



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOÃO PAULO MELO DE PINHO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIESPASMÓDICAS E MIORRELAXANTES
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM MICRANTHUM* EM TRAQUÉIAS ISOLADAS
DE RATOS WISTAR**

FORTALEZA
2010

JOÃO PAULO MELO DE PINHO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIESPASMÓDICAS E MIORRELAXANTES
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM MICRANTHUM* EM TRAQUÉIAS ISOLADAS
DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

FORTALEZA
2010

P723e Pinho, João Paulo Melo de
Estudo das propriedades antiespasmódicas e miorelaxantes do
óleo essencial de *Ocimum micranthum* em traquéias isoladas de ratos
wistar. / João Paulo Melo de Pinho. – Fortaleza, 2010.
89f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de
Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Plantas medicinais 2. *Ocimum* 3. Óleos vegetais I. Magalhães,
Pedro Jorge Caldas (Orient.) II. Título.

CDD: 615.321

JOÃO PAULO MELO DE PINHO

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIESPASMÓDICAS E MIORRELAXANTES
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *OCIMUM MICRANTHUM* EM TRAQUÉIAS ISOLADAS
DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará-UFC

Aos meus pais, por me mostrar
os verdadeiros valores da vida.

A minha esposa Rebeca,
pelo companheirismo e
apoio de sempre.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem
perder o bem que poderíamos conquistar
se não fosse o medo de tentar”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pelo seu apoio, dedicação, orientação, e paciência ao longo da realização deste trabalho.

Ao meu amigo e professor, Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, pelo constante auxílio e incentivo nesta caminhada.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Rodrigo Siqueira, Francisco José Batista, Teresinha Brito, Walter Breno, Cristiano Teles, Daniel Freire, Igor Sombra, Patrícia Magalhães, Davi Jucá, Luan Costa, Cássia Rodriquez, Carol Farias, Géssica Fontes, Helder Veras, Alfredo Vasconcelos, Diogo Siebra, pela excelente convivência e ajuda prestada.

A Áurea Rhanes e Márcia Herminia, pela paciência e disponibilidade em atender minhas solicitações na Secretaria de Pós-Graduação em Farmacologia.

A CAPES pelo apoio financeiro ao longo de todo o período do mestrado.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse estudo.

RESUMO

Ocimum micranthum Willd. é uma planta popularmente conhecida como alfavaca de folha miúda ou estoraque sendo utilizada na medicina popular no tratamento de gripe, resfriados, febre, tosse, bronquites, nas infecções intestinais e estomacais, nas otites e como estimulante e carminativa. O presente estudo teve como objetivo mostrar a atividade do óleo essencial de *Ocimum micranthum* e seu principal constituinte, o cinamato de metila, em traquéias isoladas de ratos Wistar. Foi evidenciado que tanto o OEOM quanto o cinamato de metila, nas concentrações de 1-1000 µg/mL, não interferem no tônus basal, no entanto são capazes de reverter a resposta contrátil induzida por cloreto de potássio e carbacol com CI_{50} de 112 e 128,2 µg/mL (para o OEOM) e 308 e 100 µg/mL (para o cinamato de metila) respectivamente. . A concentração de 100 µg/mL OEOM, quando adicionada antes do agente contrátil, é capaz de atenuar a resposta máxima do KCl em traquéias de ratos *naïve*, fato que não ocorreu quando a contração foi induzida por carbacol na presença de nitrendipina. Adicionalmente, em animais submetidos a modelos de asma pela OVA, o OEOM se mostrou mais ativo em animais desafiados do que apenas sensibilizados. Portanto, o mecanismo envolvido nos efeitos miorreaxante e antiespasmódico do OEOM é, pelo menos em parte, devido à sua ação preferencial nos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC). Seu principal constituinte, o cinamato de metila, parece estar envolvido nos efeitos miorreaxantes do OEOM.

Palavras-chave: Plantas medicinais, Óleos vegetais, *Ocimum*

ABSTRACT

The *Ocimum micranthum* Willd. is a plant popularly known as “alfavaca-de-folha-miúda” or “estoraque” and is used in folk medicine to treat flu, colds, fever, cough, bronchitis, stomach and intestinal infections, ear infections and as stimulant and carminative. This study aimed to show the activity of its essential oil (EOM) and of its main constituent, methyl cinnamate, in rat isolated trachea. It was shown that both the EOM and methyl cinnamate (1-1000 µg/mL) did not change the basal tone, but they were able to reverse the contractile response induced by potassium chloride or carbachol with IC₅₀ of 112 and 128.2 µg/mL (for EOM) and 308 and 100 µg/mL (for methyl cinnamate), respectively. At 100 µg/mL, added before the contractile agent, EOM attenuated maximal response to KCl in trachea from *naïve* rats. This effect did not occur when contraction was induced by carbachol in the presence of nitrendipine. Additionally, in animals subjected to an ovalbumin-sensitized model of asthma, EOM was more active in challenged than in sensitized animals. In conclusion, the myorelaxant and antispasmodic effects of the EOM are due to its preferential action on voltage-operated calcium channels. Its major constituent, methyl cinnamate, appears to be involved in the pharmacological effects of the EOM.

Keywords: Plants, medicinal, Plant oils, *Ocimum*

LISTA DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1	<i>Ocimum micranthum</i> Willd	22
FIGURA 2	Cromatografia do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> ...	33
FIGURA 3	Sistema de registro da atividade contrátil em preparações isoladas de traquéia de rato	37
FIGURA 4	Figura 4. Óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> (OEOM) não altera o tônus basal de traquéia isolada de rato.....	45
FIGURA 5	Cinamato de metila não altera o tônus basal de traquéia isolada de rato	47
FIGURA 6	Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> (OEOM) sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato	49
FIGURA 7	Efeito do cinamato de metila sobre a contração induzida por KCl em traquéia isolada de rato	51
FIGURA 8	Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> (OEOM) sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato	53
FIGURA 9	Efeito do cinamato de metila sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato	55
FIGURA 10	Curvas concentração-efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados e animais sensibilizados e desafiados a ovalbumina	57
FIGURA 11	Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados na ausência e na presença de óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i>	59
FIGURA 12	Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados e desafiados à OVA, na ausência e na presença de OEOM	61
FIGURA 13	Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de ratos na presença de nitrendipina e na ausência e presença de óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i>	63
FIGURA 14	Curvas concentração-efeito do KCl em traquéia isolada de	

	animais sensibilizados e animais sensibilizados e desafiados à OVA	65
FIGURA 15	Curva concentração efeito do KCl em traquéia isolada de animais sensibilizados na ausência e na presença de óleo essencial de <i>Ocimum</i>	67
FIGURA 16	<i>micranthum</i> Curva concentração efeito do KCl em traquéia isolada de ratos sensibilizados e desafiados na ausência e na	69
TABELA 1	presença de OEOM	33
	Constituintes Químicos Majoritários do OEOM	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Plantas medicinais	15
1.2	Óleos essenciais e a pesquisa de suas propriedades farmacológicas	16
1.3	Plantas do gênero <i>Ocimum</i>	19
1.4	<i>Ocimum micranthum</i> Willd.	21
1.5	Cinamato de metila	24
1.6	Musculatura lisa e canais de cálcio	25
1.7	Asma e hiperreatividade	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	Material botânico	31
4.1.1	Produção e coleta da matéria-prima	31
4.1.2	Identificação do material botânico e obtenção do óleo essencial...	31
4.1.3	Identificação dos constituintes químicos	32
4.2	Aspectos éticos	34
4.3	Animais	34
4.4	Método de sensibilização dos animais	35
4.5	Método de desafio antigênico	35
4.6	Experimentos com anéis de traquéia	36
4.7	Protocolos experimentais para estudo da contratilidade traqueal	38
4.8	Confecção das curvas concentração-efeito	38
4.8.1	Efeitos do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos <i>naive</i>	39
4.8.2	Efeitos do OEOM na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados	40
4.8.3	Efeitos do cinamato de metila na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos <i>naive</i>	41

4.9	Soluções e drogas	42
4.10	Análise estatística	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> sobre o tônus basal de traquéia isolada de rato	44
5.2	Efeito do cinamato de metila sobre o tônus basal de traquéia isolada de rato	46
5.3	Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato	48
5.4	Efeito do cinamato de metila sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato	50
5.5	Efeito do óleo essencial de <i>Ocimum micranthum</i> sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato	52
5.6	Efeito do cinamato de metila sobre a contração induzida por carbacol (CCh) em traquéia isolada de rato	54
5.7	Curva concentração-efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados desafiados com salina ou OVA	56
5.8	Curva concentração efeito do carbacol na presença e ausência de OEOM em animais sensibilizados a OVA	58
5.9	Curva concentração efeito do carbacol na presença e ausência de OEOM em animais sensibilizados e desafiados à OVA	60
5.10	Curva concentração efeito do carbacol na presença de nitrendipina e na presença e ausência de OEOM	62
5.11	Curva concentração-efeito do KCl em traquéia isolada de animais sensibilizados e desafiados com salina ou OVA	64
5.12	Curva concentração efeito do cloreto de potássio na presença e ausência de óleo essencial de OEOM	66
5.13	Curva concentração efeito do KCl na presença e ausência de OEOM em tecidos de animais sensibilizados e desafiados à OVA	68
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	75
8	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

Os vegetais são fontes de alimento e de matéria prima para uma gama de produtos utilizados pelo homem, como; objetos para defesa, vestuário, transporte, habitação, dentre inúmeros outros, desde antepassados remotos. Representaram também uma fonte de misturas usadas em rituais religiosos e para a cura de diversos males (FONTENELE, 2004).

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são ainda comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

Arqueólogos já descreveram traços de numerosas plantas de reconhecido valor medicinal em antigos centros funerários e habitáculos do homem primitivo. Por exemplo, no século passado, na região do Oriente Médio, foi encontrado um esqueleto humano em que os pesquisadores estimam ter 60.000 anos. Junto a este foi encontrado alguma quantidade de pólen de achilea e jacinto; plantas utilizadas até hoje por camponeses da região (OTTE, 1994). Segundo relatos na literatura, há aproximadamente três milênios antes de Cristo, os antigos povos orientais já faziam uso de plantas no tratamento de diversas doenças.

Nas últimas décadas o interesse por drogas derivadas de plantas tem crescido expressivamente e estima-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente provenientes de plantas (CALIXTO, 2000).

Acredita-se que o Brasil é um dos países com a maior diversidade genética vegetal do mundo, com mais de 55.000 espécies catalogadas (AZEVEDO; SILVA, 2006). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, devido à pobreza e a falta de acesso a medicina moderna, 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente de plantas para cuidados

primários de saúde (CALIXTO, 2000). Deste modo, é de extrema importância o estudo dessas plantas a fim de verificar seus efeitos biológicos.

Segundo Albuquerque e Hanazaki (2006), um dos caminhos para o estudo de plantas medicinais é a abordagem etnodirigida. Esta se baseia na identificação de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos e suas utilizações, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença. Nesse sentido a etnofarmacologia consiste em combinar estas informações obtidas com as comunidades locais que utilizam plantas medicinais, com estudos químicos e farmacológicos realizados em laboratórios apropriados.

A biodiversidade brasileira associada ao conhecimento etnofarmacológico, constituem uma vantagem no processo de desenvolvimento de programas e projetos com plantas medicinais (SILVA *et al.*, 2001).

Dentre inúmeras descobertas baseadas na etnofarmacologia podemos citar a artemisinina, um sesquiterpeno de *Artemisia annua* com atividade terapêutica contra a malária e contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina. A galantamina, utilizada em medicina popular para fraqueza muscular, é um inibidor competitivo e reversível da acetilcolinesterase. É utilizado na Europa, para tratamento de pacientes com Alzheimer (MUKHERJEE, *et al.*, 2007).

Com o avanço da tecnologia, muitas substâncias sintéticas têm sido produzidas no intuito de prevenir, controlar e curar doenças. No entanto, existe ainda um grande número de produtos naturais no mercado (CALIXTO, 2000).

1.2 Óleos essenciais e a pesquisa de suas propriedades farmacológicas

Os óleos essenciais recebem destaque dentre os agentes terapêuticos provenientes de plantas, com uso medicinal popular e científico. Estes são conhecidos também como essências ou óleos etéreos e são princípios ativos oleosos e voláteis, possuindo ações em sistemas biológicos (CRAVEIRO *et al.*, 1981). Além disso, são amplamente utilizados na indústria como aromatizantes para

a preparação de perfumes, sabões, desinfetantes e cosméticos e também na indústria alimentícia.

Segundo Vitti e Brito (2003), os óleos essenciais são definidos pela International Standard Organization (ISO) como produtos obtidos das partes das plantas, através de técnicas específicas, e são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São chamados de essência devido ao aroma agradável e intenso da maioria de seus representantes. Seus constituintes são pertencentes a diversos grupos químicos, como fenóis e terpenos como exemplo (MAGALHÃES, 2002).

Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de utilização do mesmo, sendo os mais comuns; a “enfleurage”, que é empregado para extrair o óleo essencial de pétalas de flores; arrete por vapor d’água, visto que os constituintes do material vegetal possuem pressão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso arrastado; extração com solventes orgânicos, como os solventes apolares; e por fim a prensagem ou expressão, que é empregado para a extração de óleos essenciais de frutos cítricos (LUPE, 2007).

O bioma Caatinga, exclusivamente brasileiro, estende-se por quase 1 milhão de km² no Nordeste do Brasil. Sua vegetação xerófita encontra-se perfeitamente adaptada pela longa e irregular seca, altas temperaturas e elevada radiação ultravioleta. Na região, uma das mais pobres do Brasil, com alta concentração de famílias de baixa renda, o uso de plantas medicinais e a auto-medicação é muito comum (MORAIS *et al.*, 2006). Algumas plantas aromáticas encontradas com maior frequência em nossa região têm demonstrado atividades farmacológicas coerentes com seu uso em medicina popular (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999).

Um dos exemplos é o óleo essencial de *Croton zehntneri* (OECZ), popularmente conhecida como “canela-de-cunhã”, que apresentou interessantes propriedades farmacológicas sobre o músculo esquelético e sobre o músculo liso intestinal. Seus principais constituintes são o anetol e estragol. Tanto o OECZ como o anetol e estragol, inibiram contrações induzidas pela estimulação elétrica direta no nervo e pela acetilcolina enquanto que potencializaram as contrações produzidas pela cafeína, em músculo esquelético (ALBUQUERQUE, 1996). Apresentam efeitos predominantemente antiespasmódicos no músculo liso e são atribuídos ao estragol

(COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997). Em concentrações maiores que 10 µg/mL, o óleo essencial de *Croton zehntneri* pode produzir contrações rítmicas em íleo e aumento da amplitude e a frequência das contrações espontâneas da bexiga de cobaio (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998).

Mentha x villosa, conhecida popularmente como “hortelã-rasteira”, mostrou atividade hipotensora em ratos em um trabalho publicado por Lahlou *et al.* (2001). Em músculo sartório de sapo este óleo essencial também apresenta uma atividade inibitória sobre contrações induzidas por 80 mM de K⁺ e potencializa as contrações provocadas pela cafeína. Por outro lado, em concentrações maiores que 1mg/mL produz contrações que são bloqueadas pela procaína (FOGAÇA *et al.*, 1997). O principal constituinte do hidrolato obtido na extração do óleo essencial da *M. villosa*, o óxido de piperitenona, também demonstrou atividade sobre diversas preparações biológicas, como por exemplo, sobre o músculo liso intestinal de cobaio com efeitos antiespasmódicos (SOUSA *et al.*, 1997).

O óleo essencial da planta conhecida popularmente como “colônia” (*Alpinia speciosa*), apresentou efeito relaxante e antiespasmódico sobre preparações intestinais de íleo de rato (BEZERRA *et al.*, 2000; LAHLOU *et al.* (2002).

O óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (OECN), planta utilizada contra distúrbios gastrintestinais como antiespasmódica e carminativa possui interessantes propriedades farmacológicas (CRAVEIRO *et al.*, 1980). Este óleo demonstrou propriedades miorelaxantes em músculo liso intestinal de cobaio (MAGALHÃES, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998) e em camundongos, a administração intragástrica de OECN (10-100 mg/kg) aumentou o trânsito intestinal do marcador de carvão depositado no estômago. O OECN possui baixa toxicidade aguda e quando administrado por via oral, apresentou uma DL₅₀ acima de 3 g/Kg de peso corporal. Além disso, apresentou atividade antiedematogênica nos modelos de edema de pata induzidos por dextrana, histamina e carragenina, em doses relativamente baixas (10 – 300 mg/Kg), e uma atividade analgésica em modelos de nocicepção induzida por ácido acético, formalina e estímulo térmico (30 – 300 mg/Kg).

