



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

DAVI MATTHEWS JUCÁ

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Eucalyptus tereticornis* E
DOS CONSTITUINTES 1,8-CINEOL, α -PINENO E β -PINENO NA
MOTILIDADE DO MÚSCULO LISO GASTRINTESTINAL DE
RATOS

FORTALEZA
2012

DAVI MATTHEWS JUCÁ

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Eucalyptus tereticornis* E
DOS CONSTITUINTES 1,8-CINEOL, α -PINENO E β -PINENO NA
MOTILIDADE DO MÚSCULO LISO GASTRINTESTINAL DE
RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Hélio Rola

FORTALEZA
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

M84e

Jucá, Davi Matthews

Efeitos do Óleo Essencial do *Eucalyptus tereticornis* e dos constituintes 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na motilidade do músculo liso gastrintestinal de ratos / Davi Matthews Jucá. – 2012.
84 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Hélio Rola.

1. Óleos Voláteis. 2. Eucalyptus. 3. Monoterpenos. 4. Músculo liso. I. Título.

CDD: 615.32

DAVI MATTHEWS JUCÁ

EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Eucalyptus tereticornis* E DOS CONSTITUINTES
1,8-CINEOL, α -PINENO E β -PINENO NA MOTILIDADE DO MÚSCULO LISO
GASTRINTESTINAL DE RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 26 de setembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Hélio Rola (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires
Centro Universitário Estácio do Ceará - ESTÁCIO-FIC

Profa. Dra. Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva
Faculdade Terra Nordeste - FATENE

Prof. Dr. Raimundo Araujo Filho
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

Prof. Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos
Centro Universitário Estácio do Ceará - ESTÁCIO-FIC

A todas as pessoas que acreditam na construção de uma realidade diferente, mais justa e mais humana e que dão sua contribuição diária para que este objetivo se realize.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Hélio Rola pelo incentivo, atenção, apoio, amizade e por todas as lições transmitidas.

Aos ilustres membros da banca examinadora, Dr. Raimundo Araujo Filho, Dr. Vasco Pinheiro Diógenes Bastos, Dra. Alana de Freitas Pires e à Dra. Maria Fernanda Piffer Tomasi Baldez da Silva pela gentileza em aceitar o convite e pelas sugestões acrescidas à tese.

A todos os professores pelos estímulos constantes em minha formação acadêmica.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pela amizade, paciência e por sempre estarem dispostos a colaborar.

Aos colegas da Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC pela agradável convivência.

A todos do Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso e do Laboratório Escola Luiz Capelo, da Universidade Federal do Ceará pelas colaborações nos experimentos ou em discussões teóricas, pelo crescimento científico e pessoal e pelo companheirismo.

Aos meus avôs, José Luciano Leite Jucá e Henry Ramos Matthews, que por decisão de Deus não puderam vivenciar este passo importante em minha vida, mas que permanecem vivos no meu coração.

Às minhas avós Luiza Neyde Pereira Jucá e Zulene Calmon Cirino Matthews pelo amor, alegria e lições de vida sempre transmitidas.

Ao meu cunhado Arthur de Castro Callado pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus sogros, Antonio Bandeira Nogueira e Rita Maria Dantas Nogueira, pelo constante apoio e exemplo de vida.

À minha esposa Eveline Dantas Nogueira, pois ela é minha razão de viver e sem ela minha vida não teria graça. Obrigado pelo apoio em todas as horas.

Aos meus pais Paulo Pereira Jucá e Evelyn Matthews Jucá e irmãs Paulyne Matthews Jucá e Fernanda Matthews Jucá, agradeço por tudo o que já compartilhamos e pela parcela de cada um de vocês que está presente nesta tese, através das mais diversas formas.

Ao CNPq, por propiciar incentivo aos pesquisadores e tornar possível a execução deste trabalho.

A todos aqueles que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho os meus agradecimentos.

“E não me esquecer, ao começar o trabalho, de me preparar para errar. Não esquecer que o erro muitas vezes se havia tornado o meu caminho. Todas as vezes em que não dava certo o que eu pensava ou sentia – é que se fazia enfim uma brecha, e, se antes eu tivesse tido coragem, já teria entrado por ela. Mas eu sempre tivera medo de delírio e erro. Meu erro, no entanto, devia ser o caminho de uma verdade: pois só quando erro é que saio do que conheço e do que entendo. Se a verdade fosse aquilo que posso entender – terminaria sendo uma verdade pequena, do meu tamanho.”

Clarice Lispector

RESUMO

O 1,8-cineol, o α -pineno e β -pineno são monoterpenos constituintes do óleo essencial de plantas encontradas no Nordeste do Brasil como a “malva-santa” e o “eucalipto” (Óleo Essencial do *Eucalyptus tereticornis* - OEET) que, na medicina popular, são usadas no tratamento de distúrbios intestinais e respiratórios. As ações miolorrelaxantes desses óleos essenciais são atribuídas à presença desses monoterpenos. Nosso objetivo foi estudar mais detalhadamente os efeitos desses constituintes, assim como o do OEET, sobre a contratilidade do músculo liso gastrointestinal e sobre o efeito procinético em ratos. No presente estudo, foram usados ratos Wistar machos (180-250g) sacrificados por deslocamento cervical. Tiras de duodeno, íleo e fundo de estômago foram cortados e mantidos em solução de Tyrode normal. As contrações isométricas foram registradas através de transdutores de força conectados a sistema computadorizado. Soluções contendo o 1,8-cineol, o α -pineno ou β -pineno foram preparadas em Tween 80 (concentração final $\leq 0,2\%$ v/v). Usados isoladamente, o OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e β -pineno diminuíram o tônus basal em tiras de duodeno. Em tônus basal de tiras isoladas de fundo gástrico, o OEET e o 1,8-cineol possuíram efeito miolorrelaxante, enquanto o α -pineno e o β -pineno possuíram efeito contrátil. Esse efeito contrátil do α -pineno e do β -pineno em tiras isoladas de fundo gástrico é por possível interferência com o mecanismo dependente de IP3 e independe da ativação local do receptor muscarínico e de uma ação central na ativação de receptores nicotínicos, da mesma forma, o efeito miolorrelaxante na musculatura lisa duodenal é mediado por possível interferência com os mecanismos celulares mediados pela formação de IP3. Além disso, como demonstrado anteriormente, em íleo de rato, esses monoterpenos provavelmente ativam as vias de entrada de Ca^{2+} para a célula em situações de depleção dos estoques intracelulares. Em estudos de retenção fracional de corante no trato gastrointestinal, o OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno promoveram a aceleração do esvaziamento gástrico. O α -pineno e β -pineno também aceleraram o trânsito intestinal e reduziram a complacência gástrica. Os nossos dados mostram que OEET possui propriedades pró-cinéticas, que podem ser atribuíveis aos efeitos contrastantes induzidos por α -pineno e β -pineno, corroborando com dados apresentados anteriormente (Jucá, 2007).

Palavras-chave: Óleos Voláteis. Eucalyptus. Monoterpenos. Músculo liso.

ABSTRACT

The monoterpenes 1,8-cineole, α -pinene and β -pinene are constituents commonly found in several essential oils obtained from plants in Brazilian northeast such as “malva-santa” and “eucalipto” (Essential Oil of *Eucalyptus tereticornis* - EOET), which are used in folk medicine to treat respiratory and gastrointestinal dysfunctions. Myorelaxant actions are due to the presence of these constituents in their essential oils. The present work aimed to further study the pharmacological effects of these compounds, as well as the EOET, on smooth muscle gastrointestinal contractility and the prokinetic effect in rats. Wistar rats (200-250 g) were used, sacrificed by cervical dislocation. Strips were carefully obtained from gastric fundus, duodenum and ileum, and were maintained in normal Tyrode's solution. Isometric contractions were recorded through force transducers coupled to a computerized data acquisition system. Solutions containing 1,8-cineole, α -pinene or β -pinene were prepared with Tween 80 (final concentration $\leq 0,2\%$ v/v). Solely used, EOET, 1,8-cineole, α -pinene or β -pinene decreased duodenal basal tonus. In basal tone of gastric fundus isolated strips, EOET and 1,8-cineole had relaxant effect, while α -pinene and β -pinene had contractile effect. This contractile effect of α -pinene and β -pinene in isolated strips of gastric fundus is due to possible interference with IP₃-dependent mechanism and independent of the muscarinic receptor activation and a central action in the activation of nicotinic receptors, in the same way, the duodenal smooth muscle relaxant effect is mediated by possible interference with the cellular mechanisms mediated by the formation of IP₃. Moreover, as shown above, in the rat ileum, monoterpenes activate capacitative Ca²⁺ entry to intracellular milieu after Ca²⁺ stores depletion. The α -pinene and β -pinene also accelerated intestinal transit and reduced gastric compliance. Our data show that OEET has prokinetic properties in rats, which may be attributable to the contrasting effects induced by α -pinene and β -pinene, corroborating data presented previously (Jucá, 2007).

Keywords: Oils Volatile. Eucalyptus. Monoterpenes. Muscle Smooth.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAF	Cafeína
CaM	Calmodulina
CCE	Curva concentração-efeito
CCh	Carbacol
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CE ₅₀	Concentração efetiva capaz de produzir 50 % do efeito máximo
CI ₅₀	Concentração inibitória capaz de produzir 50 % do efeito máximo
CICR	Liberação de cálcio induzida pelo cálcio
cmH ₂ O	Centímetro de água
DE	Diâmetro externo
DI	Diâmetro interno
DL ₅₀	Dose letal suficiente para matar 50%
E.P.M.	Erro padrão da média
EGTA	Ácido etileno-bis(β-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
GMPC	Guanosina monofosfato cíclico
i.p.	Intraperitoneal

IP ₃	Trifosfato de Inositol
K ⁺	Íon Potássio
KCl	Cloreto de potássio
K60	Solução contendo 60 mM de K ⁺
mL	Mililitro
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
mM	Milimolar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
µg/mL	Micrograma por mL
µM	Micromolar
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCX	Trocador cálcio-sódio
OEET	Óleo essencial do <i>Eucalyptus Tereticornis</i>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PHE	Fenilefrina
PDE	Fosfodiesterase
PKC	Proteína quinase C
ROCC	Canal para cálcio operado por receptor
rpm	Rotações por minuto
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
SMOCC	Canal para cálcio operado por segundos mensageiros

SOCC	Canal para cálcio operado por estoque
SR	Retículo sarcoplasmático
TCA	Tricloroacético
TGI	Trato gastrintestinal
TN	Tyrode normal
VOCC	Canal para cálcio operado por voltagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura molecular do α -pineno e do β -pineno.	21
Figura 2 -Estrutura molecular do 1,8-cineol.	23
Figura 3 -Mediação da abertura dos canais SOC pelas moléculas STIM-1	26
Figura 4 -Mecanismos de controle e ação do íon cálcio na célula muscular lisa.....	26
Figura 5 -Ondas lentas e potenciais em ponta.....	28
Figura 6 -Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade <i>in vitro</i>	34
Figura 7 -Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de retenção fracional de corante.	36
Figura 8 -Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de trânsito intestinal.	38
Figura 9 -Esquema simplificado da metodologia da complacência gástrica	40
Figura 10 -Efeito relaxante do β -pineno sobre o tônus basal de duodeno de rato.	41
Figura 11 -Efeito inibitório do β -pineno sobre a contração evocada por ACh em duodeno isolado de rato.....	41
Figura 12 -Efeito do α -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de KCl.....	42
Figura 13 -Efeito do α -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de ACh.	43
Figura 14 -Efeito do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal.....	44
Figura 15 -Efeito do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de ciproheptadina.	45
Figura 16 -Efeito do α -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina.	46

Figura 17 -Efeito do α -pineno no t3nus basal de fundo g3astro isolado de rato na presen3a de hexamet3nio.	47
Figura 18 -Efeito do α -pineno no t3nus basal de fundo g3astro isolado de rato na presen3a de U73122.	48
Figura 19 -Efeito relaxante do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e do β -pineno sobre o t3nus basal de duodeno e fundo g3astro isolados de rato.....	51
Figura 20 -Efeito do α -pineno e β -pineno sobre a contra33o evocada por ACh em duodeno e fundo g3astro isolados de rato.	52
Figura 21 -Efeito do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno sobre a contra33o induzida pela adi33o de Ca^{2+} em prepara33es mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presen3a de KCl.	54
Figura 22 -Efeito do OEET, do α -pineno e do β -pineno sobre a contra33o induzida pela adi33o de Ca^{2+} em prepara33es mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presen3a de ACh.....	56
Figura 23 -Redu33o da contra33o t3nica da ACh pelo 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno em Tyrode normal com Verapamil.	58
Figura 24 -Redu33o na contra33o do fundo g3astro isolado de rato induzida por K^+ pelo α -pineno e o β -pineno na presen3a de ciproheptadina.....	59
Figura 25 -Tra3ados das curvas concentra33o-efeito do α -pineno e β -pineno em tiras isoladas de fundo g3astro na presen3a de atropina.....	60
Figura 26 -Tra3ados das curvas concentra33o-efeito do α -pineno e β -pineno em tiras isoladas de fundo g3astro na presen3a de atropina.....	61
Figura 27 -Inibi33o da contra33o α -pineno e do β -pineno no fundo g3astro isolado de rato pela adi33o do U73122	62
Figura 28 -Reten33o fracional de corante de ratos tratados com OEET e 1,8-cineol e estudados aos 10 minutos p3s-prandial	64
Figura 29 -Reten33o fracional de corante de ratos tratados com α -pineno e o β -pineno e estudados aos 10 e 20 minutos p3s-prandial.	65
Figura 30 -Efeito do α -pineno e do β -pineno no tr3nsito intestinal	66
Figura 31 -Efeito do α -pineno e do β -pineno na complac3ncia g3astica.....	67

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Os óleos essenciais.....	16
1.2 Os terpenóides.....	17
1.3 O músculo liso.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Materiais e métodos.....	32
4.1.1 Aspectos Éticos.....	32
4.1.2 Animais.....	32
4.1.3 Soluções e drogas.....	32
4.1.4 Metodologia da contratilidade <i>in vitro</i>	33
4.1.5 Metodologia do esvaziamento gástrico.....	34
4.1.6 Metodologia do trânsito intestinal.....	37
4.1.7 Metodologia da complacência gástrica.....	39
4.2 Protocolos experimentais <i>in vitro</i>	40
4.2.1 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no tônus basal de duodeno e fundo gástrico isolado de rato.....	40
4.2.2 Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno e do fundo gástrico isolado de rato induzida por ACh.....	41
4.2.3 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto ao KCl.....	42

4.2.4	Efeito do OEET, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto à ACh.....	43
4.2.5	Efeito do 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal.....	44
4.2.6	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de ciproheptadina.....	45
4.2.7.	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina.....	46
4.2.8	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio.....	47
4.2.9	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de U73122.....	48
4.3	Análise Estatística.....	49
5.	RESULTADOS.....	57
5.1	Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no tônus basal de duodeno e fundo gástrico isolado de rato.....	51
5.2	Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno e do fundo gástrico isolado de rato induzida por ACh.....	52
5.3	Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto ao KCl.....	53
5.4	Efeito do OEET, α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto à ACh.....	55
5.5	Efeito do 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal.....	57
5.6	Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do fundo gástrico isolado de rato induzida por K^+ na presença de ciproheptadina.....	59
5.7	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina.....	60
5.8	Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio.....	61

5.9	Efeito do α -pineno e do β -pineno no t \acute{o} nus basal de fundo g \acute{a} strico isolado de rato na presen \c ca de U73122.....	62
5.10	Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no esvaziamento g \acute{a} strico....	63
5.11	Efeito do α -pineno e β -pineno no tr \acute{a} nsito intestinal.....	66
5.12	Efeito do α -pineno e β -pineno na complac \hat{e} ncia g \acute{a} strica.....	67
6.	DISCUSS\tilde{a}O	68
7.	CONCLUS\tilde{O}ES	74
	REFER\hat{E}NCIAS BIBLIOGR\acute{A}FICAS	75
	AP\hat{E}NDICE	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os óleos essenciais

Embora seja difícil precisar o início da evolução da arte de curar através do uso de plantas medicinais, devido ao uso místico, mágico e ritualístico, sabemos que muitos povos orientais conheciam o poder das plantas medicinais como substâncias aromáticas, óleos, remédios e venenos, muito tempo antes de Cristo. Existem registros em que a Índia, o Egito, Roma e a Babilônia contribuíram na expansão do conhecimento acerca da utilização das plantas com finalidade terapêutica.

O óleo essencial de uma dada planta é o conjunto de substâncias voláteis que a caracterizam como “aromática”, uma vez que são responsáveis pelo aroma característico da planta, apresentando componentes de diferentes grupos químicos como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, etc. Além do seu vasto uso industrial em perfumaria, os óleos essenciais têm sido aproveitados com fins terapêuticos em aromaterapia, para aplicação tópica através de massagens, banho de compressas, incensos ou mesmo administrado por via oral.

Através de modificações de grupamentos moleculares, os constituintes dos óleos essenciais podem ser utilizados como modelos estruturais para pesquisa de novos fármacos com maior eficácia e seletividade.

A pesquisa dos efeitos farmacológicos de óleos essenciais obtidos de plantas comumente encontradas na região Nordeste do Brasil, e seus respectivos constituintes, sobre a musculatura visceral tem sido uma das mais tradicionais linhas de estudo no Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso da UFC (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998; LAHLOU *et al.*, 1999, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2003; EVANGELISTA *et al.*, 2007; JUCÁ *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2011). Esses estudos relacionam as ações farmacológicas dos óleos essenciais sobre parâmetros fisiológicos como a pressão arterial e o trânsito gastrintestinal e também sobre diversos tipos de músculo liso *in vitro*. Tais resultados corroboram a eficácia atribuída a essas plantas pela utilização empírica por parte da população. Por outro lado, estes estudos caracterizam os principais constituintes desses óleos como o terpineol, metil-eugenol, anetol e estragol entre outros, como princípios ativos dos seus respectivos extratos. No geral são substâncias que, isoladamente ou em conjunto, apresentam

atividade sobre tecidos biológicos e são possuidoras, portanto, de um potencial espectro de ações farmacológicas a ser explorado.

Os estudos também são direcionados às ações farmacológicas do óleo essencial de eucalipto, em especial da espécie *Eucalyptus tereticornis*. Neles, demonstramos as ações miorelaxantes do óleo sobre tecido muscular liso de traquéia de cobaias (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2009) e tecido muscular liso do trato digestivo (Jucá *et al.*, 2011). Essas observações demonstram que a utilização dessa planta no tratamento empírico de afecções do trato respiratório apresenta fundamentação farmacológica. No presente estudo, trazemos os efeitos do óleo essencial de *E. tereticornis* e de três constituintes, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno no comportamento contrátil da musculatura lisa do trato gastrointestinal.

Os óleos essenciais de eucalipto

O nome eucalipto deriva do grego eu (= bem, de boa constituição) e kalyptós (= cobrir, coberto), porque seu fruto é uma estrutura que protege bem as sementes (REMADE, 2001b).

O eucalipto chegou à Europa em 1774 pela crença generalizada em seu poder milagroso contra a malária e outras doenças. Não se conhecia, à época, a etiologia da malária e o eucalipto cumpriu o seu papel “milagroso”, diminuindo os casos da doença, com a eliminação do encharcamento dos pântanos. Em 1871, ao contrário, a introdução do eucalipto no estado do Rio de Janeiro, no Brasil, coincidiu com um surto de febre amarela; não é preciso dizer que, em 1882, na cidade de Vassouras, todas as árvores de eucalipto foram arrancadas pelo povo como responsáveis pelo aparecimento da doença na cidade. (SILVA, 2003).

Embora originados na Austrália, Remade reportou em 2001 que existem cerca de 13.698.000 hectares de eucaliptos plantados em todo o mundo dos quais 2.955.000 ha são encontrados no Brasil, 4.800.000 ha na Índia e 1.701.500 ha na África. O estado de Minas Gerais é o principal produtor brasileiro, com 1.524.000 (51,6%) ha de eucalipto (REMADE, 2001a).

A família *Myrtaceae* compreende cerca de 140 gêneros, com aproximadamente 3.000 espécies divididas em 2 subfamílias, Myrtoideae e Leptospermoideae (Cronquist, 1991). Eucalipto é uma denominação geral e uma adaptação para o português da designação latina *Eucalyptus*, gênero pertencente a essa família, e nele são enquadradas mais de 700 espécies.

No Brasil, o eucalipto foi usado durante algum tempo em ferrovias e na construção de postes para eletrificação. Hoje, seu principal cultivo é para produção de painéis de madeira, papel, celulose, lenha e carvão.

São plantas aromáticas e produzem óleo essencial encontrado principalmente nas folhas. São divididos em três categorias de importância comercial: os *medicinais* que contêm quantidades substanciais de eucaliptol; os *industriais* que contêm terpenos usados na indústria (devem ser ricos em felandrenos ou piperitona) e os *aromáticos* como o eucalipto-limão (*E. citriodora*) os quais são caracterizados pelo seu aroma (exigem como base o citronelal em teor mínimo de 70%).

Atualmente, do eucalipto, tudo se aproveita. Das folhas, extraem-se óleos essenciais empregados em produtos de limpeza e alimentícios, em perfumes e até em remédios. A casca oferece tanino, usado no curtimento do couro. O tronco fornece madeira para sarrafos, lambris, ripas, vigas, postes, varas, esteios para minas, mastros para barco, tábuas para embalagens e móveis. Sua fibra é utilizada como matéria-prima para a fabricação de papel e celulose. (AMBIENTE BRASIL, 2007).

O eucalipto-limão (*Eucalyptus citriodora* Hook), cujo princípio ativo é o citronelal, é utilizado na fabricação de desinfetantes e odorizantes, não devendo ser utilizada para fins terapêuticos, principalmente por inalação, por ser irritante para a mucosa do trato respiratório. Esse uso inadequado deve ser devido à associação dos nomes “eucalipto” e “limão”, tradicionalmente considerados como medicinais. É a espécie mais usada popularmente no Ceará (MATOS, 2000). Além do citronelal, são encontrados também geraniol, cineol, isopulegol, pineno e sesquiterpenos.

O *Eucalyptus globulus* é a espécie mais conhecida de eucalipto do ponto de vista de aplicação terapêutica, sendo conhecido como “eucalipto medicinal”. A Farmacopéia Britânica descreve o “óleo de Eucalipto”, com alto teor de 1,8-cineol, como o óleo extraído de folhas frescas do *E. globulus* e também de outras espécies.

São consideradas medicinais as espécies cujo óleo essencial contenha mais de 50% de eucaliptol na sua constituição (MATOS, 2002). Essa espécie é conhecida e utilizada na medicina popular em muitas partes do mundo primariamente como expectorante e no tratamento de afecções como gripes, febre, pneumonia e asma (ZANKER *et al.*, 1980; GOLDSTEIN; COOPER; TARKINGTON, 1976; BURROW; ECCLES; JONES, 1983). Há registros de sua utilização como antimicrobiano em uma série de quadros infecciosos incluindo aqueles dos tratos digestivos e urinários, além de seu uso no controle da pediculose. Tem sido descritas atividades antiinflamatórias e antitumorais do “óleo de Eucalipto” (TAKASAKI *et al.*, 1995). Na terapêutica este óleo pode ser encontrado em produtos

bastante comercializados com indicação expectorante, mucolítica e no tratamento de bronquite aguda e crônica, asma, tosse e resfriados. Das especialidades farmacêuticas mais conhecidas que possuem o eucaliptol em suas formulações podemos citar o TRANSPULMIN® e o VICK VAPORUB®.

O *Eucalyptus tereticornis* é uma espécie híbrida de eucalipto com grande distribuição geográfica. Embora as propriedades farmacológicas e toxicológicas dessa espécie não sejam totalmente conhecidas, infusões e decocções são tradicionalmente usadas no tratamento de doenças respiratórias. O óleo essencial do *E. tereticornis* (OEET) é amplamente usado para aliviar a tosse, resfriados, dores de garganta e outros sintomas respiratórios superiores (SILVA *et al.*, 2003; JUERGENS *et al.*, 2003).

