

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

DAVI MATTHEWS JUCÁ

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS MONOTERPENOS
 α - E β -PINENO NO MÚSCULO LISO GASTRINTESTINAL DE
RATOS: EFEITO MIORRELAXANTE E PRÓ-CINÉTICO

FORTALEZA
2007

DAVI MATTHEWS JUCÁ

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS MONOTERPENOS
 α - E β -PINENO NO MÚSCULO LISO GASTRINTESTINAL DE
RATOS: EFEITO MIORRELAXANTE E PRÓ-CINÉTICO

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães

FORTALEZA
2007

J84p Jucá, Davi Matthews

Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β -
Pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito
miorelaxante e pró-cinético / Davi Matthews Jucá; orientador:
2007.

87 f. : il.

Dissertação - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de
Medicina, 2007.

1. Monoterpenos 2. Músculo Liso 3. Trato Gastrointestinal I.
Magalhães, Pedro Jorge Caldas (Orient.). II. Título.

CDD 615.32

DAVI MATTHEWS JUCÁ

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS MONOTERPENOS α - E β -PINENO NO
MÚSCULO LISO GASTRINTESTINAL DE RATOS: EFEITO MIORRELAXANTE E
PRÓ-CINÉTICO

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

Aprovada em 20 de julho de 2007.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães (Orientador)

Prof. Adjunto de Fisiologia Humana da Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos

Prof. Associado de Fisiologia Humana da Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira

Prof. Titular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP/RP

DEDICATÓRIA

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. Pedro Jorge Caldas Magalhães pela dedicação, incentivo, atenção, apoio, amizade e por todas as lições transmitidas.

Aos ilustres membros da banca examinadora, Dr. Armênio Aguiar dos Santos e Dr. Ricardo Brandt de Oliveira, pela gentileza em aceitar o convite e pelas sugestões acrescidas à dissertação.

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 Eletrofisiologia (LEF) 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, em especial aos amigos Moisés Tolentino Bento da Silva e Raimundo Campos Palheta Junior.

À Prof^a Dr^a Leticia Veras Costa-Lotufo e seu aluno de Pós-Graduação, Diego Veras Wilke, pela contribuição na discussão sobre toxicidade.

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, pois sem eles talvez nem existisse esta dissertação.

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.

Principalmente, 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 dissertação, através das mais diversas formas: apoio, incentivo, carinho e atenção.

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.

*“Algo só é impossível até que alguém
duvide e acabe provando o contrário”*
Einstein

RESUMO

Propriedades farmacológicas dos monoterpenos α - e β -pineno no músculo liso gastrointestinal de ratos: efeito miorrelaxante e pró-cinético. Davi Matthews Jucá, Dissertação de Mestrado em Farmacologia, UFC, 2007.