Estes dados demonstram que o OECN possui propriedades miorelaxantes e antiespasmódicas *in vitro*, que é consistente com o uso de preparações da planta na medicina popular como um antiespasmódico intestinal (DANTAS, 1979; CRAVEIRO *et al.*, 1980).

1.3 Plantas do gênero *Ocimum*

Ocimum é um gênero botânico da família das Lamiaceas e possui de 50 a 150 variedades de espécies (HILTUNEN; HOLM, 2005), cujas plantas mais conhecida são a alfavaca e o manjeriço.

É uma planta aromática e anual com altura de 30 a 150 cm que difere em suas características morfológicas e composição de seus óleos essenciais. É utilizado amplamente na indústria alimentícia e cosmética (VIÑA; MURRILO, 2003).

Segundo Khosla (1995) existem três centros com diversidade de *Ocimum*: em regiões tropicais e subtropicais da África, regiões tropicais da Ásia e da América do Sul, principalmente Brasil.

As espécies de *Ocimum* presentes no Brasil podem ser divididas em três grupos:

1) composto por espécies cultivadas, como o *Ocimum basilicum* e suas variedades, introduzidas da Europa.

2) formado por espécies naturalizadas incluindo o *Ocimum gratissimum* e suas variedades.

3) composto por espécies selvagens, incluindo o *Ocimum micranthum*, *Ocimum selloi*, *Ocimum nudicaule* dentre outros (VIEIRA; SIMON, 2000).

Acredita-se que as espécies de *Ocimum* foram introduzidas no Brasil de duas maneiras. A primeira realizada pelos colonizadores portugueses e pelos imigrantes europeus como italianos, alemães e poloneses. A segunda pelos escravos africanos (ALBUQUERQUE, 1996), que realizaram um importante papel na disseminação do *Ocimum*, introduzindo várias espécies em regiões diferentes onde eram obrigados a viver e trabalhar (VIEIRA; SIMON, 2000).

São plantas bastante utilizadas na culinária por suas características aromáticas e são também utilizadas em medicina popular como analgésico, antifebril e antiemético (CORREA, 1984); contra bronquites, tosses e dores de garganta (VIEIRA; SIMON, 2000); para insônia e com estimulante digestivo (VIÑA; MURRILO, 2003).

Muitos constituintes podem ser encontrados nos óleos essenciais de espécies de plantas desse gênero, como o eugenol, isoeugenol, linalol, 1,8-cineol (eucaliptol), cinamato de metila, beta-elemeno, alfa e beta-pineno, beta-cariofileno, beta-elemeno, limoneno, estragol, timol. (MORAES; FACANALI; MARQUES, 2002; VANI; CHENG; CHUAH, 2009; ZHELJAZKOV; CALLAHAN; CANTRELL, 2008; VIÑA; MURRILO, 2003; VIEIRA; SIMON, 2000; ROSAS *et al.*, 2004; LINO *et al.*, 2005).

Trabalhos publicados na literatura fazem também referência que a qualidade e a quantidade de óleos essenciais produzidos por plantas dependem de vários fatores como variação sazonal, método de colheita, estágio de desenvolvimento, clima e tipo de solo. Vani, Cheng e Chuah (2009), mostraram que tanto o *Ocimum basilicum* quanto o *Ocimum sanctum* apresentavam variações na composição de seus óleos essenciais de acordo com a época de colheita. Outros trabalhos mostram que o método de extração das essências também podem alterar a quantidade e a composição das mesmas (MAZUTTI *et al.*, 2006; CARVALHO FILHO *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2007).

Vários estudos têm demonstrado que as espécies desses gêneros são possuidoras de atividades farmacológicas interessantes. Por exemplo, já foram registrados efeitos inibitórios do *Ocimum gratissimum* sobre a proliferação, migração e morfogênese e indução de COX-2 em células de câncer de mama (NANGIA-MAKKER *et al.*, 2007). A administração de extratos aquosos dessa espécie também reduziu os níveis plasmáticos de glicose em animais diabéticos tratados com streptozotocina (EGESIE *et al.*, 2006). Em um trabalho realizado por Interaminense e colaboradores em 2005, o óleo essencial de *O. gratissimum* (OEOG) foi capaz de induzir efeitos antihipertensivos em ratos DOCA-sal devido a sua propriedade de induzir relaxamento vascular.

Outros estudos sobre o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* mostram que o mesmo apresenta efeito antibacteriano, principalmente contra *Staphylococcus aureus* (NAKAMURA *et al.*, 1999), propriedades antinociceptivas, inibindo significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e inibindo os efeitos tanto da primeira fase quanto da segunda fase no teste da formalina (RABELO *et al.*, 2003). Pereira e Maia (2007) também relatam uma atividade antioxidante do OEOG.

Para outra espécie, o *Ocimum basilicum* foram relatados efeitos inibitórios sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina relacionada a efeito antitrombótico *in vivo* (TOHTI *et al.*, 2006). Segundo Lee (2004) o óleo essencial de *O. basilicum* apresenta atividade antioxidante. Esse óleo essencial também possui atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*, atividade antisséptica contra *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* e *Salmonella paratyph*, e atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Penicillium notatum* e *Microsporeum gyseum* (SIDDIQUI *et al.*, 2007).

1.4 *Ocimum micranthum* Willd.

É uma planta aromática anual, de porte rasteiro, com altura de até 50 cm quando florida, possuindo caule bastante ramificado, pequenas folhas pecioladas, opostas, ovadas, inteiras ou deitadas, glabras, verde escuras; cálice frutífero maior que o pedicelo, membranáceo, glabro, flores gamopétalas, zigomorfas, bilabiadas, inflorescências verdes e corola branca, aglomeradas no ápice dos ramos e dispostas em espigas ou racimos curtos; sementes oblongas pretas e pequenas (SILVA; PINHEIRO, 2008) (Figura 1).



Figura 1 – *Ocimum micranthum* Willd

Fonte: <http://chalk.richmond.edu/flora-kaxil-kiuic/o/>

O *O. micranthum* Willd. é popularmente conhecido como alfavaca de folha miúda, estoraque, majericão-grande, alfavacão, alfavaca do campo, alfavaca de vaqueiro (SILVA; PINHEIRO, 2008) e no nordeste como alfavaca de galinha (PEREIRA *et al.*, 2009).

É utilizado na medicina popular no tratamento de gripe, resfriados, febre, tosse, bronquites, nas infecções intestinais e estomacais, nas otites e como estimulante e carminativa (ROSAS *et al.*, 2004). Seu óleo essencial é obtido das folhas e das flores. É um líquido amarelo claro. É amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de perfumes devido aos seus constituintes majoritários (LORENZI; MATOS, 2002).

As espécies pertencentes à família Lamiaceae podem apresentar polimorfismo químicos dos seus óleos essenciais e três quimiotipos distintos da espécie de *Ocimum micranthum* foram identificados. O quimiotipo indiano que é constituído principalmente por eugenol, eucaliptol, beta-cariofileno, e delta-elemeno; o do norte brasileiro, proveniente de plantas da região amazônica, que possui principalmente beta-elemeno, beta-cariofileno e isoeugenol; e por fim o quimiotipo nordestino, tendo como principais constituintes o eugenol e beta-cariofileno (VIEIRA, 2009).

A despeito destes quimiotipos de óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM) relatados anteriormente, alguns trabalhos demonstram a presença de outros constituintes como componentes majoritários deste óleo. Viña e Murrilo (2003), realizaram a análise da composição do óleo essencial de doze espécies de *Ocimum* crescidas na Colômbia. Das doze, dez, inclusive o *Ocimum micranthum*, mostraram ter como principal constituinte o cinamato de metila. Este achado corrobora com outros trabalhos realizados no norte do Brasil como o realizado por Rosas *et al.* (2004) e Silva e Pinheiro, (2008), onde o cinamato de metila foi um dos principais constituintes.

Lino *et al.* (2005), estudaram o efeito antinociceptivo e antiinflamatório do óleo essencial de *O. micranthum*, que tinha como componentes majoritários eugenol, beta-elemeno, beta-cariofileno e isoeugenol. Os resultados demonstraram que este óleo essencial apresenta atividade antinociceptiva, inibindo significativamente a produção de dor pelo estímulo químico como com ácido acético e formalina. Acredita-se que não há o envolvimento do sistema opióide mas, como o efeito foi revertido pelo L-NAME, provavelmente há participação da via de produção do óxido nítrico. Por outro lado, o OEOM não apresentou nenhum efeito antiedematogênico significativo nos modelos de carragenina e dextrina.

Esse óleo também possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas assim como atividade antifúngica (SACCETTI *et al.*, 2004).

Utilizando o conhecimento da população local do uso de plantas medicinais, Otero *et al.* (2000) estudaram o efeito anti-hemorrágico de 75 extratos de plantas empregadas no tratamento de picadas de serpentes. Dentre outros achados, dezenove extratos apresentaram atividade neutralizadora moderada, incluindo o extrato de *Ocimum micranthum*.

1.5 Cinamato de metila

Os óleos essenciais de plantas aromáticas possuem uma grande variedade de constituintes. Muitas plantas do gênero *Ocimum*, apresentam quantidades significativas de cinamato de metila..

O cinamato de metila também pode ser o principal constituinte do óleo essencial de outras espécies de plantas como de *Alpinia malaccensis* (AZAH *et al.*, 2005) e *Alpinia zerumbet* (MURAKAMI *et al.*, 2009). O óleo essencial desta última, tem sido aplicado clinicamente como um fitoterápico, e apresenta vários efeitos farmacológicos interessantes. Em experimentos utilizando íleo de rato este óleo essencial mostrou ser possuidor de atividade miorelaxante e antiespasmódica, apresentou também atividade antinociceptiva em camundongos, efeitos no potencial de ação em nervo ciático de ratos, e atividade antihipertensiva e cardiovascular (MURAKAMI *et al.*, 2009).

Em um trabalho realizado por Kong *et al.* (2007), foi detectada potente atividade nematocida de vários cinamatos. Dentre muitas substâncias deste grupo analisadas, o cinamato de metila mostrou ser um dos compostos mais potentes.

Foi demonstrado que o cinamato de metila apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, ao inibir a proliferação de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Este resultado mostra que esta substância tem uma atividade antimicrobiana de amplo espectro, podendo inibir tanto bactérias G+, quanto G- e fungos (HUANG; ZHU; LI, 2009).

Em um trabalho recente, realizado por Silva e Pinheiro (2008), foi demonstrada a baixa toxicidade e atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Ocimum micranthum* que apresenta o cinamato de metila como componente majoritário. Para a atividade antinociceptiva, o OEOM não foi capaz de interferir de maneira significativa na primeira fase do teste da formalina. No entanto, na segunda fase, foi observada uma redução no tempo de lambida, em comparação com o grupo controle, sugerindo que o óleo essencial de *Ocimum micranthum* esteja relacionado com a inibição da dor de origem inflamatória. A dose de 5000 mg/kg não causou óbito em nenhum dos animais, demonstrando que esta substância pode ser considerada de baixa toxicidade, visto que a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) preconiza que agentes xenobióticos

administrados por via oral que apresentem DL_{50} entre 2500-5000 mg/kg sejam considerados de baixa toxicidade.

1.6 Musculatura lisa e canais de cálcio

Camadas de células musculares lisas estão presentes nas paredes de vários órgãos no corpo, como vasos sanguíneos, estômago, intestino, bexiga, útero e vias aéreas. São vitais para as mais diversas funções do organismo e seu funcionamento anormal pode contribuir para muitas doenças (MAGALHÃES, 2002).

Estes músculos não apresentam estrias, tais como o músculo cardíaco e esquelético e, além disso, sua inervação é proveniente do Sistema Nervoso Autônomo. Adicionalmente, o estado contrátil dessas células pode ser controlado por hormônios, agentes autócrinos e/ou parácrinos e outros sinais químicos locais (WEBB, 2003).

A contração no músculo liso ocorre por uma alteração nos filamentos grossos de miosina mediada pelo cálcio, enquanto que na musculatura esquelética essa alteração se dá nos filamentos finos, de actina. O acoplamento excitação- contração na musculatura lisa é controlado por dois mecanismos principais, a alteração da concentração intracelular de cálcio e a via de sinalização da Rho-quinase. Enquanto este último parece ser relativamente constante, existe uma enorme variação com relação aos mecanismos responsáveis pela geração da sinalização de cálcio (BERRIDGE, 2008).

O aumento na concentração intracelular de cálcio faz com o mesmo se combine com uma proteína citoplasmática chamada calmodulina. O complexo cálcio-calmodulina irá ativar a cinase de cadeia leve da miosina (MLKC). Uma vez ativada esta cinase passa a fosforilar a cadeia leve regulatória de miosina (MLCr), permitindo assim a interação molecular entre a actina e a miosina. A energia liberada pelo ATP através da atividade de ATPase da miosina resulta no ciclo de pontes cruzadas. Deste modo a contratilidade das células musculares lisas é determinada primariamente pelo estado de fosforilação da cadeia leve regulatória de miosina (WEBB, 2003).

Adicionalmente à ativação dependente de cálcio da MLKC, o estado de fosforilação da MLCr é também regulado por uma fosfatase (MLCP), que remove o fosfato de alta energia da cadeia leve de miosina e promove o relaxamento muscular. A Rho cinase pode inibir esta miosina fosfatase e assim interferir no estado contrátil da célula, favorecendo a contração (SOMLYO, 1985; SOMLYO; SOMLYO, 2000)

Duas maneiras fundamentais possibilitam o aumento da concentração intracelular de cálcio: a liberação dos estoques intracelulares de cálcio via receptores especializados presentes no retículo sarcoplasmático ou o influxo de cálcio a partir do meio extracelular através de uma variedade de canais iônicos na membrana plasmática ou ainda, por ambos os processos. (PEREZ-ZOGHBI *et al.*, 2009).

A contração dos vários tipos de músculos lisos pode diferir marcadamente com relação a alguns aspectos como: a relativa contribuição do meio extracelular e do intracelular (retículo sarcoplasmático) para o processo de acoplamento excitação-contração e quanto a participação de quais tipos de canais iônicos responsáveis pela entrada do cálcio na célula (MacFADZEAN; GIBSON, 2002).

Uma das vias de entrada de cálcio mais bem caracterizadas utiliza canais de cálcio operados por voltagem (VOCC), particularmente, os canais 'L-type' sensíveis às dihidropiridinas. No entanto, existem na membrana das células musculares lisas outros canais que não são dependentes de voltagem, incluindo os canais de cálcio operados por receptor (ROCC), ativados por agonistas agindo de maneira ampla nos receptores acoplados a proteína G (GPCR), e os canais de cálcio operados por estoque (SOCC), ativados pela depleção de cálcio do retículo sarcoplasmático (MacFADZEAN; GIBSON, 2002; PAREKH *et al.*, 2005).

A exposição de alguns tipos de músculo liso, inclusive da traquéia, à agonistas contráteis como a acetilcolina e serotonina, provoca uma elevação bifásica na concentração de cálcio intracelular. Esta resposta é resultante da liberação inicial do cálcio do retículo sarcoplasmático e posteriormente, do influxo de cálcio a partir do meio extracelular (JUDE *et al.*, 2008) Neste último caso, em condições fisiológicas, a participação dos canais VOCC parece ser mínima, enquanto a de outros canais como os ROCC, parece ter um papel fundamental (BABA *et al.*, 1986; PEREZ-ZOGHBI *et al.*, 2009). No entanto, em condições patológicas, como na

hiperreatividade das vias aéreas, o grau de envolvimento desses canais pode estar alterado (MOURA, 2004).

1.7 Asma e hiperreatividade

Segundo o terceiro Consenso Brasileiro no Manejo da Asma (2002) a asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperresponsividade das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéias, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e à manutenção dos sintomas.

Kumar (2001) infere que a asma pode ser considerada como uma síndrome e não como uma simples doença. Assim como outras síndromes, ela apresenta certas características específicas que são expressas em indivíduos afetados. Estas podem ser resumidas da seguinte maneira:

- Episódios recorrentes de obstrução do fluxo aéreo
- Hiperreatividade das vias aéreas a uma variedade de estímulos
- Inflamação aguda a crônica das vias aéreas
- Mudanças estruturais nas paredes da vias aéreas

O distúrbio funcional mais importante na asma é aumento da resistência ao fluxo de ar. Esta é a base das manifestações clínicas mais marcantes da asma, incluindo a falta de ar e chiado no peito. Os mecanismos de aumento na resistência ao fluxo aéreo incluem (1) diminuição das dimensões físicas das vias aéreas, como consequência de broncoespasmo ou bronconstrição (2), estreitamento luminal devido ao edema das paredes das vias aéreas, e (3) obstrução luminal resultante de hipersecreção de muco (McFADDEN, 1998).