Em estudos desenvolvidos anteriormente, foi observado que o óleo essencial de *E. tereticornis* e seu maior constituinte, o 1,8-cineol, apresentaram efeito miorelaxante em preparações isoladas de traquéia de cobaia, reduzindo a resposta contrátil induzida por K^+ (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2005; BASTOS *et al.*, 2009). Esses achados corroboram a utilização empírica desta planta pela população através da inalação de vapores produzidos pela fervura da água com as folhas destas espécies de *Eucalyptus* para o tratamento de afecções do sistema respiratório.

O óleo essencial do *Eucalyptus tereticornis* possui em sua composição substância conhecidas como terpenos, com a seguinte distribuição: 1,8-cineol (74.6%), α -pineno (7.8%), β -pineno (7.4%), limoneno (3.9%), aromadendreno (2.5%), globulol (1.9%), allo-aromadendreno (0.6%), borneol (0.5%), indefinido (0.8%).

A presença do 1,8-cineol é atribuída à propriedade terapêutica do óleo (MATOS, 2002), embora, em outro estudo, tenha sido demonstrado também que outros dois constituintes isolados, o α -pineno e o β -pineno e o óleo essencial do *Eucalyptus tereticornis* aceleram o trânsito gastrintestinal de ratos (JUCÁ *et al.*, 2011). Essa descoberta e também outros achados (JUCÁ, 2007), como o efeito miorelaxante em preparações de duodeno de rato isolado, motiva o desenvolvimento de novas drogas com capacidade potencial de interferir nos mecanismos etiológicos de manifestações gastrintestinais como a dispepsia funcional, assim como investigar outros terpenos e suas aplicabilidades terapêuticas.

1.2 Os terpenóides

Terpenos são substâncias químicas encontradas como constituintes de muitos extratos vegetais. Na natureza, representam uma das maiores e mais diversas classes de

metabólitos secundários, com aproximadamente 55.000 membros isolados até hoje (MAIMONE; BARAN, 2007). São formados pela ciclização enzimática através da conversão de moléculas simples, lineares de hidrocarbonetos fosfatados em esqueletos carbocíclicos quirais. Oxidação e rearranjos posteriores fornecem em interminável número de estruturas químicas concebíveis. Por isso, ocupam lugar especial na história das ciências químicas e, por consequência na medicina, por possuírem um largo espectro de ações farmacológicas, desde atividades anti-câncer (LEWIS; HANSON, 1991) à capacidade de interferência em canais iônicos (ALVES *et al.*, 2010).

Possuem ampla distribuição e são encontrados, por exemplo, nas plantas superiores, fungos, organismos marinhos e feromônios de insetos. São também chamados de terpenos ou isoprenóides, pois sua estrutura pode ser dividida em unidades de isoprenos (C_5H_8) (RUZICKA, 1953). Os monoterpénóides são compostos por duas unidades de isopreno ($C_{10}H_{16}$), os sesquiterpenóides por três ($C_{15}H_{24}$), os diterpenóides por quatro ($C_{20}H_{32}$), os triterpenóides compostos por seis ($C_{30}H_{48}$) e os tetraterpenóides, ou carotenóides, têm oito unidades de isopreno ($C_{40}H_{64}$). Podem também ser classificadas em acíclica (cadeia aberta), monocíclicas (um anel), bicíclicas (dois anéis), tricíclicas (três anéis), etc. (ROBBERS, 1997, p. 93).

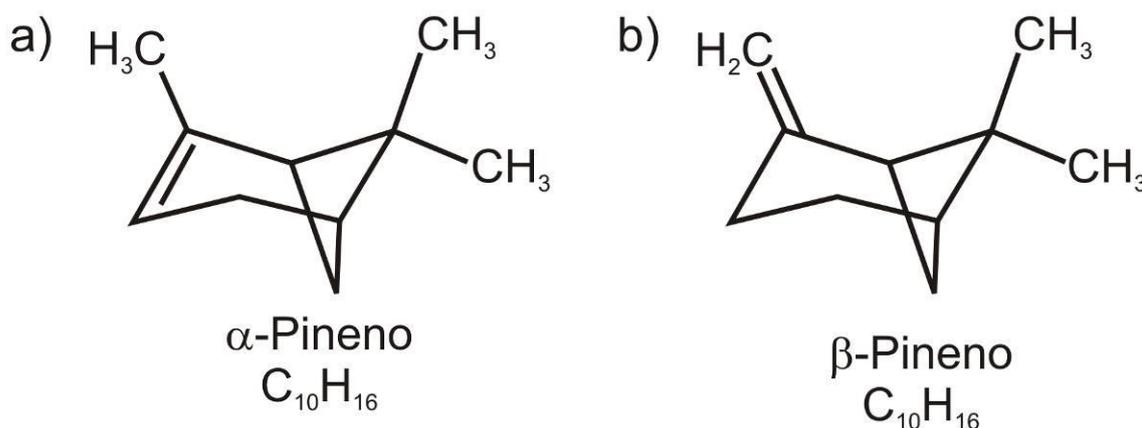
Juergens *et al.* (2003) destaca que monoterpénos, encontrados em vários óleos essenciais, são amplamente utilizados pelo homem com propriedades secretoras e que a irritação das vias aéreas e a contração brônquica provocada pelas misturas naturais de monoterpénos é um fator limitante para seu uso.

O α -pineno e o β -pineno

Pinenos são monoterpénos (figura 1) encontrados na composição de diversos óleos essenciais, e isso sugere que eles podem estar relacionados aos efeitos farmacológicos descritos para extratos de várias plantas usadas na medicina popular no tratamento de afecções gastrointestinais: por exemplo, *Zingiber roseum* Rosc. (PRAKASH *et al.*, 2006), *Plectranthus barbatus* Andrews (CÂMARA *et al.*, 2003), *Hyssopus officinalis* L. (LU *et al.*, 2002) e *Ferula gummosa* Boiss. (SADRAEI *et al.*, 2001). Todas essas espécies apresentam ações farmacológicas sobre o trato gastrintestinal. São, preponderantemente, ações antiespasmódicas e miorelaxantes, uma vez que estão relacionadas à inibição das contrações induzidas por $BaCl_2$, K^+ , ACh e CCh em preparações intestinais de rato.

O α -pineno é um dos constituintes mais encontrados em óleos essenciais de folhas, frutas, sementes e caules (READ; GUNSTONE, 1958). Dharmagunawardena (2002) demonstra através de teste cutâneo a atividade alérgica “leve” do α -pineno.

Figura 1 - Estrutura molecular do α -pineno e do β -pineno.



Representação das estruturas moleculares tridimensionais do α -pineno (a) e do β -pineno (b), respectivamente. Através das duas representações é possível observar a semelhança entre os dois compostos e sua única diferença, o local da dupla ligação.

O óleo essencial do *Eucalyptus tereticornis* possui além do 1,8-cineol, concentrações de α -pineno e β -pineno em 7,8 e 7,4 %, respectivamente. Em estudos realizados com o Óleo Essencial do *E. tereticornis* (OEET), foi observado um efeito relaxante na musculatura traqueal de cobaias maior do que o produzido pelo 1,8-cineol isoladamente, resultado atribuído ao sinergismo entre o 1,8-cineol com outros constituintes do óleo essencial (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 2005). O óleo essencial de *Plectranthus barbatus* (OEPB), na faixa de concentração entre 1 e 300 μ g/ml, assim como seus principais constituintes, dentre eles o α -pineno, na proporção e quantidade encontrados no óleo essencial, promoveram efeito relaxante e antiespasmódico intestinal, tendo sido atribuída à presença de α -pineno a explicação para tal atividade farmacológica (CÂMARA *et al.*, 2003).

Em outro estudo, foi demonstrado que o α -pineno e o β -pineno possuem efeito miorelaxante em preparações de duodeno de rato isolado e efeito pró-cinético sobre o esvaziamento de líquido no estômago de rato (JUCÁ, 2007). Essas ações são mediadas por provável ação preferencial sobre o tecido intestinal sem interferência direta com o

comportamento motor gástrico. Sobretudo, suas ações miorreaxantes estão relacionadas à sua capacidade em interferir com a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos.

O 1,8-cineol (Eucaliptol)

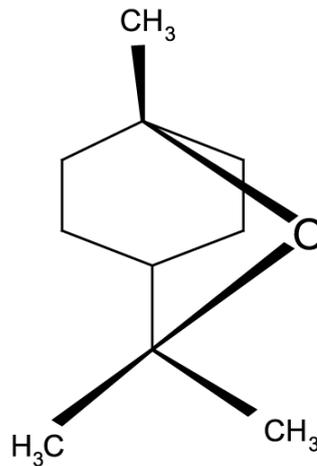
O 1,8-cineol (eucaliptol) é um óxido monoterpênico ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$, figura 2), incolor, com odor semelhante à cânfora, sendo constituinte de uma variedade de óleo essencial, tais como, óleo das espécies de *Eucalyptus*, *Croton*, *Hyptis* (*Hyptis martuisi*), *Pectis* (*Pectis apodacephala*), *Melaleuca* (*Melaleuca alternifolia*) (CRAVEIRO *et al.*, 1981; TISSERAND; BALACS, 1995).

O 1,8-cineol apresentou atividade pró-inflamatória e pró-nociceptiva local, com ações sobre os mastócitos e a adenosina, em modelo de indução de edema de pata de rato (SANTOS; RAO, 1999). Porém, quando administrado sistemicamente o 1,8-cineol exerceu efeito antiinflamatório e antinociceptivo, inibindo o edema inflamatório agudo e a permeabilidade vascular. Neste mesmo estudo os autores ainda apresentaram propriedades, relacionadas ao 1,8-cineol, como sedativas e anticonvulsivantes, onde era proporcionando uma potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital e preveniu convulsões em modelos de epilepsia por pentilenotetrazol. Outras funções apresentadas pelo 1,8-cineol, no estudo de Santos e Rao (1999) foram: função gastroprotetora (redução da acidez gástrica e o aumento do muco gástrico), função antissecretória e efeito de proteção contra hepatite tóxica.

Juergens *et al.* (2003) destacaram que a ação antiinflamatória do 1,8-cineol já havia sido apresentada por Dewhirst em 1980, onde ele ressaltou que a inibição da fase da ciclooxigenase pelo 1,8-cineol teria uma ação potente de inibição no processo inflamatória. Mais recentemente Juergens *et al.* (1998) mostraram que o monoterpene 1,8-cineol apresentava sua supressão dos metabólicos do ácido araquidônico e na produção de citocinas em monócitos de humano, semelhante ao apresentado pelos glicocorticóides. Bastos (2009) concluiu que o 1,8-cineol funciona como substância miorreaxante e antiinflamatória nas vias aéreas de cobaias por envolvimento, preferencialmente, com eventos eletromecanicânicos sobre os canais para cálcio operados por voltagem (VOCCs).

Em outro estudo, desenvolvido por Coelho-de-Souza *et al.* (2005), foi demonstrado que o 1,8-cineol, principal constituinte do *Eucalyptus tereticornis*, provocou redução da resposta contrátil traqueal induzida pelo potássio, de maneira dependente de concentração, além de ter aumentado às contrações provocadas pela acetilcolina.

Figura 2 - Estrutura molecular do 1,8-cineol.



Representação da estrutura molecular tridimensional do monoterpene óxido 1,8-cineol (Eucaliptol – C₁₀H₁₈O).

1.3 O músculo liso

Guyton e Hall (2000) definem o músculo liso como músculo involuntário, que se localiza na parede dos órgãos ocos, em que podem apresentar diferenças em vários aspectos, tais como: dimensão física, organização em feixes ou lâminas, resposta aos diferentes tipos de estímulos, características de inervação e função. Pelo fato de ser encontrado nas paredes da maioria das vísceras do corpo, ele pode ser denominado de músculo liso visceral. Conforme descrito pelo assim denominado “pai” da eletrofisiologia das células musculares lisas viscerais, Professor Emil Bozler, emérito no Departamento de Fisiologia da *The Ohio State University* (EUA), o músculo liso possui duas classificações principais: o músculo liso multinunitário e o músculo liso unitário. O músculo liso intestinal é classificado como músculo liso unitário, o que significa que as fibras musculares lisas se contraem juntas, como uma só unidade. Suas membranas celulares estão aderidas uma nas outras, o que lhes confere a capacidade de transmitir a força gerada para a célula vizinha. Possui também junções abertas (*gap junctions*) entre as membranas celulares, permitindo que os íons fluam com baixa resistência elétrica através dessas aberturas e, com isso, propagem o potencial de ação que acarretará na contração simultânea das fibras, dando origem ao nome músculo liso sincicial.

As fibras musculares lisas individuais do trato gastrointestinal (TGI) têm aproximadamente 500 micrômetros de comprimento e 5 a 20 micrômetros de diâmetro (HOWARD, 1998).

Mecanismo contrátil no músculo liso

Nos idos anos 1960, descreveu-se a ligação do Ca^{2+} à troponina, uma proteína localizada nos filamentos de actina, para regular as contrações no músculo esquelético. Essa foi a primeira demonstração do papel regulatório do Ca^{2+} nas funções celulares (EBASHI, 1991). Assim como na musculatura esquelética, o músculo liso possui filamentos de actina e miosina, sendo destituído, porém, do complexo troponina. Portanto, o controle do processo contrátil difere do músculo esquelético, sendo realizado através da regulação da miosina e não da actina, como acontece no músculo esquelético. O músculo liso compartilha de outra particularidade com o músculo esquelético, ambos dependem do aumento dos íons Ca^{2+} intracelulares para desencadear a contração.

Os três tipos de filamentos que estão presentes no músculo liso visceral (actina, miosina e filamentos intermediários de desmina) encontram-se interdigitados na célula. Na presença de estímulo elétrico ou mecânico, ocorre o primeiro passo para gerar a contração muscular: a fosforilação da cadeia leve da miosina (HANSEN, 2003). O processo contrátil do músculo liso ocorre na presença de uma proteína regulatória denominada calmodulina. Os íons cálcio combinam-se com a calmodulina, que irá, após formação de complexo, ativar a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK, do inglês *Myosin Light Chain Kinase*), enzima responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina. A ligação do Ca^{2+} com a calmodulina aumenta a habilidade da actina em ativar a ação Mg^{2+} -ATPásica da miosina, promovendo a quebra do ATP ligado à cabeça da miosina. Com a hidrólise do ATP, o filamento de miosina, que teve sua conformação alterada, se associa à actina e, assim, é capaz de gerar a contração através da efetivação de ciclos desses fenômenos (HOROWITZ *et al.*, 1996; MURPHY, 1998).

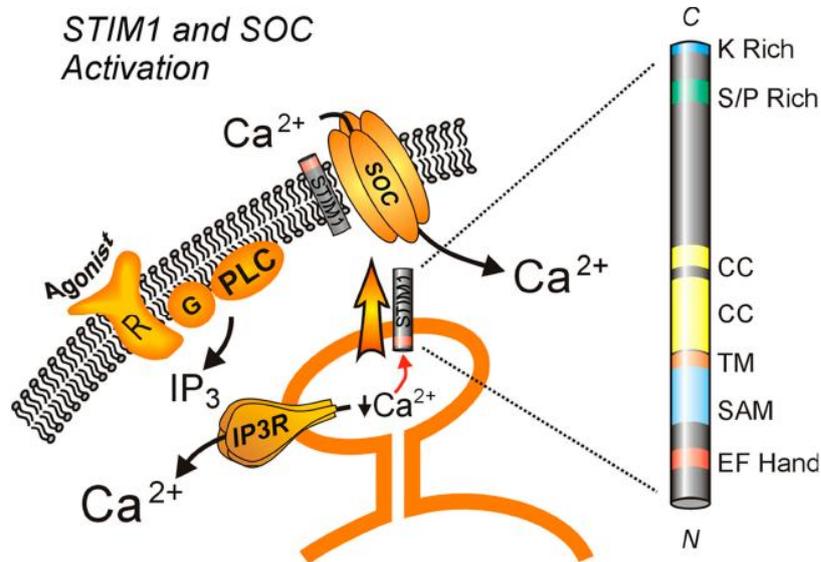
No músculo liso, a contração é cessada como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil. O processo de relaxamento requer a diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} e aumento da atividade de fosfatase da cadeia leve da miosina pela enzima fosfatase miosínica, que irá remover o fosfato da cadeia leve reguladora (GUYTON; HALL, 2000, p.90). Alguns mecanismos são implicados na remoção do Ca^{2+} citoplasmático e envolvem a recaptação do

Ca^{2+} através da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático, por vias dependentes da hidrólise de ATP. A Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase reticular, quando fosforilada, liga-se a dois átomos de Ca^{2+} , os quais são, então, transportados e liberados para o compartimento luminal do retículo sarcoplasmático. Trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ também estão localizados na membrana plasmática e ajudam na diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} , sendo acoplados aos seus níveis intracelulares que regulam sua atividade (WEBB, 2003).

Na descrição do processo contrátil foi relatada a necessidade dos íons Ca^{2+} livres no citoplasma para o início do processo contrátil (BOOTMAN *et al.*, 2001), que pode ocorrer por mecanismos eletromecânicos e/ou farmacomecânicos.

Como exemplo de fatores que interferem com o influxo do cálcio, podemos citar vários tipos de canais para cálcio: (1) os que são ativados por despolarização da membrana (eletromecânicos), também chamados dependentes de voltagem (VOCC, do inglês *Voltage-Operated Channels*); (2) os canais operados por receptores específicos de membrana ou intracelulares, ativados por fatores farmacomecânicos, independentes do potencial de ação (ROCC, do inglês *Receptor-Operated Channels*) (CUTHBERT *et al.*, 1994; TANSEY *et al.*, 1994) e (3) a entrada de cálcio capacitativa, também denominada de canal para cálcio operado por estoque (SOCC, do inglês *Store-Operated Channels*) que foi originalmente proposta por Casteels e Droogmans (CASTEELS; DROOGMANS, 1981) e posteriormente refinada por James W. Putney como influxo de cálcio regulado por receptor e controlado pelo IP_3 (inositol 1,4,5-trisphosphate) é o principal mecanismo de influxo de íons cálcio em células não excitáveis e agora vem sendo descrito também em células excitáveis (PUTNEY, 1986; ROSADO, 2006). Putney imaginava que após o estímulo do IP_3 , a concentração de cálcio do retículo se esgotava, liberando um transmissor capaz de abrir os canais para cálcio operados por estoque (SOCC) para que ocorresse o influxo de cálcio e, desta maneira, o retículo poderia estocar novamente o íon. Tais evidências ganharam força quando Putney em 2005 demonstrou a influência das moléculas STIM-1 de drosófilas (do inglês *Stromal Interaction Molecule*) sobre esses canais (PUTNEY, 2005, figura 3). (4) Por fim, os canais iônicos ativados por segundos mensageiros como lipídeos de membrana ou nucleotídeos cíclicos como AMPc e GMPc. Esses canais inibem a entrada de Ca^{2+} , produzindo diminuição das concentrações intracelulares desse íon. O acúmulo de óxido nítrico e nucleotídeos cíclicos são capazes de diminuir a entrada de Ca^{2+} via canais ativados por estoque, assim como o ácido araquidônico (PAREKH; PUTNEY, 2005).

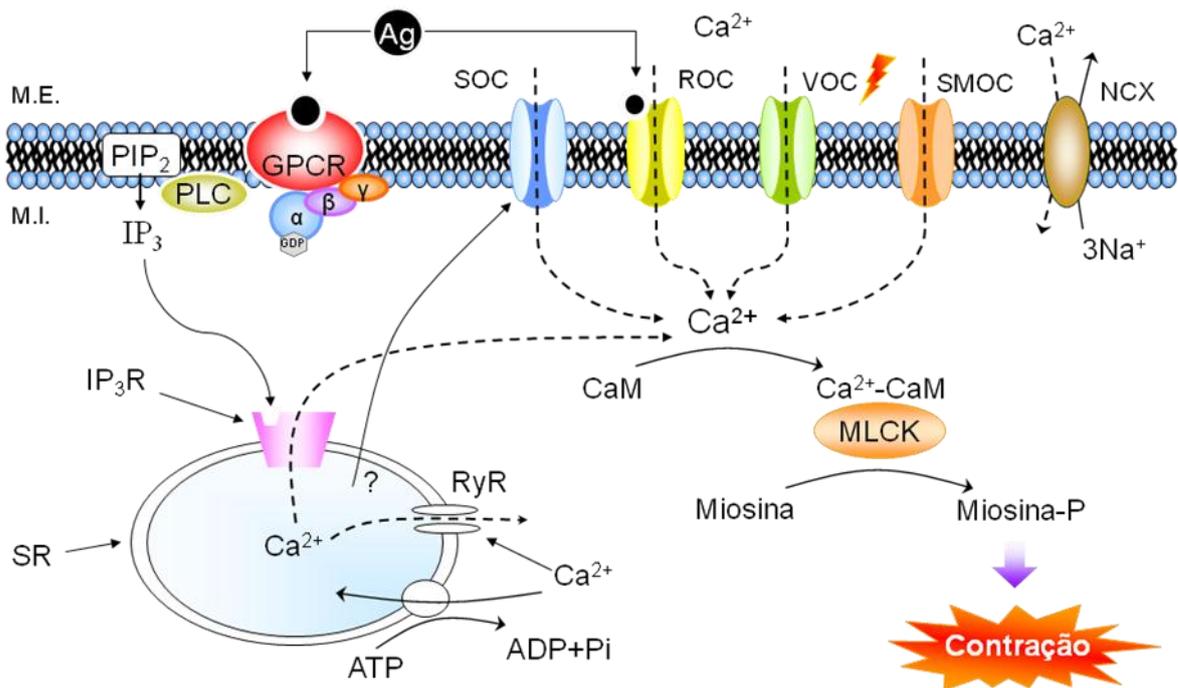
Figura 3 - Mediação da abertura dos canais SOC pelas moléculas STIM-1



Esquema demonstrando que após a diminuição da concentração de cálcio dentro do retículo sarcoplasmático (SR) por sua liberação através do IP₃ (IP₃R), o SR é capaz de liberar moléculas STIM-1 que irão mediar a abertura dos canais para cálcio operados por estoque (SOC). Fonte: Putney, 2005.

Os mecanismos de controle e ação do íon cálcio na célula muscular lisa estão resumidos na figura 4.

Figura 4 - Mecanismos de controle e ação do íon cálcio na célula muscular lisa.



Principais vias de regulação da entrada de Ca^{2+} para dentro da célula. Canal para cálcio operado por voltagem (VOC), o canal para cálcio operado por segundos mensageiros (SMOC), o canal para cálcio operado por estoque (SOC), o canal para cálcio operado por receptor (ROC) e o trocador cálcio-sódio (NCX). Mecanismo de ativação da proteína G pelo agonista (Ag). Ação do IP_3 em seu recetor (IP_3R), do receptor Rianodina (RyR) e da bomba de cálcio (SERCA) no retículo sarcoplasmático e por fim, o mecanismo contrátil (Ca^{2+} -calmodulina – MLCK).

Fonte: Adaptação de Rang *et al.*, 2004; Parekh; Putney, 2005.

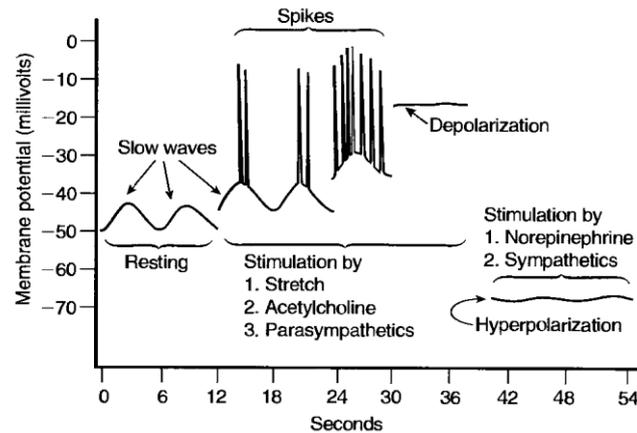
A contração do músculo liso pode ser classificada, essencialmente, em fásica ou tônica, dependendo das características de manutenção da contração. A primeira é aquela em que a musculatura encontra-se normalmente relaxada e é capaz de desenvolver contração não mantida. Os músculos tônicos estão normalmente contraídos ou são capazes de produzir contração sustentada. Essas fases estão relacionadas aos processos de aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular (MITA; WALSH, 1997).

