRIGGLE, C. R.; TRIGGLE, D. J. An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea-pig ileal longitudinal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 254, p. 39-54, 1976.

TRIGGLE, D. J.; ZHENG, W.; HAWTHORN, M.; KWON, Y. W.; WEI, X. Y.; JOSLYN, A.; FERRANTE, J.; TRIGGLE, A. M. Calcium channels in smooth muscle. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 560, p. 215-229, 1989.

TSCHIRHART, E.; FROSSARD, N.; BERTRAND, C.; LANDRY, Y. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310-316, 1987.

UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990-994, 1997.

UNNO, T.; KOMORI, S.; OHASHI, H. Inhibitory effect of muscarinic receptor activation on Ca<sup>2+</sup> channel current in smooth muscle cells of guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 484, n. 3, p. 567-581, 1995.

VALEZE, F. H.; BRENZAN, M. A. Perfil de utilização de medicamentos fitoterápicos pela população do município de Boa Esperança – PR. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2011.

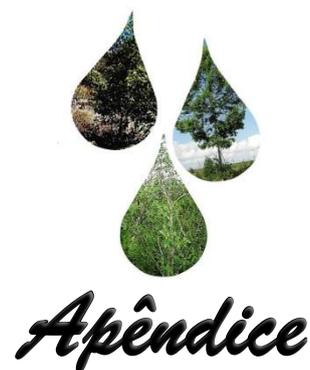
VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-Calcium interaction in mammalian smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 30, p. 167-208, 1979.

VAN DER STAAY, F. J.; FANELLI, R. J.; BLOKLAND, A.; SCHMIDT, B. H. Behavioral effects of apamin, a selective inhibitor of the SK<sub>Ca</sub>-channel, in mice and rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1087-1110, 1999.

VAN ROSSUM, J. M. Cumulative dose-resposta curvas. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 143, p. 299-330, 1963.

- VERGARA, C.; LATORRE, R.; MARRION, N. V.; ADELMAN, J. P. Calcium-activated potassium channels. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, n. 3, p. 321-329, 1998.
- VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VOGALIS, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 20, p. 207-219, 2000.
- WALSH, C. T.; FISCHBACH, M. A. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v.132, n.8, p. 2469-2493, 2010.
- WATERMAN, S. A. Voltage-gated calcium channels in autonomic neuroeffector transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 60, n. 2, p. 181-210, fev 2000.
- WATTERSON, K. R.; RATZ, P. H.; SPIEGEL, S. The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 289-298, 2005.
- WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p. 201-206, 2003.
- WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and Molecular Relationships of Calcium-Activated Potassium Channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 463-472, 2005.
- WEI, X. Y.; LUCHOWSKI, E. M.; RUTLEDGE, A.; SU, C. M.; TRIGGLE, D. J. Pharmacologic and radioligand binding analysis of the actions of 1,4-dihydropyridine activator-antagonist pairs in smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 239, p. 144-153, 1986.
- WINKLHOFER, M.; MATTHIAS, K.; SEIFERT, G.; STOCKER, M.; SEWING, S.; HERGET, T.; STEINHÄUSER, C.; SAALER-REINHARDT, S. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of  $K_v1.1$  potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 6, p. 829-842, 2003.
- WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.
- WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407; 2005.
- YELLEN, G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. **Nature**, v. 419, n. 6902, p. 35-42, 2002.
- ZAVALA, M.; MACÍAS, A.; OROPEZA, M.; CÁRDENAS, N.; PONCE-MONTER, H.; CAMPOS, M. G.; PÉREZ, S.; PÉREZ, C. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. **Fitoterapia**, v. 79, p. 446-450, 2008.

ZHENG, W.; RAMPE, D.; TRIGGLE, D. J. Pharmacological, radioligand binding, and electrophysiological characteristics of FPL 64176, a novel nondihydropyridine Ca<sup>2+</sup> channel activator, in cardiac and vascular preparations. **Molecular Pharmacology**, v. 40, p. 734-741, 1991.