Essas alterações, que podem ser rapidamente induzidas por diferentes mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos como parte de uma reação de hipersensibilidade, são reversíveis. Na verdade, a reversibilidade da limitação do fluxo aéreo é uma das marcas da asma, e a demonstração de uma resposta terapêutica à broncodilatadores contribui para o diagnóstico clínico (KUMAR, 2001).

A hiperreatividade encontrada na asma é primariamente mediada pelo excesso de contração da musculatura lisa do trato respiratório e seus mecanismos ainda são incertos. Uma hipótese favorável para esclarecer essa excessiva produção de força pelas células musculares lisas, seria um aumento na concentração de cálcio intracelular (PEREZ-ZOGHBI *et al.*, 2009).

Moura (2004), em um trabalho utilizando traquéias isoladas de ratos, demonstrou que na contração muscular lisa mediada por agonista, como a serotonina, a hiperreatividade induzida por ovalbumina pode interferir na participação dos canais de cálcio durante a contração. Foi evidenciada uma participação marcante dos canais VOCC na sinalização desse tipo de contração.

2 JUSTIFICATIVA

O óleo essencial de *Ocimum micranthum* é utilizado em várias regiões do país com fins terapêuticos e uma de suas utilizações é em doenças respiratórias, como asma e bronquites. Apesar de seu uso, estudos de suas propriedades farmacológicas são extremamente escassos e até a presente data não temos conhecimento de nenhum trabalho que relate seus efeitos na musculatura lisa de traquéia, assim como do seu principal constituinte, o cinamato de metila.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo tem com objetivo geral analisar as ações do óleo essencial de *Ocimum micranthum* e do seu componente majoritário, o cinamato de metila, sobre o músculo liso respiratório de ratos.

3.2 Objetivos específicos

1. Detectar eventuais alterações provocadas pelo óleo essencial de *Ocimum micranthum*, *in vitro*, na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos *naïve*.
2. Detectar eventuais alterações provocadas pela presença do cinamato de metila, *in vitro*, na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos *naïve*.
3. Estudar as alterações produzidas pela presença do óleo essencial de *Ocimum micranthum*, *in vitro*, na resposta contrátil de traquéias isoladas de ratos Wistar sensibilizados e desafiados à ovalbumina

4 METODOLOGIA

4.1 Material botânico

4.1.1 Produção e coleta da matéria-prima

As amostras de *Ocimum micranthum* foram obtidas de espécimes plantadas em canteiros devidamente preparados nas instalações da Extratos Vegetais Ativos Ltda. (ERVA ATIVA), empresa de base tecnológica especializada na produção de óleos essenciais e extratos bioativos em condições agronômicas de adubação orgânica que, gentilmente, nos forneceu o material de estudo. As plantas foram cultivadas por um período de 60 dias, entre 04/06/05 a 04/08/05. Foram coletados 580 kg de material aéreo (folhas e talos, com exceção da raiz) no período de 04/08/05 à 16/08/05.

4.1.2 Identificação do material botânico e obtenção do óleo essencial

A identificação da espécie foi realizada por comparação com a exsicata de N° 168.833 depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, localizado na cidade de Belém.

O Óleo essencial de *Ocimum* foi obtido por destilação por arraste a vapor, nas instalações da empresa e para isso, equipamento, todo em aço inoxidável, operou em uma temperatura na faixa de 90-98 °C, com pressão na faixa de 2,0 kg/cm². O procedimento consistiu em carregar o cesto com cerca de 30 kg da parte aérea da planta fresca, introduzido no destilador, seguindo-se a admissão gradual do vapor, até alcançar a pressão de trabalho. O condensado foi recolhido em um separador de óleo, separando-se a fase aquosa da fase orgânica. Após separação, o óleo essencial foi filtrado sob vácuo, seco e armazenado em frascos de vidro

âmbar. Após esta destilação o OEOM apresentou um rendimento de 0,13% (786g de óleo).

4.1.3 Identificação dos constituintes químicos

O óleo essencial de *Ocimum micranthum* foi analisado pela empresa ERVA ATIVA por cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massa (CG / EM) com auxílio de computador e por comparação a substâncias padrões que ocorrem comumente em óleos essenciais. O cromatograma (Figura 2) e os componentes químicos majoritários (Tabela 1) do OEOM são demonstrados a seguir.

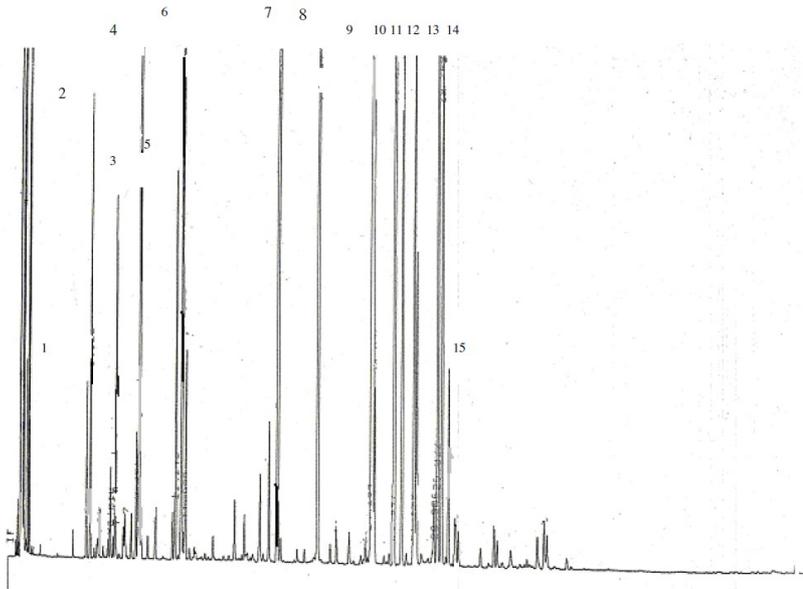


Figura 2: Cromatograma do OEOM

Principais constituintes do óleo essencial de *Ocimum micranthum* Willd.

1: α -Tujeno (0,3%); **2:** α -Pineno (0,8%); **3:** Mirceno (0,73%); **4:** Limoneno (12,9%); **5:** Fenchona (0,9%); **6:** Linalol (7,2%); **7:** Carvona (9,6%); **8:** (Z)-Cinamato de metila (5,92%); **9:** (E)-Cinamato de metila (33,6%); **10:** β -Cariofileno (8,03%); **11:** trans- α -Bergamoteno (2,68%); **12:** α -Humuleno (2,7%); **13:** α -Selineno (3,95%); **14:** β -Selineno (2,82%); **15:** α -Bisabuleno (0,6%)

Fonte: Silva; Pinheiro (2008)

Tabela 1 - Constituintes químicos majoritários do OEOM.

Constituintes Químicos	%
(E)-Cinamato de metila	33,6
Limoneno	12,9
Carvona	9,6
β -Cariofileno	8,03
Linalol	7,2

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo foi executado de acordo com os preceitos éticos que regem a experimentação científica com uso de animais de laboratório e foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo 14/10, de acordo com o que determina o Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais (COBEA). Declaramos explicitamente que não existem conflitos de interesse para a realização do presente estudo.

4.3 Animais

No presente trabalho, foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), machos, da variedade Wistar, pesando 200-250 g. Os animais foram obtidos de colônias mantidas pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso. Durante o período de realização dos experimentos, os animais foram alojados no Biotério pelo período de quatro semanas em caixas tipo gaiola confeccionadas em polipropileno, com medidas de 41x34x16 cm e capacidade para 6 ratos. Durante o período de alojamento, a manipulação dos animais consistiu apenas dos procedimentos necessários para troca de ração, água, limpeza e higienização das gaiolas. Aos animais sensibilizados também foram procedidas manipulações adicionais em virtude do processo de sensibilização antigênica pela aplicação de injeções intraperitoneais de OVA. A todos os animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.

Os animais considerados nesse estudo foram divididos em 03 grupos:

Animais *naïve*: ratos sem nenhum tratamento prévio.

Animais sensibilizados: ratos tratados com o antígeno sensibilizante, e desafiados com inalação de solução salina.

Animais desafiados: ratos tratados com o antígeno sensibilizante e desafiados com inalação do antígeno.

4.4 Método de sensibilização dos animais

A sensibilização dos animais foi realizada de forma ativa mediante a aplicação de injeções intraperitoneais de ovalbumina (OVA; *chicken egg albumin, grade II*, 10 mg/kg, 3 aplicações em dias alternados - nos dias 1, 3 e 5) de acordo com o método descrito por Weinreich e Undem (1987). Esses animais só foram utilizados após um período mínimo de 21 dias e não mais que 50 dias após a última injeção aplicada no período de sensibilização.

4.5 Método de desafio antigênico

Define-se como “desafio antigênico” (também chamado de broncoprovocação) o processo de exposição dos animais previamente sensibilizados ao antígeno sensibilizante por via inalatória. O desafio ocorreu após 21 a 50 dias da última injeção do antígeno e, 12 horas após, os animais foram sacrificados para obtenção dos tecidos para realização dos experimentos. Resumidamente, os animais foram colocados em uma caixa transparente de acrílico com as medidas de 30 x 16,6 x 19,8 cm. Na parte superior da caixa existe uma tampa removível para a colocação e retirada dos animais do compartimento interno. Nas porções laterais existem dois orifícios que permitem, de um lado, o acoplamento do nebulizador ultra-sônico para a realização da nebulização com solução salina ou solução de OVA e, de outro, servem ao escape do ar saturado do compartimento interno onde se encontra o animal, evitando-se assim a reinalação do ar expirado.

A solução de OVA usada para o desafio antigênico foi preparada imediatamente antes da realização dos procedimentos experimentais e foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) à temperatura ambiente. Imediatamente após o preparo, a solução de ovalbumina foi transferida para o nebulizador (Respira Max®

Inalador ultra-sônico, NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda., SP) e este foi acoplado à caixa de acrílico para iniciar o processo de nebulização do antígeno conforme descrição anterior. Uma vez iniciada a nebulização, o período máximo de manutenção dos animais no interior da caixa de acrílico foi de 30 minutos, divididos em duas sessões seqüenciais de 15 minutos cada (a primeira com nebulização de solução de OVA a 1 mg/mL e a segunda a 5 mg/mL). Em todas as sessões de nebulização o experimentador permanecia observando as alterações respiratórias eventualmente ocorridas, sendo o aparecimento de tiragem intercostal, desconforto respiratório acentuado, aumento do ritmo respiratório ou tosse associada à coriza intensa os critérios utilizados para retirada do animal do interior da caixa, em qualquer tempo de tratamento para evitar a morte desnecessária do animal. Nesse estudo, foram utilizados apenas os animais que completaram o período de 30 min de desafio antigênico forma ininterrupta.

4.6 Experimentos com anéis de traquéia

A traquéia dos animais foi obtida para os estudos de contratilidade in vitro. Para tanto, os animais foram eutanasiados por aplicação de injeção de hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.) seguida de exsanguinação após confirmação da anestesia por pinçamento da pata traseira do animal e incisão mediana ventral. Após esse procedimento, a traquéia foi rapidamente cortada em segmento único de aproximadamente 10 - 12 mm. Posteriormente este foi cortado em 4 segmentos sob a forma de anéis em placa de Petri preenchida com solução de Krebs-Henseleit, à temperatura ambiente, cuja composição (em mmol/l) foi: NaCl 118,0, KCl 4,7, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,2, NaHCO₃ 25,0, KH₂PO₄ 1,2 e glicose 10,0). Após a remoção dos tecidos adjacentes, os anéis foram transferidos para câmaras para órgão isolado de 5 mL de capacidade preenchidos com solução de Krebs-Henseleit, pH 7,4, aerada continuamente com ar atmosférico e mantida a 37°C. A luz dos anéis traqueais foi atravessada sem inter cruzamentos por duas peças metálicas confeccionadas em fino aço inoxidável. Cada peça foi atada a pontos distintos na câmara, um fixo em seu compartimento interno e outro conectado ao transdutor de força (Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass., EUA) apropriado para registro de contrações isométricas. Os

sinais gerados pelo transdutor de força foram amplificados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (Dataq, PM-1000, WCE, Akron, Ohio, EUA) (Figura 3). A tensão aplicada a cada segmento traqueal foi ajustada em 1g. O período de equilíbrio foi de 1 hora com troca do líquido de incubação a cada 15 minutos.

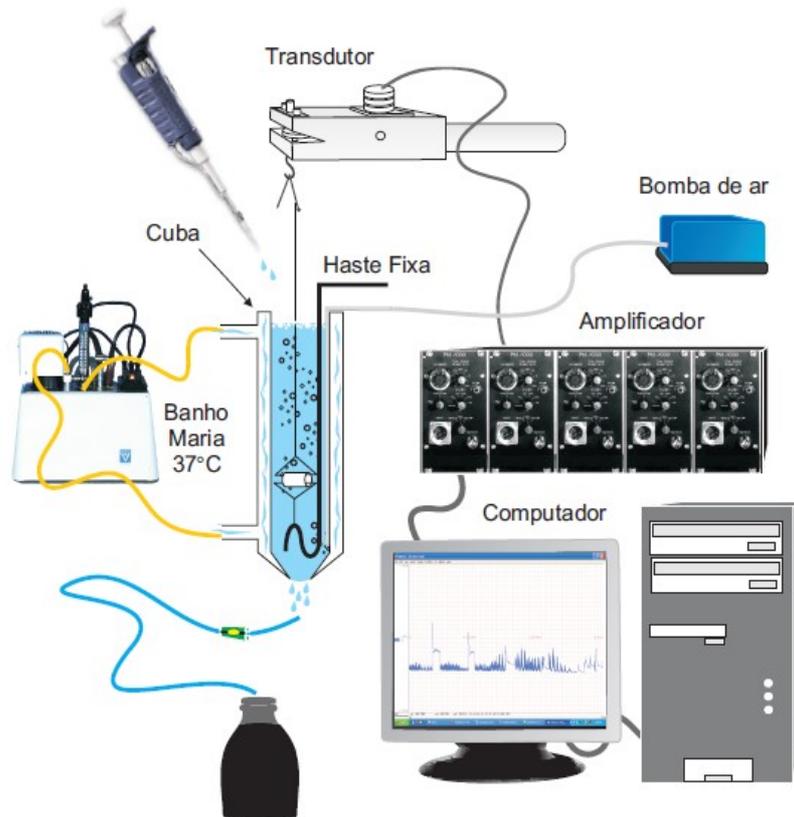


Figura 3 - Sistema de registro da atividade contrátil em preparações isoladas de traquéia de rato
Fonte: Figura adaptada de JUCÁ, 2007, p. 33

4.7 Protocolos experimentais para estudo da contratilidade traqueal

Após o período usual de 60 min para equilíbrio das preparações às condições experimentais, os tecidos foram repetidamente estimulados para produção de contrações que serviram a dois propósitos: referência para expressar grande parte dos resultados e avaliar a responsividade tecidual ainda no início dos experimentos. As contrações foram consideradas como a deflexão positiva dos traçados experimentais registrados no *software* de aquisição e foram medidas pela diferença entre o valor assintótico do pico da deflexão e o valor registrado no traçado de tensão basal observada antes da adição do agente contrátil. Em todos os experimentos, contrações iniciais foram induzidas pela adição de alta concentração de K^+ (60 mM) e esse procedimento foi repetido até que duas contrações de mesma magnitude fossem observadas. Nesse momento o tecido foi considerado em condições de iniciar qualquer outro procedimento.

4.8 Confeção das curvas concentração-efeito

Curvas concentração-efeito (CCE) foram construídas de acordo com o método de Van Rossum (1963). Resumidamente, as preparações foram expostas a concentrações crescentes e cumulativas de óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM), assim como a outros agentes como seu principal constituinte, o cinamato de metila, cloreto de potássio (KCl) ou carbacol (CCh). As substâncias adicionadas a uma dada concentração na câmara de banho, especialmente no caso do OEOM e do cinamato de metila, foram assim mantidas por um período de cinco minutos e, então, outras concentrações foram adicionadas de forma subsequente. Para as demais drogas o tempo de contato de cada concentração foi de 3 minutos apenas se seus efeitos fossem classicamente conhecidos e facilmente evidenciados. O efeito máximo (E_{max}) para a curva concentração-efeito foi considerado alcançado quando o aumento na concentração de dada substância não induziu resposta contrátil adicional àquela observada com a concentração anterior.