Moura (2004) relata que o cálcio, necessário para o processo contrátil, pode prover de duas origens, fonte intracelular e fonte extracelular. Cada tecido possui sua principal fonte de íons cálcio, dependendo do estímulo contrátil, das características da célula e do padrão da resposta contrátil (fásica ou tônica). A resposta fásica é dita rápida e é geralmente representada como um pico. Essa característica se deve ao fato da célula abrir os canais para cálcio presentes nos estoques internos como o retículo sarcoplasmático. Uma vez liberado, ocorre contração sem sustentação. A resposta tônica é conhecida como sendo associada aos processos que tornam a contração sustentável ao longo da manutenção do estímulo. Nessa fase são ativados os canais para Ca^{2+} ativados por voltagem (VOCC) e os canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROCC) que se abrem perdurando, assim, o efeito e sustentando a contração. De maneira geral, o retículo sarcoplasmático da célula muscular lisa é pouco desenvolvido, diferentemente do músculo esquelético, no que diz respeito ao estoque de Ca^{2+} . Desta maneira, as células musculares lisas necessitam do Ca^{2+} extracelular para manutenção de suas funções.

Músculo liso do trato digestório

O músculo liso gastrointestinal, que possui a voltagem de potencial de repouso da membrana variável (-40 a -80 milivolts), é estimulado por uma atividade elétrica intrínseca lenta e contínua ao longo das fibras musculares pelas células intersticiais de Cajal. Essa atividade é conhecida como ondas lentas (figura 5), que podem sofrer alterações elétricas e dar origem as ondas em ponta (MAKHLOUF, 1995; MURPHY, 1998).

Figura 5 - Ondas lentas e potenciais em ponta



Através dessa figura é possível notar as diferenças nos potenciais de membrana e tempo das ondas lentas e dos potenciais em ponta, reais potenciais de ação, bem como, estímulos que podem produzir os potenciais em ponta (despolarização) e os estímulos que podem causar a hiperpolarização.

Fonte: Guyton; Hall, 2000.

As ondas lentas não são potenciais de ação, são alterações lentas ondulantes no potencial de ação, cuja amplitude pode variar entre 5 e 15 milivolts e a frequência pode oscilar entre 3 a 12 por minutos em diversos segmentos do trato gastrointestinal, por exemplo: 3 no corpo do estômago, 12 no duodeno e 9 no íleo terminal (HANSEN, 2003). Tais ondas, tidas como marca passo, dependem do canal para cálcio voltagem dependente resistente a dihidropiridina ($VOCC_{L\text{-type}}$) localizadas nas células intersticiais de Cajal (SANDERS *et al.*, 2004).

O potencial em ponta, o verdadeiro potencial de ação, origina-se da oscilação positiva do potencial de repouso da membrana muscular lisa gastrointestinal, ficando em aproximadamente -40 milivolts, quando o potencial de repouso é entre -50 a -60 milivolts. Quanto maior a elevação do potencial das ondas lentas, maior será a possibilidade do surgimento de um potencial em ponta (habitualmente 1 a 10 pontas por segundo). O potencial de ação no trato gastrointestinal é produzido pela grande entrada de íons cálcio, juntamente com uma pequena entrada de íons sódio pelos canais de cálcio-sódio, ao contrário do potencial de ação gerado nas fibras nervosas, que ocorrem principalmente pela entrada dos íons sódio através de canais de sódio (SUZUKI, 2000; SANDERS *et al.*, 2004; LAMMERS; SLACK, 2001). Tal fato corrobora o que já vem sendo descrito, ou seja, a necessidade de íons cálcio do meio extracelular para a musculatura lisa. É importante mencionar que esses canais

cálcio-sódio são de abertura e fechamento lentos, o que explica a longa duração do potencial de ação no TGI.

Como dito anteriormente, o potencial de repouso no TGI é variável. Essa variação se deve, além das ondas lentas e dos potenciais em ponta, ao estiramento do músculo, à estimulação por acetilcolina, noradrenalina ou outros hormônios e ao estímulo produzido pelo sistema parassimpático ou simpático (ABDEL-LATIF, 1989).

As ondas lentas são responsáveis pela entrada de íons sódio na fibra muscular lisa, por isso, as ondas lentas por si só não causam contração muscular, visto que a musculatura lisa necessita do cálcio extracelular para a realização da contração muscular. É no potencial em ponta, gerado no pico das ondas lentas, que há grande entrada de íons cálcio e, portanto, ocorre a maior parte da contração (GUYTON; HALL, 2000, p.719).

O sistema nervoso entérico

O sistema nervoso entérico, constituído por dois plexos, o plexo mioentérico (Auerbach) e o plexo submucoso (Meissner) começa no esôfago e vai até o ânus. É constituído com cerca de 500 milhões de neurônios, quase a mesma totalidade da medula espinhal, o que nos atém a imaginar a importância desse sistema para o controle da função gastrointestinal.

O plexo mioentérico, localizado entre a camada muscular longitudinal e circular, é responsável, principalmente, pelo controle da motilidade gastrointestinal, já o plexo submucoso, localizado na camada submucosa, controla a secreção e o fluxo sanguíneo local. Os sistemas parassimpático e simpático podem interagir com o sistema nervoso entérico, ativando ou inibindo suas funções (GRUNDY, 2006; PARAN, 2006; RÜHL, 2005).

Os neurônios entéricos podem secretar mais de dez neurotransmissores, tanto excitatórios quanto inibitórios, entre eles, destacamos a acetilcolina, que exerce atividade excitatória gastrointestinal e a noradrenalina, quase sempre inibidora da atividade gastrointestinal (GRUNDY, 2006; SCHEMANN, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento farmacológico atual de alterações gastrintestinais como a dispepsia funcional dos tipos ‘inespecífica’ e do tipo “dismotilidade” compreende o uso empírico de agentes pró-cinéticos. O uso racional de drogas pró-cinéticas, como a metoclopramida, a cisaprida, a bromoprida e a domperidona é fundamentado pelo conceito de que pacientes com dispepsia funcional podem apresentar diminuição anormal da contratilidade antral e retarde do esvaziamento gástrico. É grande o interesse no desenvolvimento de novas drogas com capacidade potencial de interferir nos mecanismos etiológicos dessas manifestações gastrintestinais.

Em estudo anterior, discutimos os efeitos de dois constituintes do óleo essencial de *E. tereticornis*, o α -pineno e o β -pineno no comportamento contrátil da musculatura lisa do trato gastrintestinal (JUCÁ, 2007). Concluimos que o α -pineno e o β -pineno possuem atividade miolorrelaxante em preparações de tiras de duodeno de rato *in vitro*, assim como aceleram o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos. Diante de tais achados sugerimos a avaliação e comparação dos efeitos do óleo essencial do *E. tereticornis* e de seus constituintes, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno, no trato gastrintestinal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos farmacológicos do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno no trato gastrintestinal de ratos.

3.2 Objetivos específicos

Determinar o efeito do OEET e do 1,8-cineol sobre o tônus basal da musculatura lisa intestinal de rato;

Esclarecer os possíveis mecanismos de ação do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno sobre a contratilidade do músculo liso gastrintestinal;

Verificar as repercussões cinéticas do OEET, do 1,8-cineol, do α - e do β -pineno no trato gastrintestinal.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e métodos

4.1.1 Aspectos Éticos

O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Ceará sob o número de protocolo: 13/06, tendo sido julgado e considerado aprovado. A manipulação dos animais antes e durante os experimentos obedeceu às normas de manipulação de animais de laboratório preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1.2 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina-UFC, alojados em gaiolas com água e ração *ad libitum* e aclimatados com ciclos naturais dia/noite de 12/12h.

4.1.3 Soluções e drogas

O 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno, purificados e isolados, foram adquiridos da empresa Sigma® Chemical. O óleo essencial do *E. tereticornis* (OEET) foi gentilmente cedido, analisado e classificado pelo Professor Francisco José de Abreu Matos (*in memoriam*). As soluções de OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno foram preparadas imediatamente antes de seu uso no experimento. Para alguns experimentos foi necessária a utilização do solvente (Tween 80), não ultrapassando a concentração final de 0,2 % dentro da câmara de perfusão.

Soluções sem íons cálcio (Ca^{2+}) foram preparadas pela simples omissão do cloreto de cálcio (CaCl_2). As soluções de ACh (acetilcolina), verapamil, EGTA (β -amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético) e outras substâncias foram preparadas pela diluição da substância pura em água destilada (H_2O) ou seu respectivo diluente (Ex.: EGTA diluído em água destilada e

NaOH) e armazenadas em freezer em concentrações 100 a 1000 vezes maiores que aquelas usadas na câmara durante os experimentos. As soluções utilizadas foram preparadas frescas e agitadas em aparelho Vortex imediatamente antes do uso.

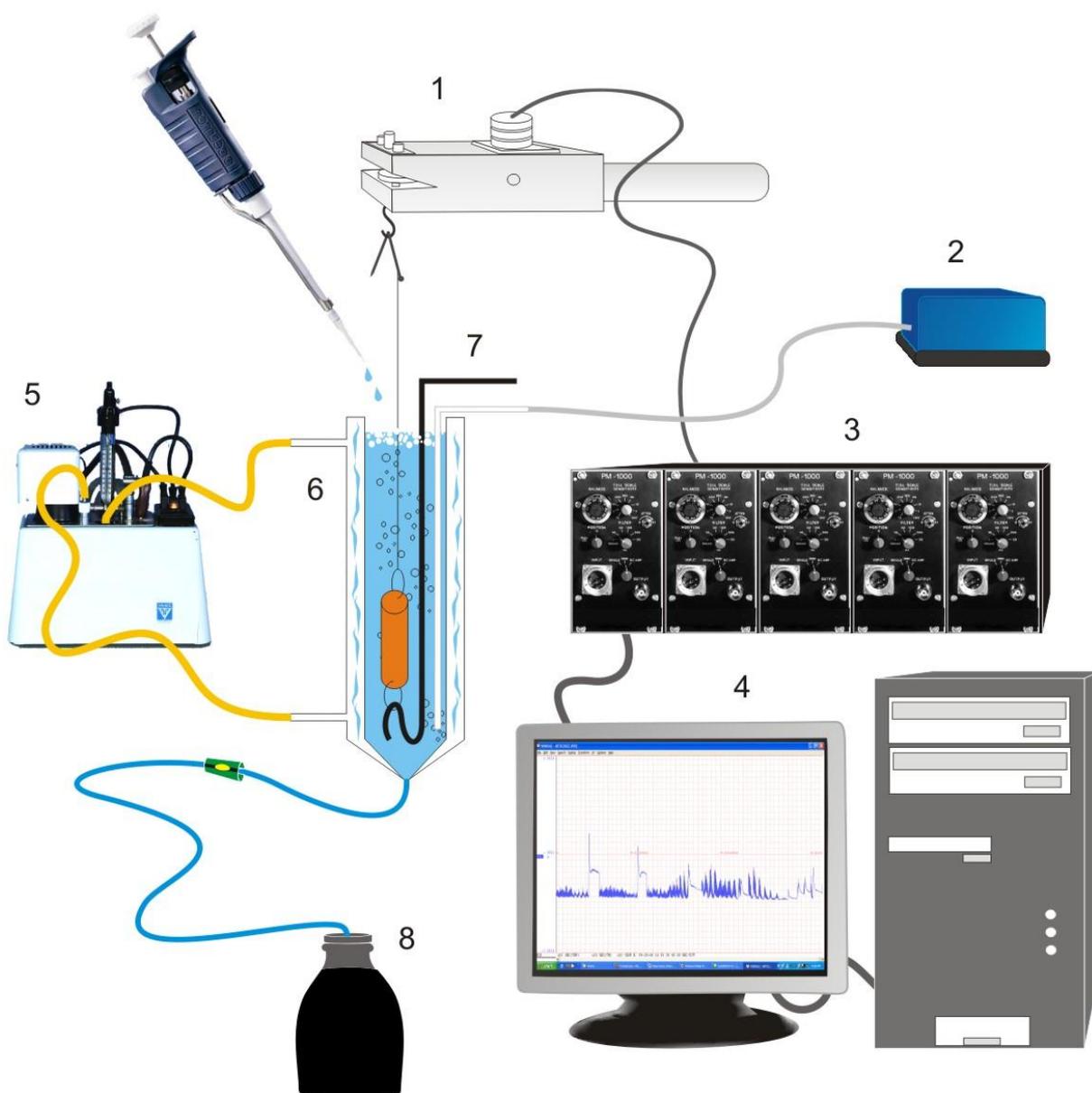
4.1.4 Metodologia da contratilidade *in vitro*

Após o período de equilíbrio (aproximadamente 30 minutos, tempo destinado para a adaptação da preparação às novas condições), os tecidos foram expostos a soluções despolarizantes com 60 mM de potássio (K^+) até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (este período foi de aproximadamente 30 a 60 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação), para avaliar a viabilidade do tecido no início dos experimentos.

A maior parte dos resultados apresentados está expressa como percentual da média destas duas últimas contrações. As curvas concentração-efeito para determinar o efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações crescentes, de forma cumulativa no banho (VAN ROSSUM; VAN DEN BRING, 1963), respeitando o tempo de 5 minutos para cada concentração.

Para os experimentos *in vitro*, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, imediatamente antes do início dos protocolos experimentais para obtenção dos tecidos. Após laparotomia, o estômago ou duodeno foram cuidadosamente removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo solução nutritora de Tyrode normal modificado. A solução fisiológica de Tyrode normal modificado tinha a seguinte constituição (em mmol/L): NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0,98, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 0,36, NaHCO₃ 11,9 e glicose 5,5. Os tecidos adjacentes foram cuidadosamente extraídos. O duodeno foi cortado transversalmente em anéis de aproximadamente 0,5 cm. O estômago foi aberto pela grande curvatura e foi cortado na região do fundo para a obtenção de tiras de aproximadamente 1 cm. Os tecidos assim manipulados foram montados em câmaras para órgão isolado contendo 5 mL de solução fisiológica de Tyrode, pH 7,4, mantida aquecida a 37°C com bomba de circulação Haake (Modelo FJ, Alemanha). A solução de Tyrode foi aerada continuamente com ar atmosférico. Os tecidos foram atados a um ponto fixo na câmara e a uma unidade transdutora de força (Grass, modelo FT03C, Quincy, Mass., EUA) apropriada para registro isométrico das contrações. A tensão basal aplicada ao tecido foi de 1 g. Os sinais gerados pelo transdutor de força foram condicionados e registrados em um sistema de aquisição computadorizado (Dataq, PM-1000, WCE, USA, vide esquema simplificado na figura 6).

Figura 6 - Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade *in vitro*.



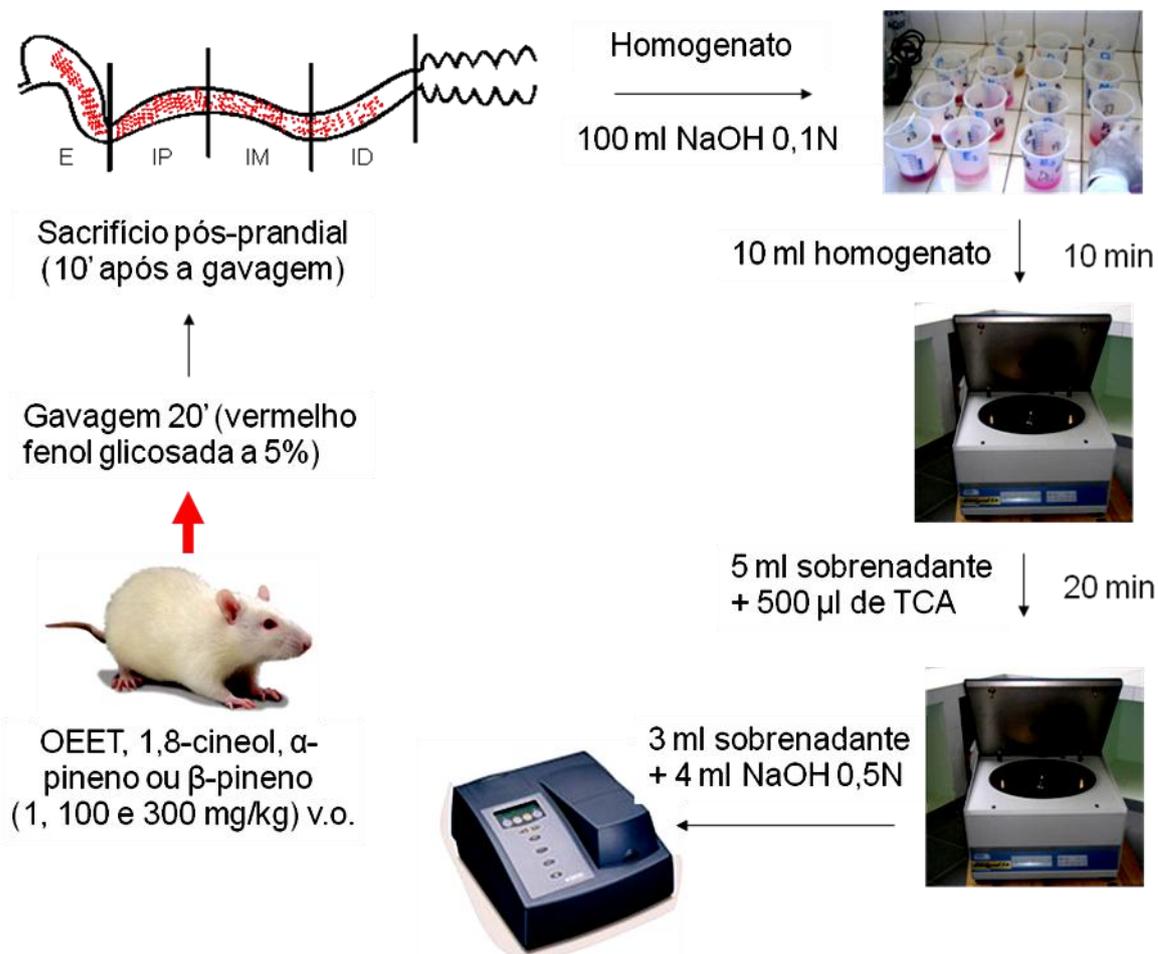
Na figura podemos visualizar os seguintes equipamentos: 1) Transdutor de força Grass FT03C. 2) Bomba de oxigenação. 3) Amplificador DATAQ PM-1000. 4) Sistema Windaq DI-200. 5) Banho de circulação Haake FJ. 6) Cuba 5 mL. 7) Haste Fixa. 8) Coletor. Fonte: Jucá, 2007.

4.1.5 Metodologia do esvaziamento gástrico

A determinação da retenção fracional no trato gastrintestinal foi feita mediante uma modificação da técnica de diluição de corante, originalmente descrita por Reynell e Spray (1956). Conforme representado na figura 7, o OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -

pineno foram administrados por via oral (v.o.) e após 20 minutos foi feita a gavagem com solução marcadora (Glicose 5%, Vermelho Fenol 0,75 mg/mL de H₂O). Decorrido os tempos de 10, 20 e 30 minutos da gavagem os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o piloro e a região da cárdia foram pinçados e o trato gastrintestinal estendido rapidamente em uma prancha e dividido em 4 segmentos: estômago, intestino delgado proximal (40% iniciais), intestino delgado medial (30% intermediários) e intestino delgado distal (30% finais). O estômago e os segmentos intestinais foram, então, postos em uma proveta contendo solução de NaOH (100 mL, 0,1N) e, desta maneira, determinado o volume das vísceras. Em seguida o conteúdo da proveta foi despejado em um béquer e homogeneizado por 30 segundos. Uma amostra de 10 mL desse homogenato foi centrifugada por 10 minutos (2800 rpm). Em seguida foi retirado 5 mL do conteúdo e adicionado ao ácido tricloroacético (20% peso/vol) para novamente ser submetido à centrifugação (20 minutos em 2800 rpm) e precipitar as proteínas. Depois desse processo, 3 mL do sobrenadante foi adicionado a 4 mL de NaOH (0,5N) para determinação da absorbância por espectrofotometria sob um comprimento de onda de 560 nm. Os dados foram analisados através da determinação da quantidade de vermelho fenol em cada segmento (quantidade x volume) e a posteriori relacionado ao percentual da retenção de vermelho fenol de cada segmento pelo total de vermelho fenol em todos os segmentos multiplicado por 100.

Figura 7 - Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de retenção fracional de corante.



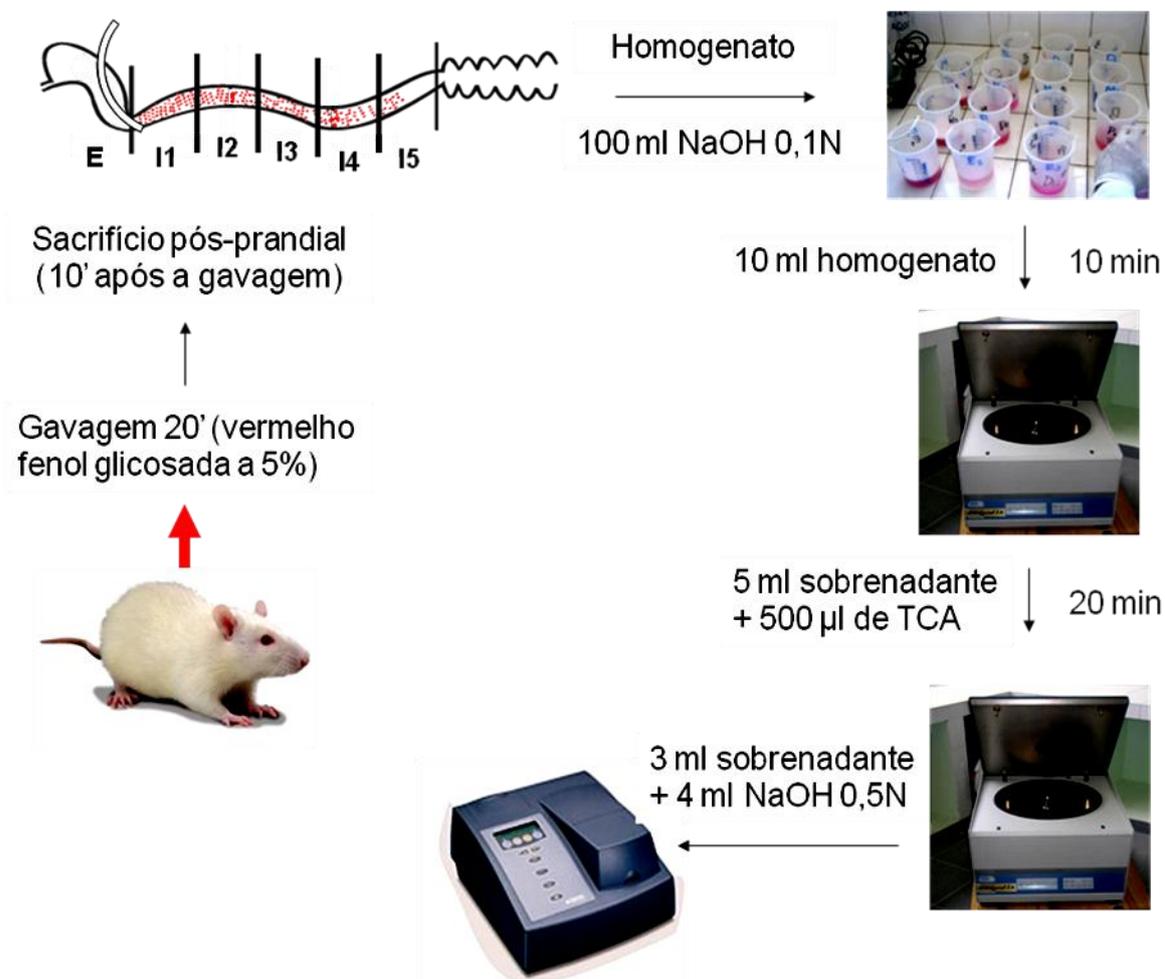
Os animais foram alimentados com OEET, 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno por via oral. Após 20 min. foi feita a gavagem com refeição teste (vermelho fenol glicosada a 5%). Sacrifício pós-prandial (10 min. após a gavagem). Preparação do homogenato em 100 mL de NaOH 0,1N. Retirada de 10 mL do homogenato para centrifugação por 10 min. Retirada de 5 mL do sobrenadante adicionado a 500 μ L de TCA para centrifugação por 20 min. Retirada de 3 mL do sobrenadante adicionado a 4 mL de NaOH 0,5N para leitura no espectrofotômetro. Legenda complementar: E (estômago), IP (intestino proximal, IM (intestino medial) e ID (intestino distal).