α - e β -pineno são monoterpenos constituintes do óleo essencial de plantas encontradas no Nordeste do Brasil como a malva-santa e o eucalipto que, na medicina popular, são usadas no tratamento de distúrbios intestinais e respiratórios. As ações miorrelaxantes desses óleos essenciais são atribuídas à presença de α - e de β -pineno. Nosso objetivo foi estudar mais detalhadamente os efeitos desses constituintes sobre a contratilidade do músculo liso gastrointestinal e sobre o esvaziamento gástrico de líquido em ratos. No presente estudo, foram usados ratos Wistar machos (200-250g) sacrificados por deslocamento cervical. Tiras de duodeno, íleo e fundo de estômago foram cortados e mantidos em Tyrode. As contrações isométricas foram registradas através de transdutores de força conectados a sistema computadorizado. Soluções contendo α - ou β -pineno foram preparadas em Tween 80 (concentração final $\leq 0,2\%$ v/v). Usados isoladamente, α - e β -pineno diminuíram o tônus basal em duodeno com CI_{50} de 655,1 e 810,2 μ M, respectivamente. Contrações submaximais induzidas por K^+ (60 mM, K60) ou acetilcolina (ACh, 3 μ M) foram inibidas, de maneira concentração-dependente ($p < 0,001$, ANOVA), com valores de CI_{50} correspondentes a 790,0 [580,2-1007,4] e 760,0 [650,6-870,8] μ M, respectivamente, para o α -pineno e 770,1 [500,3-1180,5] e 620,7 [520,9-750,2] μ M para o β -pineno, respectivamente. Em preparações pré-tratadas com 1 mM de α - ou β -pineno, a contração fásica induzida por ACh (3 μ M) em meio sem Ca^{2+} contendo EGTA (0,2 mM) foi reduzida de $18,4 \pm 3,3\%$ para $7,7 \pm 1,5\%$ e $5,0 \pm 1,2\%$ da contração K60, respectivamente. A contração tônica induzida por adição de Ca^{2+} (2 mM) em preparações mantidas na presença de K^+ (60 mM) ou ACh (3 μ M), em meio sem Ca^{2+} contendo EGTA (0,2 mM), foi reduzida de $50,2 \pm 3,3\%$ e de $53,9 \pm 5,2\%$ para $10,6 \pm 2,6\%$ e $24,4 \pm 4,1\%$ pelo α -pineno e $6,6 \pm 1,1\%$ e $10,9 \pm 3,5\%$ pelo β -pineno, respectivamente. Em preparações pré-tratadas com 1 mM de α - ou β -pineno, a contração tônica induzida por ACh (60 μ M) em Tyrode normal contendo verapamil (3 μ M) foi reduzida de $29,0 \pm 4,1\%$ para $10,6 \pm 2,7\%$ e $12,5 \pm 2,2\%$ da K60, respectivamente. A resposta contrátil induzida pela cafeína (20 mM) em Tyrode normal foi potencializada de $47,8 \pm 3,2\%$ para $72,1 \pm 9,0$ e $88,8 \pm 10,6\%$ da resposta controle pelo pré-tratamento da preparação com α - ou β -pineno, respectivamente. Em meio sem Ca^{2+} com EGTA, a resposta contrátil da cafeína (20 mM) foi reduzida para $9,5 \pm 3,5\%$. Sob essa condição e, na presença de α - ou β -pineno, a resposta não foi alterada significativamente, correspondendo a $7,2 \pm 2,2$ e $4,7 \pm 1,3\%$, respectivamente. Após esgotamento dos estoques intracelulares com CCh (100 mM), a contração induzida por adição de Ca^{2+} (2 mM), em meio sem Ca^{2+} com EGTA (0,2 mM) e verapamil (3 μ M), foi potencializada pela adição prévia de α - ou β -pineno de $30,7 \pm 2,1\%$ para $80,6 \pm 4,7$ e $51,3 \pm 7,6\%$, respectivamente ($p < 0,05$, teste de Bonferroni). Em estudos de retenção fracional de corante no trato gastrointestinal, o α - e o β -pineno aumentaram o esvaziamento gástrico, porém, a contratilidade induzida por ACh (3 μ M) em tiras de fundo de estômago *in vitro* não foi alterada pela presença prévia de α - e β -pineno. O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que os monoterpenos α - e β -pineno apresentam efeito procinético em ratos. Em tecidos isolados, não afetam a contração colinérgica em tiras de estômago, mas apresentam atividade miorrelaxante em tecido duodenal, por provável interferência com os mecanismos celulares mediados pela formação de IP_3 . Além disso, como demonstrado 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.

Palavras-chave: α -pineno, β -pineno, terpenos, músculo liso, contratilidade, intestino, esvaziamento gástrico.

ABSTRACT

Pharmacological properties of the monoterpenes α - and β -pinene on rat gastrointestinal smooth muscle: myorelaxant and prokinetic effects. Davi Matthews Jucá, Master's Dissertation in Pharmacology, UFC, 2007.