4.8.1 Efeitos do óleo essencial de *Ocimum micranthum* na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos *naive*.

- **CCE para o OEOM adicionado à preparação sob tônus basal**

Para estudar as possíveis alterações provocadas pelo OEOM no tônus basal de traquéias isoladas de ratos, foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa de OEOM nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 µg/mL. Após a adição da maior concentração de OEOM, o tecido foi lavado mediante trocas sucessivas e completas da solução fisiológica da câmara de banho. Outro parâmetro avaliado que indica a integridade do tecido ao final do experimento, é a repetição de uma contração induzida por K⁺ 60 mM

- **CCE para o OEOM adicionado à preparação sobre o platô da contração induzida pelo cloreto de potássio**

Este protocolo foi realizado com o intuito de avaliar a ação do óleo essencial de *Ocimum micranthum* sobre a contração mantida induzida por KCl em traquéias isoladas de ratos. Com a adição de 60 mM de KCl ao meio de incubação dos anéis de traquéias isoladas observou-se uma contração. Depois de atingido o platô da resposta contrátil, foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa de OEOM nas mesmas concentrações relatadas na seção anterior.

- **CCE para o OEOM adicionado à preparação sobre o platô da contração induzida pelo carbacol**

Este protocolo foi semelhante ao da seção anterior, exceto pelo fato de o CCh (0.3 µM) ter sido usado para induzir contração, ao invés de KCl. Depois de atingido o platô da contração provocada pelo CCh, o OEOM foi adicionado de forma cumulativa nas mesmas concentrações usadas na seção anterior (1-1000 µg/mL). A partir dos dados obtidos de acordo com os protocolos com KCl e CCh, foi possível a avaliação de parâmetros farmacológicos como a eficácia e potência do OEOM com relação à inibição dos efeitos causados pelos agentes contraturantes.

- **CCE para o carbacol na presença de nitrendipina**

O protocolo foi realizado com o intuito de detectar os efeitos do OEOM na contração induzida por carbacol na ausência de influxo de Ca^{2+} por canais operados por voltagem em traquéias isoladas de ratos *naive*. Inicialmente, o tecido foi exposto a 60 mM de KCl para testar sua viabilidade e em seguida, após lavagens sucessivas, foi acrescentada a nitrendipina a $1\mu\text{M}$. Após essa etapa, uma CCE foi obtida para o CCh nas concentrações de 10^{-9} a 3×10^{-5} M, com intervalo de dois minutos entre as concentrações, esta ainda na ausência do OEOM. Atingido o pico máximo de resposta, a solução das câmaras foi trocada por 3 a 6 vezes por uma solução fisiológica e uma nova CCE foi executada mantendo-se a presença de nitrendipina, mas dessa vez com adição de OEOM nas concentrações de 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$.

- **CCE para o cloreto de potássio**

Após o tecido ter sido exposto a estímulos repetidos com 60 mM de KCl para testar sua viabilidade, uma CCE foi construída para o KCl nas concentrações de 10, 20, 40, 60, 80, 100, e 120 mM, com intervalo de dois minutos entre as concentrações. Atingido o pico máximo de desenvolvimento de força pelo tecido, a solução das câmaras foi trocada por várias vezes e, após o retorno do traçado ao valor basal, a CCE foi repetida agora na presença de 30 ou de 100 $\mu\text{g/mL}$ de OEOM..

4.8.2 Efeitos do OEOM na musculatura lisa isolada de traquéia de ratos sensibilizados e desafiados

- **Efeito do OEOM na CCE induzida CCh em tecidos de animais sensibilizados e desafiados com salina ou OVA**

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sensibilizados e desafiados foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição

anterior (ver item 4.1.5). Após testada a viabilidade funcional do tecido, foi construída uma CCE para CCh nas concentrações de 10^{-9} a 3×10^{-5} M,. Após atingido o pico máximo de desenvolvimento de força o retorno do traçado ao valor basal (depois de lavagens sucessivas) uma nova CCE para CCh foi construída agora na presença de 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de OEOM, adicionado cinco minutos antes do início da CCE com o CCh. O desenvolvimento de hiperreatividade foi observado pela comparação das respostas contráteis entre os tecidos de animais sensibilizados e desafiados.

- **Efeito da adição in vitro do OEOM na CCE induzida KCl**

Anéis de traquéia com o epitélio íntegro obtidos de animais sensibilizados e desafiados foram montados em câmaras para órgãos isolados conforme descrição anterior (ver item 4.1.5). Após testada a viabilidade funcional do tecido, foi construída uma CCE para KCl nas concentrações de 10^{-2} a $1,2 \times 10^{-1}$ M,. Após atingido o pico máximo de desenvolvimento de força o retorno do traçado ao valor basal (depois de lavagens sucessivas) uma nova CCE para o cloreto de potássio foi construída agora na presença de 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de OEOM, adicionado cinco minutos antes do início da CCE com o KCl. O desenvolvimento de hiperreatividade foi observado pela comparação das respostas contráteis entre os tecidos de animais sensibilizados e desafiados.

4.8.3 Efeitos do cinamato de metila na musculatura lisa isolada de traquéia de ratos *naive*

- **CCE para o cinamato de metila adicionado à preparação sob tônus basal**

Para estudar as alterações do cinamato de metila, principal constituinte do óleo essencial de *Ocimum micranthum*, no tônus basal de traquéias isoladas de ratos, foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa de cinamato de metila nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após a utilização de todas as concentrações, o tecido foi lavado por várias vezes consecutivas com

solução fisiológica na câmara de banho. Ao final do experimento, a repetição de uma contração induzida por K^+ 60 mM indica a integridade do tecido.

- **CCE para o cinamato de metila adicionado à preparação sobre o platô da contração induzida pelo cloreto de potássio**

Com a adição de 60mM de KCl ao meio de incubação dos anéis de traquéias isoladas observou-se uma contração. Após atingido o platô da resposta contrátil, foram confeccionadas CCEs com a adição cumulativa e crescente de cinamato de metila (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) para avaliar a habilidade dessa substância em reverter uma contração tipicamente eletromecânica no tecido traqueal.

- **CCE para o cinamato de metila adicionado à preparação sobre o platô da contração induzida pelo carbacol (CCh)**

Com a adição de 0,3 μM de CCh ao meio de incubação dos anéis de traquéias isoladas e a consequente contração ter atingido seu estado estacionário (platô da contração), concentrações cumulativas de cinamato de metila (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas para avaliar a habilidade dessa substância em reverter uma contração muscarínica em seu decurso.

4.9 Soluções e drogas

As soluções de carbacol (CCh), foram preparadas pela adição da substância pura nas quantidades apropriadas diretamente em água destilada e foram armazenadas em freezer a concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara de banho dos tecidos. As soluções de OEOM foram preparadas para cada experimento, dissolvendo-o diretamente em Krebs-Henseleit

contendo Tween 80 a 1% imediatamente antes da utilização. Diluições adicionais foram realizadas para alcançar a concentração desejada e a concentração de Tween não ultrapassou 0,06% (v/v) em contato com os tecidos. Sais e drogas (todos de grau analítico) foram adquiridos da Sigma Chemical (Saint Louis, MO, E.U.A.) ou Merck (Dermstadt, Alemanha).

4.10 Análise estatística

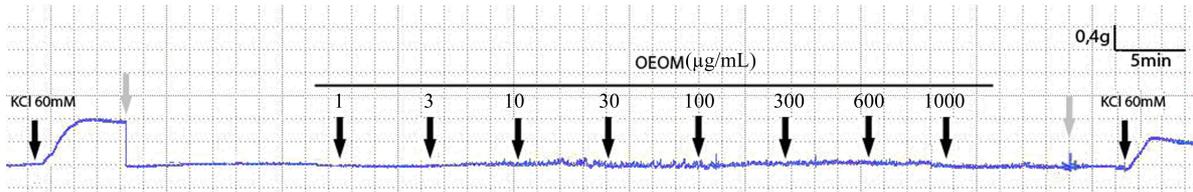
Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. Para comparação entre os grupos, foram utilizados: análise de variância (ANOVA) seguida de teste de múltipla comparação de Holm-Sidak, quando apropriado. Para comparações entre dois grupos, optou-se pelo teste *t* de Student. A probabilidade de ocorrência de nulidade menor que 5% foi aceita como indicativa de significância estatística. Os dados de contratilidade foram expressos em valores absolutos (g) ou em percentual (%) da resposta média das contrações de referência induzidas por K⁺ (60 mM), obtida no início de cada experimento. Alguns resultados foram expressos como % da contração do agonista na ausência de OEOM .

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* sobre o tônus basal de traquéia isolada de rato

Conforme descrito na seção metodologia, no início dos experimentos, as preparações foram estimuladas com soluções contendo alta concentração de K^+ (60 mM) e os tecidos produziram contração cuja magnitude correspondeu a $219,6 \pm 33,1$ mg ($n = 12$). Após a lavagem da preparação e o retorno à linha de base, os anéis de traquéia isolada de rato foram incubados por 5 min com concentrações cumulativas de OEOM (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$). Após a adição destas concentrações pudemos observar que a exposição do tecido traqueal ao OEOM não provocou alteração do tônus basal. Para se comprovar estatisticamente o que é observado no traçado de um experimento típico (Fig. 4A) os dados obtidos foram analisados por meio de Análise de Variância (*one way ANOVA*) que demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ($p=0,945$) nos valores de tônus basal antes e após a adição de OEOM. Ao final do experimento, com a retirada do OEOM por meio de lavagens sucessivas com solução fisiológica, a preparação foi novamente estimulada com 60 mM de K^+ e pudemos observar o desenvolvimento de contração, indicativa de que a preparação ainda permanecia responsiva ao agente contraturante.

A



B

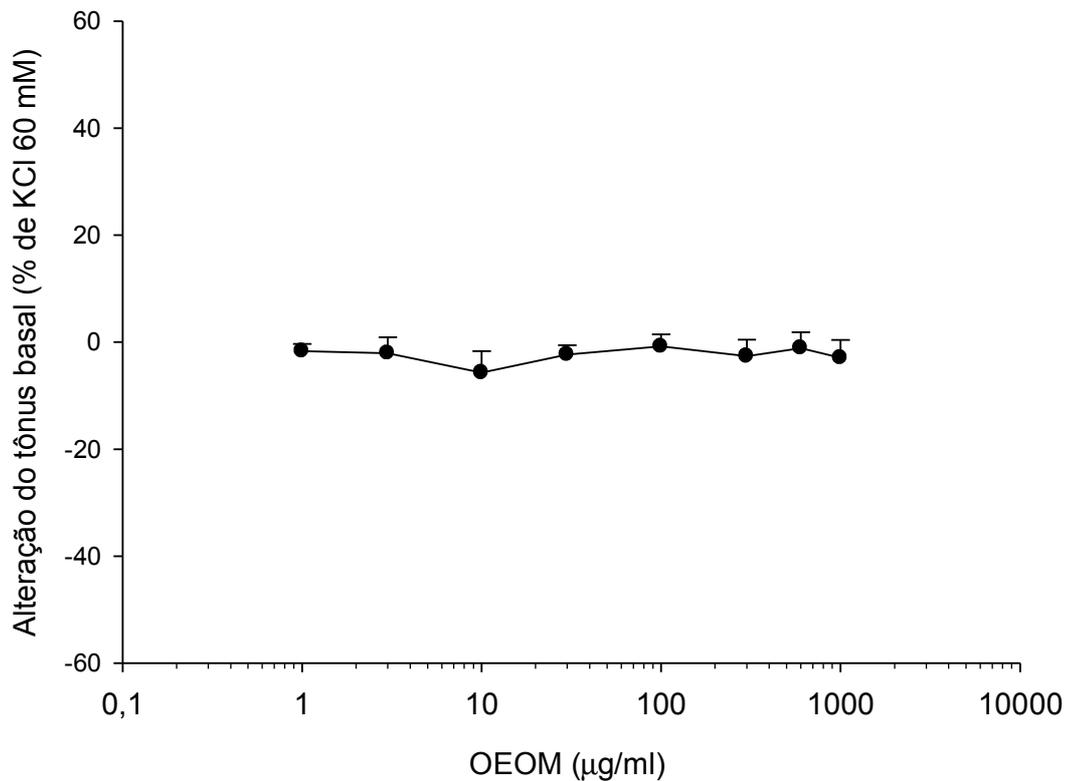


Figura 4 - Óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM) não altera o tônus basal de traquéia isolada de rato.

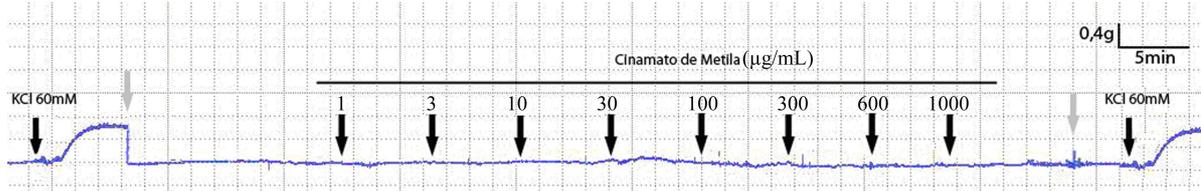
A) Traçado experimental mostrando a ausência de efeito do OEOM sobre o tônus basal da musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos Wistar;

B) Gráfico com os valores médios para o tônus basal de anéis de traquéia de ratos na presença de diferentes concentrações de OEOM (n = 12); valores expressos como média \pm E.P.M.

5.2 Efeito do cinamato de metila sobre o tônus basal de traquéia isolada de rato

Após o período de avaliação da viabilidade tecidual e equilíbrio da preparação, os anéis de traquéia isolada de ratos foram incubados por 5 min com concentrações cumulativas de cinamato de metila (1 – 1000 µg/mL). Após a adição dessas concentrações, pudemos observar que a exposição do tecido traqueal ao cinamato de metila, não provocou alteração do tônus basal. Os dados obtidos foram analisados por meio de ANOVA que demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ($p=0,945$) nos valores de tônus basal antes e após a adição de cinamato de metila. Ao final do experimento, com a retirada do cinamato de metila por meio de lavagens sucessivas com solução fisiológica, a preparação foi novamente estimulada com 60 mM de K^+ e pudemos observar o desenvolvimento de contração, indicativa de que a preparação ainda permanecia responsiva ao agente contraturante (Fig. 5).

A



B

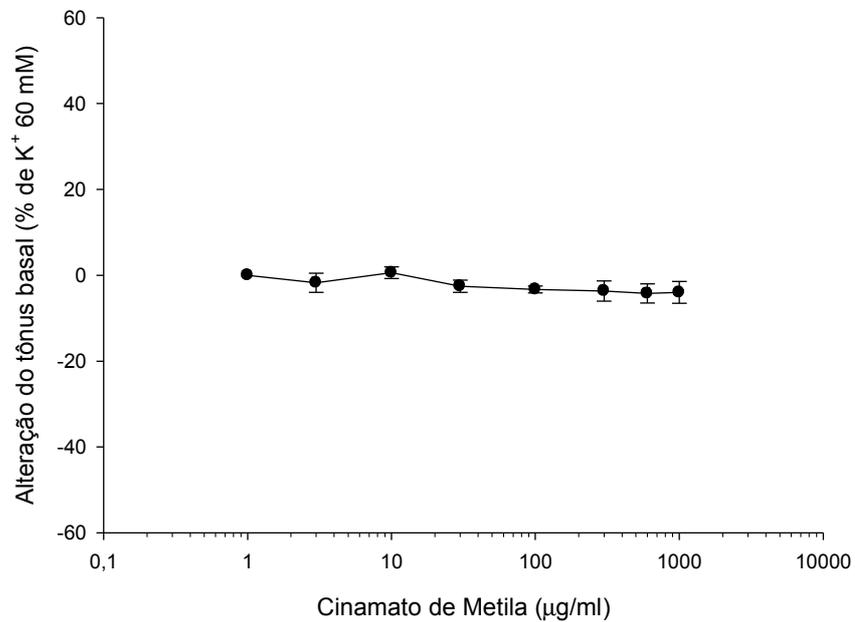


Figura 5 - Efeito do cinamato de metila sobre o tônus basal de traquéia isolada de rato

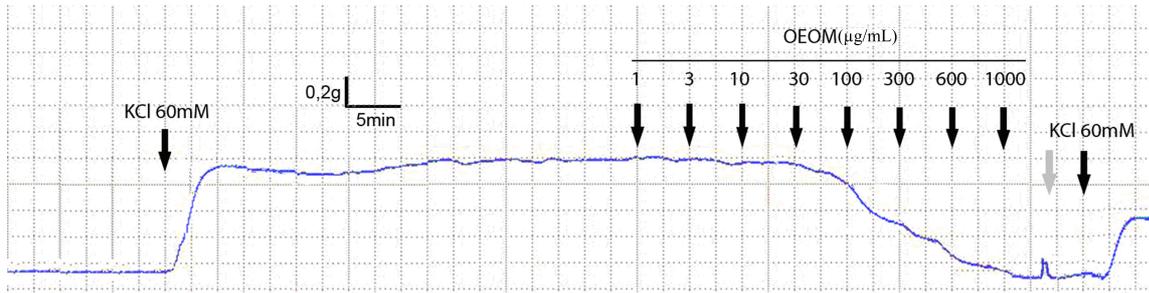
A) Traçado experimental representando a ausência de efeito do cinamato de metila sobre o tônus basal da musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos Wistar.