4.1.6 Metodologia do trânsito intestinal

Os animais foram submetidos a jejum de 24 h, com livre acesso ao soro de reidratação, quando então foram anestesiados com tribromo-etanol (0,1 mL/100g - 20%, i.p.). Em seguida, foram submetidos à laparotomia mediana e o estômago exposto. Mediante fístula no fundo gástrico, uma cânula de polietileno foi inserida no estômago e sua extremidade distal posicionada na primeira porção do duodeno (1cm distal ao esfíncter pilórico). A seguir, a cânula foi fixada com uma ligação em forma de bolsa de tabaqueira no fundo gástrico e a extremidade livre (devidamente ocluída com um mandril) levada com o auxílio de um trocater via subcutâneo para a região inter-escapular onde, após transfixação na pele, foi fixada através de uma sutura. Os animais foram então mantidos por 2 dias em gaiolas individuais com livre acesso à ração triturada e soro de reidratação até 2 h antes do experimento.

O α -pineno e o β -pineno foram administrados diretamente no duodeno através da cânula de polietileno e após 20 minutos foi feita a administração com solução marcadora (Glicose 5%, Vermelho Fenol 0,75 mg/mL de H₂O). Decorrido o tempo de 10 minutos da administração do marcador, os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico com pentobarbital. As etapas seguintes são similares ao estudo do esvaziamento gástrico, diferindo na quantidade de divisões do intestino delgado, agora em cinco partes iguais (ver figura 8) (SALLAM *et al.*, 2007).

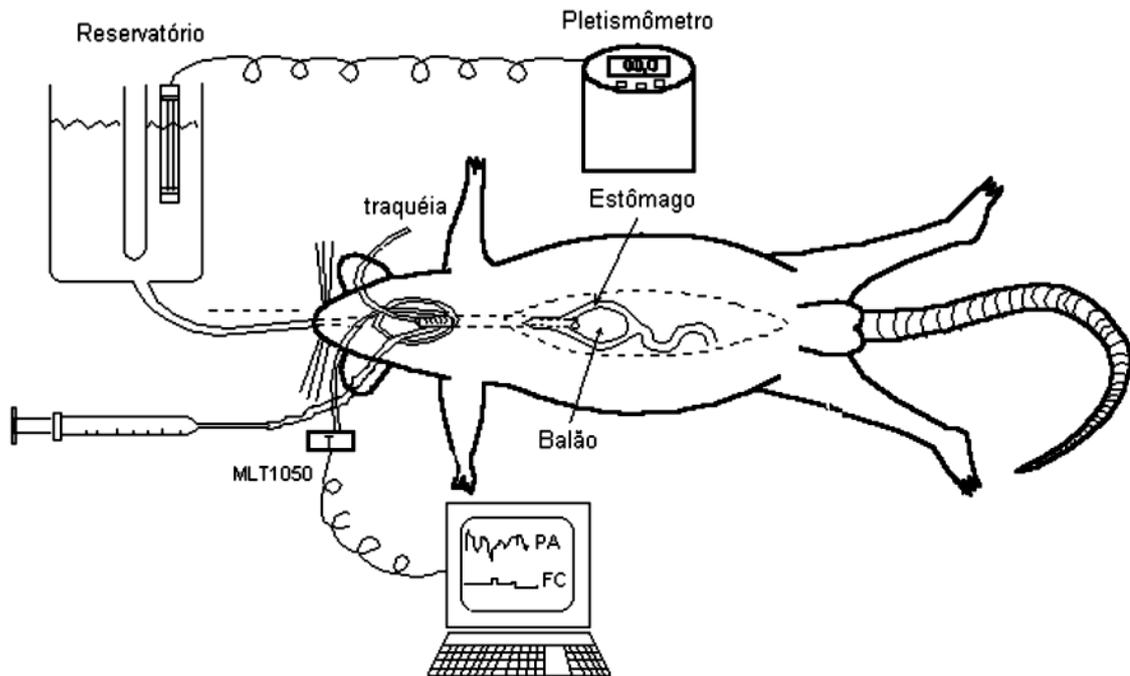
Figura 8 - Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de trânsito intestinal.



4.1.7 Metodologia da complacência gástrica

Os animais foram submetidos a jejum de 24 h, com livre acesso ao soro de reidratação até 2 h antes do experimento. Após a anestesia com uretana (1,2 g/kg, i.p.) os animais foram submetidos à traqueostomia com a inserção de uma cânula para facilitar a ventilação espontânea. Em seguida, foi introduzido na veia jugular esquerda e na artéria carótida direita cânulas de polietileno (PE 50) preenchidas com solução salina (0,9%) e heparina (500 U/mL). A veia é reservada para administração de drogas ou veículo e monitoração da pressão venosa central, enquanto a artéria é utilizada para monitoração da pressão arterial. Para o estudo da complacência gástrica foi utilizado o método de pletismometria, descrito e validado por Graça *et al.* (2000, figura 9). Inicialmente foi introduzido *per os* e com o auxílio de guia metálico um cateter de polietileno (DE=2,0mm; DI=1,5mm) contendo na extremidade um balão de látex (volume máximo ~ 4 mL), cuidadosamente posicionado no estômago proximal. A extremidade livre do cateter foi conectada à base de um reservatório em “U” (DI=2,5cm, capacidade máxima de 30 mL). Mediante um sistema de tripla entrada, foi preenchido o reservatório, a sonda gástrica e o balão de latex com uma solução padrão (45 mg% de NaCl e 0,3 mL% de polietilenoglicol/imbebiente BBC Ornano®, pré-aquecida à 37°C), configurando um sistema de vasos comunicantes. Assim sendo, as variações no tônus do estômago capazes de alterar o volume do balão gástrico ao serem transmitidas ao reservatório são detectadas continuamente pelo sensor eletrônico de volume e indicadas no visor do pletismômetro (Ugo Basile 7140). Exceto quando indicado, o estômago foi distendido com 4 cmH₂O de pressão, mediante a elevação, logo no início dos experimentos, do nível líquido do reservatório até 4cm acima do apêndice xifóide. As variações na complacência gástrica foram monitoradas continuamente e anotadas a cada 30s, expressas em mL.

Figura 9 - Esquema simplificado da metodologia da complacência gástrica



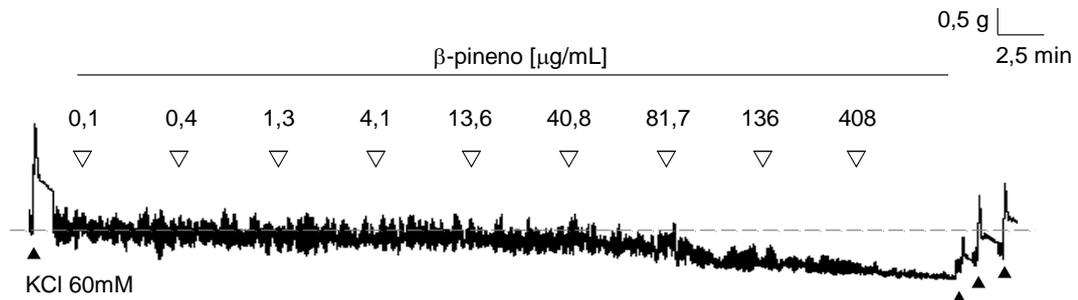
Desenho esquemático do sistema empregado para estudar a complacência gástrica registrada mediante pletismometria em ratos anestesiados.

4.2 Protocolos experimentais *in vitro*.

4.2.1 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no tônus basal de duodeno e fundo gástrico isolado de rato

Após equilíbrio da preparação, o OEET (1 – 600 $\mu\text{g/mL}$), 1,8-cineol (0,1 – 462 $\mu\text{g/mL}$), α -pineno e β -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados de forma crescente à solução fisiológica de Tyrode normal na câmara de banho, para avaliação de seus efeitos sobre o tônus basal do duodeno isolado de rato. O tempo de 5 minutos para cada concentração foi rigorosamente obedecido. A linha de base obtida ao final de cada período de exposição, subtraída daquela obtida ainda nas suas ausências, foi considerada como a alteração do tônus basal. Após a realização da curva concentração-efeito o tecido foi lavado com Tyrode normal e exposto a três contrações induzidas por KCl 60 mM (nos tempos de 5, 10 e 15 minutos) como forma de verificar a integridade do tecido. Durante o período de lavagem da preparação foi observado o retorno do tônus ao nível anterior obtido no período controle. (Figura 10)

Figura 10 - Efeito relaxante do β -pineno sobre o tônus basal de duodeno de rato.

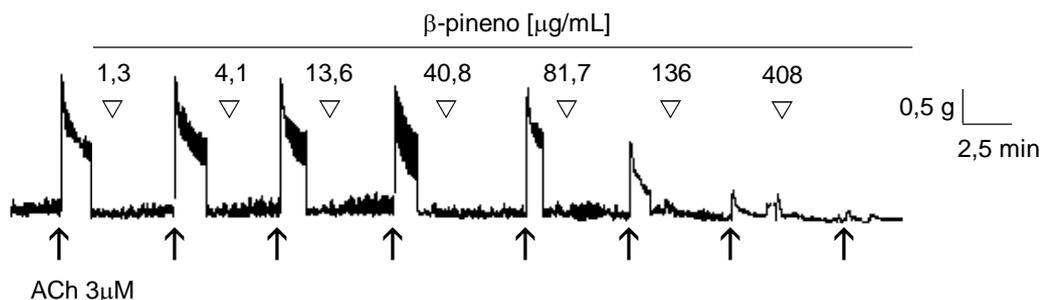


Traçado do experimento com β -pineno, demonstrando seu efeito relaxante sobre o tônus basal de duodeno isolado de rato. O β -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foi cumulativamente adicionado nas concentrações indicadas e nos momentos mostrados através dos triângulos (∇). No início do experimento foi evocada uma contração com K^+ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K^+ é indicado na figura pelo símbolo (\blacktriangle). Ao final do experimento, note a recuperação parcial da resposta contrátil induzida por K^+ e do tônus basal com 5, 10 e 15 minutos após a retirada do β -pineno da solução de banho.

4.2.2 Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno e do fundo gástrico isolado de rato induzida por ACh

A exposição prévia da preparação a uma dada concentração de α -pineno ou β -pineno (1,3 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foi usada para avaliar os efeitos dessas substâncias sobre as contrações induzidas por concentração submaximal de acetilcolina (ACh, 3 μM) em tiras de duodeno e fundo gástrico isoladas. Após o equilíbrio do tecido configurado pela estabilização das respostas contráteis iniciais, a resposta subsequente induzida pelo agente contraturante ACh na ausência de α -pineno ou β -pineno foram consideradas como controle para comparação das demais obtidas na presença dos monoterpenos. (Figura 11)

Figura 11 - Efeito inibitório do β -pineno sobre a contração evocada por ACh em duodeno isolado de rato.

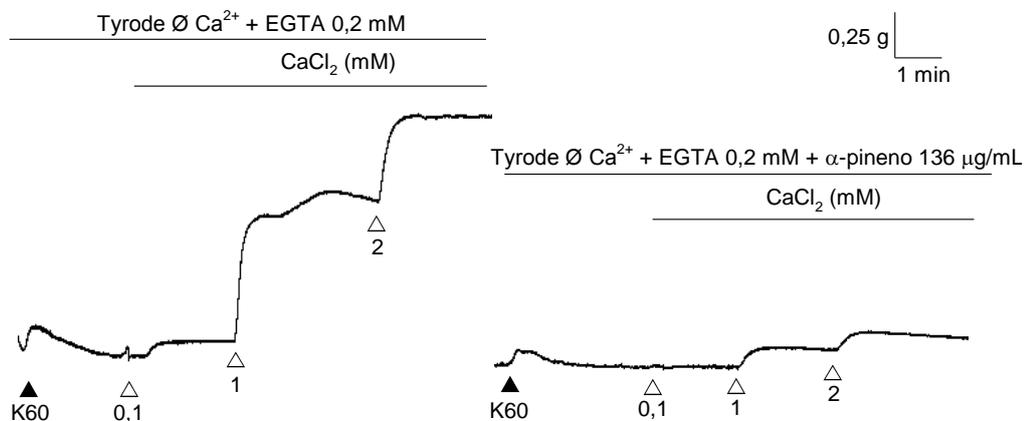


Traçado usado para demonstrar o efeito inibitório do β -pineno (1,3 – 408 $\mu\text{g/mL}$) na contração induzida por ACh 3 μM . O símbolo (\blacktriangle) indica o momento da aplicação da solução despolarizante durante o experimento. A primeira contração induzida por ACh foi obtida ainda na ausência do β -pineno e sua amplitude foi considerada como contração controle. O momento e as concentrações do β -pineno estão indicados pelo símbolo (∇) e pelos valores indicados na figura (em μM). Após cada contração induzida por ACh, a preparação foi lavada por um período de aproximadamente 10 min para adicionar nova concentração de β -pineno. As etapas de lavagens não foram registradas para que o traçado fosse mostrado de forma a facilitar a visualização dos efeitos.

4.2.3 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto ao KCl

Para a realização desse protocolo, no início do experimento, o tecido foi estimulado de maneira semelhante aos protocolos já descritos anteriormente, até que duas contrações induzidas por KCl 60mM apresentassem a mesma amplitude. Em seguida, foram feitas quatro lavagens do tecido com solução de Tyrode sem Ca^{2+} à qual foi adicionado o agente quelante de Ca^{2+} EGTA (sigla em inglês de *ethylene glycol tetraacetic acid*, 200 μM), permanecendo assim por cinco minutos. Ainda na presença de solução sem Ca^{2+} e com EGTA, o tecido foi estimulado por KCl 60mM e, esperada a estabilização do mesmo, o CaCl_2 (0,1, 1 e 2mM) foi adicionado. Esse mesmo procedimento foi realizado em tecidos pré-tratados com o OEET (100 e 300 $\mu\text{g/mL}$), 1,8-cineol (308 $\mu\text{g/mL}$), α -pineno ou β -pineno (136 $\mu\text{g/mL}$) por 5 min. (Figura 12)

Figura 12 - Efeito do α -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de KCl.

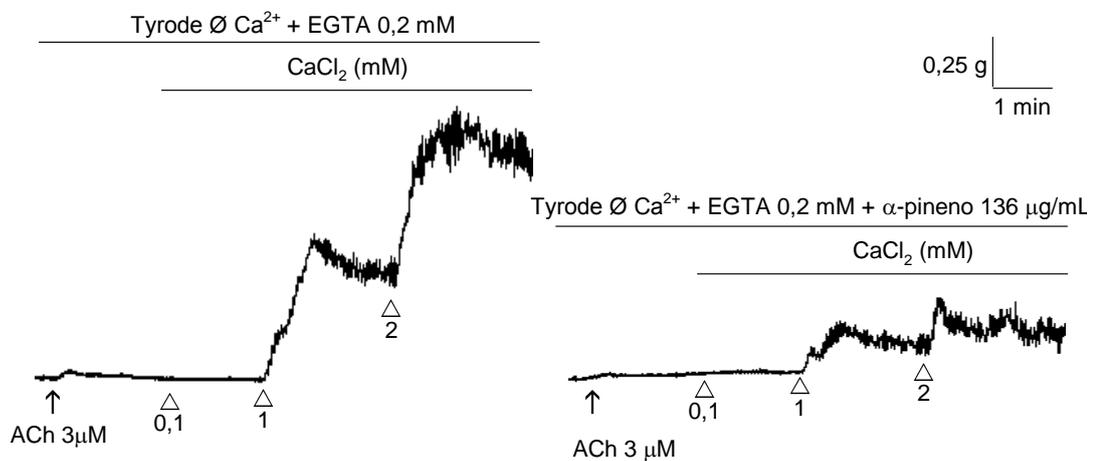


Traçado que demonstra a contração induzida pela adição de Ca^{2+} (0,1, 1 e 2 mM) em preparações estimuladas com K^+ (60 mM) e mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} (\emptyset Ca^{2+}) com EGTA 0,2 mM na ausência (traçado à esquerda) e na presença do α -pineno (136 $\mu\text{g/mL}$, traçado à direita). O símbolo (\blacktriangle) indica o momento da aplicação da solução potássica durante o experimento e a preparação foi assim mantida durante a adição de Ca^{2+} . O momento e as concentrações do Ca^{2+} estão indicados pelo símbolo (\triangle) e pelos valores indicados na figura (em mM).

4.2.4 Efeito do OEET, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto à ACh.

Para a realização desse protocolo, no início do experimento, o tecido foi estimulado de maneira semelhante aos protocolos já descritos anteriormente, até que duas contrações induzidas por KCl 60mM apresentassem a mesma amplitude. Em seguida, foram feitas quatro lavagens do tecido com solução de Tyrode sem Ca^{2+} à qual foi adicionado o agente quelante de Ca^{2+} EGTA (200 μM), permanecendo assim por cinco minutos. Ainda na presença de solução sem Ca^{2+} e com EGTA, o tecido foi estimulado por ACh 3 μM e, esperada a estabilização do mesmo, o CaCl_2 (0,1, 1 e 2mM) foi adicionado. Esse mesmo procedimento foi realizado em tecidos pré-tratados com o OEET (100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), α -pineno ou β -pineno (136 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min. (Figura 13)

Figura 13 - Efeito do α -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de ACh.

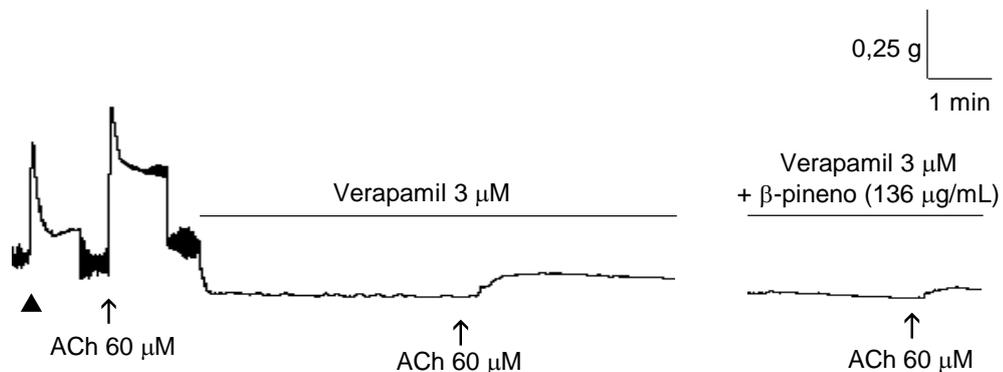


Traçado que demonstra a contração induzida pela adição de Ca^{2+} (0,1, 1 e 2 mM) em preparações estimuladas com ACh (3 μM) e mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} (\emptyset Ca^{2+}) com EGTA 0,2 mM na ausência (traçado à esquerda) e na presença do α -pineno (136 $\mu\text{g}/\text{mL}$, traçado à direita). O símbolo (\uparrow) indica o momento da aplicação da solução colinérgica durante o experimento e a preparação foi assim mantida durante a adição de Ca^{2+} . O momento e as concentrações do Ca^{2+} estão indicados pelo símbolo (Δ) e pelos valores indicados na figura (em mM).

4.2.5 Efeito do 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal.

Após estabilização das respostas contráteis induzidas por KCl 60 mM em Tyrode normal, o verapamil (3 μ M), um bloqueador do canal para cálcio voltagem dependente, foi adicionado à cuba e, passados 5 minutos, o tecido foi estimulado com uma concentração supramaximal de ACh (60 μ M). A concentração usada do verapamil foi suficiente para impedir a contração induzida por 60 mM de K⁺. Após sucessivas lavagens do tecido com Tyrode normal, foram administrados 1,8-cineol (154, 308 e 462 μ g/mL), α -pineno ou β -pineno (136 e 408 μ g/mL) novamente na presença de verapamil (3 μ M) para, em seguida, o tecido ser novamente estimulado com ACh (60 μ M). Após repetidas lavagens, foi realizada uma nova contração com ACh (60 μ M), na presença de verapamil (3 μ M) para certificar a recuperação da resposta contrátil colinérgica após a retirada do 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno. A primeira contração obtida na ausência do 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno foi considerada como a contração controle. (Figura 14)

Figura 14 - Efeito do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal.

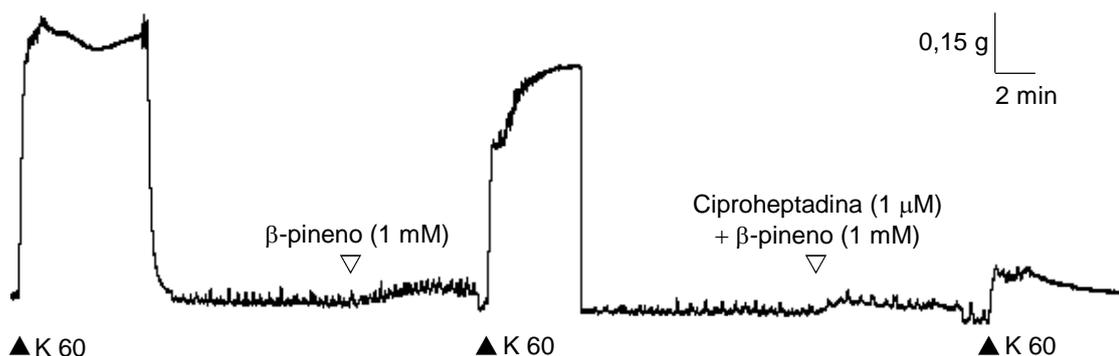


Traçado do experimento com duodeno isolado de rato estimulado inicialmente com K⁺ (60 mM, ▲). Após lavagem da preparação com Tyrode normal, o tecido foi estimulado com ACh 60 μ M. Nota-se um pico inicial, fásico, seguido de pequeno decaimento até atingir valor estacionário característico de fase tônica da contração. Após exposição do tecido ao verapamil (3 μ M) nota-se redução da fase fásica da contração induzida por ACh e manutenção da segunda fase da contração. A repetição do protocolo na presença de β -pineno (1 mM) demonstrou redução da amplitude dessa contração.

4.2.6 Efeito do α -pineno e do β -pineno no t \acute{o} nus basal de fundo g \acute{a} strico isolado de rato na presen \acute{c} a de ciproheptadina.

A exposi \tilde{c} o pr \acute{e} via da prepara \tilde{c} o a uma dada concentra \tilde{c} o de α -pineno ou β -pineno (136 μ g/mL) na aus \tilde{e} ncia e na presen \tilde{c} a de ciproheptadina (1 μ M), um bloqueador serotonin \acute{e} rgico, foi usada para avaliar os efeitos dessas subst \acute{a} ncias sobre as contra \tilde{c} o \tilde{e} s induzidas por concentra \tilde{c} o submaximal de K^+ (60 mM). Ap \acute{o} s o equil \acute{i} brio do tecido configurado pela estabiliza \tilde{c} o das respostas contr \acute{a} teis iniciais, a resposta subsequente induzida pelo agente contraturante K^+ na presen \tilde{c} a de α -pineno ou β -pineno e na aus \tilde{e} ncia de ciproheptadina foi considerada como controle para compara \tilde{c} o das demais obtidas na presen \tilde{c} a da ciproheptadina. (Figura 15)

Figura 15 - Efeito do β -pineno no t \acute{o} nus basal de fundo g \acute{a} strico isolado de rato na presen \tilde{c} a de ciproheptadina.

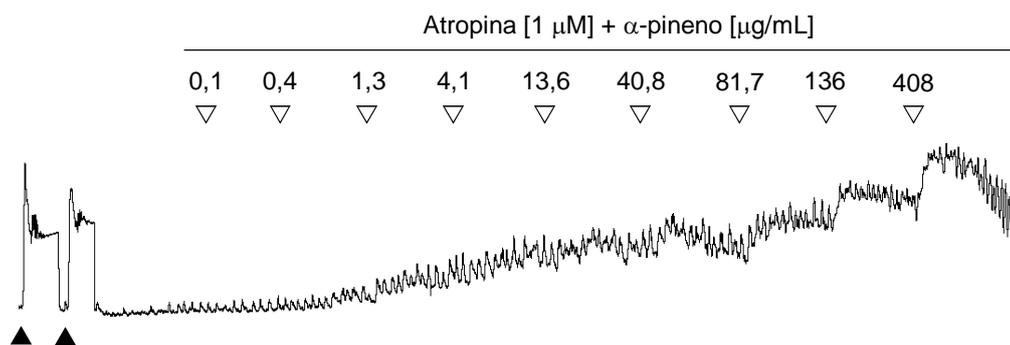


Traçado usado para demonstrar o efeito inibitório do β -pineno (1 mM) na contra \tilde{c} o induzida por KCl 60 mM na presen \tilde{c} a de ciproheptadina (1 μ M). O s \acute{i} mbo (▲) indica o momento da aplica \tilde{c} o da solu \tilde{c} o despolarizante durante o experimento. A contra \tilde{c} o induzida por K^+ obtida na presen \tilde{c} a do β -pineno e na aus \tilde{e} ncia da ciproheptadina foi considerada como contra \tilde{c} o controle. O momento da adi \tilde{c} o do β -pineno est \acute{a} indicado pelo s \acute{i} mbo (▽).