The monoterpenes α - and β -pinene are constituents commonly found in several essential oils obtained from plants in Brazilian northeast such as “malva-santa” and “eucalipto”, 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 on smooth muscle gastrointestinal contractility as well as on liquid gastric emptying 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 Tyrode's solution. Isometric contractions were recorded through force transducers coupled to a computerized data acquisition system. Solutions containing α - or β -pinene were prepared with Tween 80 (final concentration $\leq 0,2\%$ v/v). Solely used, α - or β -pinene decreased duodenal basal tonus with IC_{50} value corresponding to 655.1 μ M and 810.2 μ M, respectively. Submaximal contractions induced by K^+ (60 mM, K60) or acetylcholine (ACh, 3 μ M) were inhibited, in a concentration-dependent manner ($p < 0.001$, ANOVA), with IC_{50} values of 790.0 [580.2-1007.4] e 760.0 [650.6-870.8] μ M, respectively to α -pinene and 770.1 [500.3-1180.5] e 620.7 [520.9-750.2] μ M, respectively to β -pinene. In tissues pre-treated with α - (1 mM) or β -pinene (1 mM) in medium without Ca^{2+} with EGTA (0.2 mM), ACh (3 μ M)-induced phasic contractions were inhibited from $18.4 \pm 3.3\%$ to $7.7 \pm 1.5\%$ and $5.0 \pm 1.2\%$ of K60, respectively. In tissues maintained under Ca^{2+} -free conditions (in medium containing EGTA 0.2 mM) and in presence of K^+ (60 mM) or ACh (3 μ M), tonic contractions induced by Ca^{2+} addition were reduced from $50.2 \pm 3.3\%$ and $53.9 \pm 5.2\%$, respectively to values corresponding to $10.6 \pm 2.6\%$ and $24.4 \pm 4.1\%$ to experiments with α -pinene and $6.6 \pm 1.1\%$ and $10.9 \pm 3.5\%$ to experiments with β -pinene, respectively. In tissues pre-treated with α - (1 mM) or β -pinene (1 mM), ACh (60 μ M)-induced tonic contractions, in verapamil (3 μ M)-containing medium, were inhibited from $29.0 \pm 4.1\%$ to $10.6 \pm 2.7\%$ and $12.5 \pm 2.2\%$ of the K60, respectively. The caffeine (20 mM)-induced contractile response in normal Tyrode's solution was potentiated from $47.8 \pm 3.2\%$ to 72.1 ± 9.0 and $88.8 \pm 10.6\%$ of the control response in virtue of α - (1 mM) or β -pinene (1 mM) presence, respectively. In EGTA-containing Ca^{2+} -free medium, the contractile response to caffeine was reduced to $9.5 \pm 3.5\%$. Under these conditions, and in presence of α - (1 mM) or β -pinene (1 mM), this response was not significantly altered, with values corresponding to 7.2 ± 2.2 e $4.7 \pm 1.3\%$, respectively. In verapamil- and EGTA-containing Ca^{2+} -free medium, after depletion of the intracellular Ca^{2+} stores by CCh (100 μ M), the contractions induced by Ca^{2+} addition were potentiated by the presence of α - (1 mM) or β -pinene (1 mM) from $30.7 \pm 2.1\%$ to 80.6 ± 4.7 and $51.3 \pm 7.6\%$, respectively ($p < 0.05$, Bonferroni's test). In gastrointestinal dye fractional retention studies, α - or β -pinene increased the rat liquid gastric emptying. On the other hand, they did not alter the ACh-induced contractions on gastric fundus strips. Our study firstly shows that, both α - and β -pinene have prokinetic properties in rats. In isolated tissues, they did not affect cholinergic contractions on gastric fundus strips, but are myorelaxant compounds on rat duodenal preparations, probably by an interference with cellular mechanisms mediated by IP_3 release. Moreover, α - and β -pinene activate capacitative Ca^{2+} entry to intracellular milieu after Ca^{2+} stores depletion.

Keywords: α -pinene, β -pinene, terpenes, smooth muscle, contractility, intestine, gastric emptying