B) Gráfico com os valores médios para o tônus basal de anéis de traquéia de ratos na presença de diferentes concentrações de cinamato de metila (n = 4); valores expressos como média ± E.P.M.

5.3 Efeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato.

A adição de KCl (60 mM) ao meio de incubação dos anéis de traquéias de ratos *naive* ocasionou contração que se caracteriza por ser sustentada enquanto a concentração do KCl for mantida alta. A resposta contrátil é característica e é composta de duas fases com um primeiro platô alcançado em 1-2 minutos do início do estímulo e outro mais tardio alcançado apenas após ~30 min do início da contração (Fig. 6). A magnitude desse segundo pico foi de $183,8 \pm 22,3 \mu\text{g/mL}$. (n = 8). A adição de concentrações cumulativas do OEOM, após o estabelecimento do segundo platô da contração promoveu reversão total desta resposta contrátil, de maneira dependente de concentração ($p < 0,001$, ANOVA). O relaxamento foi estatisticamente significativo a partir da concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ ($p=0,004$, Holm-Sidak) que, neste caso, reduziu a resposta contrátil para $94,9 \pm 1,8\%$ do valor obtido na ausência de OEOM. O relaxamento foi total na concentração de $600 \mu\text{g/mL}$, momento em que a contração do tecido foi apenas residual ($0,8 \pm 0,5\%$ da resposta contrátil na ausência de OEOM). A concentração necessária de OEOM capaz de produzir 50% de inibição da resposta contrátil (CI_{50}) foi de $112,93 \mu\text{g/mL}$ [$84,0 - 151,8 \mu\text{g/mL}$].

A



B

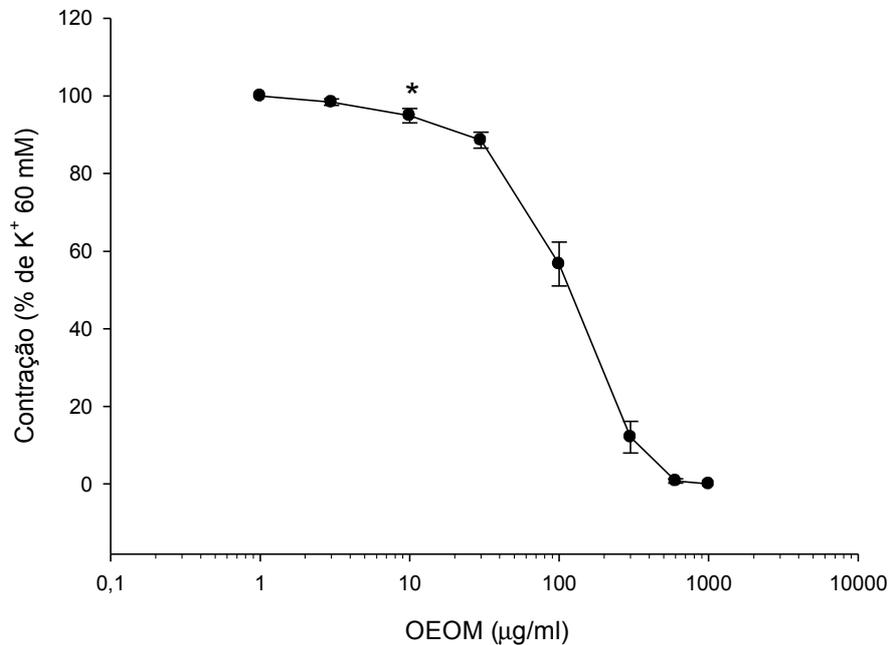


Figura 6 - Efeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM) sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato.

A) Traçado experimental representando o efeito do OEOM sobre a contração do KCl na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos Wistar.

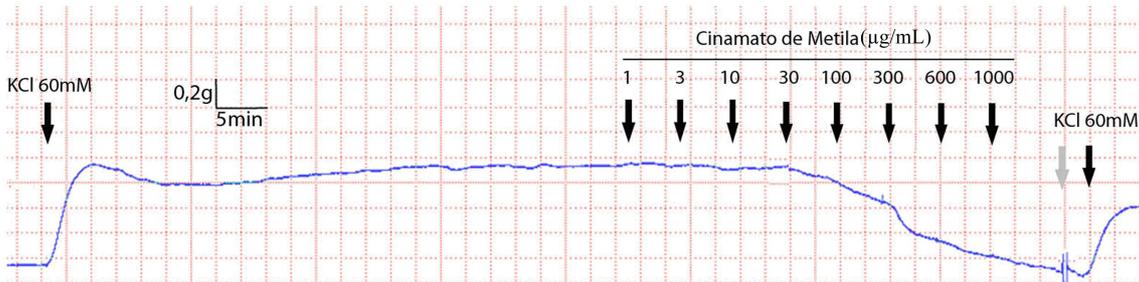
B) Gráfico com os valores médios da contração na presença de diversas concentrações de OEOM (n=8); os valores são expressos como média ± E.P.M. *, p < 0,05, primeiro efeito significativo, comparado ao valor obtido na ausência de OEOM.

5.4 Efeito do cinamato de metila sobre a contração sustentada do KCl em traquéia isolada de rato.

O presente protocolo teve o mesmo desenho dos procedimentos descritos na seção anterior. Após o estabelecimento do platô da contração induzida por KCl, a adição cumulativa de cinamato de metila de 1 µg/mL à 1000 µg/mL, proporcionou uma reversão total desta resposta contrátil (Fig. 7). O relaxamento foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 30 µg/mL ($p=0,009$, Holm-Sidak) que, neste caso, reduziu a contração para $91,2 \pm 2,3$ % da resposta contrátil observada na ausência de cinamato de metila. A concentração de 600 µg/mL reduziu a contração para $22,8 \pm 9,2$ % da resposta na ausência de cinamato de metila. Quando comparado com essa mesma concentração do OEOM, observa-se que os valores de contração residual na presença do óleo são significativamente menores do que com o cinamato de metila ($p < 0,05$, teste t de Student). A reversão total só foi observada com 1000 µg/mL de cinamato de metila, concentração em que a contração foi de apenas $1,9 \pm 6,7$ % da resposta na ausência do constituinte. A concentração de cinamato necessária para produzir 50% de inibição (CI_{50}) da resposta contrátil foi de 308,48 [170,00-559,77] µg/mL.

A

A



B

B

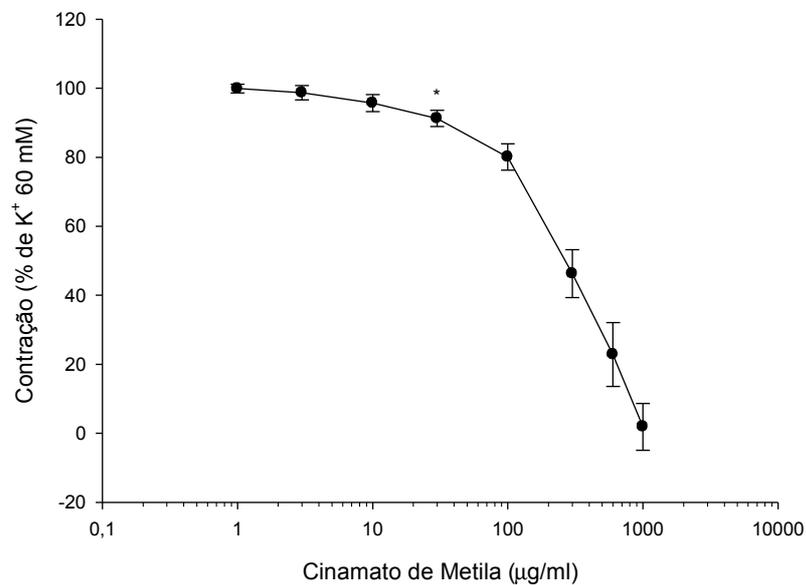


Figura 7 - Efeito do cinamato de metila sobre a contração induzida por KCl em traquéia isolada de rato

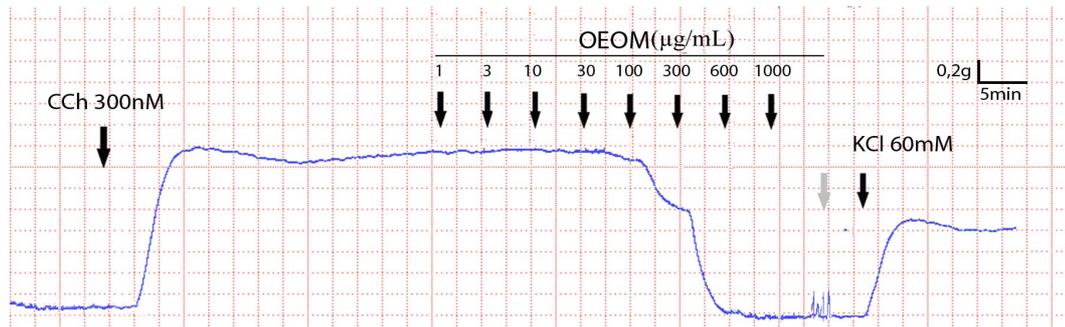
A) Traçado experimental representando o efeito do cinamato de metila sobre a contração do KCl na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos.

B) Gráfico com os valores médios da contração na presença de diversas concentrações de cinamato de metila (n=6); os valores são expressos como média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$, primeiro efeito significativo, comparado ao valor obtido na ausência de cinamato de metila

5.5 Efeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato.

A adição de CCh (0,3 μ M) ao meio de incubação dos anéis de traquéias de ratos *naive* ocasionou contração que, a exemplo do KCl, também se caracteriza por ser sustentada. Ao ser atingido o platô da resposta contrátil, cuja magnitude alcançou valores correspondentes $1,03 \pm 0,3$ g (n = 4), a adição de concentrações cumulativas do OEOM (1 a 1000 μ g/mL) promoveu reversão total desta resposta contrátil, de maneira dependente de concentração (p < 0,001, ANOVA) (Fig. 8). O relaxamento foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 100 μ g/mL (p < 0,05, Holm-Sidak) reduzindo a resposta contrátil para $62,3 \pm 7,9\%$ do valor obtido na ausência de OEOM. O relaxamento foi total na concentração de 600 μ g/mL, condição em que a contração do tecido foi apenas $3,8 \pm 6,8\%$ da resposta contrátil na ausência de OEOM. A concentração necessária de OEOM capaz de produzir 50% de inibição da resposta contrátil (CI_{50}) foi de 128,2 [72,7 - 225,8 μ g/mL].

A



B

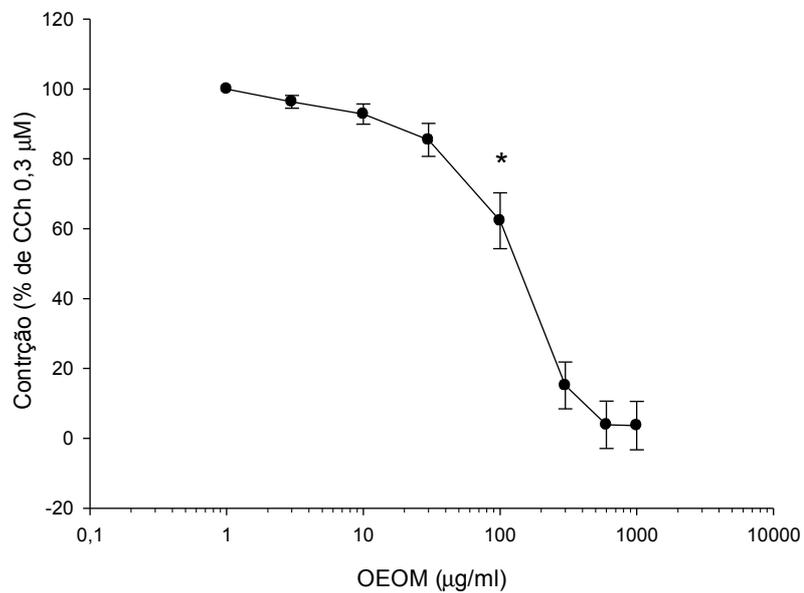


Figura 8 - Efeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM) sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato.

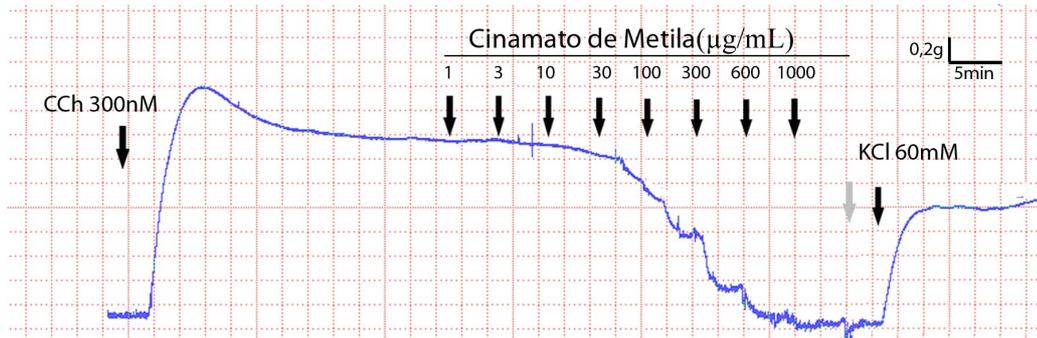
A) Traçado experimental representando o efeito do OEOM sobre a contração do CCh na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos.

B) Gráfico com os valores médios da contração na presença de diversas concentrações de OEOM (n = 4); os valores são expressos como média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$, primeiro efeito significativo, comparado ao valor obtido na ausência de OEOM.

5.6 Efeito do cinamato de metila sobre a contração induzida por carbacol (CCh) em traquéia isolada de rato.

O protocolo aqui descrito é semelhante ao da seção anterior. Após o estabelecimento do platô da contração induzida por CCh, a adição cumulativa de cinamato de metila (1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), produziu uma reversão total da resposta contrátil (Fig. 9). O relaxamento foi estatisticamente significativo a partir da concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$, Holm-Sidak) que, neste caso, reduziu a contração para $75,3 \pm 3,2 \%$ ($n = 4$) da resposta contrátil observada na ausência de cinamato de metila. A concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aboliu totalmente a contração. A concentração de cinamato necessária para produzir 50% de inibição (CI_{50}) da resposta contrátil foi de 100,4 [83,9 - 120,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

A



B

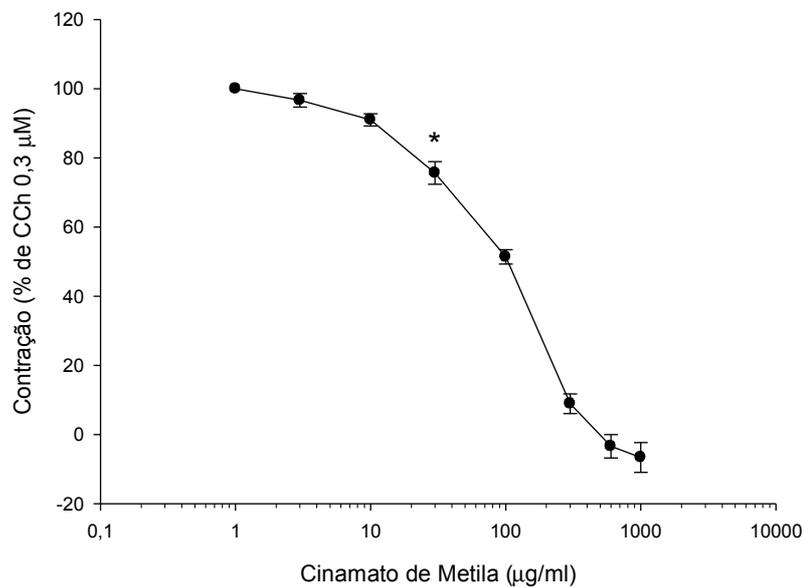


Figura 9 - Efeito do cinamato de metila sobre a contração sustentada do CCh em traquéia isolada de rato.