## APÊNDICE A – Artigo publicado na revista Brazilian Journal of Anesthesiology.

Rev Bras Anesthesiol  
2012; 62: 6: 820-837

REVIEW ARTICLE

# Malignant Hyperthermia: Clinical and Molecular Aspects

Ana Carolina de Carvalho Correia<sup>1,2</sup>, Polyana Cristina Barros Silva<sup>1,2</sup>, Bagnólia Araújo da Silva<sup>1,3</sup>

**Summary:** Correia ACC, Silva PCB, Silva BA – Malignant Hyperthermia: Clinical and Molecular Aspects.

**Content:** Malignant hyperthermia (MH) is a potentially lethal pharmacogenetic disorder that affects genetically predisposed individuals. It manifests in susceptible individuals in response to exposure to Inhalant anesthetics, depolarizing muscle relaxants or extreme physical activity in hot environments. During exposure to these triggering agents, there is a rapid and sustained increase of myoplasmic calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) concentration induced by hyperactivation of ryanodine receptor of skeletal muscle (RyR1), causing a profound change in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, featuring a hypermetabolic state. RyR1,  $\text{Ca}^{2+}$  release channels of sarcoplasmic reticulum, is the primary locus for MH susceptibility. Several mutations in the gene encoding the protein RyR1 have been identified; however, other genes may be involved. Actually, the standard method for diagnosing MH susceptibility is the muscle contracture test for exposure to halothane-caffeine (CHCT) and the only treatment is the use of dantrolene. However, with advances in molecular genetics, a full understanding of the disease etiology may be provided, favoring the development of an accurate diagnosis, less invasive, with DNA test, and also will provide the development of new therapeutic strategies for treatment of MH. Thus, this brief review aims to integrate molecular and clinical aspects of MH, gathering input for a better understanding of this channelopathy.

**Keywords:** Anesthetics, Inhalation; Calcium; Malignant Hyperthermia; Neuromuscular Blocking Agents; Ryanodine.

©2012 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

## APÊNDICE B – Artigo publicado na revista Journal of Ethnopharmacology.

Journal of Ethnopharmacology 141 (2012) 895–900



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm)

## Vasorelaxant action of the total alkaloid fraction obtained from *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae) involves NO/cGMP/PKG pathway and potassium channels

Fabio S. Monteiro<sup>a</sup>, Ana C.L. Silva<sup>a</sup>, Italo R.R. Martins<sup>a</sup>, ~~Ana C.C. Correia<sup>a</sup>~~, Ionaldo J.L.D. Basílio<sup>a</sup>, Maria F. Agra<sup>a,c</sup>, Jnanabrata Bhattacharyya<sup>b</sup>, Bagnólia A. Silva<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal da Paraíba, Brazil

<sup>b</sup> University of Georgia, Department of Chemistry, Athens, United States

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 December 2011

Received in revised form 13 February 2012

Accepted 17 March 2012

Available online 26 March 2012

## Keywords:

*Solanum paludosum*

Total alkaloids

Rat aorta

NO/sCG/PKG pathway

Potassium channels

## ABSTRACT

**Ethnopharmacological relevance:** *Solanum paludosum* Moric. (jurubeba-roxa) is commonly used to treat hypertension as a substitute for *Solanum paniculatum* L. (jurubeba verdadeira). The total ethanolic extract from the root bark of *Solanum paludosum* have been found to cause hypotension in rats.

**Aim of the study:** To investigate the mechanism by which the total alkaloid fraction obtained from the root bark of *Solanum paludosum* (FAT-SP) acts as a vasorelaxant agent on rat thoracic aorta.

**Materials and methods:** Rings of rat aorta were suspended in organ bath containing Krebs solution at 37 °C, bubbled with carbogen mixture (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) under a resting tension of 1 g. Isometric contractions were measured using a force transducer coupled to an amplifier and a microcomputer.