4.2.7. Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina.

Após equilíbrio da preparação, o α -pineno ou β -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados de forma crescente à solução fisiológica de Tyrode normal na presença de atropina (1 μM), um antagonista muscarínico, na câmara de banho, para avaliação de seus efeitos sobre o tônus basal do fundo gástrico isolado de rato. O tempo de 5 minutos para cada concentração foi rigorosamente obedecido. (Figura 16)

Figura 16 - Efeito do α -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina.

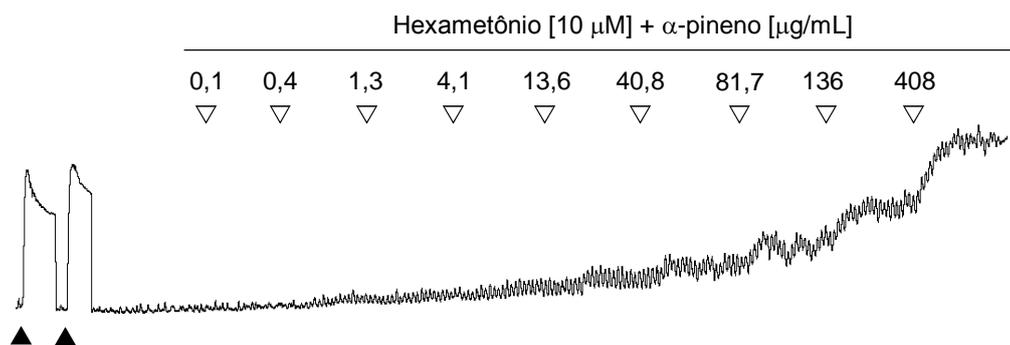


Traçado do experimento com α -pineno, demonstrando seu efeito sobre o tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina (1 μM). O α -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foi cumulativamente adicionado nas concentrações indicadas e nos momentos mostrados através dos triângulos (▽). No início do experimento foram evocadas contrações com K^+ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K^+ é indicado na figura pelo símbolo (▲).

4.2.8 Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio

Após equilíbrio da preparação, o α -pineno ou β -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados de forma crescente à solução fisiológica de Tyrode normal na presença de hexametônio (1 μM), um bloqueador ganglionar, na câmara de banho, para avaliação de seus efeitos sobre o tônus basal do fundo gástrico isolado de rato. O tempo de 5 minutos para cada concentração foi rigorosamente obedecido. (Figura 17)

Figura 17 - Efeito do α -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio.

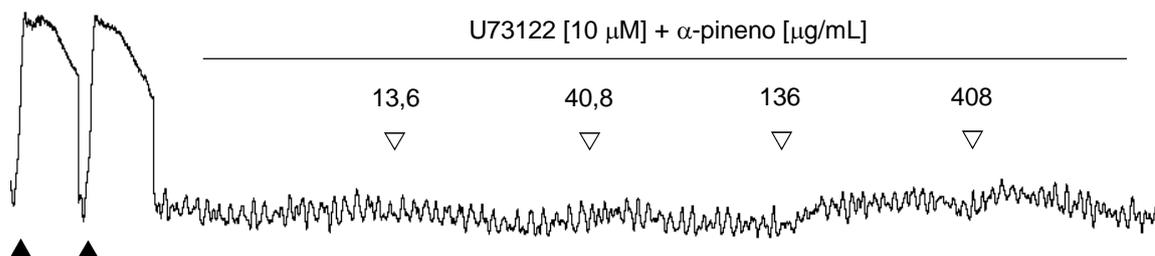


Traçado do experimento com α -pineno, demonstrando seu efeito sobre o tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio (10 μM). O α -pineno (0,1 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foi cumulativamente adicionado nas concentrações indicadas e nos momentos mostrados através dos triângulos (▽). No início do experimento foram evocadas contrações com K^+ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K^+ é indicado na figura pelo símbolo (▲).

4.2.9 Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de U73122

Após equilíbrio da preparação, o α -pineno ou β -pineno (13,6 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionados de forma crescente à solução fisiológica de Tyrode normal na presença de U73122 (10 μM), um inibidor da fosfolipase C, na câmara de banho, para avaliação de seus efeitos sobre o tônus basal do fundo gástrico isolado de rato. O tempo de 5 minutos para cada concentração foi rigorosamente obedecido. (Figura 18)

Figura 18 - Efeito do α -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de U73122.



Traçado do experimento com α -pineno, demonstrando seu efeito sobre o tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de U73122 (10 μM). O α -pineno (13,6 – 408 $\mu\text{g/mL}$) foi cumulativamente adicionado nas concentrações indicadas e nos momentos mostrados através dos triângulos (∇). No início do experimento foram evocadas contrações com K^+ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K^+ é indicado na figura pelo símbolo (\blacktriangle).

4.3 Análise Estatística

As respostas experimentalmente observadas foram consideradas através das deflexões dos traçados originais obtidos pelo sistema de aquisição de dados e analisadas conforme cada situação apropriada. Elas foram expressas em valores percentuais relativas às respostas obtidas em períodos ou experimentos controle, conforme o tratamento especificado para cada protocolo experimental. A maior parte dos valores está considerada pelas médias aritméticas \pm erro padrão da média (E.P.M.), com a representação do número de observações experimentais (n). Alguns parâmetros, como os valores de concentração inibitória ou efetiva medianas (CI₅₀ ou CE₅₀, respectivamente) calculados por interpolação semi-logarítmica, foram expressos com a média geométrica seguida do intervalo de confiança 95%. A significância estatística foi considerada quando a probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade foi menor que 5 % ($p < 0,05$). A comparação entre os valores obtidos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) seguida de um teste de múltipla comparação, conforme apropriado, indicados na seção de resultados. A comparação entre dois grupos foi feita pelo teste t de Student pareado ou não pareado, conforme a necessidade. Os testes foram aplicados com a utilização do programa SigmaStat (Systat Software Inc, USA). Os gráficos aqui mostrados foram confeccionados com o programa SigmaPlot (Systat Software Inc, USA).

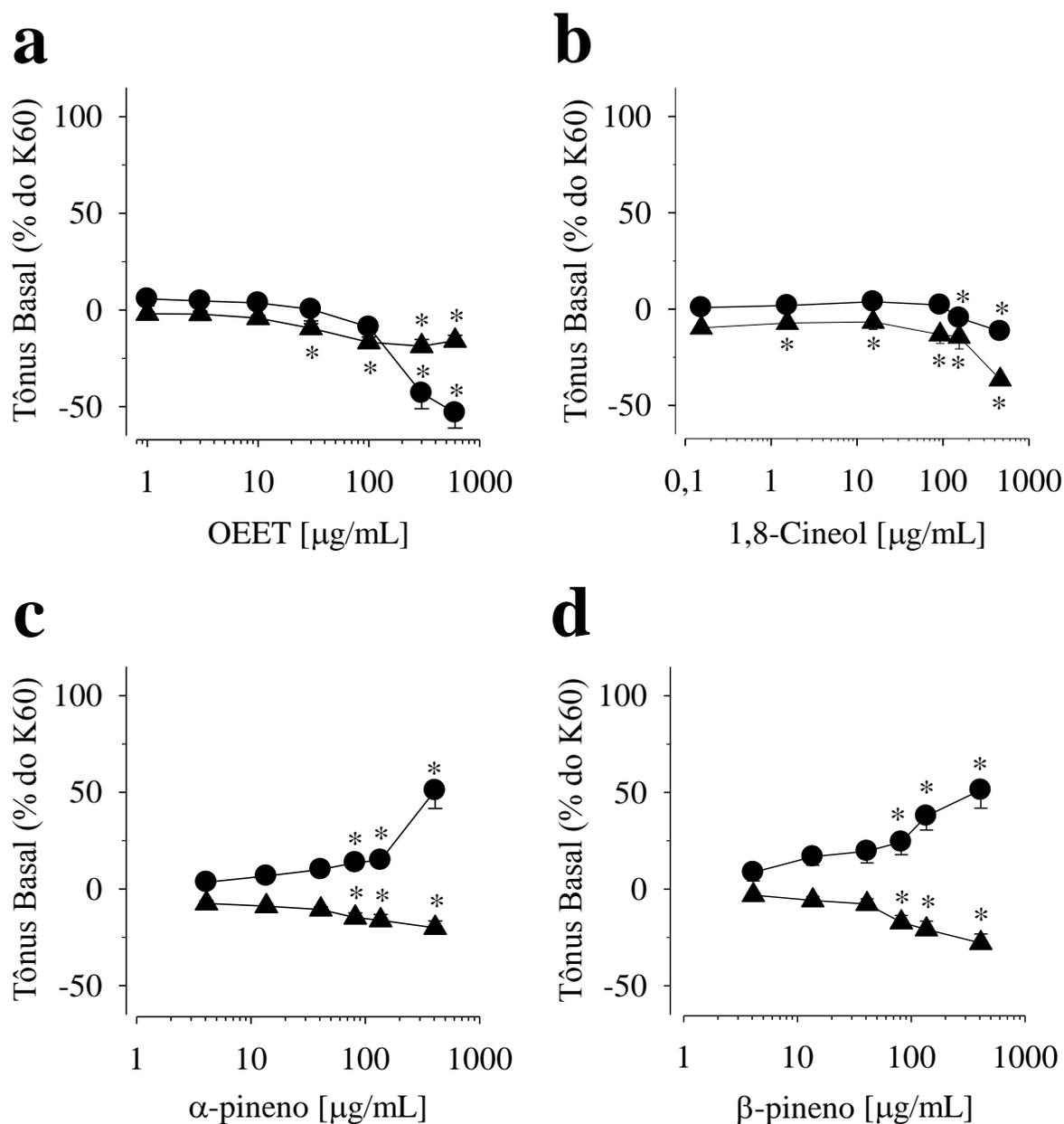
5. RESULTADOS

5.1 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no tônus basal de duodeno e fundo gástrico isolado de rato

A administração do OEET e do 1,8-cineol demonstraram efeito inibitório concentração dependente ($p < 0,05$) no tônus basal de tiras isoladas de duodeno e fundo gástrico (figura 19, **painel a e b**).

O α -pineno e o β -pineno tiveram efeito relaxante ($p < 0,05$) em tiras isoladas de duodeno, entretanto, em tiras isoladas de fundo gástrico, o α -pineno e o β -pineno aumentaram ($p < 0,05$) o tônus basal para $50,9 \pm 9,3\%$ ($n=6$) e $51,2 \pm 9,4\%$ ($n=6$), respectivamente (figura 19, **painel c e d**; valores são % da contração de referência: KCl 60 mM; $0,45 \pm 0,01$ g; $n=12$). Os efeitos induzidos pelo α -pineno e β -pineno em tiras gástricas são claramente opostos as suas ações miorelaxantes e antiespasmódicas em preparações duodenais.

Figura 19 - Efeito relaxante do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e do β -pineno sobre o tônus basal de duodeno e fundo gástrico isolados de rato.

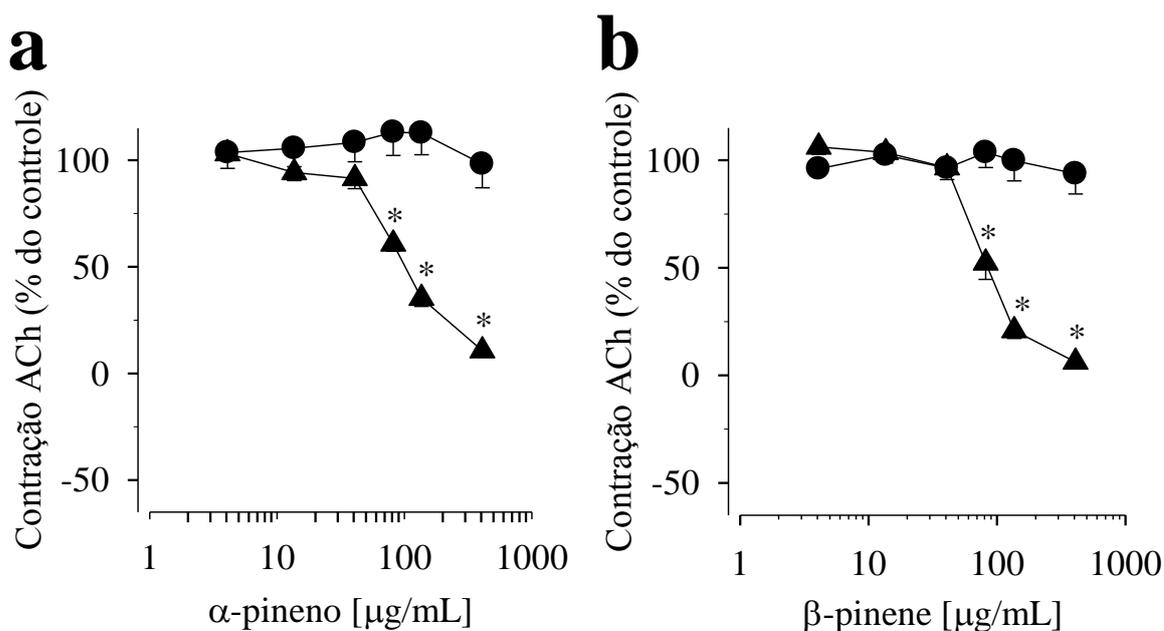


Efeitos do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno em tiras isoladas de fundo gástrico (●) e duodeno (▲) de ratos. O tratamento do tecido com OEET (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$, **painel a**) ou 1,8-cineol (0,1 – 462 $\mu\text{g/mL}$, **painel b**) relaxou o tônus basal de tiras de fundo gástrico e duodeno. O tratamento com α -pineno (**painel c**) ou β -pineno (4 – 408 $\mu\text{g/mL}$, **painel d**) relaxou o tônus basal de duodeno de rato isolado, enquanto aumentou o tônus basal de tiras de fundo gástrico. Alterações no tônus basal são expressos como % da contração controle inicial com K^+ 60 mM (n=6 por grupo). * p < 0,05, ANOVA e teste Holm-Sidak, comparado com valores controle na ausência do OEET, 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno conforme apropriado.

5.2 Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno e do fundo gástrico isolado de rato induzida por ACh

Adicionados à solução de banho por um período prévio de 5 minutos, α -pineno ou β -pineno (4 – 408 $\mu\text{g/mL}$) inibiram, de maneira dependente de concentração ($p < 0,05$), as contrações submaximais induzidas por ACh 3 μM em tiras isoladas de duodeno, já em preparações com fundo gástrico isolado o α -pineno e o β -pineno não foram capazes de bloquear a contração provocada pela ACh. (Figura 20)

Figura 20 - Efeito do α -pineno e β -pineno sobre a contração evocada por ACh em duodeno e fundo gástrico isolados de rato.

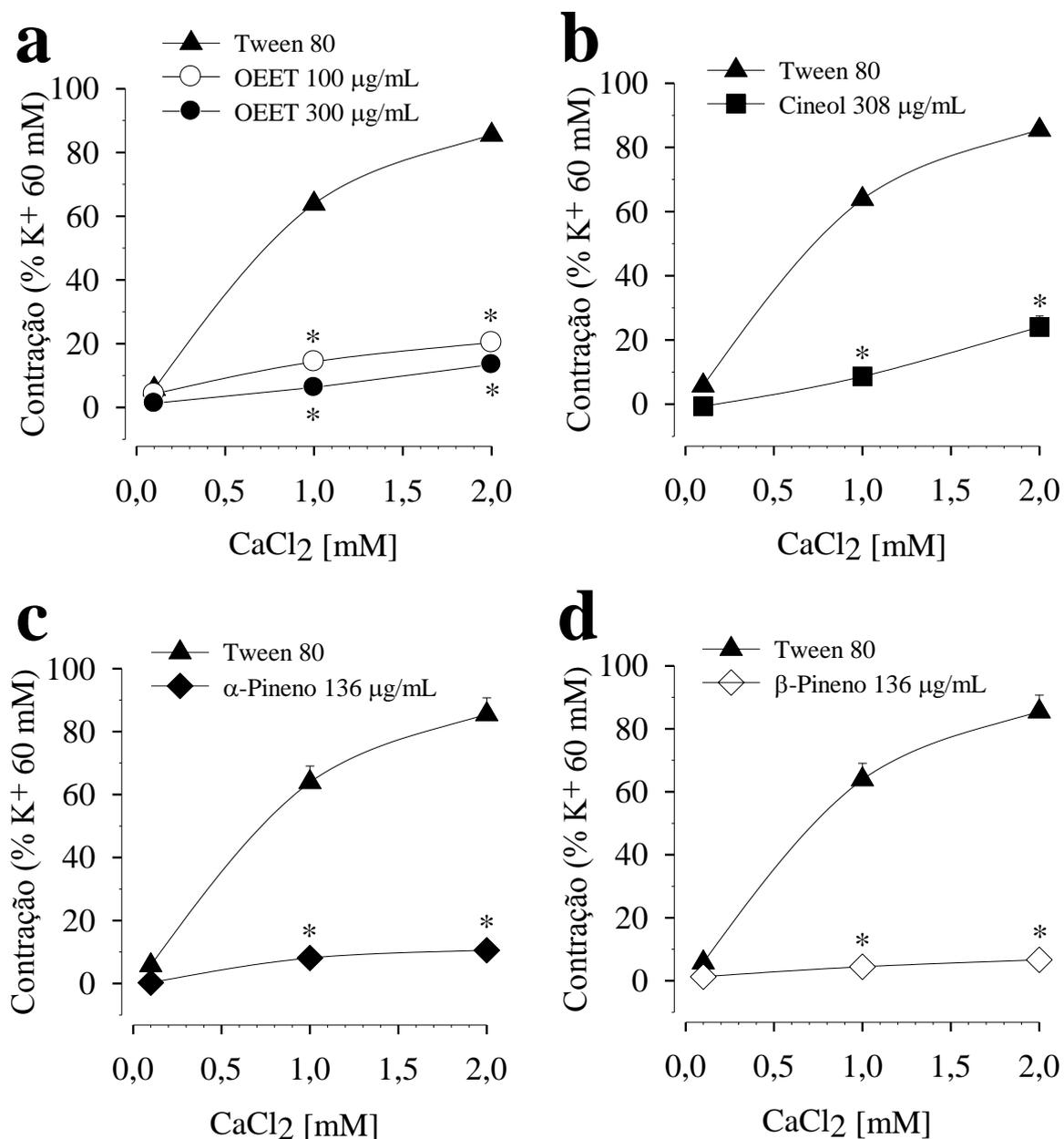


Efeitos do α -pineno (**painel a**) e β -pineno (**painel b**) em tiras isoladas de fundo gástrico (●) e duodeno (▲) de ratos. Contrações provocadas por ACh em concentração submaximal (3 μM) foram inibidas pelo pré-tratamento de tiras duodenais com α -pineno ou β -pineno (4 – 408 $\mu\text{g/mL}$), embora, não tenham sido alteradas em tiras de fundo gástrico. Os valores de inibição da ACh estão expressas como % da contração induzida por ACh 3 μM na ausência dos monoterpenos ($n=6$ por grupo). * $p < 0,05$, ANOVA e teste Holm-Sidak, comparado com valores controle na ausência do α -pineno ou β -pineno conforme apropriado.

5.3 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto ao KCl.

Para estudar os efeitos do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno ou do β -pineno sobre a contração induzida pela passagem de Ca^{2+} através da membrana foram utilizados os protocolos de estimulação das preparações com K^+ (60 mM), mantidas em meio sem Ca^{2+} com EGTA (0,2 mM), seguidos da adição gradual de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1, 1 e 2 mM). Nessas condições, o OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno ou o β -pineno foram capazes de diminuir ($p < 0,05$; figura 21) a amplitude das curvas concentração-efeito induzidas pela adição de Ca^{2+} . Considerando a concentração de 2 mM de Ca^{2+} , a resposta contrátil foi reduzida de $85,2 \pm 5,2\%$ no controle para $20,4 \pm 2,6\%$, $13,5 \pm 2,0\%$, $24,1 \pm 3,4\%$, $10,6 \pm 2,6\%$ e $6,6 \pm 1,1\%$ pelo OEET 100 $\mu\text{g/mL}$, OEET 300 $\mu\text{g/mL}$, 1,8-cineol 308 $\mu\text{g/mL}$, α -pineno 136 $\mu\text{g/mL}$ ou β -pineno 136 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 21 - Efeito do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de KCl.

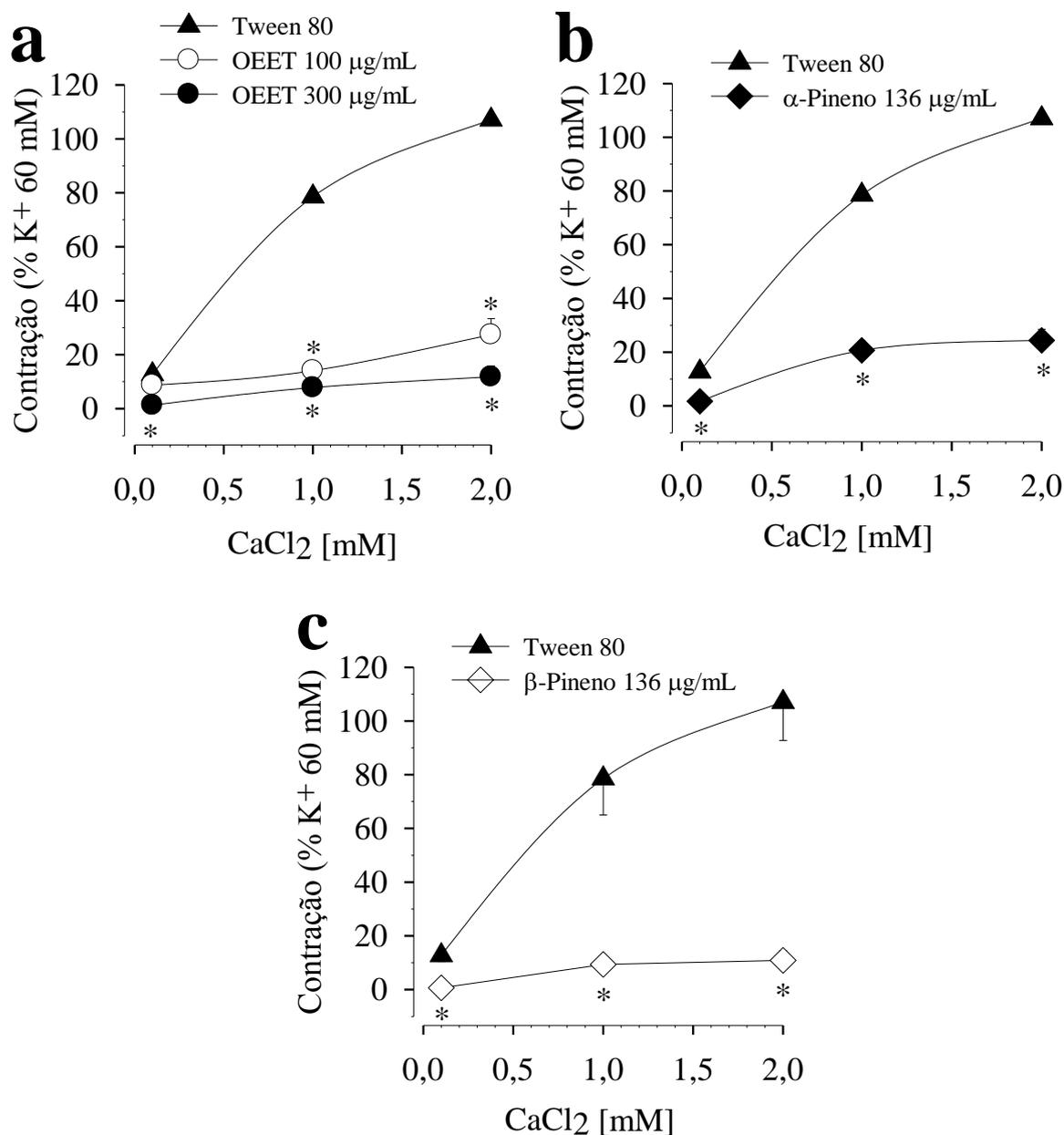


O gráfico mostra a média das contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na presença de Tween 80 (▲, n=6) ou presença de OEET (○, 100 µg/mL; ● 300 µg/mL; n=6; **painel a**), 1,8-cineol (■; 308 µg/mL; n=6; **painel b**), α -pineno (◆; 136 µg/mL; n=6; **painel c**) e β -pineno (◇; 136 µg/mL; n=6; **painel d**). Os valores estão expressos em percentual da contração de K^+ (60 mM) induzida no início do experimento durante o período de equilíbrio da preparação. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0,05$ para os efeitos obtidos para OEET, 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno em relação à resposta obtida no controle.