A) Traçado experimental representando o efeito do cinamato de metila sobre a contração do CCh na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos.

B) Gráfico com os valores médios da contração na presença de diversas concentrações de cinamato de metila ($n = 4$); os valores são expressos como média \pm E.P.M. *, $p < 0,05$, comparado ao valor obtido na ausência de cinamato de metila.

5.7 Curva concentração-efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados desafiados com salina ou OVA

Às câmaras de banho contendo traquéias isoladas obtidas de animais sensibilizados ou de animais sensibilizados e também desafiados com OVA foram adicionadas concentrações cumulativas de CCh nas concentrações de 1 nM a 30 μ M. Como pode ser observado na figura 10, a força desenvolvida pelo tecido após o estímulo muscarínico foi significativamente maior nos tecidos dos animais desafiados do que nos tecidos de animais sensibilizados. Nestes, o efeito máximo (Emax) foi correspondente a $121,7 \pm 28,1\%$ da contração induzida por 60 mM de K⁺ ainda no início do experimento, enquanto que naqueles, a resposta máxima foi correspondente a $306 \pm 32,9\%$ da contração induzida por 60 mM de K⁺. O desvio à esquerda foi caracterizado pelo menor valor de CE₅₀ nesses tecidos. A concentração de carbacol necessária para provocar um resposta de 50% da máxima nos tecidos dos animais sensibilizados foi de 1307,6 [360,6 - 2254,6] nM (n = 7), enquanto que nos animais desafiados a CE₅₀ foi de 234,4 [158,3 - 310,6] nM (n = 8). Esses valores mostraram diferença significativa (p < 0,05, teste t de Student).

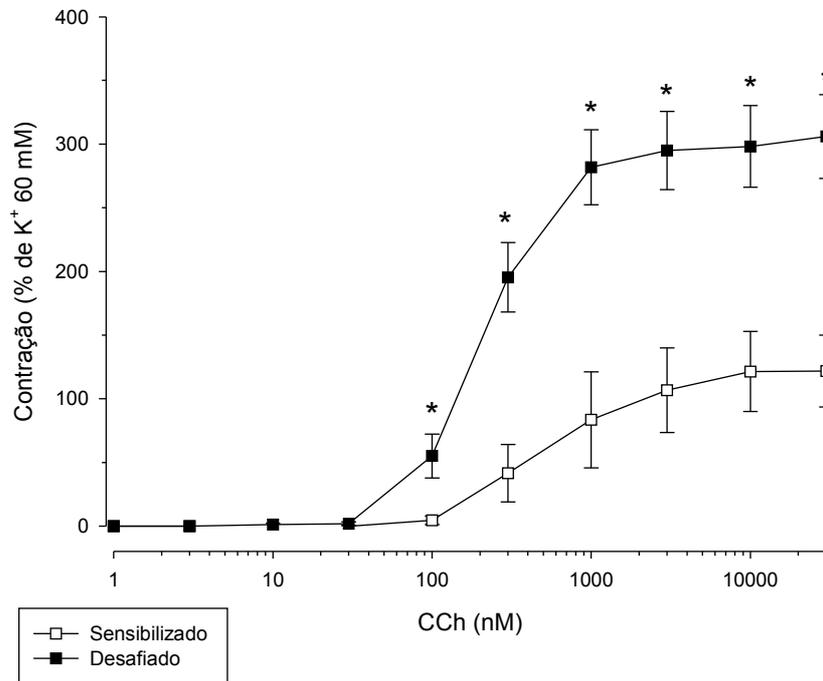


Figura 10 - Curvas concentração-efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados e animais sensibilizados e desafiados a ovalbumina.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do carbacol sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados (n = 7) e ratos sensibilizados e desafiados (n = 8); sendo estes valores expressos em média \pm E.P.M. * p<0,05 em relação à mesma concentração nos tecidos dos animais sensibilizados, segundo teste two way ANOVA e Holm-Sidak.

5.8 Curva concentração efeito do carbacol na presença e ausência de OEOM em animais sensibilizados a OVA

Em tecidos traqueais obtidos de animais ativamente sensibilizados pela ovalbumina, foram adicionadas concentrações cumulativas de CCh inicialmente na ausência e, posteriormente, na presença 30 ou 100 µg/mL de OEOM. Conforme a seção anterior, na ausência de OEOM, a CE_{50} para o CCh foi de 1307,6 [360,6 - 2254,6] nM ($n = 7$) e o E_{max} foi correspondente a $121,7 \pm 28,1\%$ da contração induzida por 60 mM de K^+ . O tratamento das preparações com OEOM 30 µg/mL não foi capaz de alterar nem a sensibilidade tecidual ao CCh, nem a magnitude da resposta máxima (Figura 11). Com 30 µg/mL, a CE_{50} ao CCh foi de 1832,8 [508,0 - 3157,7] nM, e o E_{max} foi correspondente a $110,3 \pm 26,9\%$ da contração induzida por K^+ 60 mM. Adicionalmente, o tratamento da preparação com OEOM 100 µg/mL também não alterou nem a CE_{50} nem o E_{max} na resposta contrátil induzida pelo CCh, os quais corresponderam a 2150,9 [1055,8 - 3245,9] nM e $105,9 \pm 25,0\%$ da contração induzida por K^+ 60 mM, respectivamente, Nem os valores de CE_{50} , nem os valores de E_{max} apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p = 0,466$, *one way ANOVA*).

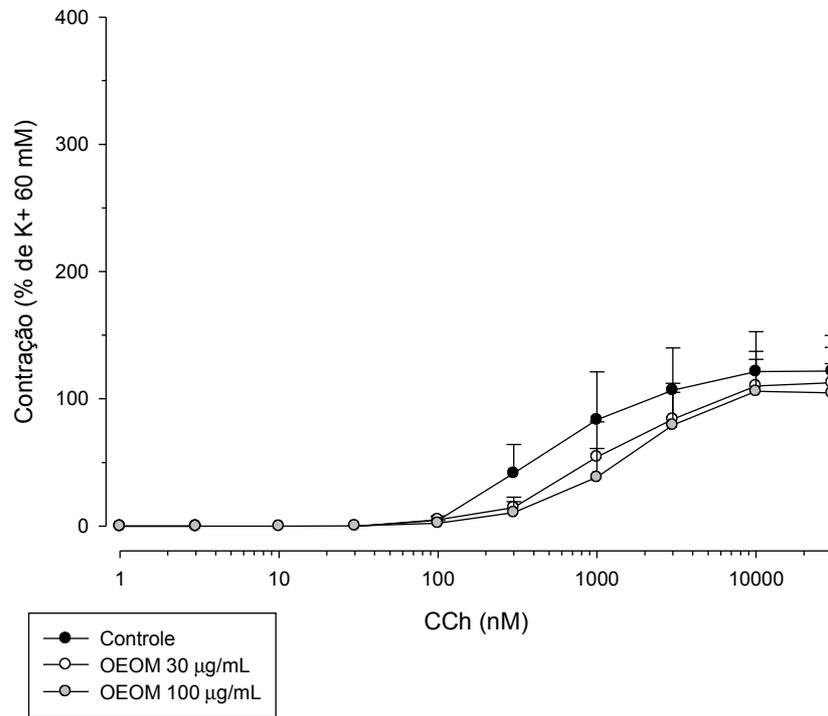


Figura 11 - Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados na ausência e na presença de óleo essencial de *Ocimum micranthum*.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do carbacol sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados (n = 7) na ausência e na presença de OEOM a 30 ou 100 µg/mL; os valores são expressos como média \pm E.P.M.

5.9 Curva concentração efeito do carbacol na presença e ausência de OEOM em animais sensibilizados e desafiados à OVA

Em tecidos traqueais obtidos de animais sensibilizados e desafiados pela inalação de OVA, foram adicionadas concentrações cumulativas de CCh inicialmente na ausência e, posteriormente, na presença 30 ou 100 µg/mL de OEOM. Conforme descrito anteriormente, na ausência de OEOM, a CE_{50} para o CCh foi de 234,4 [158,3 - 310,6] nM ($n = 8$) e o E_{max} foi correspondente a $306 \pm 32,9\%$ da contração induzida por 60 mM de K^+ . O tratamento das preparações com OEOM 30 µg/mL promoveu um deslocamento da CCE ao CCh para a direita de maneira significativa (Figura 12). Na presença de OEOM 30 µg/mL, a CE_{50} ao CCh foi aumentada para 497,4 [410,8 - 583,9] nM, embora esse aumento não tenha sido significativo ($p > 0,05$, ANOVA). Por outro lado, na presença de 100 µg/mL, a CE_{50} para o CCh foi de 1338,5 [933,1 - 1743,9] nM, valor significativamente maior que o observado na ausência de OEOM ($p < 0,05$, Holm-Sidak), Digno de nota é o fato de que os valores de E_{max} na presença OEOM (30 ou 100 µg/mL) não foram diferentes dos valores observados no controle ($297,6 \pm 37,3\%$ e $250,6 \pm 45,4\%$ da contração de K^+ 60 mM, respectivamente ($p > 0,05$, *one way* ANOVA).

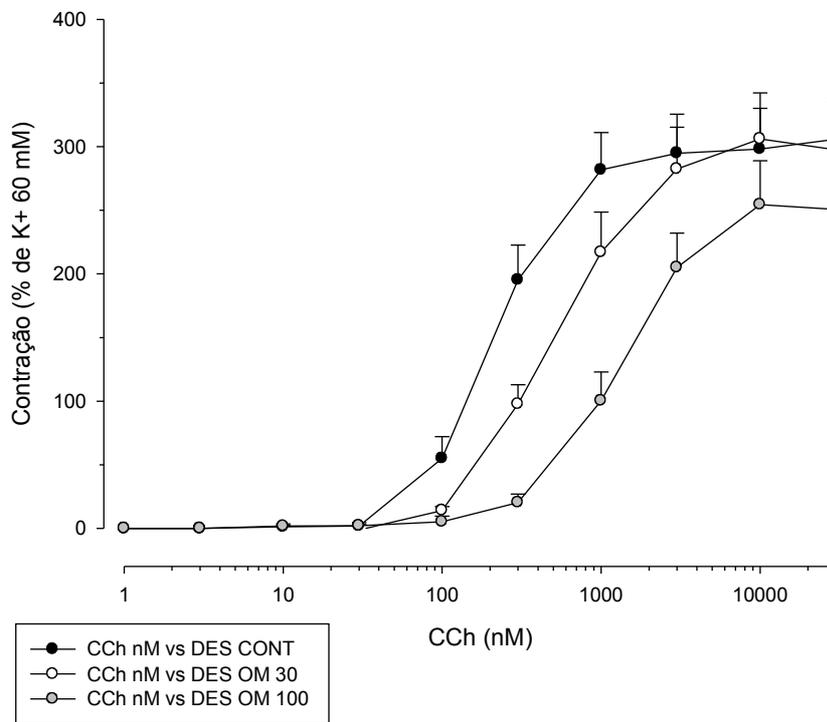


Figura 12 - Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de animais sensibilizados e desafiados à OVA, na ausência e na presença de OEOM.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do carbacol sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados ($n = 8$) na ausência e na presença de OEOM a 30 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; os valores são expressos como média \pm E.P.M.

5.10 Curva concentração efeito do carbacol na presença de nitrendipina e na presença e ausência de OEOM

Em tecidos traqueais, incubados em solução fisiológica, de animais *naive*, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de carbacol de 1nM à 30 μ M na presença de 1 μ M de nitrendipina e na presença e ausência de óleo essencial de *Ocimum micranthum* (30 e 100 μ g/mL).

Duas curvas concentração efeito foram realizadas por experimento. Uma curva controle do carbacol e nitrendipina, onde não há a presença do OEOM ao meio de incubação do tecido isolado e uma curva onde há a presença do óleo. Nas curvas em que há a presença do OEOM foi utilizada a concentração de 30 μ g/mL antes da adição das concentrações do CCH ou uma concentração de 100 μ g/mL. As concentrações de carbacol variaram de 1nM a 30 μ M em todos os experimentos.

A concentração de carbacol necessária para provocar um resposta de 50% da máxima na curva dos animais na ausência de OEOM e presença de nitrendipina foi de 639,18nM [415,87 - 982,42nM]. Já na presença de 30 μ g/mL ou 100 μ g/mL de óleo essencial de *Ocimum micranthum* a CE50 foi de 1324,09nM [776,15 - 2258,86nM] e 1392,68nM [895,79 - 2165,21nM], respectivamente.

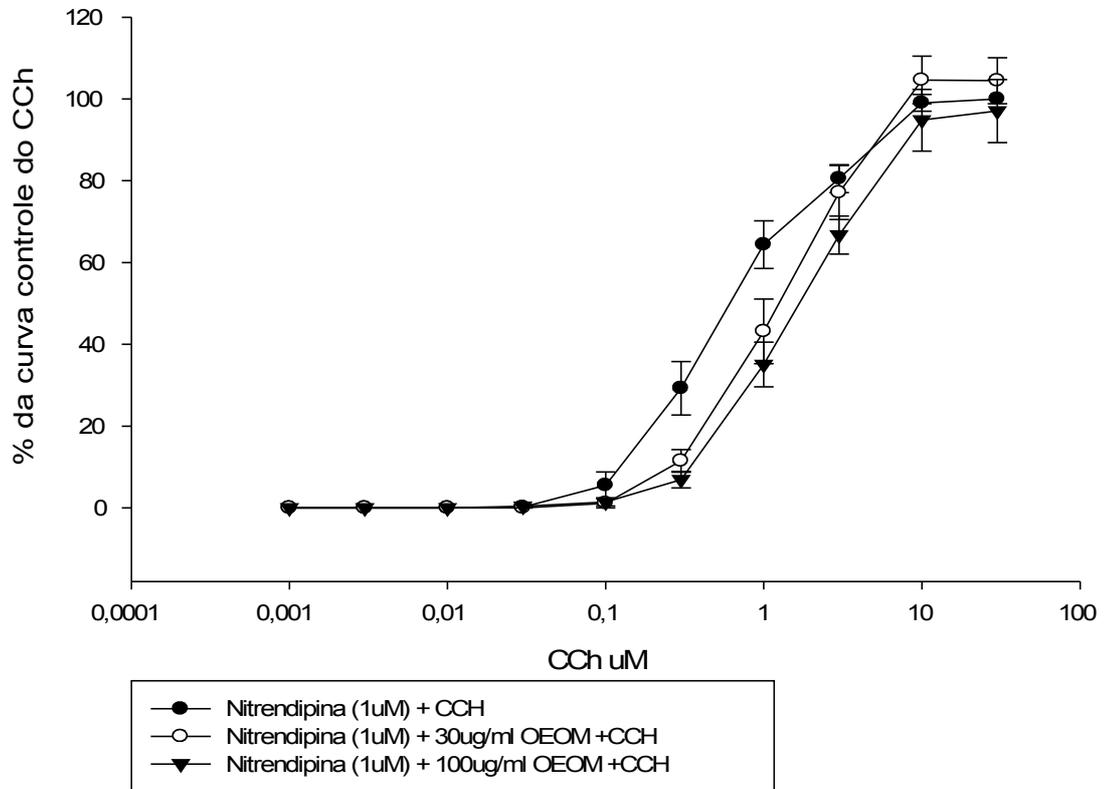


Figura 13 - Curva concentração efeito do carbacol em traquéia isolada de ratos na presença de nitrendipina e na ausência e presença de óleo essencial de *Ocimum micranthum*.

Gráfico da resposta do carbacol e nitrendipina na ausência e presença de OEOM sobre traquéias isoladas de ratos *naïve* (n=15); sendo estes valores expressos em média \pm E.P.M.

5.11 Curva concentração-efeito do KCl em traquéia isolada de animais sensibilizados e desafiados com salina ou OVA

Às câmaras de banho contendo traquéias isoladas obtidas de animais sensibilizados ou de animais sensibilizados e desafiados com OVA foram adicionadas concentrações cumulativas de KCl nas concentrações de 10 a 120 mM. Como pode ser observado na figura 14, a força desenvolvida pelo tecido após o estímulo despolarizante foi significativamente maior nos tecidos dos animais desafiados do que nos tecidos de animais sensibilizados. Nestes, o efeito máximo (E_{max}) foi correspondente a $128,4 \pm 9,2\%$ ($n = 7$) da contração induzida por 60 mM de K^+ obtida ainda no início do experimento, enquanto que naqueles, a resposta máxima foi correspondente a $193,1 \pm 29,4\%$ ($n = 5$) da contração induzida por 60 mM de K^+ . Esses valores apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$, two way ANOVA). Por outro lado, não evidenciamos desvio à esquerda uma vez que não houve diferença significativa nos valores de CE_{50} para o KCl entre os tecidos de animais sensibilizados ou desafiados ($51,4 [36,1 - 66,7]$ mM para os animais sensibilizados e $50,2 [43,1 - 57,4]$ mM nos animais desafiados ($p > 0,05$, teste t de Student).