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CAF	Cafeína
CCE	Curva concentração-efeito
CCh	Carbacol
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
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
IP ₃	Trifosfato de Inositol
K60	Solução contendo 60 mM de K ⁺
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
NCX	Trocador cálcio-sódio
ROC	Canal para cálcio operado por receptor
rpm	Rotações por minuto
SMOC	Canal para cálcio operado por segundos mensageiros
SOC	Canal para cálcio operado por estoque
TCA	Tricloroacético
TGI	Trato gastrintestinal
TN	Tyrode normal
VOC	Canal para cálcio operado por voltagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Estrutura molecular do α -pineno e do β -pineno.	18
Figura 2 -Mediação da abertura dos canais SOC pelas moléculas STIM-1 (Putney, 2005).	22
Figura 3 -Vias de regulação do influxo de cálcio pela membrana plasmática (Parekh; Putney, 2005).	23
Figura 4 -Corte transversal da parede gastrintestinal (adaptado de Heanue, 2007).	26
Figura 5 -Ondas lentas e potenciais em ponta (Guyton; Hall, 2000).	28
Figura 6 -Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade in vitro.	33
Figura 7 -Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de retenção fracional de corante.	34
Figura 8 -Efeito relaxante do α - e do β -pineno sobre o tônus basal de duodeno isolado de rato.	44
Figura 9 -Efeito inibitório do α -pineno e β -pineno sobre a contração evocada por KCl em duodeno isolado de rato.	46
Figura 10 -Efeito inibitório do α -pineno e β -pineno sobre a contração evocada por ACh em duodeno isolado de rato.	48
Figura 11 -Efeito do α - 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.	51
Figura 12 -Efeito do α - 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.	53
Figura 13 -Inibição da contração induzida por ACh pelo α -pineno e β -pineno em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA.	56
Figura 14 -Redução da contração tônica da ACh pelo α -pineno e β -pineno em Tyrode normal com Verapamil.	59
Figura 15 -Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por cafeína em Tyrode normal.	61

Figura 16 -Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por Cafeína em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA.....	63
Figura 17 -Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por Cálcio em Tyrode sem Ca^{2+} com EGTA e Verapamil.....	65
Figura 18 -Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α - ou β -pineno (1mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.....	68
Figura 19 -Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α -pineno ou β -pineno (100mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.....	69
Figura 20 -Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α -pineno ou β -pineno (300mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.....	70
Figura 21 -Efeito do α -pineno ou β -pineno na contração do fundo do estômago isolado de ratos wistar induzida por ACh 3 μM	72

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos específicos.....	30
3. METODOLOGIA.....	31
Animais e preparação dos tecidos	31
Protocolos experimentais.....	36
Soluções e drogas	41
Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

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 e até para uso interno.

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 Eletrofisiologia da UFC (Coelho-de-Souza *et al.*, 1997; Magalhães *et al.*, 1998; Lahlou *et al.*, 1999 e 2000; Magalhães *et al.*, 2003; Evangelista *et al.*, 2007). 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). 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 de dois outros constituintes do óleo essencial de *E. tereticornis*, o α - e o β -pineno (Coelho-de-Souza *et al.*, 2005) no comportamento contrátil da musculatura lisa do trato gastrintestinal.

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, 2002).

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, 2001).

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 (Gênero). 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, 2000). 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. Recentemente 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. Entretanto, praticamente não existem estudos sobre sua atividade em tecidos biológicos, a não ser uma possível atividade hepatoprotetora do ácido ursólico, um constituinte isolado das folhas desta planta (Saraswat; Visen; Agarwal, 2000). Em estudos desenvolvidos anteriormente, foi observado que o óleo essencial de *E. tereticornis* apresentou efeito miorelaxante em preparações isoladas de traquéia de cobaia (Coelho-de-Souza *et al.*, 2005). 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. Um dos principais constituintes do seu óleo essencial é o 1,8-cineol, cuja atividade é responsável pelos efeitos terapêuticos do “óleo de eucalipto”.

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 conseqüência na medicina, por possuírem um largo espectro de ações farmacológicas, desde atividades anti-câncer à capacidade de interferência em canais iônicos.

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 monoterpenóides 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).

O α -pineno e o β -pineno

Pinenos são monoterpenos encontrados em óleos essenciais de plantas existentes na região Nordeste do Brasil como a malva-santa e o eucalipto que, na medicina popular, são usadas no tratamento de distúrbios intestinais e respiratórios. Ações miorelaxantes foram demonstradas para tais óleos essenciais, sendo atribuída à presença de α -pineno e de β -pineno, parte dessas propriedades (Câmara *et al.*, 2003; Coelho-de-Souza *et al.*, 2005).