5.4 Efeito do OEET, α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por Ca^{2+} adicionado a meio sem Ca^{2+} e com EGTA e exposto à ACh

Para estudar os efeitos do OEET, do α -pineno ou do β -pineno sobre a contração induzida pela passagem de Ca^{2+} através da membrana foram utilizados os protocolos de estimulação das preparações, mantidas em meio sem Ca^{2+} com EGTA (0,2 mM), com ACh (3 μM), seguidos da adição gradual de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1, 1 e 2 mM). Nessas condições, o OEET (100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, figura 22, painel a), o α -pineno (136 $\mu\text{g}/\text{mL}$, figura 22, painel b) ou o β -pineno (136 $\mu\text{g}/\text{mL}$, figura 22, painel c) foram capazes de diminuir a amplitude das curvas concentração-efeito induzidas pela adição de Ca^{2+} . Considerando a concentração de 2 mM de Ca^{2+} , a resposta contrátil foi reduzida de $107,1 \pm 14,3\%$ no controle para $27,5 \pm 5,9\%$, $11,8 \pm 4,0\%$, $24,4 \pm 4,1\%$, e $10,9 \pm 3,5\%$ pelo OEET 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, OEET 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, α -pineno 136 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou β -pineno 136 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Figura 22 - Efeito do OEET, do α -pineno e do β -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de ACh.



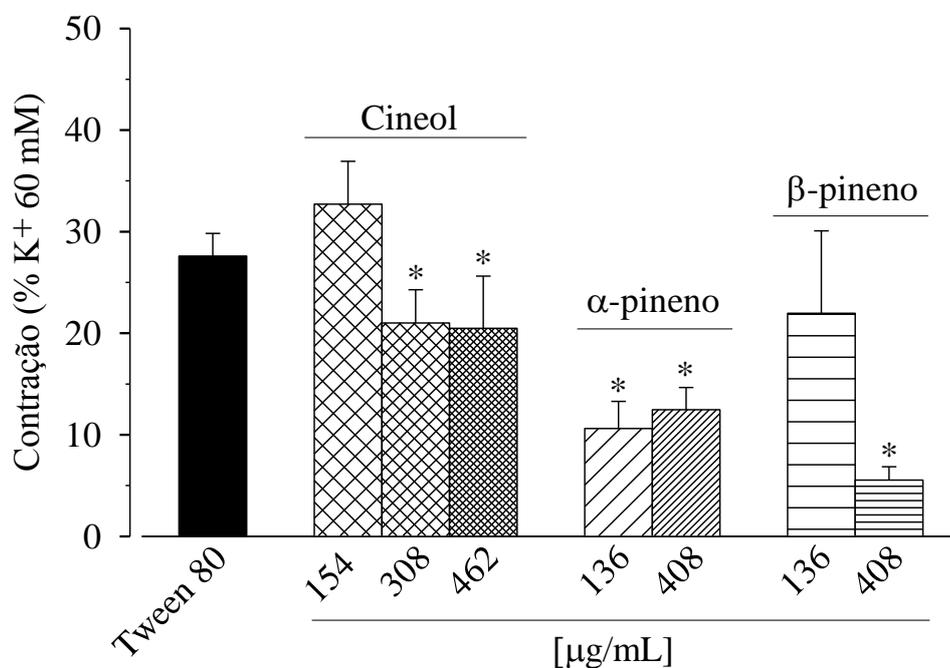
Os gráficos mostram a média das contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na presença de Tween 80 (\blacktriangle , n=6) ou presença de OEET (\circ , 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; \bullet 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=6; **painel a**), α -pineno (\blacklozenge ; 136 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=6; **painel b**) e β -pineno (\diamond ; 136 $\mu\text{g}/\text{mL}$; n=6; **painel c**). Os valores estão expressos em percentual da contração de K^+ (60 mM) induzida no início do experimento durante o período de equilíbrio da preparação. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0,05$ para os efeitos obtidos para OEET, α -pineno ou β -pineno em relação à resposta obtida no controle.

5.5 Efeito do 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh na presença de verapamil em Tyrode normal

Para avaliar o efeito do 1,8-cineol, α -pineno ou β -pineno sobre contrações mediadas pela entrada de Ca^{2+} através de canais operados por receptor, foram executados experimentos com preparações mantidas em solução de Tyrode normal contendo verapamil (3 μM), capaz de inibir as contrações induzidas por K^+ (60 mM) (dados não mostrados). A adição de concentração supramaximal de ACh (60 μM) na ausência de verapamil produz resposta contrátil colinérgica característica contendo um pico fásico inicial seguido de fase tônica sustentada. Na presença de verapamil, a ACh, nessa mesma concentração, produz resposta contrátil de baixa amplitude, caracterizando-se por pequena resposta fásica e presença de resposta tônica cuja amplitude correspondeu a $27,6 \pm 2,2\%$ da contração induzida por K^+ 60 mM inicial.

O pré-tratamento do tecido com 1,8-cineol (154, 308 e 462 $\mu\text{g/mL}$) produziu redução significativa ($p < 0,05$) da contração, nas concentrações de 308 e 462 $\mu\text{g/mL}$, para $21,0 \pm 3,3\%$ e $20,5 \pm 5,1\%$ da contração obtida por K^+ 60 mM, respectivamente (figura 23). O pré-tratamento com α -pineno (136 e 408 $\mu\text{g/mL}$) também produziu redução significativa ($p < 0,05$) da contração para $10,6 \pm 2,7\%$ e $12,5 \pm 2,2\%$, respectivamente. Por outro lado, o β -pineno (136 e 408 $\mu\text{g/mL}$) reduziu, de maneira significativa, essa contração apenas na concentração de 408 $\mu\text{g/mL}$, que correspondeu a $5,5 \pm 1,3\%$ da resposta K^+ 60 mM.

Figura 23 - Redução da contração tônica da ACh pelo 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno em Tyrode normal com Verapamil.

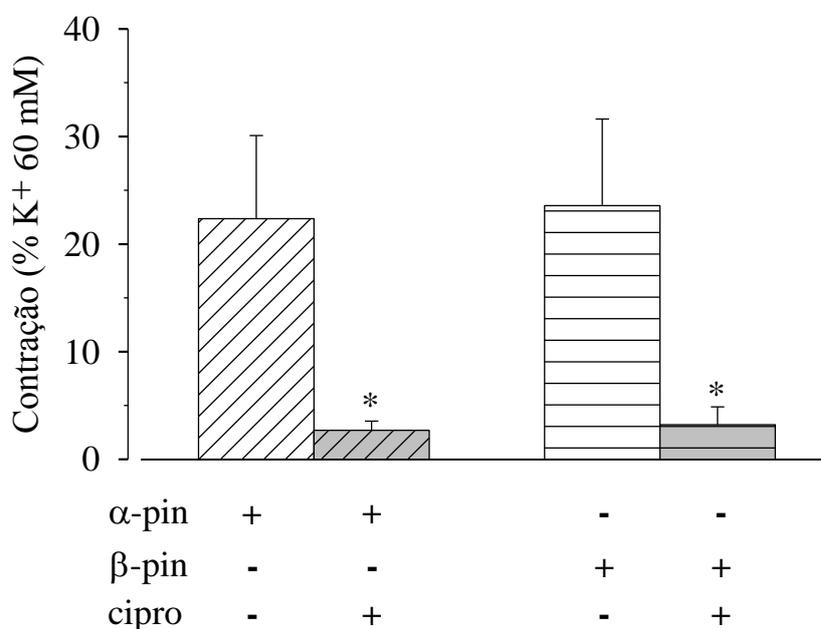


O gráfico mostra as médias do efeito inibitório do 1,8-cineol (308 e 462 $\mu\text{g/mL}$, $n=6$), do α -pineno (136 e 408 $\mu\text{g/mL}$, $n=6$) e do β -pineno (408 $\mu\text{g/mL}$, $n=6$) sobre a contração induzida por ACh 60 μM em Tyrode com verapamil (3 μM). Os valores estão expressos em percentual da contração induzida por KCl 60 mM realizadas no início dos experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0,05$ para os efeitos inibitórios do 1,8-cineol, α -pineno e do β -pineno, comparando-os ao controle com Tween 80.

5.6 Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do fundo gástrico isolado de rato induzida por KCl na presença de ciproheptadina

O pré-tratamento de tiras isoladas de fundo gástrico com α -pineno ou β -pineno (136 $\mu\text{g/mL}$) na presença de ciproheptadina (1 μM) produziu redução significativa ($p < 0,05$) da contração induzida por KCl 60 mM para $2,6 \pm 0,8\%$ e $3,2 \pm 1,6\%$ da contração obtida na ausência dos monoterpênicos, respectivamente (figura 24).

Figura 24 - Redução na contração do fundo gástrico isolado de rato induzida por K^+ pelo α -pineno e o β -pineno na presença de ciproheptadina.

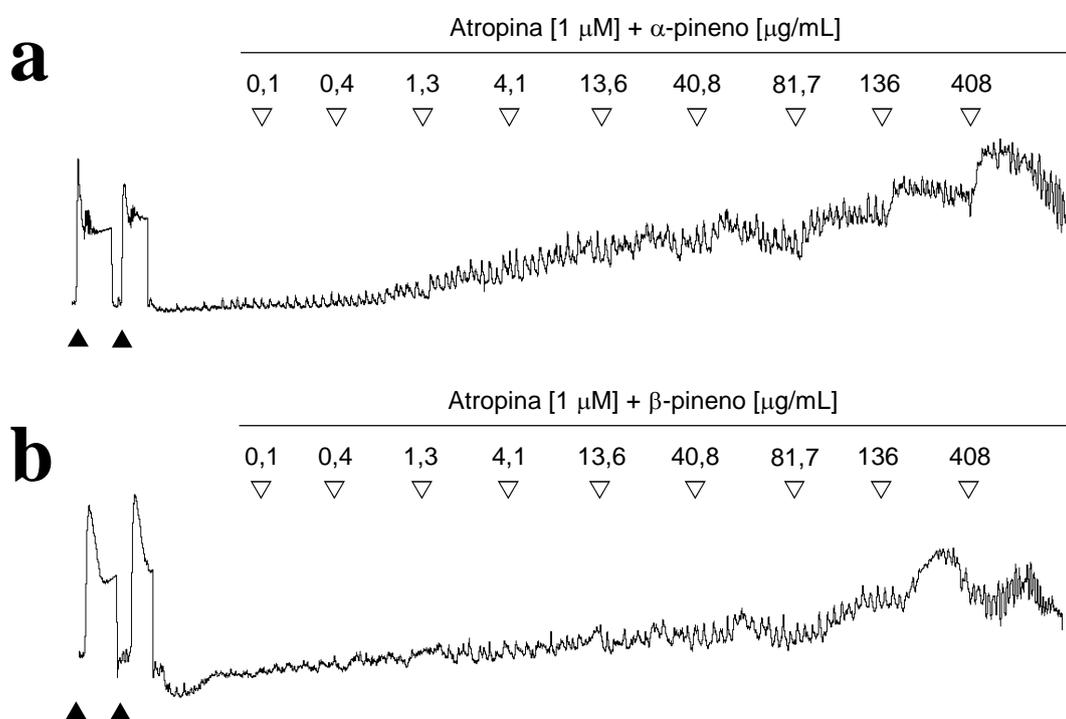


O gráfico mostra as médias do efeito inibitório do α -pineno e do β -pineno (136 $\mu\text{g/mL}$, $n=6$) sobre a contração induzida por KCl 60 mM em Tyrode normal na ausência e na presença de ciproheptadina (1 μM). Os valores estão expressos em percentual da contração induzida por KCl 60 mM realizadas no início dos experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0,05$ para os efeitos inibitórios do α -pineno e do β -pineno, comparando-os ao controle.

5.7 Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina

A presença de atropina (1 μ M) não foi capaz de inibir de maneira significativa a contração provocada pela adição dos monoterpenos α -pineno ou β -pineno (0,1 – 408 μ g/mL) no tônus basal de tiras isoladas de fundo gástrico. (Figura 25)

Figura 25 - Traçados das curvas concentração-efeito do α -pineno e β -pineno em tiras isoladas de fundo gástrico na presença de atropina

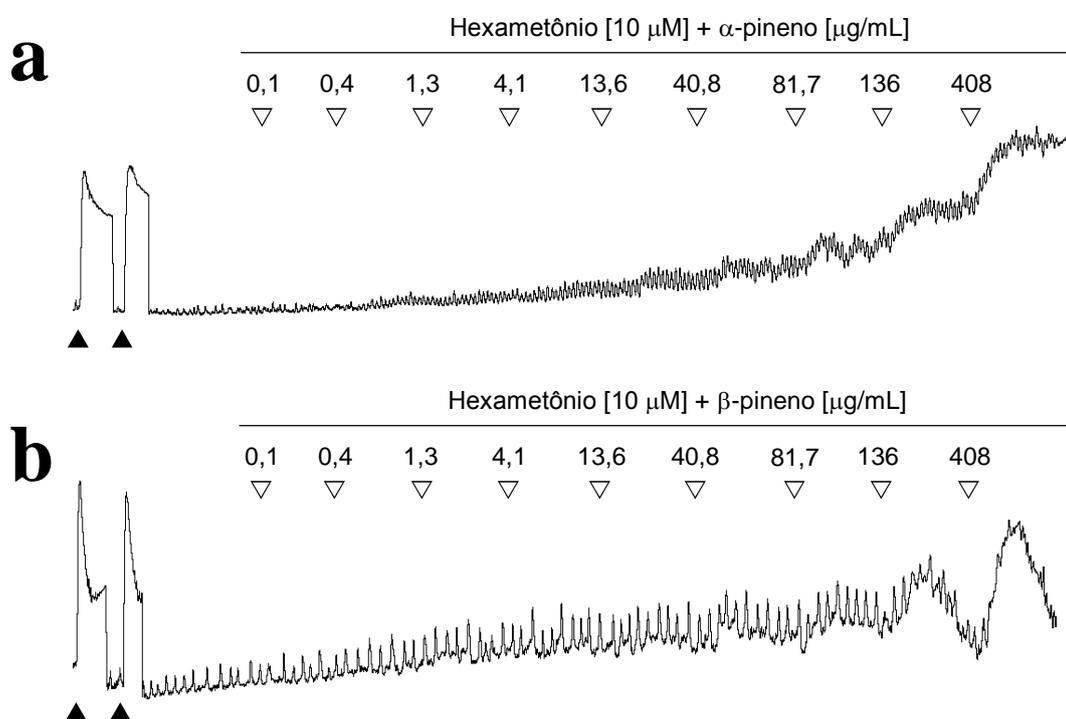


Traçado do experimento demonstrando o efeito do α -pineno (**painel a**) e do β -pineno (**painel b**) sobre o tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de atropina (1 μ M). Os monoterpenos foram cumulativamente adicionados nas concentrações indicadas (0,1 – 408 μ g/mL) e nos momentos mostrados através dos triângulos (▽). No início do experimento foram evocadas contrações com K⁺ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K⁺ é indicado na figura pelo símbolo (▲).

5.8 Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio

A presença de hexametônio (10 μ M) não foi capaz de inibir de maneira significativa a contração provocada pela adição dos monoterpenos α -pineno ou β -pineno (0,1 – 408 μ g/mL) no tônus basal de tiras isoladas de fundo gástrico. (Figura 26)

Figura 26 - Traçados das curvas concentração-efeito do α -pineno e β -pineno em tiras isoladas de fundo gástrico na presença de atropina



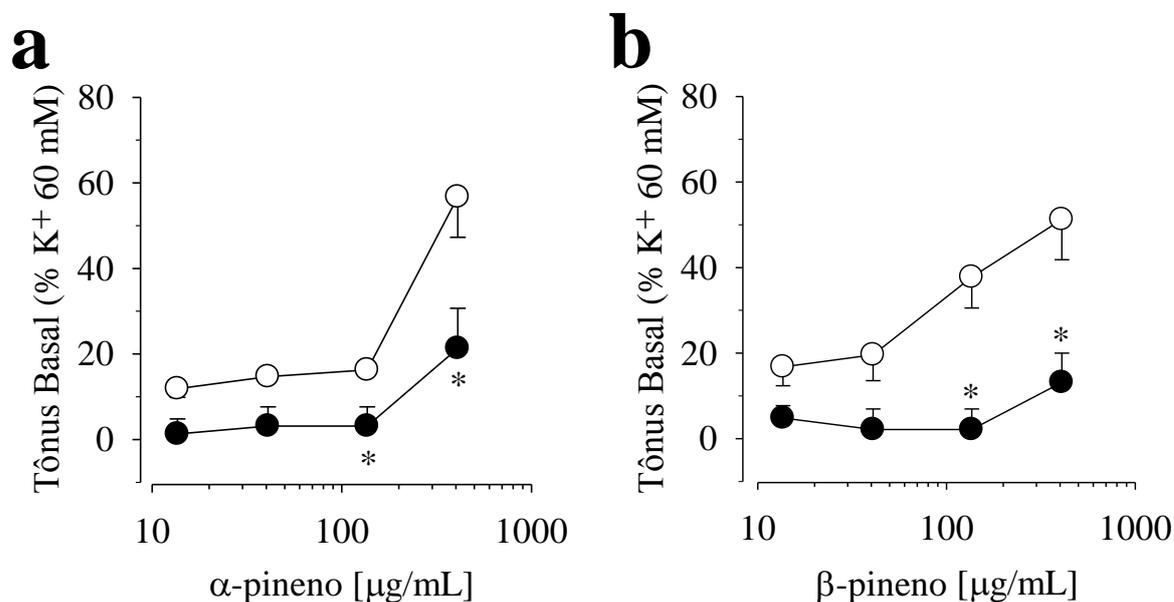
Traçado do experimento demonstrando o efeito do α -pineno (**painel a**) e do β -pineno (**painel b**) sobre o tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de hexametônio (10 μ M). Os monoterpenos foram cumulativamente adicionados nas concentrações indicadas (0,1 – 408 μ g/mL) e nos momentos mostrados através dos triângulos (▽). No início do experimento foram evocadas contrações com K+ 60 mM (K60), que foi usada como referencial para expressar a alteração do tônus. O momento da aplicação da solução de K+ é indicado na figura pelo símbolo (▲).

5.9 Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de fundo gástrico isolado de rato na presença de U73122

A presença do U73122 (10 μ M) inibiu de maneira significativa ($p < 0,05$) a contração provocada pela adição dos monoterpenos α -pineno ou β -pineno (13,6 – 408 μ g/mL) no tônus basal de tiras isoladas de fundo gástrico. (Figura 27)

Considerando as concentrações de 136 e 408 μ g/mL do α -pineno, a resposta contrátil foi reduzida de $16,2 \pm 1,0\%$ e $56,7 \pm 9,4\%$ na ausência de U73122 para $3,1 \pm 4,5\%$ e $21,3 \pm 9,3\%$ na presença do U73122, respectivamente. Para o β -pineno, as concentrações de 136 e 408 μ g/mL, reduziram a resposta contrátil de $37,7 \pm 7,2\%$ e $51,2 \pm 9,4\%$ na ausência de U73122 para $2,1 \pm 4,8\%$ e $13,1 \pm 6,8\%$ na presença do U73122, respectivamente.

Figura 27 - Inibição da contração α -pineno e do β -pineno no fundo gástrico isolado de rato pela adição do U73122



O gráfico mostra a média das contrações induzidas pela adição do α -pineno (13,6 – 408 μ g/mL, **painel a**) ou β -pineno (13,6 – 408 μ g/mL, **painel b**) na ausência (○) e na presença de 10 μ M de U73122 (●). As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * $p < 0,05$.

5.10 Efeito do OEET, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno no esvaziamento gástrico

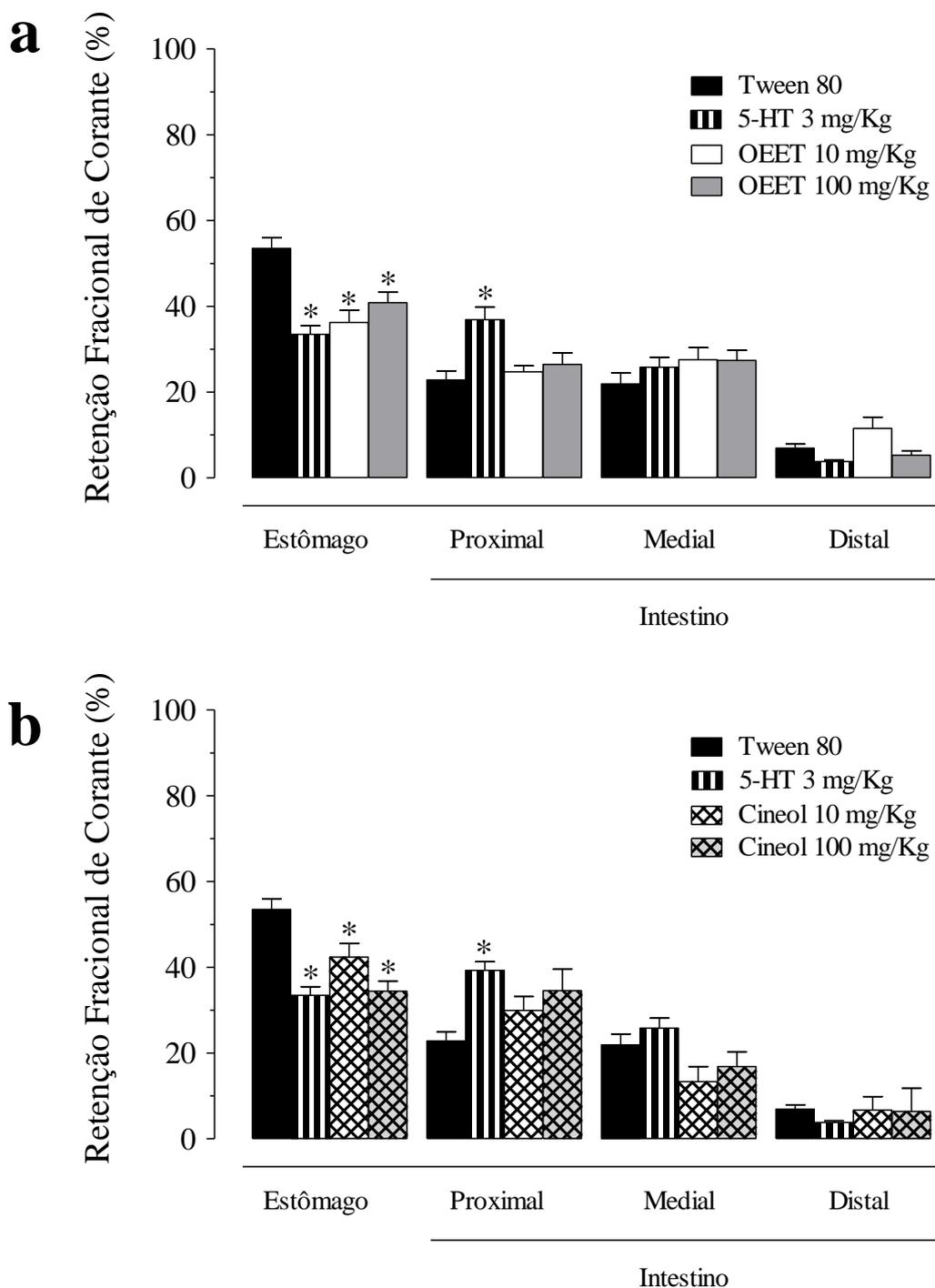
O OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno foram administrados por via oral e após 20 minutos foi realizado a gavagem com solução marcadora (Glicose 5%, Vermelho Fenol 0,75 mg/ml de H₂O). O animal foi sacrificado e seu trato digestório seccionado em estômago, intestino delgado proximal, medial e distal após 10 (Figura 28 e Figura 29, painel a) ou 20 minutos (Figura 29, painel b) da gavagem.