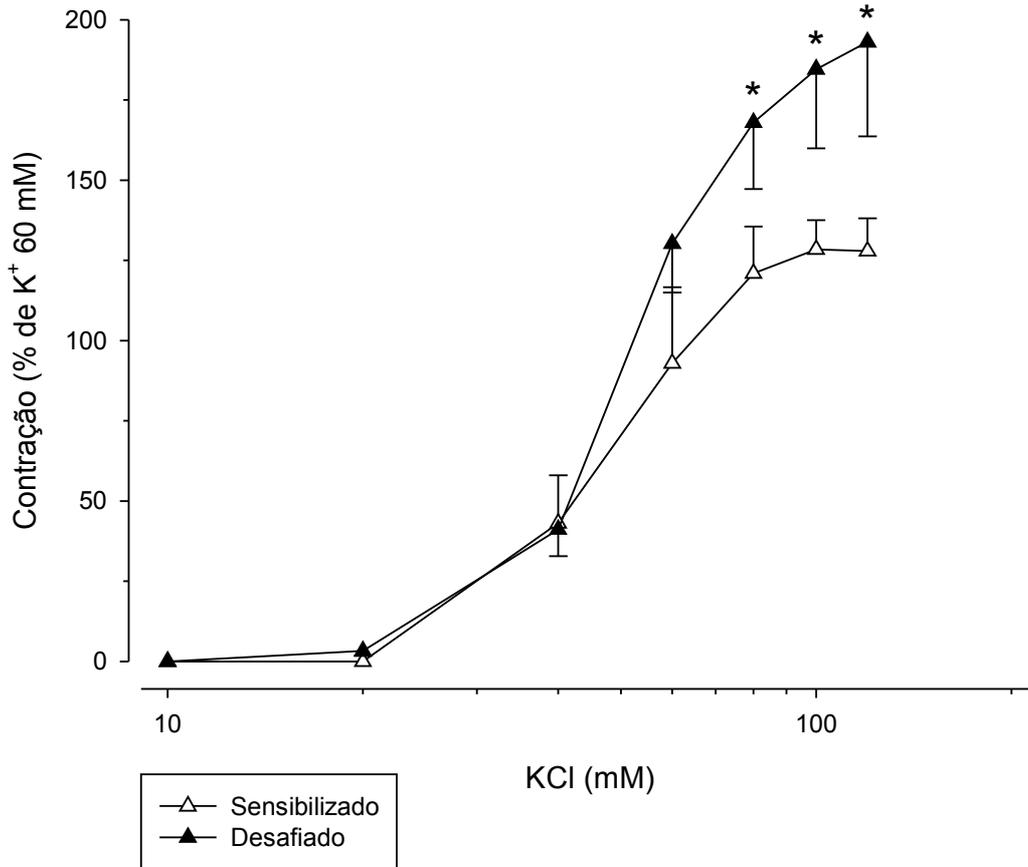


Figura 14 - Curvas concentração-efeito do KCl em traquéia isolada de animais sensibilizados e animais sensibilizados e desafiados à OVA.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do KCl sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados (n = 7) e ratos sensibilizados e desafiados (n = 5); sendo estes valores expressos em média \pm E.P.M. * $p < 0,05$ em relação à mesma concentração nos tecidos dos animais sensibilizados, segundo teste two way ANOVA e Holm-Sidak.

5.12 Curva concentração efeito do cloreto de potássio na presença e ausência de óleo essencial de OEOM

Em tecidos traqueais obtidos de animais ativamente sensibilizados pela ovalbumina, foram adicionadas concentrações cumulativas de KCl, inicialmente na ausência e, posteriormente, na presença 30 ou 100 µg/mL de OEOM. Conforme já descrito, na ausência de OEOM, a CE_{50} para o KCl foi de 51,4 [36,1 - 66,7] mM (n = 7) e o E_{max} foi correspondente a $128,4 \pm 9,2\%$ (n = 7) da contração induzida por 60 mM de K^+ . O tratamento das preparações com OEOM 30 ou com 100 µg/mL não foi capaz de alterar a sensibilidade tecidual ao KCl, uma vez que os valores de CE_{50} foram 55,8 [43,7 - 67,9] mM e 60,7 [55,4 - 66,0] mM, respectivamente, e não apresentara diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$, ANOVA). Por outro lado, o OEOM foi capaz de reduzir a magnitude da resposta máxima induzida pelo KCl. Com OEOM 30 µg/mL, o E_{max} foi $117,7 \pm 7,9\%$ da contração de K^+ 60 mM, mas não foi estatisticamente diferente, enquanto que com OEOM a 100 µg/mL, o valor de E_{max} foi significativamente menor ($54,1 \pm 5,7\%$ da contração de K^+ 60 mM) ($p < 0,05$, ANOVA).

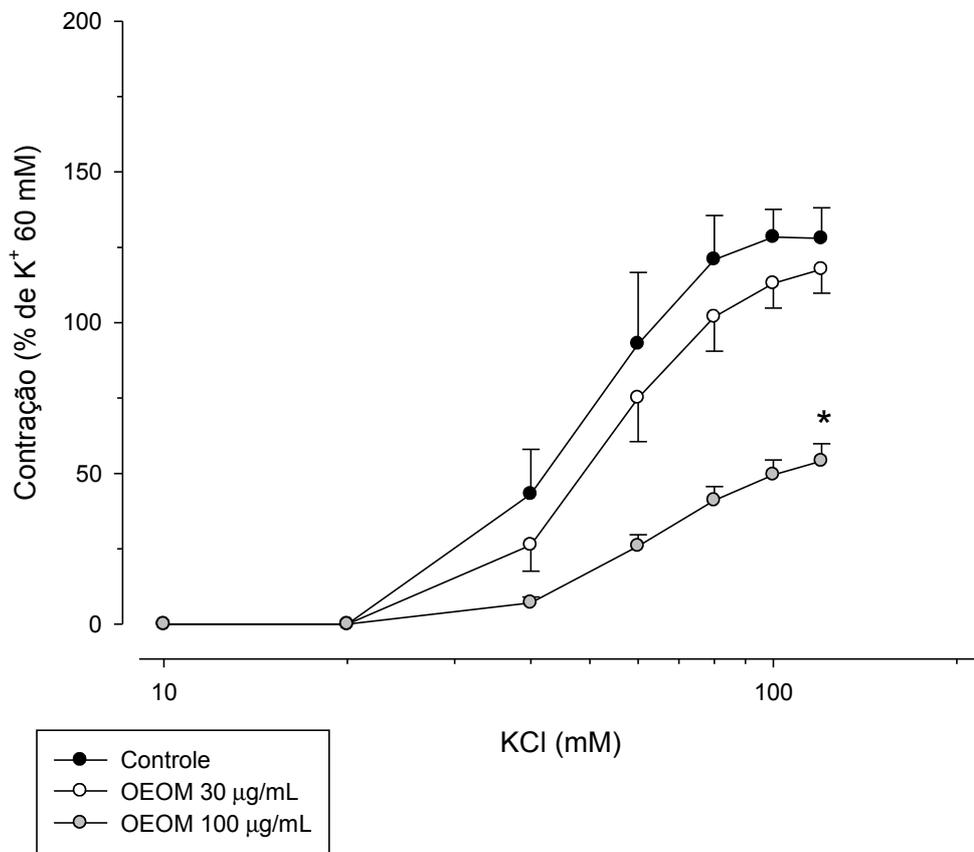


Figura 15 - Curva concentração efeito do KCl em traquéia isolada de animais sensibilizados na ausência e na presença de óleo essencial de *Ocimum micranthum*.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do KCl sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados (n = 7) na ausência e na presença de OEOM a 30 ou 100 µg/mL; os valores são expressos como média ± E.P.M.

5.13 Curva concentração efeito do KCl na presença e ausência de OEOM em tecidos de animais sensibilizados e desafiados à OVA

Em tecidos traqueais obtidos de animais sensibilizados e desafiados pela inalação de OVA, foram adicionadas concentrações cumulativas de KCl, inicialmente na ausência e, posteriormente, na presença 30 ou 100 µg/mL de OEOM. Conforme já descrito, na ausência de OEOM, a CE_{50} para o KCl foi de 50,2 [43,1 - 57,4] mM (n = 5) e o E_{max} foi correspondente a $193,1 \pm 29,4\%$ (n = 5) da contração induzida por 60 mM de K^+ . O tratamento das preparações com OEOM 30 ou com 100 µg/mL não foi capaz de alterar a sensibilidade tecidual ao KCl, uma vez que os valores de CE_{50} foram 56,8 [49,1 - 64,4] mM e 66,9 [49,6 - 84,1] mM, respectivamente, e não apresentaram diferença significativa em relação ao controle ($p > 0,05$, ANOVA), embora o último valor tenha apresentado valor limítrode de p (0,07), tendendo a se tornar significativo. Por outro lado, o OEOM foi capaz de reduzir a magnitude da resposta máxima induzida pelo KCl. Com OEOM 30 µg/mL, o E_{max} foi $157,6 \pm 23,9\%$ da contração de K^+ 60 mM, mas não foi estatisticamente diferente, enquanto que com OEOM a 100 µg/mL, o valor de E_{max} foi significativamente menor ($68,0 \pm 11,6\%$ da contração de K^+ 60 mM) ($p < 0,05$, ANOVA).

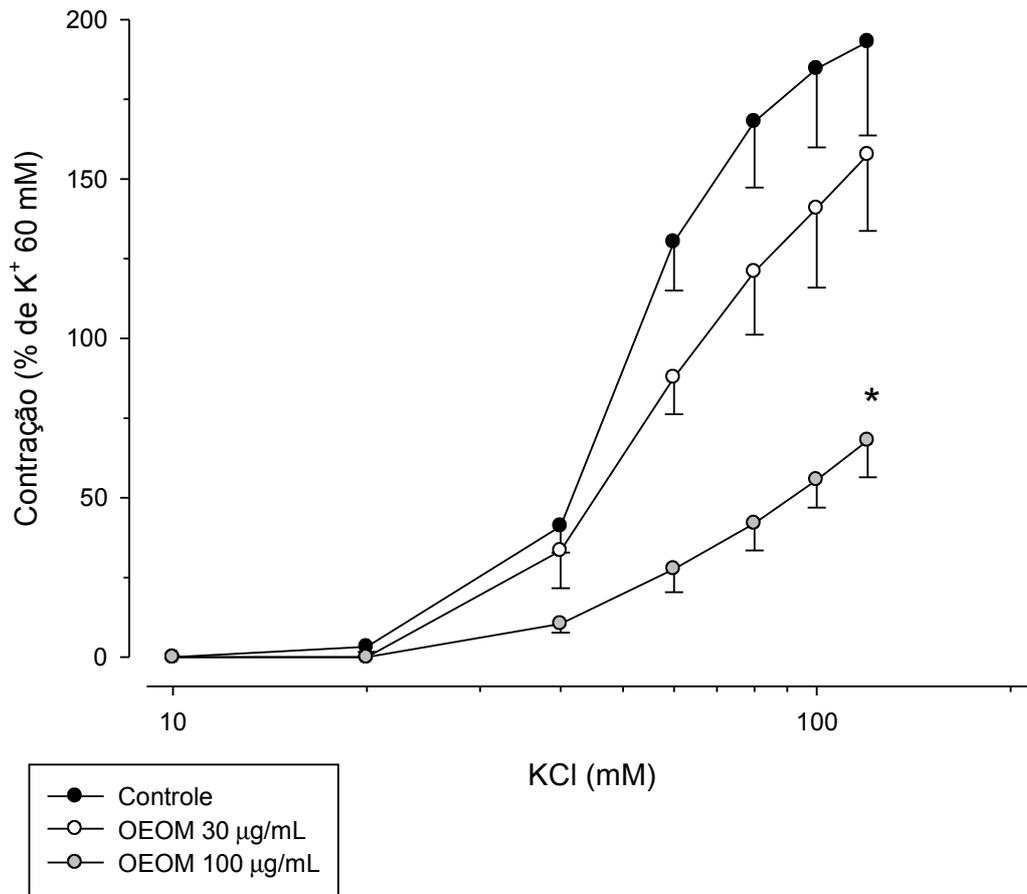


Figura 16 - Curva concentração efeito do KCl em traquéia isolada de ratos sensibilizados e desafiados na ausência e na presença de OEOM.

Gráfico com os valores médios da resposta contrátil do KCl sobre traquéias isoladas de ratos sensibilizados e desafiados (n = 5) na ausência e na presença de OEOM a 30 ou 100 µg/mL; os valores são expressos como média ± E.P.M.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra as ações miorreaxantes e antiespasmódicas do óleo essencial de *Ocimum micranthum* (OEOM) em tecidos isolados de traquéia de rato. Além disso, demonstramos também que seu principal constituinte, o cinamato de metila, pode ser responsável por parte de seus efeitos e que o OEOM possui efeito seletivo em tecidos submetidos a processo inflamatório decorrente da apresentação de antígeno sensibilizante a animais previamente sensibilizados.

Há relatos de que o *Ocimum micranthum*, também conhecido como “alfavaca da folha miúda”, é tradicionalmente utilizado no tratamento de distúrbios respiratórios (SILVA; PINHEIRO, 2008) e nossos experimentos mostram que esse óleo essencial possui efeitos interessantes na musculatura lisa de traquéias isoladas, confirmando assim sua utilização popular. Na realidade, algumas plantas aromáticas, encontradas com maior freqüência em nossa região, têm demonstrado atividades farmacológicas coerentes com seu uso em medicina popular (LEAL CARDOSO; FONTELES, 1999).

Os trabalhos científicos a respeito do óleo essencial de *Ocimum micranthum* são extremamente escassos na literatura, e o presente estudo é o primeiro a relatar seus efeitos na musculatura lisa traqueal. Utilizamos como metodologia a confecção de diversas curvas concentrações-efeito com protocolos diferentes no intuito de demonstrar e tentar traçar, pelo menos em parte, o perfil farmacológico deste óleo essencial e seu componente majoritário, o cinamato de metila.

Ao utilizamos o OEOM nas concentrações de 1 – 1000 µg/mL, pudemos evidenciar que o mesmo não provoca alterações no tônus basal de traquéia isolada de rato. Essa característica difere de outros óleos essenciais de plantas do gênero *Ocimum*, que possuem propriedades miorreaxantes, inclusive sobre o tônus basal, como o *Ocimum gratissimum* (MADEIRA *et al.*, 2002). Estas respostas discrepantes se devem ao fato de que os óleos essenciais são constituídos de complexas associações de componentes, pertencentes a diversos grupos químicos, como fenóis e terpenos (MAGALHÃES, 2002) e as quantidades destes componentes podem variar enormemente. Trabalhos mostram que as

estações do ano, o tipo de solo, clima e até mesmo a hora da coleta podem influenciar na composição dos óleos essenciais obtidos de uma mesma espécie (CARVALHO FILHO *et al.*, 2006; ROSAS *et al.*, 2004; VIÑA; MURRILO, 2003; MURAKAMI *et al.*, 2006).

Apesar do óleo essencial de *Ocimum micranthum* não relaxar o tônus basal da musculatura lisa de traquéias isoladas, ele mostra efeitos interessantes nas contrações induzida por outras substâncias. Pudemos observar que o OEOM foi capaz de reverter completamente a contração já estabelecida e induzida por cloreto de potássio, bem como por CCh, na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos Wistar. Quando o OEOM é adicionado antes do agente contraturante também evidenciamos seus efeitos antiespasmódicos.

. Usando o KCl como agente contrátil, foi possível evidenciar que a resposta máxima (E_{max}) do tecido foi diminuída pelo uso da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ do OEOM. Está descrito na literatura que o K^+ pode induzir um acoplamento excitação-contração através de um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , a partir de um influxo do meio extracelular, por meio da ativação de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCC – *Voltage Opereted Calcium Channels*) (SPEDDING, 1984; BASTOS *et al.*, 2009).