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

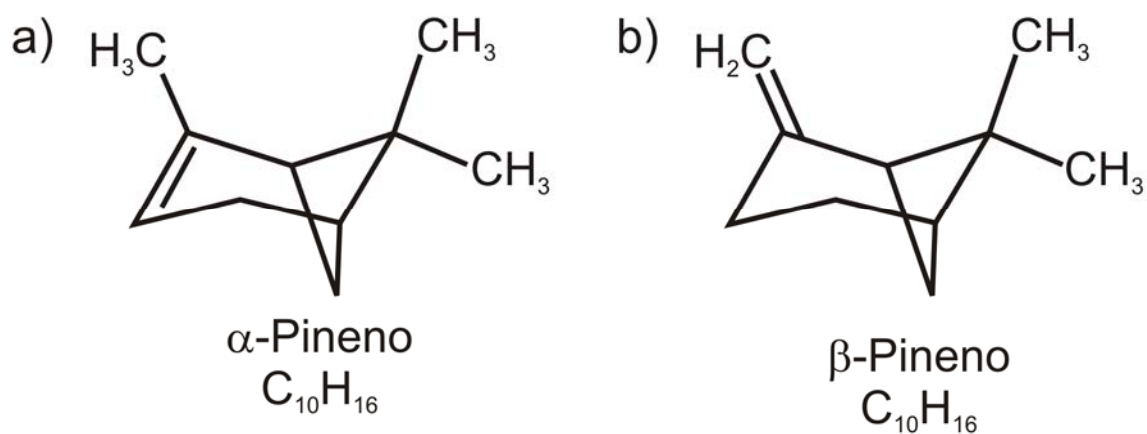


Figura 1 - Estrutura molecular do α -pineno e do β -pineno.

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 $\mu\text{g/ml}$, 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). Diante destes fatos, nos propomos a identificar os efeitos que o α -pineno e o β -pineno, isoladamente, promovem no músculo liso intestinal de rato.

O músculo liso

Guyton e Hall (2000) definem o músculo liso como músculo involuntário, que se localiza na parede dos órgãos ocos, onde pode 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, professor 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 gastrintestinal (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 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (vide figura 3) 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, que pode ocorrer por mecanismos eletromecânicos e/ou farmacomecânicos. Como exemplo de fatores positivos à entrada do cálcio por mecanismos eletromecânicos, podemos citar vários tipos de canais para cálcio: (1) os que são ativados por despolarização da membrana, também chamados dependentes de voltagem (VOC, 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 (ROC, do inglês *Receptor-Operated Channels*) e (Cuthbert *et al.*, 1994; Tansey *et al.*, 1994). (3) a entrada de cálcio capacitativa, também denominada de canal para cálcio operado por estoque (SOC, 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 (SOC) 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 2). (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).

As vias que controlam a entrada de Ca^{2+} através da membrana estão resumidas na figura 3.

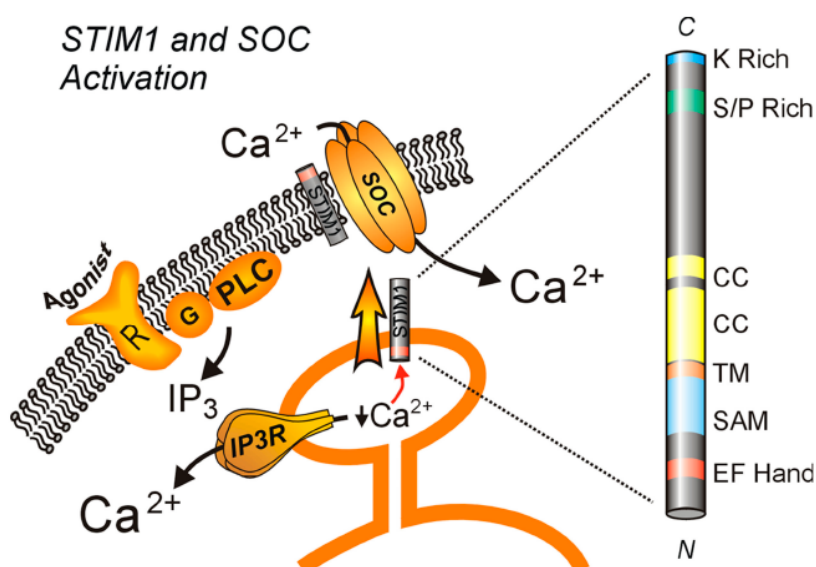


Figura 2 - Mediação da abertura dos canais SOC pelas moléculas STIM-1 (Putney, 2005).