**Results:** FAT-SP has been found cause relaxation of the aortic rings pre-contracted with phenylephrine (Phe) in a concentration-dependent manner, in the presence and absence of endothelium. This effect was more potent on the endothelium-intact aorta. In the presence of endothelium, neither indomethacin (non-selective cyclooxygenase inhibitor) nor atropine (non-selective muscarinic receptor antagonist), produced significant changes on the relaxation response. On the other hand, in the presence of calmidazolium (a calmodulin inhibitor), N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, nitric oxide synthase inhibitor), hydroxocobalamin (HDX) (scavenger of free-radical nitric oxide), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-one (ODQ, selective blocker of soluble guanylate cyclase), Rp-8-bromo-β-phenyl-1,N<sup>2</sup>-ethenoguanosine 3':5'-cyclic monophosphorothioate sodium salt hydrate (Rp-8-Br-PET-cGMPS, competitive inhibitor of cGMP-dependent protein kinase G) or TEA<sup>+</sup> (tetraethylammonium, nonselective potassium channel blocker), the vasorelaxant effect was significantly reduced, suggesting the involvement of NO/sCG/PKG pathway and potassium channel opening in vasorelaxant action of the FAT-SP.

**Conclusion:** The mechanism of vasorelaxant activity of the FAT-SP on rat aorta involves both NO/sCG/PKG pathway and potassium channels.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## APÊNDICE C – Artigo publicado na revista Journal of Smooth Muscle Research.

J. Smooth Muscle Res. (2011) 47 (5): 182–184

183

**Spasmolytic effect of galetin 3,6-dimethyl ether,  
a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea*  
(Benth) Ducke**

Cibério Landim MACÉDO<sup>1</sup>, Luis Henrique César VASCONCELOS<sup>1</sup>,  
Ana Carolina de C. CORREIA<sup>1</sup>, Italo Rossi Roseno MARTINS<sup>1</sup>,  
Daysianne Pereira de LIRA<sup>1</sup>, Bárbara Viviana de Oliveira SANTOS<sup>1,2</sup> and  
Bagnólia Araújo da SILVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Brazil;

<sup>2</sup>Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de  
Ciências Farmacêuticas, Brazil