As respostas observadas nos protocolos anteriormente citados, em que foi utilizado o KCl como agente contraturante, nos levam a crer que o óleo essencial de *Ocimum micranthum* possivelmente age, pelo menos em parte, interferindo na abertura dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC), visto que o OEOM foi capaz tanto de bloquear como reverter a resposta induzida por cloreto de potássio na musculatura de traquéias de ratos.

Ao utilizarmos o óleo essencial de *Ocimum micranthum* na contração induzida por carbacol obtivemos respostas diferentes de acordo com o protocolo utilizado. O carbacol é um agonista colinérgico e age de maneira semelhante à acetilcolina. Na membrana plasmática de células musculaturas lisas, este agonista pode ligar-se a receptores específicos que estão acoplados à proteína G e assim desencadear uma série de eventos celulares que aumentam a concentração intracelular de cálcio e podem resultar em contração muscular.

Em um protocolo onde a curva concentração-efeito para o óleo essencial de *Ocimum micranthum* foi iniciada depois da estabilização da contração induzida por carbacol, pudemos evidenciar que houve uma reversão dessa resposta pelo

óleo. No entanto em outro protocolo onde o óleo essencial foi adicionado, juntamente com nitrendipina, antes do início da CCE para o carbacol o mesmo resultado não ocorreu. Neste último protocolo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas concentração efeito para o CCh na ausência e presença de 30 e 100µg/mL de OEOM. A nitrendipina é um bloqueador dos canais de cálcio, mais especificamente dos VOCC (DU et al., 2010). A finalidade da utilização da mesma neste protocolo foi de tentar excluir a participação dos VOCC e filtrar a contração muscular induzida pelo carbacol via canais de cálcio operados por receptor (ROCC). Desta maneira possíveis alterações provocadas pelo OEOM poderiam ser atribuídas a uma ação em ROCC, o que não foi o caso.

Como o óleo essencial de *Ocimum micranthum* é utilizado em muitas doenças respiratórias como asma e bronquites, tentamos mimetizar estas condições em um grupo de animais do nosso estudo. Em um modelo desenvolvido por Weinreich e Undem (1987), onde a ovalbumina é o antígeno desencadeador da sensibilização, condições como hiperreatividade brônquica, aumento da secreção no trato respiratório, dificuldade ventilatória podem ser observadas nestes animais.

Os animais sensibilizados foram divididos em dois grupos; os que inalaram apenas solução fisiológica e os que inalaram uma solução contendo ovalbumina. Neste último caso, estes animais são denominados como desafiados e esse desafio mimetiza condições encontradas em uma crise asmática. O procedimento de broncoprovocação, pela repetição da exposição ao antígeno por inalação ao animal sensibilizado, provoca o desencadeamento de uma resposta broncostritora (MANZOLLI *et al.*, 1999).

Pudemos observar que o OEOM praticamente não teve efeito na CCE do CCh em animais sensibilizados mas, interessante, produziu efeitos significativos em tecidos de animais desafiados pela OVA. Nestes, o OEOM foi capaz de alterar os valores de CE_{50} nas CCE para o carbacol, indicando que nos tecidos dos animais desafiados, ele se comporta como um antagonista competitivo, uma vez que houve apenas deslocamento da curva para a direita sem redução de seu efeito máximo

O OEOM se mostrou mais efetivo no bloqueio dos VOCC visto que ele foi capaz tanto de reverter como bloquear a resposta contrátil induzida por KCl. Esta aparente seletividade pode explicar sua maior interferência na curva concentração-efeito do CCh em animais desafiados. Em condições normais a participação destes

canais é mínima na contração induzida por este tipo de agonista (carbacol). No entanto em condições patológicas, como na hiperreatividade, a participação dos canais de cálcio operados por voltagem é marcante (MOURA, 2004) possibilitando assim uma ação mais efetiva do óleo essencial de *Ocimum micranthum*..

Ao contrário do que foi observado nas CCE para o carbacol, evidenciamos diferenças significativas no efeito máximo induzido pelo KCl na presença de OEOM, tanto em animais apenas sensibilizados como também em tecidos de animais sensibilizados e desafiados. Por outro lado, não foram detectados alterações na sensibilidade do KCl uma vez que os valores de CE_{50} não apresentaram diferença significativa.

Após a investigação dos efeitos do óleo essencial de *Ocimum micranthum* na musculatura lisa de traquéias isoladas de ratos, decidimos por investigar a ação do seu principal constituinte, o cinamato de metila. Esta substância está presente em diversos óleos essenciais das plantas aromáticas (BALLABENI *et al.*, 2010; MURAKAMI *et al.*, 2009; ZHELJAZKOV; CALLAHAN; CANTRELL, 2008).

Primeiramente utilizamos o cinamato de metila nas concentrações de 1 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ sob o tônus basal de traquéias isoladas (figura 5a). Pudemos observar que assim como o óleo essencial de *Ocimum micranthum*, o seu constituinte majoritário, o cinamato de metila, não altera o tônus basal.

Em um segundo protocolo utilizando esta substância, testamos sua ação no estado de contração sustentada na musculatura lisa de traquéias de ratos pelo cloreto de potássio (60 mM). Assim, o cinamato de metila conseguiu reverter de maneira concentração-dependente a contração induzida por KCl. Este fato também foi observado em um outro protocolo na contração induzida por CCh.

Ao contrário do OEOM que agiu com potências semelhantes na reversão da resposta contrátil para o KCl e CCh, com CI_{50} de 112,9 e 128,2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, o cinamato de metila apresentou diferenças nestas concentrações. Na reversão da resposta induzida por KCl a CI_{50} do cinamato foi de 308,48 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que na reversão da contração provocada por CCh, foi de 100,4 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados são interessantes, visto que apesar do cinamato de metila ser o constituinte majoritário do OEOM, suas ações podem ser diferentes. Isso pode ser explicado por uma provável interferência dos demais constituintes do óleo essencial, como o limoneno, que constitui 12,9% de sua composição.

Em conclusão, o óleo essencial de *Ocimum micranthum*, não interfere no tônus basal da musculatura lisa de traquéias mas demonstra ser possuidor de efeitos miorelaxantes e antiespasmódicos. Possivelmente estes efeitos, pelo menos em parte, são provenientes de uma ação nos canais operados por voltagem (VOCC). Adicionalmente o OEOM foi capaz de atuar de maneira mais específica no bloqueio da resposta contrátil de animais desafiados. Para o cinamato de metila foi demonstrado que o mesmo também não interfere no tônus basal e é capaz de reverter a resposta contrátil induzida por cloreto de potássio e carbacol, porém estudos mais aprofundados devem ser realizados, no intuito de tentar traçar o perfil farmacológico de seu efeito miorelaxante.

7 CONCLUSÃO

- O óleo essencial de *Ocimum micranthum*, assim como o seu principal constituinte cinamato de metila, não altera o tônus basal de traquéias isoladas de ratos;
- O óleo essencial de *O. micranthum* apresenta atividade miorelaxante e antiespasmódica;
- O cinamato de metila possui atividade miorelaxante
 - O mecanismo envolvido no efeito miorelaxante e antiespasmódico do óleo essencial de *Ocimum micranthum* e no efeito miorelaxante do cinamato de metila é, pelo menos em parte, devido preferencialmente a ação nos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. **Taxonomia e etnobotânica do Gênero Ocimum L. no Nordeste do Brasil.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 1996.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N.. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, supl., p. 678-689, 2006.
- AZAH, M. A.; SAM, Y.Y.; MAILINA, J. *et al.* Methyl cinnamate: The major constituent of the essential oil of *Alpinia malaccensis* var. *nobilis*. **J. Trop. Forest Sci.**, v. 17, n. 4, p. 631-633, 2005.
- AZEVEDO, S.K.; SILVA, I. M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 185-194, 2006.
- BABA, K.; SATAKE, T.; TAKAGI, K.; TOMITA, T. Effects of verapamil on the response of the guinea-pig tracheal muscle to carbachol. **Br. J. Pharmacol.**, v. 88, n. 2, p. 441-449, 1986.
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **J. Physiol.**, v. 586, pt. 21, p. 5047-5061, 2008.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CARVALHO FILHO, J. L. S.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; EHLERT, P.A.D.; MELO, A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN, R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 1, p. 24-30, 2006.
- CORREA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. 6v.

CRAVEIRO, A. A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; DANTAS, T.N.C. Fixed and volatile constituents of essential oil of *Cróton aff nepetifolius*. **J. Nat. Prod.**, v. 43, p. 758-767, 1980.

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

DAÍ, J. M.; KUO, K. H.; LEO, J.; PARÉ, P.D.; VAN BREEMEN, C.; LEE, C.H. Acetylcholine-induced asynchronous Calcium waves in intact Human Bronchial Muscle Bundle. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 36, n 5, p. 600-608, 2007.

DU, H.; HE, J.; WANG, S.; HE, L. Investigation of calcium antagonist-L-type calcium channel interactions by a vascular smooth muscle cell membrane chromatography method. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. **397**, n. **5**, p. **1947-1953**, **2010**.

EGESIE, U.G.; ADELAIYE, A.B.; IBU, J.O.; EGESIE, O.J. Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats. **Niger J. Physiol. Sci.**, v. 21, n. 1-2, p. 31-35, 2006.

HILTUNEN, R.; HOLM, Y. (Ed.) **Basil: The Genus Ocimum**. Australia: Harwood Academic Publishing, 2005. v. 10.

HUANG, Q.; ZHU, Y.; LI, H.; Inibitory effects of Methyl trans-cinnmate on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activites. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 2565-2569, 2009.

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

KHOSLA, M.K. Study of interBrelationship, phylogeny and evolutionary tendencies in genus *Ocimum*. **Ind. J. Genet. Plant Bree.**, v. 55, p. 71-83, 1995.

KONG, J.O.; LEE, S.M.; MOON, Y.S.; LEE, S.G.; AHN, Y.J. Nematicidal activity of Cássia and cinnamon oil compounds and related compounds toward *Bursaphelenchus xylophilus*. **J. Nematol.**, v. 39, n. 1, p. 31-36, 2007.

KUMAR, R.K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy? **Pharmacol. Ther.**, v. 91, p. 93-104, 2001.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.; TOSCANO, C.F. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, peperitenone oxide, in normotensive anaesthetized rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 67, n. 7, p. 638-643, 2001.

LAHLOU, S.; GALDINO, C.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C.; DUARTE, G.P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med.**, v. 68, n. 12, p. 1097-1102, 2002

LINO, C.S.; GOMES, P.B.; LUCETTI, D.L.; DIÓGENES, J.P.; SOUSA, F.C.; SILVA, M.G.; VIANA, G.S. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory activities of the essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. From northeastern Brazil. **Phytother. Res.**, v. 19, n. 8, p. 708-712, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MANZOLLI, S.; MACEDO-SOARES, M. F.; VIANNA, E. O.; SANNOMIYA, P. Allergic airway inflammation in hypothyroid rats. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 104, p. 595-600, 1999.

MAGALHÃES, P.J.C. Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura lisa de cobaio. **Rev. Med. UFC**, v. 35/37, n. 1/2, p. 63, 1995/1997)

MAGALHÃES, P.J.C.; CRIDDLE, D.N.; TAVARES, R.A.; MELO, E.M. The effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MAGALHÃES, P.J.C. **Estudo farmacológico do óleo essencial de *Croton Nepetaefolius* Baill, sobre os músculos lisos traqueal e vascular e sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celíaco.** Tese(Doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MAZUTTI, M.; BELEDELLI, B.; MOSSI, A.J.; CANSIAN, R.L.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V.; PAROUL, N. Caracterização química de extratos de *Ocimum basilicum* L. obtidos através de extração com CO₂ a altas pressões. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1198-1202, 2006.

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

MORAES, L.A.S.; FACANALI, R.; MARQUES, M.O.M. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 74, n. 1, p. 183-186, 2002.

MOURA, C.T.M. **Participação dos canais de cálcio na hiperreatividade induzida por ovalbumina em traquéias isoladas de ratos**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 14, p. 289–300, 2007.

MURAKAMI, S.; LI, W.; MATSUURA, M.; SATOU, T.; HAYASHI, S.; KOIKE, K. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. **J. Nat. Med.**, v. 63, n. 2,, p. 204-208, 2009.

NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; BANDO, E.; MELO, A.F.N.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of *ocimum gratissimum* l. essential oil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L.; SHEKHAR, M.P.; PALOMINO, E.; HOGAN, V.; PIECHOCKI, M.P.; FUNASAKA, T.; RAZ, A. Inhibition of breast tumor growth and angiogenesis by a medicinal herb: *Ocimum gratissimum*. **Int. J. Cancer**, v. 121, n. 4, p. 884-894, 2007.

OTERO, R.; NÚÑEZ, V.; BARONA, J.; FONNEGRA, R.; JIMÉNEZ, S.L.; OSÓRIO, R.G.; SALDARRIAGA, M.; DÍAZ, A.J. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. **J. Ethnopharmacol.** v. 73, n. 1-2, p. 233-241, 2000.

OTTE, S. Los aceites assenciales: medicina redescubierta. **Dragaco**, v. 39, p. 91-109, 1994.

PAREKH, A.B.; PUTNEY, J.W. JR. Store-operated calcium channels. **Physiol. Rev.**, v. 85, n. 2, p. 757-810, 2005.

PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

PEREZ-ZOGHBI, J.F.; KARNER, C.; ITO, S.; SHEPHERD, M.; ALRASHDAN, Y.; SANDERSON, M.J. Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 22, n. 5, p. 388-397, 2009.

RABELO, M.; SOUZA, E. P.; SOARES, P. M. G.; MIRANDA, A. V.; MATOS, F. J. A.; CRIDDLE, D. N. Antinociceptive properties of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (labiateae) in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 521-524, 2003.

ROSAS, J.F.; SILVA, A.C.M.; ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A. Comparação dos voláteis das folhas de *Ocimum micranthum* Willd. Obtidos por hidrodestilação e destilação-extração simultânea. **Rev. Bras. Plan. Med.**, v. 7, n.1, p. 26-29, 2004.

ROSSUM, J.M.V.; BRINK, F.G.V.D. Cumulative dose-response curves. **Arch. Int. Pharmacol**, 143: 240-6, 1963.

SACCETTI, G.; MÉDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E.; BRUNI, R. Composition and functional properties of the essential oil amazonian basil, *ocimum micranthum* wild. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 11, p. 3486-3491, 2004.

SIDDIQUI, B.S.; ASLAM, H.; ALI, S.T.; BEGUM, S.; KHATOON, N. Two new triterpenoids and a steroidal glycoside from the aerial parts of *Ocimum basilicum*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 4, p. 516-519, 2007.

SILVA, A.S.B.; PINHEIRO, B.G.P. **Avaliação toxicológica e atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Ocimum micranthum* Willd.** Monografia. Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

SOARES, R.D.; CHAVES, M.A.; SILVA, A.A.L.; SILVA, M.V.; SOUZA, B.S. Influência da temperatura e velocidade do ar na secagem de majericão (*Ocimum basilicum* L.) com relação aos teores de óleos essenciais e de Linalol. **Ciênc. Agrotec., (Impr.)**, v. 31, n. 4, p. 1108-1113, 2007.

SOMLYO, A.P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 57, n. 4, p. 497-507, 1985.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J. Physiol.**, v. 522, pt. 2, p. 177-185, 2000.

TOHTI, I, TURSUN, M, UMAR, A, TURDI, S.; IMIN, H.; MOORE, N. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. **Thromb. Res.**, v. 118, n. 6, p. 733-739, 2006.

VANI, S.R.; CHENG, S.F.; CHUAH, C.H. Comparative stude of volatile compounds from genus *ocimum*. **Am. J. Appl. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 523-528, 2009.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J.E. Chemical characterization of basil (*ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine. **Econ. Bot.**, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

VIEIRA, P.R.N. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de *Ocimum* frtente a cepas de *Cândida* SPP e *Microsporium canis***. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

VIÑA, A.; MURRILO, E. Essential oil composition from twelve varieties of Basil (*Ocimum* spp) grown in Colômbia. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 5, p. 744-749, 2003.

VITTI, M.A.S.; BRITO, J.O. Óleo essencial de Eucalipto. **Documentos Florestais**, n. 17, p. 1-26, Agosto de 2003.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, n. 1-4, p. 201-206, 2003.

WEINREICH, D.; UNDEM, B.J. Immunological regulation of synaptic transmission in isolated guinea pig autonomic ganglia. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 5, p. 1529–1532, 1987.

ZHELJAZKOV, V.D.; CALLAHAN, A.; CANTRELL, C.L. Yield and oil composition of 38 Basil (*Ocimum basilicum* L.) Accessions Grown in Mississippi. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 241-245, 2008.