Esquema demonstrando que após a diminuição da concentração de cálcio dentro do retículo sarcoplasmático (SR) por sua liberação através do IP_3 , o SR é capaz de liberar moléculas STIM-1 que irão mediar a abertura dos canais para cálcio operados por estoque (SOC).

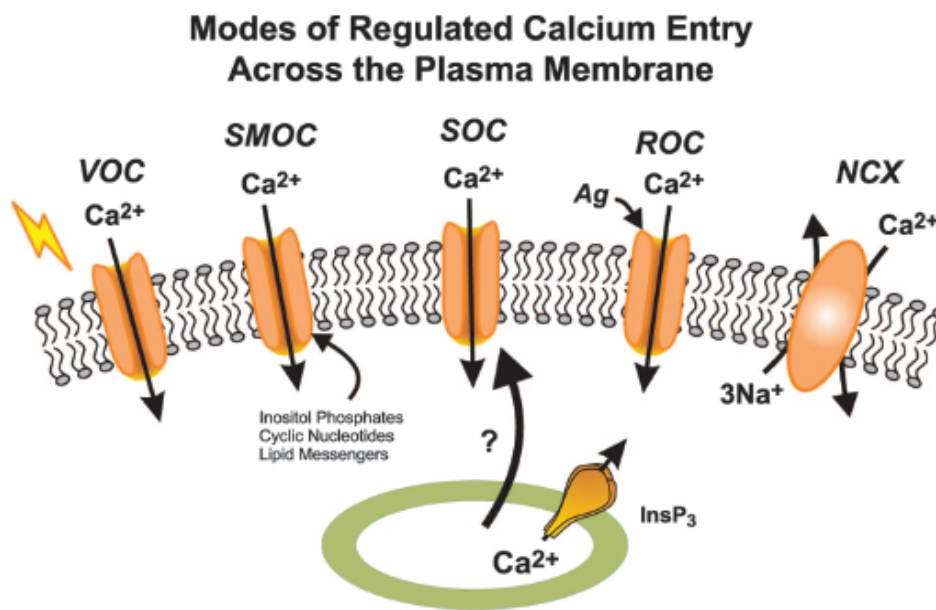


Figura 3 - Vias de regulação do influxo de cálcio pela membrana plasmática (Parekh; Putney, 2005).

Principais vias de regulação da entrada de Ca²⁺ 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 por fim, o trocador cálcio-sódio (NCX).

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. A contração muscular lisa também pode ser dividida em fase fásica e fase tônica. Essas fases estão relacionadas aos processos de aumento da concentração de Ca²⁺ 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 (VOC) e os canais para Ca^{2+} operados por receptor (ROC) 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.

Sistema digestório

Gardner, Gray e O’Rahilly (1971) definem o sistema digestório como sendo constituído de um “tubo” oco, que se origina na boca e termina no ânus e contém várias glândulas cuja secreção é expelida na cavidade desse tubo e colaboram no processo digestivo. O sistema digestório é dividido em três partes iniciais, a boca, a faringe e o ducto alimentar. O ducto alimentar é constituído pelo esôfago, o estômago (cárdia, fundo, corpo, antro e piloro), o intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e o intestino grosso (ceco, cólon e reto). As glândulas salivares (parótida, submaxilares, sublinguais etc.), o fígado e o pâncreas fazem parte do aparato digestório. Cada órgão deste aparato possui uma função específica, por exemplo: na cavidade oral os alimentos são triturados e mastigados mediante os dentes; o alimento é propelido através da faringe, do esôfago e passa para o estômago, onde irá ser misturado ao suco gástrico e formará o quimo; no intestino delgado o alimento é digerido por secreções procedentes de glândulas das paredes do intestino, assim como, o fígado e o pâncreas; a água é absorvida através do intestino grosso, que enviará o alimento em forma de fezes ao ânus para ser excretado.