Na figura 28, painel a, é possível observar que o OEET (10 ou 100 mg/kg; v.o.) diminuiu ($p < 0,05$) a retenção gástrica pós-prandial ($53,5 \pm 2,5\%$ em ratos tratados com veículo versus $34,1 \pm 3,3\%$ e $39,1 \pm 2,8\%$, respectivamente, para as duas concentrações) no tempo de 10 minutos após a gavagem. A retenção gástrica de corante produzida pelo OEET foi semelhante à induzida pelo controle positivo da 5-hidroxitriptamina (5-HT, 3mg/kg, v.o.; $33,4 \pm 2,0\%$), embora apenas a 5-HT tenha sido capaz de aumentar a retenção ($p < 0,05$) no segmento proximal do intestino delgado. De maneira semelhante, na figura 27, painel b, note que o 1,8-cineol (10 ou 100 mg/kg; v.o.) também diminuiu ($p < 0,05$) a retenção gástrica pós-prandial ($53,5 \pm 2,5\%$ em ratos tratados com veículo versus $42,3 \pm 3,3\%$ e $34,4 \pm 2,4\%$, respectivamente, para as duas concentrações) no tempo de 10 minutos após a gavagem.

Na figura 29, painel a, o α -pineno e o β -pineno (100 mg/kg; v.o.) aumentaram a velocidade de esvaziamento gástrico e de trânsito gastrintestinal. No tempo de 10 minutos pós-prandial, diminuíram ($p < 0,05$) a retenção gástrica ($53,5 \pm 2,5\%$ em ratos tratados com veículo versus $43,9 \pm 2,2\%$ e $42,2 \pm 2,8\%$, respectivamente, para α -pineno e β -pineno) e aumentaram a retenção ($p < 0,05$) na porção distal do intestino ($6,9 \pm 0,9\%$ em ratos tratados com veículo versus $15,8 \pm 3,3\%$ e $10,1 \pm 1,0\%$, respectivamente).

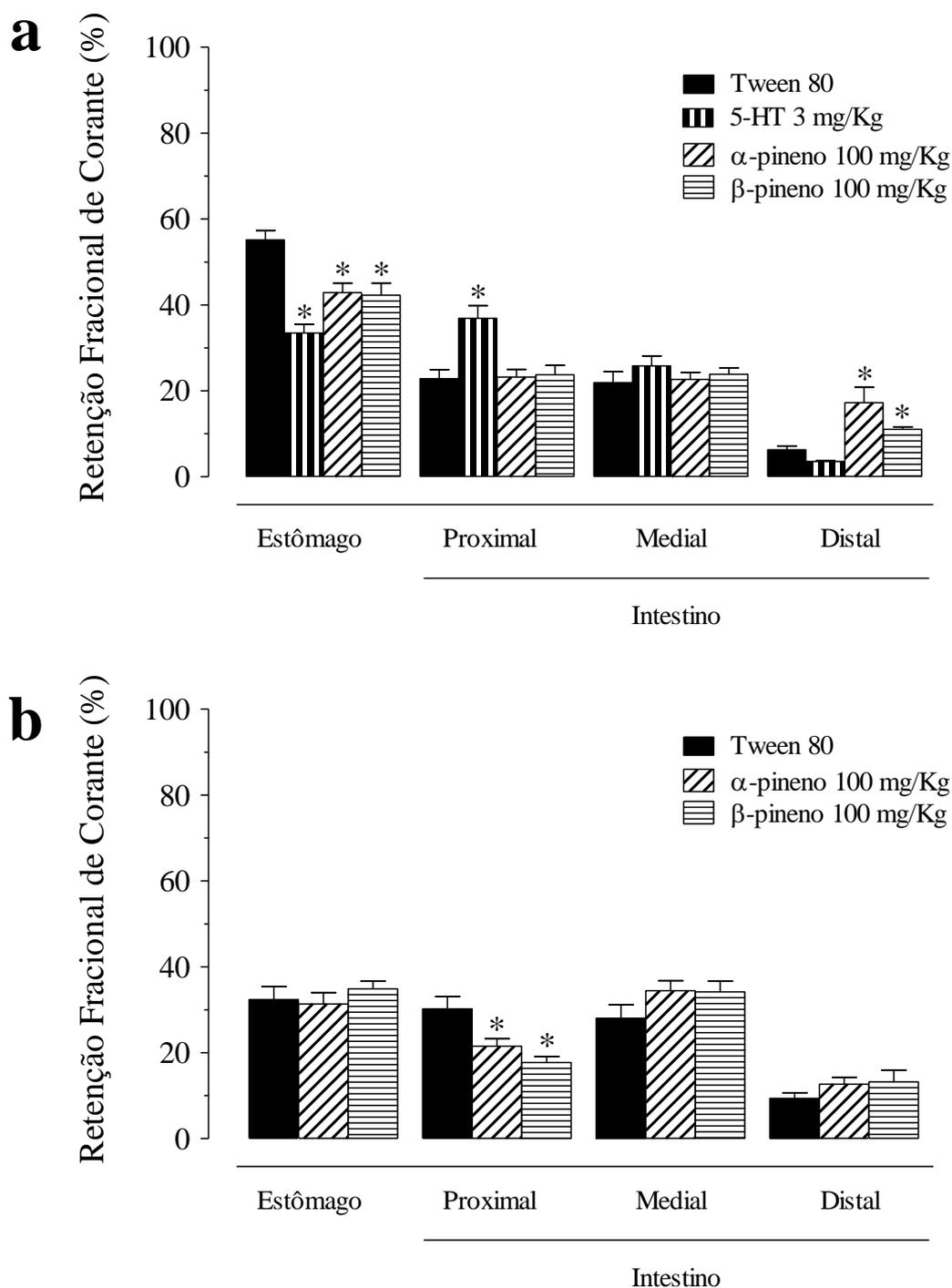
Aos 20 minutos pós-prandial (figura 29, painel b), ambos os monoterpênicos (α -pineno e β -pineno) diminuíram ($p < 0,05$) os valores de retenção no intestino proximal. Aos 30 minutos pós-prandial, não foram observadas alterações significativas nos valores gástricos ou intestinais de retenção de corante entre os grupos controle e tratados com α -pineno ou β -pineno (dados não mostrados).

Figura 28 - Retenção fracional de corante de ratos tratados com OEET e 1,8-cineol e estudados aos 10 minutos pós-prandial



Comparação de valores (%) da retenção de fracional de corante no estômago e no intestino delgado proximal, medial e distal de ratos conscientes, 10 minutos após terem sido alimentados por gavagem com refeição teste. Os animais foram tratados com veículo (Tween 80), OEET (10 ou 100 mg/kg, v.o., painel a) ou 1,8-cineol (10 ou 100 mg/kg, v.o., painel b). A 5-hidroxitriptamina (5-HT, 3 mg/kg, v.o.) foi utilizada como um controle positivo, pós-prandial 10min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 8 ratos por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste Holm-Sidak.

Figura 29 - Retenção fracional de corante de ratos tratados com α -pineno e o β -pineno e estudados aos 10 e 20 minutos pós-prandial.

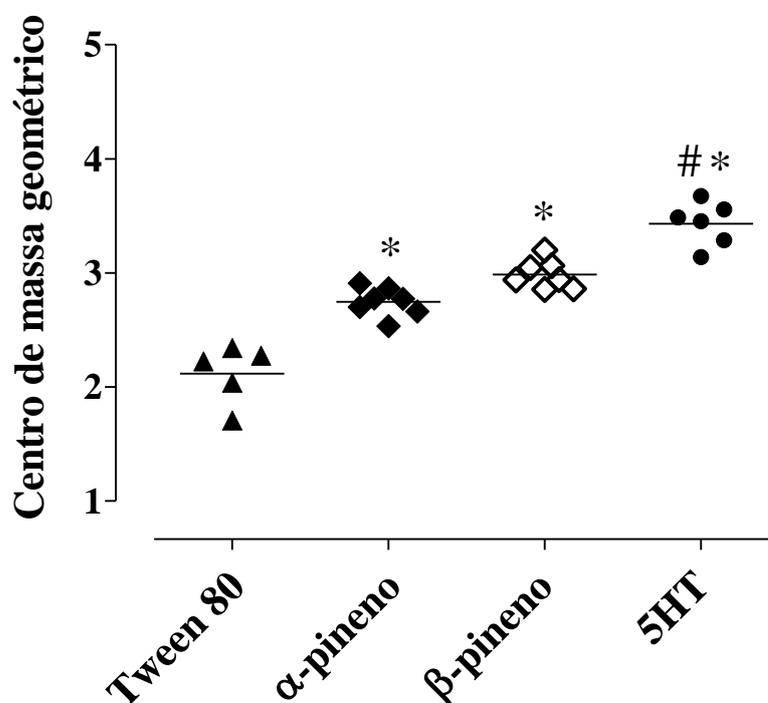


Comparação de valores (%) da retenção de fracional de corante no estômago e no intestino delgado proximal, medial e distal de ratos conscientes, 10 (**painel a**) e 20 (**painel b**) minutos após terem sido alimentados por gavagem com refeição teste. Os animais foram tratados com veículo (Tween 80), α -pineno ou β -pineno (100 mg/kg, v.o.). 5-hidroxitriptamina (5-HT, 3 mg/kg, v.o., **painel a**) foi utilizado como um controlo positivo, pós-prandial 10min. Os resultados foram expressos como média \pm EPM de 8 ratos por grupo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste Holm-Sidak.

5.11 Efeito do α -pineno e β -pineno no trânsito intestinal

Avaliamos o efeito do α -pineno e do β -pineno (100 mg/kg, v.o.) sobre trânsito de uma refeição teste líquida no intestino delgado, que foi distribuída, significativamente, mais distalmente após o tratamento com α -pineno e β -pineno (figura 30; $2,7 \pm 0,1$ e $2,9 \pm 0,1$, respectivamente, versus $2,2 \pm 0,1$ no grupo veículo/Tween 80). Os valores dos pinenos foram menores que o observado no grupo controle positivo (5-HT; 3mg/kg, v.o.; $3,6 \pm 0,1$).

Figura 30 - Efeito do α -pineno e do β -pineno no trânsito intestinal

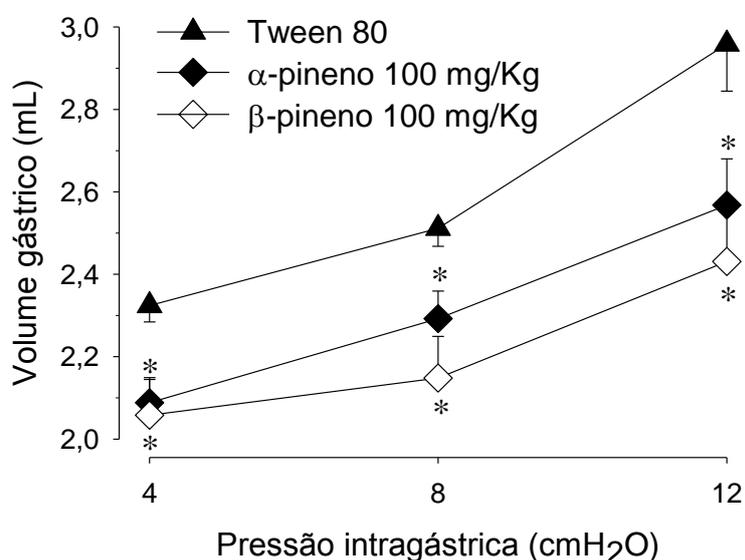


Comparação dos valores de trânsito intestinal em ratos conscientes tratados com veículo (\blacktriangle ; Tween 80; n=5; v.o.), α -pineno (\blacklozenge ; 100 mg/kg; n=7; v.o.) ou β -pineno (\blacklozenge ; 100 mg/kg; n=7; v.o.). A 5-hidroxitriptamina (\bullet ; 5-HT; 3 mg/kg; n=5; v.o.) foi utilizada como um controle positivo. Diagramas de dispersão mostram valores individuais e medianos (linha horizontal) para o centro geométrico da dispersão de recuperação de corante do duodeno proximal (segmento de número 1) para o segmento mais distal do intestino delgado (segmento de número 5). * $p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Holm-Sidak comparado aos valores do grupo controle (Tween 80). # $p < 0,05$, ANOVA seguido de teste Holm-Sidak comparado aos grupos tratados com α -pineno e β -pineno.

5.12 Efeito do α -pineno e β -pineno na complacência gástrica

Em ratos anestesiados, o α -pineno e o β -pineno (100 mg/kg) reduziram a complacência gástrica, indicando um maior tônus gástrico *in vivo*. Para uma dada pressão de distensão gástrica (4, 8 ou 12 cmH₂O), o volume gástrico foi sempre significativamente menor nos grupos tratados com α -pineno e β -pineno do que em ratos tratados com veículo (p < 0,05; figura 31).

Figura 31 - Efeito do α -pineno e do β -pineno na complacência gástrica



Comparação dos valores de volume gástrico (mL) registrados por pletismometria em ratos anestesiados submetidos a intervalos de 10 minutos de pressão de distensão gástrica crescente (4, 8 e 12 cmH₂O) na ausência (\blacktriangle ; ratos tratados com veículo, Tween 80; n=6) ou na presença de 100 mg/kg de α -pineno (\blacklozenge ; n=7) ou β -pineno (\diamond ; n=8). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * P < 0,05 comparado ao grupo veículo, ANOVA seguido de teste Holm-Sidak.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que o OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno exibem efeitos farmacológicos sobre o músculo liso gastrointestinal, que envolvem desde ações miorelaxantes em preparações isoladas de duodeno até propriedades contráteis em tiras de fundo de estômago. Sobretudo, essas ações miorelaxantes estão relacionadas à capacidade em interferir com a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos.

Este trabalho complementa a primeira descrição realizada do efeito pró-cinético do α -pineno e do β -pineno (JUCÁ, 2007). Entretanto, ao contrário de drogas pró-cinéticas clássicas, o α -pineno e o β -pineno não alteraram a contração induzida por concentração submaximal de ACh em tiras de estômago (SCHUURKES *et al.*, 1985a, 1985b). Substâncias pró-cinéticas clássicas como a metoclopramida e a domperidona são conhecidamente eficazes em aumentar a amplitude e a frequência das contrações antrais pós-prandiais e em acelerar o esvaziamento gástrico (McCALLUM, 1991). Estes efeitos são decorrentes do aumento da liberação de ACh das terminações nervosas presentes nos plexos intramurais via estimulação de receptores serotoninérgicos do tipo 4 (5-HT₄) ou mesmo uma ação de inibição da acetilcolinesterase (NASELLO *et al.*, 1995). Para confirmar essa observação, trabalhos recentes demonstram que o óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*) e alguns constituintes como β -pineno, terpinoleno e α -felandreno interagem com o receptor 5-HT₃ em íleo de rato (ABDEL-AZIZ *et al.*, 2005; RYIAZI *et al.*, 2007).

No âmbito geral, as informações científicas sobre os efeitos farmacológicos das substâncias estudadas neste trabalho no sistema gastrointestinal ainda são escassas, embora já tenham sido relatados alguns efeitos (NEVES *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2004). Isso permite concluir que essas substâncias podem ser consideradas potencialmente úteis para estudos farmacológicos que envolvam o comportamento motor do músculo liso em disfunções gastrointestinais. Corroborando essa idéia, demonstramos neste trabalho propriedades aceleradoras do esvaziamento gástrico e do trânsito intestinal, úteis no tratamento de pacientes com dispepsia funcional secundária à dismotilidade (RÖSCH *et al.*, 2002; SCHEMANN *et al.*, 2006).

Além disso, os efeitos relatados no presente trabalho não devem estar relacionados a possível efeito tóxico, pois a reversibilidade dos efeitos foi um fator sempre observado, mesmo após a adição das concentrações mais elevadas dos compostos. De um modo geral, esses constituintes são considerados pouco tóxicos (WEI *et al.*, 2006): os valores

de DL50 para ratos são correspondentes a 2480 mg/kg (v.o.), 3700 mg/kg (v.o.) e 4700 mg/kg (v.o.) para o 1,8-cineol, o α -pineno e para o β -pineno, respectivamente. Esses valores estão situados em faixa de toxicidade semelhante a de outros constituintes terpênicos como o eugenol, cujos valor é superior a 2000 mg/kg (INTERAMINENSE *et al.*, 2007).

Quimicamente, 1,8-cineol, α -pineno e β -pineno são monoterpenos, substâncias com 10 carbonos (duas unidades isoprênicas) que apresentam geralmente odores agradáveis e diversas propriedades biológicas. São encontrados na natureza em muitas plantas e, por isso, são amplamente empregados na obtenção de aromas e fragrâncias. Como o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno são encontradas na composição de diversos óleos essenciais, isso sugere que eles possam estar relacionados aos efeitos farmacológicos descritos para extratos de várias plantas usadas na medicina popular no tratamento de afecções gastrintestinais. Por exemplo, alguns trabalhos relatam que os óleos essenciais de *Artemisia maritima* L. (SHAH *et al.*, 2011), *Zingiber roseum* Rosc. (PRAKASH *et al.*, 2006), *Plectranthus barbatus* Andrews (CÂMARA *et al.*, 2003), *Hyssopus officinalis* L. (LU *et al.*, 2002) e *Ferula gummosa* Boiss. (SADRAEI *et al.*, 2001) apresentam ações farmacológicas sobre o trato gastrintestinal. São, preponderantemente, ações antiespasmódicas e miiorrelaxantes, uma vez que estão relacionadas à inibição das contrações induzidas por BaCl₂, K⁺, ACh e CCh em preparações intestinais de rato. Para os casos citados acima, exceto para *H. officinalis*, encontramos referência direta à presença dos monoterpenos 1,8-cineol, α -pineno e/ou β -pineno, atribuindo-os a explicação, pelo menos em parte, das ações farmacológicas desses óleos essenciais.

No presente estudo, o OEET e o 1,8-cineol demonstraram efeito miiorrelaxante no tônus basal, tanto em tiras isoladas de duodeno como também em tiras isoladas de fundo gástrico, o que não ocorreu com α -pineno e o β -pineno, que reduziram o tônus basal de tiras isoladas de duodeno, mas aumentaram o tônus basal de tiras isoladas de fundo gástrico.

Outro achado interessante desse trabalho é o fato de que, embora apresentem efeito miiorrelaxante em duodeno de rato, o α -pineno e o β -pineno não são isoladamente ativos nas contrações colinérgicas em tiras isoladas de estômago. Eles diminuíram o tônus basal de maneira reversível, assim como inibiram respostas contráteis produzidas por agentes contraturantes como K⁺ e ACh em duodeno. Esses agentes envolvem aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺ e, em virtude desse íon ser o elemento fisiológico mais importante para o processo de contração, estudos anteriores sugerem que para os óleos essenciais constituídos de α -pineno e β -pineno citados acima, o mecanismo de ação

provavelmente estaria relacionado com a entrada de Ca^{2+} através da membrana ou com sua liberação a partir dos estoques internos (CÂMARA *et al.*, 2003).

Evidenciou-se que tanto o α -pineno como o β -pineno inibem as contrações submaximais induzidas por K^+ e ACh. Como referido acima, esses dois agentes produzem desenvolvimento de força por induzirem aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} . As contrações induzidas por K^+ são classicamente associadas a acoplamento eletromecânico, que envolvem a ativação de canais para Ca^{2+} ativados por voltagem (KARAKI, 2004; SOMLYO; SOMLYO, 1994). Por outro lado, agonistas como a ACh promovem estimulação mecânica por acoplamento farmacomecânico pela ativação de receptores muscarínicos associados às proteínas-G, resultando na produção de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol, e abertura de canais operados por receptor (CUTHBERT *et al.*, 2004; SUEMATSU *et al.*, 1984; HASHIMOTO *et al.*, 1986). A comparação dos valores de CI_{50} (JUCÁ, 2007) revelou que não há diferença estatística em relação às potências do α -pineno e do β -pineno na inibição das contrações induzidas por K^+ e ACh. Isso pode ser indicativo de que o efeito inibitório desses monoterpenos não envolve um antagonismo direto da ativação do receptor muscarínico. É pouco provável também que os efeitos observados nesse estudo sejam mediados pela presença do veículo usado para solubilizá-los uma vez que, embora o Tween 80 também tenha sido capaz de diminuir a amplitude das contrações potássicas e a das contrações colinérgicas, a intensidade da diminuição pode ser considerada insignificante e a comparação do veículo usado isoladamente com o efeito promovido pelos constituintes revelou ser o efeito do veículo insuficiente para explicar o relaxamento observado quando os monoterpenos estiveram presentes.

As ações inibitórias do α -pineno e do β -pineno não envolvem primariamente o modo pelo qual o Ca^{2+} atravessa a membrana. Após ativação em meio sem Ca^{2+} , a célula produz pequena contração não sustentada que é evocada pela liberação de Ca^{2+} dos estoques internos (SMAILI *et al.*, 1998). Mantendo-se a presença do agonista em contato com o tecido, a adição de Ca^{2+} ao meio extracelular produz desenvolvimento de força em virtude da sua passagem através das vias celulares previamente ativadas, os canais para Ca^{2+} ativados por voltagem no caso do estímulo potássico (KARAKI, 2004) ou os canais ativados por receptor no caso da ACh (CUTHBERT *et al.*, 2004). Nos experimentos assim realizados, a inibição produzida pelo 1,8-cineol, pelo α -pineno ou pelo β -pineno foi de igual amplitude. Essas observações são contrárias à possibilidade de que esses monoterpenos possuam uma atividade especificamente localizada em um dos tipos de canais para Ca^{2+} acima relatados, inibindo o influxo de Ca^{2+} através do sarcolema.

A hipótese de que o modo de ação do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno no músculo liso intestinal está situado em algum passo da cascata de contração posterior à participação inicial da membrana, como na alteração do equilíbrio eletroquímico transmembrana ou na ativação de receptores por agonistas específicos é reforçada pelo fato de que o α -pineno e o β -pineno também inibiram as contrações induzidas pela liberação de Ca^{2+} dos estoques internos mediadas pelos mecanismos dependentes da formação de IP_3 . Está bem descrito na literatura que receptores muscarínicos são integrantes da família de receptores acoplados à proteínas G e que sua ativação envolve a formação de IP_3 a partir dos fosfolipídeos de membrana. A inibição da contração fásica observada na presença de α -pineno ou β -pineno é indicativa de que o efeito miorrelaxante desses monoterpenos, de alguma forma, envolve a participação dessa via celular.

Nas mesmas concentrações utilizadas nos protocolos experimentais anteriores, nem o α -pineno nem o β -pineno, inibiram as contrações duodenais mediadas por vias que envolvem a liberação de Ca^{2+} mediada pelo próprio Ca^{2+} (CICR, do inglês calcium-induced calcium release), como observado nos experimentos (JUCÁ, 2007) em que a cafeína foi usada como estímulo contrátil (McCARRON *et al.*, 2002). Ao contrário, eles produziram aumento da resposta contrátil nos experimentos que foram realizados em meio contendo concentrações normais de Ca^{2+} . Uma das explicações para esse efeito pode estar relacionada à maior liberação dos estoques de Ca^{2+} pela cafeína. A observação desse fenômeno poderia ser feita medindo-se a concentração de Ca^{2+} intracelular frente ao estímulo promovido pela cafeína subsequentemente na ausência e na presença dos monoterpenos (JUCÁ, 2007). Entretanto, esse efeito parece pouco provável uma vez que na realização dos mesmos experimentos com os tecidos sendo mantidos em meio sem Ca^{2+} não foi observado incremento da resposta contrátil evocada pela adição de cafeína ao meio.