Received June 21, 2011; Accepted July 20, 2011

**Abstract**

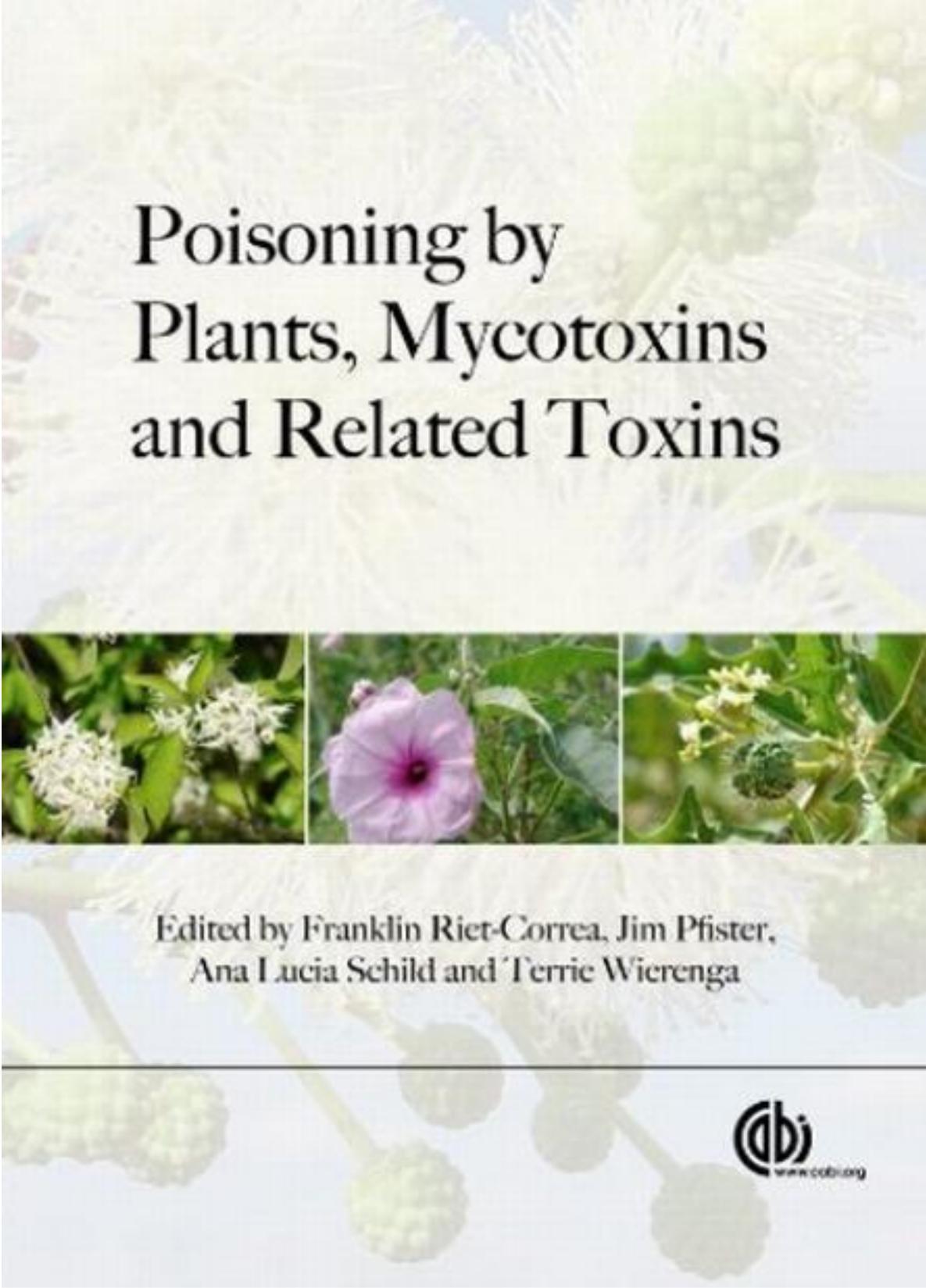
*Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke is a tree of the Caatinga, in Northeast Brazil, popularly known as “Jurema-branca”, “Jurema malícia-da-serra”, “Carcará” and “Calumbi”. In folk medicine, a decoction or tincture of its bark and leaves are used to treat wounds and as healing agents. Galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) is a flavonoid isolated from the aerial components of *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. We decided to investigate a possible FGAL spasmolytic effect on preparations of both the guinea pig ileum and trachea, the rat uterus and the male rat aorta. FGAL inhibited oxytocin ( $IC_{50} = 2.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$  M) and carbachol (CCh)-induced ( $IC_{50} = 7.7 \pm 1.2 \times 10^{-5}$  M) phasic contractions in the rat uterus, but was more effective in the inhibition of the oxytocin-induced contractions. In the guinea pig ileum, FGAL equipotently inhibited CCh ( $IC_{50} = 2.8 \pm 0.4 \times 10^{-5}$  M) and histamine-induced ( $IC_{50} = 2.2 \pm 0.5 \times 10^{-5}$  M) phasic contractions. FGAL equipotently and concentration-dependently relaxed guinea pig trachea preparations pre-contracted with CCh, both in the absence ( $EC_{50} = 0.8 \pm 0.1 \times 10^{-5}$  M) and presence ( $EC_{50} = 1.0 \pm 0.1 \times 10^{-5}$  M) of a functional epithelium. FGAL also relaxed preparations of the rat aorta pre-contracted with phenylephrine in both the absence ( $EC_{50} = 5.0 \pm 1.1 \times 10^{-6}$  M) and presence ( $EC_{50} = 5.4 \pm 1.2 \times 10^{-6}$  M) of a functional endothelium. FGAL shows a non-selective spasmolytic effect on each of the smooth muscle preparations we have tested, but with a greater effect on those from the rat aorta. The relaxant effect on preparations of both the guinea pig trachea and the rat aorta seems to not involve the epithelium or endothelium-derived relaxing factors.

Key words: *Piptadenia stipulacea*, spasmolytic effect, smooth muscle, galetin 3,6-dimethyl ether

---

Correspondence to: Cibério Landim MACÉDO, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, 58.051-970, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba, Brazil  
Phone: +55-83-32167126 Fax: +55-83-3216-7602 e-mail: bagnolia@trf.ufpb.br or ciberiolandim@hotmail.com

**APÊNDICE D** – Capítulos de livro publicados no livro *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins*.



# Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins

Edited by Franklin Riet-Correa, Jim Pfister,  
Ana Lucia Schild and Terrie Wierenga