Configuram-se, portanto, duas situações nas quais os efeitos desses monoterpenos são divergentes para um mesmo protocolo experimental: (1) potencialização da resposta contrátil ou (2) manutenção da amplitude da contração induzida pela cafeína. A discordância entre essas duas situações experimentais poderia estar relacionada à presença de concentrações normais de Ca^{2+} no meio extracelular. Surge, então, a possibilidade de que o efeito potencializador do α -pineno e do β -pineno seria provocado por aumento da entrada de Ca^{2+} após o esvaziamento dos estoques provocado pela cafeína (UFRET-VINCENY *et al.*, 1995). Essas observações são decorrentes dos estudos publicados em 1986, em que J.W. Putney Jr. propôs o conceito de um canal para cálcio operado por estoque (SOCC), que buscava entender o influxo de cálcio em células não excitáveis, processo originalmente

chamado de entrada capacitativa de cálcio (CASTEELS; DROOGMANS, 1981). Esse canal “SOCC” seria aberto após esgotamento da concentração de cálcio do retículo sarcoplasmático, na tentativa de reabastecer o retículo (PAREKH; PUTNEY, 2005).

A ativação dessa via também acontece após depleção dos estoques ativados por altas concentrações de CCh (QUINN *et al.*, 2004). Nos experimentos realizados em íleo de rato, após a estimulação do tecido com 100 μ M de CCh e sua posterior retirada por lavagens sucessivas da preparação com solução com baixas concentrações de Ca^{2+} extracelular, os tecidos foram colocados em contato com concentração normal de Ca^{2+} (2 mM). Mesmo na ausência do agonista colinérgico, a adição de Ca^{2+} promove o desenvolvimento de força indicando que, em situações onde os estoques estão depletados, a célula direciona seus mecanismos para a captação de Ca^{2+} do meio extracelular. Nossos resultados (JUCÁ, 2007), portanto, são consistentes com as observações de Putney.

A presença de α -pineno e β -pineno produziram potencialização das contrações evocadas pela adição de Ca^{2+} após esgotamento dos estoques intracelulares. Essa observação pode representar um provável influxo maior de Ca^{2+} por vias capacitativas mediadas pelo α -pineno e β -pineno. Entretanto, experimentos adicionais serão necessários para confirmar essa hipótese.

Na possibilidade de que o efeito contrátil do α -pineno e do β -pineno na musculatura lisa do fundo gástrico fosse mediado por receptor serotoninérgico, pré-tratamos o tecido com ciproheptadina, um conhecido potente bloqueador do receptor 5-HT₂. O que não atentamos foi para o seu efeito antagonista no influxo de cálcio através do canal para cálcio operado por voltagem (LOWE *et al.*, 1981) e o mais grave, a inexistência de receptores 5-HT₂ na musculatura lisa do fundo gástrico (CLINESCHMIDT *et al.*, 1985). Desse modo, qualquer conclusão acerca de tal resultado é imprecisa.

Ainda na busca do mecanismo de ação do α -pineno e do β -pineno no fundo gástrico, pré-tratamos o tecido com atropina, um clássico antagonista muscarínico não-seletivo (GAJDUS *et al.*, 2011). Com esse experimento pudemos inferir que o efeito contrátil do α -pineno e do β -pineno no fundo gástrico independe da ativação do receptor muscarínico, pois não houve inibição do efeito contrátil pela atropina.

O hexametônio, um antagonista colinérgico nicotínico, frequentemente referido como o bloqueador ganglionar (SCHEMANN; WOOD, 1989; DÖNDAS *et al.*, 2009), também não foi capaz de bloquear o efeito contrátil do α -pineno e do β -pineno, sugerindo um efeito direto desses monoterpenos sobre a contração do músculo liso.

O U73122, um inibidor específico da fosfolipase C (MOGAMI; MILLS; GALLACHER, 1997), reduziu a resposta contrátil do α -pineno e do β -pineno, indicando, em parte, um possível mecanismo de ação, corroborando dados encontrados anteriormente (JUCÁ, 2007).

O esvaziamento gástrico em ratos foi acelerado na presença do OEET, do 1,8-cineol, do α -pineno e do β -pineno. A taxa de esvaziamento gástrico é regulada através de uma interação complexa de mecanismos envolvendo neurotransmissores, substâncias parácrinas, hormônios, e excitabilidade do músculo liso (SMOUT, 2006; SOUZA *et al.*, 2009), e essas substâncias provavelmente agem sobre o equilíbrio existente entre o estômago e o duodeno, acelerando a taxa de esvaziamento gástrico. Vale lembrar que o OEET e o 1,8-cineol tiveram efeito relaxante no tônus basal de tiras isoladas de estômago, efeito que parece contradizer essa aceleração do esvaziamento gástrico, pelo menos *in loco*, pois como vimos anteriormente, o efeito relaxante em tiras de duodeno poderia explicar, em parte, a aceleração do esvaziamento gástrico.

Não podemos esquecer que o α -pineno e o β -pineno promoveram também a aceleração do trânsito intestinal e reduziram a complacência gástrica em ratos anestesiados, contribuindo diretamente para o aumento da taxa de esvaziamento gástrico. A administração do 1,8-cineol (*i.v.*) também foi capaz de reduzir a complacência gástrica em ratos anestesiados (NEVES *et al.*, 2007).

7. CONCLUSÕES

Concluimos que o OEET e o 1,8-cineol possuem efeito miorelaxante em tônus basal de tiras isoladas de duodeno e tiras isoladas de fundo gástrico.

O α -pineno e o β -pineno possuem efeito miorelaxante em tônus basal de tiras isoladas de duodeno e efeito contrátil em tiras isoladas de fundo gástrico, por provável interferência com o mecanismo depende de IP3 e independe da ativação local do receptor muscarínico e de uma ação central na ativação de receptores nicotínicos.

O efeito miorelaxante na musculatura lisa duodenal é mediado por possível interferência com o mecanismo depende de IP3.

O α -pineno e o β -pineno, no duodeno, ativam as vias de entrada de Ca^{2+} para a célula em situações de depleção dos estoques intracelulares, mecanismo via canal para cálcio operado por estoque (SOCC).

O OEET, o 1,8-cineol, o α -pineno e o β -pineno promoveram a aceleração do esvaziamento gástrico.

O α -pineno e o β -pineno aceleraram o trânsito intestinal e reduziram a complacência gástrica em ratos anestesiados.

REFERÊNCIAS

- AMBIENTE BRASIL. **Silvicultura do Eucalipto (Eucalyptus spp.)**. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./florestal/index.html&conteudo=./florestal/eucalipto.html>>. Acesso em: 01 maio 2007.
- ABDEL-AZIZ, H.; NAHRSTEDT, A.; PETEREIT, F.; WINDECK, T.; PLOCH, M.; VERSPOHL, E. J. 5-HT₃ receptor blocking activity of arylalkanes isolated from the rhizome of *Zingiber officinale*. **Planta Med.** 71(7):609-16, 2005.
- ABDEL-LATIF AA. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sci.** 45(9):757-86, 1989.
- ALVES, H. M.A.; GONÇALVES, J. C. R.; CRUZ, J. S.; ARAÚJO, D. A. M. Evaluation of the sesquiterpene (-)-alpha-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. **Neurosci Lett.** 472(1):11-5, 2010.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Imprensa da Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, vol. 2, 1991.
- BASTOS, V. P. D. **Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8-cineol em modelo experimental de asma em cobaias**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
- BASTOS, V.P.; BRITO, T.S.; LIMA, F.J.; PINHO, J.P.; LAHLOU, S.; ABREU MATOS, F.J.; SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J. Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 36(11):1120-6, 2009.
- BASTOS, V.P.; GOMES, A.S.; LIMA, F.J.; BRITO, T.S.; SOARES, P.M.; PINHO, J.P.; SILVA, C.S.; SANTOS, A.A.; SOUZA, M.H.; MAGALHÃES, P.J. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenged Guinea pigs. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 108(1):34-9, 2011.
- BOOTMAN, M. D.; COLLINS, T. J.; PEPPIATT, C. M.; PROTHERO, L. S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEY, S. C.; SEO, J. T.; BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signaling-an overview. **Semin Cell Dev Biol**, 12: 3-10, 2001.
- BRAAK, K.; FREY, H. H. Effects of solvents and detergents on the contractions of isolated smooth muscle preparations. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 42: 837-841, 1990.

BRADLEY, K. N.; FLYNN, E. R. M.; MUIR, T. C.; MCCARRON, J. G. Ca²⁺ regulation in guinea-pig colonic smooth muscle: the role of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger and the sarcoplasmic reticulum. **J. Physiol.** 538,465-482, 2002.

BURROW, A.; ECCLES, R.; JONES, A. S. The effects of *camphor*, *eucalyptus* and *menthol* vapour on nasal resistance to airflow and nasal sensation. **Acta Otolaryngol** 96(1-2):157-61, 1983.

CACHAO, P.; MENEZES BRANDAO, F.; CARMO, M.; FRAZAO, S.; SILVA M. Allergy to oil of turpentine in Portugal. **Contact Dermatitis** 14(4):205-8, 1986.

CAMARA CC, NASCIMENTO NR, MACEDO-FILHO CL, ALMEIDA FB, FONTELES MC. Antispasmodic effect of the essential oil of *Plectranthus barbatus* and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Med.** 69(12):1080-5, 2003.

CASTEELS, R.; DROOGMANS, G. Exchange characteristics of the noradrenaline-sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery. **J. Physiol. Lond.** 317:263-279, 1981.

COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARATA, E. L.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. **Phytother Res** 11:299-304, 1997.

CLINESCHMIDT, B.V.; REISS, D.R.; PETTIBONE, D.J.; ROBINSON, J.L. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors in rat stomach fundus. **J Pharmacol Exp Ther.** 235(3):696-708, 1985.

COELHO-DE-SOUZA, L. V.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MATOS, F. J. M.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. Relaxant effects of the essential oil of *E. tereticornis* on guinea-pig trachea. **Planta Medica** 71(12):1173-5, 2005.

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: Editora UFC, 1981.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants.** Columbia University: New York, 1981.

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **Am J Physiol** 266(6):620-27, 1994.

DEWHIRST, F. E. Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. **Prostaglandins**, v. 20, p. 209-222, 1980.

EBASHI, S. Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. **Annu. Rev. Physiol.** 53, 1–16, 1991.

EVANGELISTA GL, COELHO-DE-SOUZA AN, SANTOS CF, LEAL-CARDOSO JH, LOPES EA, DOS SANTOS MV, LAHLOU S, MAGALHÃES PJ. Essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* inhibits electromechanical coupling on rat isolated trachea. **J Ethnopharmacol.** 109(3):515-22, 2007.

GARDNER, E.; GRAY, D. J.; O'RAHILLY, R. **Anatomía: Estudio por Regiones del Cuerpo Humano.** 2ª ed. Barcelona: Ed. Salvat, 1971.

GRAÇA, J.R.V.; LEAL, P.R.L.; GONDIM, F.A.A.; ROLA, F.H.; SANTOS, A.A. A plethysmometric method for gastric compliance studies in anesthetized rats. **J Pharmacol Toxicol Method.** 43:25-30, 2000.

GOLDSTEIN, E.; COOPER, A. D.; TARKINGTON, B. Effect of inhaling medication vapors from a colds preparation on murine pulmonary bacterial defense systems. **J Toxicol Environ Health** 2(2):371-88, 1976.

GRUNDY, D.; AL-CHAER, E. D.; AZIZ, Q.; COLLINS, S. M.; KE, M.; TACHÉ, Y.; WOOD, J. D. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. **Gastroenterology.** 130(5):1391-411, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology.** 10. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000.

_____ **Tratado de fisiología médica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2002.

HANSEN, M. B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. **Physiol Res.** 52(1):1-30, 2003.

HASHIMOTO, T.; HIRATA, M.; ITOH, T.; KANMURA, Y.; KURIYAMA, H. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. **J Physiol.** 370:605-18, 1986.

HEANUE, T. A.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nat Rev Neurosci.** 8(6):466-79, 2007.

HOROWITZ, A.; MENICE, C. B.; LAPORTE, R.; MORGAN, K. G. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol Rev.** 76(4):967-1003, 1996.

HOWARD, C. K.: **The Gastrointestinal System.** In: Physiology, RM BERNE, MN LEVY, BM KOEPPEN, BE STANTON (eds), Mosby, St. Louis, 1998, pp 589-616.

INTERAMINENSE, L. F. L.; JUCA, D. M.; MAGALHÃES, P. J. C.; CARDOSO, J. H. L.; DUARTE, G. P.; LAHLOU, S. Pharmacological evidence of calcium channel blockade by the essential oil of *Ocimum gratissimum* and its main constituent, eugenol, in isolated aorta rings from DOCA-salt hypertensive rats. **Fundam Clin Pharmacol.** 21(5):497-506, 2007.

JUCÁ, D. M. **Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β -pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos:** efeito miorreaxante e pró-cinético. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

JUCÁ, D.M.; DA SILVA, M.T.; PALHETA, R.C. Jr.; DE LIMA, F.J.; OKOBA, W.; LAHLOU, S.; DE OLIVEIRA, R.B.; DOS SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J. The essential oil of *Eucalyptus tereticornis* and its constituents, α - and β -pinene, show accelerative properties on rat gastrointestinal transit. **Planta Med.** 77(1):57-9, 2011.

JUERGENS, U. R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respir Med.** 97:250–6, 2003.

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, n. 9, p. 407-412, 1998.

KARAKI, H. Historical techniques: cytosolic Ca^{2+} and contraction in smooth muscle. **Trends Pharmacol Sci.** 25(7):388-93, 2004.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca^{2+} release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **J Biol Chem.** 264(30):17997-8004, 1989.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Medica** 66(2):138-43, 2000.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; PINTO-DUARTE, G. I. B. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica** 65(6):553-7, 1999.

LAMMERS WJ, SLACK JR. Of slow waves and spike patches. **News Physiol Sci.** 16:138-44, 2001.

LEAR, J. T.; HEAGERTY, A. H.; TAN, B. B.; SMITH, A. G.; ENGLISH, J. S. Transient re-emergence of oil of turpentine allergy in the pottery industry. **Contact Dermatitis** 35(3):169-72, 1996.

LEWIS, D.A.; HANSON, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Prog Med Chem.** 28:201-31, 1991.

LOWE, D. A.; MATTHEWS, E. K.; RICHARDSON, B. P. The calcium antagonistic effects of cyproheptadine on contraction, membrane electrical events and calcium influx in the guinea-pig taenia coli. **Br J Pharmacol.** 74(3):651-63, 1981.

LU, M.; BATTINELLI, L.; DANIELE, C.; MELCHIONI, C.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Muscle relaxing activity of Hyssopus officinalis essential oil on isolated intestinal preparations. **Planta Med.** 68(3):213-6, 2002.

MAGALHÃES, P. J. C.; CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A; MELO, E. M.; MOTA, T. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Intestinal myorelaxant and anti-spasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother Res** 12:1-6, 1998.

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

MAIMONE T. J.; BARAN P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. **Nature Chemical Biology** 3(7), 2007.

MAKHLOUF GM. **Smooth muscle of the gut.** In: Textbook of Gastroenterology, T YAMADA (ed), J B Lippincott, Philadelphia, pp 87-107, 1995.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil.** 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000. 346 p.

_____. **Farmácias Vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** 4th ed. Fortaleza: Editora UFC; 2002.

MITA, M.; WALSH, M. P. alpha1-Adrenoceptor-mediated phosphorylation of myosin in rat-tail arterial smooth muscle. **Biochem J.** 327(3):669-74, 1997.

MCCALLUM, R. W. Cisapride: a new class of prokinetic agent. The ACG committee on FDA-related matters. American College of Gastroenterology. **Am J Gastroenterol** 86:135-49, 1991.

MCCARRON, J. G.; CRAIG, J. W.; BRADLEY, K. N.; MUIR, T. C. Agonist-induced phasic and tonic responses in smooth muscle are mediated by InsP(3). **J Cell Sci.** 115(Pt 10):2207-18, 2002.

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

MURPHY RA: **Smooth muscle.** In: Physiology, RM BERNE, MN LEVY, BM KOEPPEN, BE STANTON (eds), Mosby, St. Louis, 1998, pp 300-316.

NASELLO, A. G.; GIDALI, D.; DE SA-ROCHA, L. C.; FELICIO, L. F. Differential effects of bromopride and domperidone on cholinesterase activity in rat tissues. **Life Sci.** 56(3):151-6, 1995.

NEVES, J.R.; LIRA, G.H.; OLIVEIRA NETO, R.M.; GRAÇA, J.R.; VASCONCELOS, P.R.; NOBRE E SOUZA, M.A.; MAGALHÃES, P.J.; ROLA, F.H.; SANTOS, A.A. 1.8 cineole decreases gastric compliance in anesthetized rats. **Acta Cir Bras.** 22(1):63-7, 2007.

PARAN, T. S.; ROLLE, U.; PURI, P. Enteric nervous system and developmental abnormalities in childhood. **Pediatr Surg Int.** 22(12):945-59, 2006.

PAREKH, A. B.; PUTNEY, J. W. JR. Store-Operated Calcium Channels. **Physiological reviews** 85(2):757-810, 2005.

PRAKASH, O.; KASANA, V. K.; PANT, A. K.; ZAFAR, A.; HORE, S. K.; MATHELA, C. S. Phytochemical composition of essential oil from seeds of *Zingiber roseum* Rosc. and its antispasmodic activity in rat duodenum. **J Ethnopharmacol.** 106(3):344-7, 2006.

PUTNEY, J. W. JR. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium** 7: 1-12, 1986.

_____. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. **J Cell Biol.** 169(3):381-82, 2005.

QUINN, T.; MOLLOY, M.; SMYTH, A.; BAIRD, A. W. Capacitative calcium entry in guinea pig gallbladder smooth muscle *in vitro*. **Life Sci.** 74(13):1659-69, 2004.

REMADE. **O eucalipto em números.** Set. 2001. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/artigos_tecnicos_down.php?num=449>. Acesso em: 01 maio 2007.

_____. **O eucalipto e suas origens**. Set. 2002. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/artigos_tecnicos_down.php?num=448>. Acesso em: 01 maio 2007.

REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastro-intestinal tract of the rat. **J Physiol**. 131(2):452-62, 1956.

RIYAZI, A.; HENSEL, A.; BAUER, K.; GEISLER, N.; SCHAAF, S.; VERSPOHL, E. J. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. **Planta Med**. 73(4):355-62, 2007.

ROBBERS, J. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

ROSADO, J. A. Discovering the mechanism of capacitative calcium entry. **Am J Physiol Cell Physiol** 291:1104-1106, 2006.

RÖSCH, W.; VINSON, B.; SASSIN, I. A randomised clinical trial comparing the efficacy of a herbal preparation STW 5 with the prokinetic drug cisapride in patients with dysmotility type of functional dyspepsia. **Z Gastroenterol**. 40:401-408, 2002.

RÜHL A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol Motil**. 17(6):777-90, 2005.

RUZICKA, L. Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia** 9, 357-367, 1953.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G. R.; HAJHASHEMI, V.; KOLAGAR, A.; EBRAHIMI, M. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. **Phytomedicine** 8(5): 370-6, 2001.

SALLAM, H.S.; OLIVEIRA, H.M.; GAN, H.T.; HERNDON, D.N.; CHEN, J.D. Ghrelin improves burn-induced delayed gastrointestinal transit in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 292(1):R253-7, 2007.

SANDERS, K. M.; KOH, S.D.; ORDÖG, T.; WARD, S.M. Ionic conductances involved in generation and propagation of electrical slow waves in phasic gastrointestinal muscles. **Neurogastroenterol Motil**. 1:100-5, 2004.

SANTOS, F.A., RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineol a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTOS, F.A.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; DE ARAÚJO, R.P.; LIMA JÚNIOR, R.C.; RAO, V.S. 1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. **Food Chem Toxicol.** 42(4):579-84, 2004.

SARASWAT, B.; VISEN, P. K.; AGARWAL, D. P. Ursolic acid isolated from *Eucalyptus tereticornis* protects against ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. **Phytother Res** 14(3):163-6, 2000.

SCHEMANN, M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 41:S4-6, 2005.

SCHEMANN, M.; MICHEL, K.; ZELLER, F.; HOHENESTER, B.; RÜHL, A. Regionspecific effects of STW 5 (Iberogast) and its components in gastric fundus, corpus and antrum. **Phytomedicine.** 13:90-9, 2006.

SCHUURKES, J. A.; HELSEN, L. F.; VAN NUETEN, J. M. A comparative study on the effects of domperidone, metoclopramide, clebopride and trimebutine on the gastro-duodenal preparation of the guinea pig. **Jpn J Pharmacol.** 39(2):123-30, 1985a.

SCHUURKES, J. A.; VAN NUETEN, J. M.; VAN DAELE, P. G.; REYNTJENS, A. J.; JANSSEN, P. A. Motor-stimulating properties of cisapride on isolated gastrointestinal preparations of the guinea pig. **J Pharmacol Exp Ther.** 234(3):775-83, 1985b.

SHAH, A.J.; GILANI, A.H.; ABBAS, K.; RASHEED, M.; AHMED, A.; AHMAD, V.U. Studies on the chemical composition and possible mechanisms underlying the antispasmodic and bronchodilatory activities of the essential oil of *Artemisia maritima* L. **Arch Pharm Res.** 34(8):1227-38, 2011.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I.; MATOS, F. J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **J Ethnopharmacol.** 89:277-83, 2003.

SILVA, J. de C. **Desfazendo mitos e preconceitos.** Fev. 2003. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/artigos_tecnicos_down.php?num=422>. Acesso em: 01 maio 2007.

SILVA, J. de C; OLIVEIRA, J. T. da S. **Óleos essenciais de eucalipto II.** Ago. 2003. Disponível em: <http://www.remade.com.br/pt/artigos_tecnicos_down.php?num=492>. Acesso em: 01 maio 2007.

SMAILI, S. S.; CAVALCANTI, P. M.; OSHIRO, M. E.; FERREIRA, A. T.; JURKIEWICZ, A. Ca²⁺ release-activated channels in rat stomach smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol.** 42(1):119-22, 1998.

SMOUT, A.J. Recent developments in gastrointestinal motility. **Scand J Gastroenterol Suppl.** 243: 25–31, 2006.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature.** 372(6503):231-6, 1994.

SOUZA, M.A.; SOUZA, M.H.; PALHETA, R.C. JR.; CRUZ, P.R.; MEDEIROS, B.A.; ROLA, F.H.; MAGALHÃES, P.J.; TRONCON, L.E.; SANTOS, A.A. Evaluation of gastrointestinal motility in awake rats: a learning exercise for undergraduate biomedical students. **Adv Physiol Educ.** 33(4):343-8, 2009.

SUEMATSU, E.; HIRATA, M.; HASHIMOTO, T.; KURIYAMA, H. Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. **Biochem Biophys Res Commun.** 120(2):481-485, 1984.

SUZUKI H. Cellular mechanisms of myogenic activity in gastric smooth muscle. **Jpn J Physiol.** 50(3):289-301, 2000.

TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; TOKUDA, H. Anti-tumor-promoting activities of euglobals from *Eucalyptus* plants. **Biol Pharm Bull** 18(3):435-8, 1995.

TANSEY, M. G.; LUBY-PHELPS, K.; KAMM, K. E.; STULL, J. T. Ca²⁺-dependent phosphorylation of myosin light chain kinase decreases the Ca²⁺ sensitivity of light chain phosphorylation within smooth muscle cells. **J Biol Chem** 269(13):9912-20, 1994.

TISSERAND, A. F.; BALACS, T. Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals. New York, NY: Churchill Livingstone, 1995.

UFRET-VINCENY, C. A.; SHORT, A. D.; ALFONSO, A.; GILL, D. L. A novel Ca²⁺ entry mechanism is turned on during growth arrest induced by Ca²⁺ pool depletion. **J Biol Chem.** 10;270(45):26790-3, 1995.

WEBB RC. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ.** 27(1-4):201-6, 2003.

WEI, Q.; HARADA, K.; OHMORI, S.; MINAMOTO, K.; WEI, C.; UEDA, A. Toxicity study of the volatile constituents of Myoga utilizing acute dermal irritation assays and the Guinea-pig Maximization test. **J Occup Health.** 48(6):480-6, 2006.

ZANKER, K. S.; TOLLE, W.; BLUMEL, G.; PROBST, J. Evaluation of surfactant-like effects of commonly used remedies for colds. **Respiration** 39(3):150-7, 1980.

APÊNDICE