## Chapter 115

**Evaluation of Hemolytic and Spasmolytic Activities of *Sargassum polyceratum* Montagne (Sargassaceae)**

A.C.C. Correia<sup>1</sup>, C.L. Macêdo<sup>1</sup>, F.S. Monteiro<sup>1</sup>, F.H.T. Souza<sup>1</sup>, H.L.F. Pessôa<sup>2</sup>, G.E.C. de Miranda<sup>4</sup>, C.S. Dias<sup>1,3</sup>, J.M. Barbosa-Filho<sup>1,3</sup>, F.A. Cavalcante<sup>5</sup>, and B.A. Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros', Universidade Federal da Paraíba, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba 58.051-970, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular/UFPB, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB, Brazil; <sup>4</sup>Departamento de Sistemática e Ecologia CCEN/UFPB, Brazil; <sup>5</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL, Brazil

## Chapter 116

**Investigation of Hemolytic and Spasmolytic Activities of the Total Alkaloid Fraction from Root Bark of *Solanum paludosum* Moric. (Solanaceae)**

A.C.C. Correia<sup>1</sup>, F. de S. Monteiro<sup>1</sup>, C.L. Macêdo<sup>1</sup>, I.J.L.D. Basílio<sup>1</sup>, H.L.F. Pessôa<sup>2</sup>, M.F. Agra<sup>1,3</sup>, J. Bhattacharyya<sup>1</sup>, F.A. Cavalcante<sup>4</sup>, and B.A. Silva<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros'/ Universidade Federal da Paraíba, PO Box 5009, João Pessoa, Paraíba 58.051-970, Brazil; <sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular/UFPB, Brazil; <sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB, Brazil; <sup>4</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL, Brazil

## Chapter 117

**Hemolytic and Spasmolytic Assays of *Solanum asterophorum* Mart. (Solanaceae)**

P.C.B. Silva<sup>1</sup>, M.A. de Vasconcelos<sup>2</sup>, L.C.G.C. Lima<sup>2</sup>, L.O. Silva<sup>2</sup>,  
K.M. Silva<sup>2</sup>, A.C.C. Correia<sup>3</sup>, C.L. Macêdo<sup>3</sup>, H.L.F. Pessôa<sup>4</sup>, T.M.S. Silva<sup>5</sup>,  
B.A. Silva<sup>3,6</sup>, and F.A. Cavalcante<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição/Faculdade de Nutrição/Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus A. C. Simões, Maceió, Alagoas, 57072-970, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFAL; <sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros'/UFPB; <sup>4</sup>Departamento de Biologia Molecular/UFPB; <sup>5</sup>Departamento de Química/UFRPE; <sup>6</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB, Brazil

## Chapter 118

**Evaluation of the Cytotoxic and Spasmolytic Activities of *Solanum asperum* Rich. (Solanaceae)**

L.O. Lima<sup>1</sup>, A.D.S. Silva<sup>1</sup>, P.C.B. Silva<sup>2</sup>, A.C.C. Correia<sup>3</sup>, C.L. Macêdo<sup>3</sup>,  
H.L.F. Pessôa<sup>4</sup>, T.M.S. Silva<sup>5</sup>, B.A. Silva<sup>3,6</sup>, and F.A. Cavalcante<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, 57010-020, Brazil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição/FANUT/UFAL; <sup>3</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica 'Prof. Delby Fernandes de Medeiros'/UFPB; <sup>4</sup>Departamento de Biologia Molecular/UFPB; <sup>5</sup>Departamento de Química/UFRPE; <sup>6</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas/UFPB



**ANEXO A** – Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/LTF).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

**CERTIDÃO**

João Pessoa, 10 de abril de 2010.

CEPA Nº. 0103/10

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisadores: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

Departamento/Setor: LTF

Ref.: Estudo comparativo da potencial atividade espasmódica de óleos essenciais obtidos de três espécies de annonaceae: *Rollinia leptopetala* R.E. Fries, *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hil & Tul. e *Xylopija frutescens* Aubl.

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba, em reunião, **ANALISOU e APROVOU** a execução do projeto acima.

Número de animais: 120 ratos, 80 ratas e 180 cobais

Período: até outubro de 2013.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do LTF/UFPB