O trato gastrintestinal tem como função fornecer água, eletrólitos e nutrientes para o corpo. Para que seja possível a realização desta tarefa ele carece de um mecanismo composto de cinco princípios: movimento do alimento ao longo do tubo digestivo; secreção de sucos digestivos e a digestão de alimentos; absorção dos produtos digestivos; circulação do sangue através dos órgãos gastrintestinais; controle de todas essas funções pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal (Guyton; Hall, 2000, p.718).

A figura abaixo (figura 4) mostra um corte transversal da parede gastrintestinal, onde podemos observar cinco camadas principais, de fora para dentro:

1. Serosa
2. Muscular longitudinal
3. Muscular circular
4. Submucosa
5. Mucosa

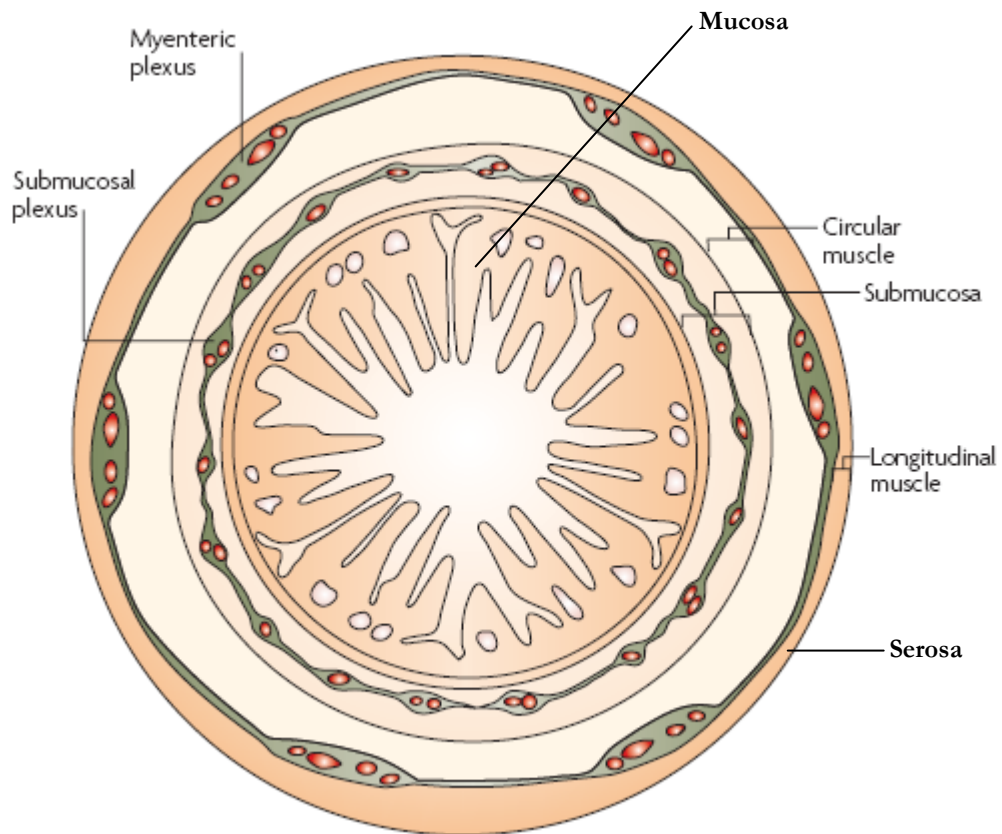


Figura 4 - Corte transversal da parede gastrintestinal (adaptado de Heanue, 2007). Esquema figurativo das diversas camadas celulares encontradas no tubo gastrintestinal.

O músculo liso gastrintestinal, 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, que podem sofrer alterações elétricas e dar origem as ondas em ponta (Makhlouf, 1995; Murphy, 1998).

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 gastrintestinal, 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 (VOC_L-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 vindo sendo descrito, 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, estimulação por acetilcolina, noradrenalina ou outros hormônios e 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).

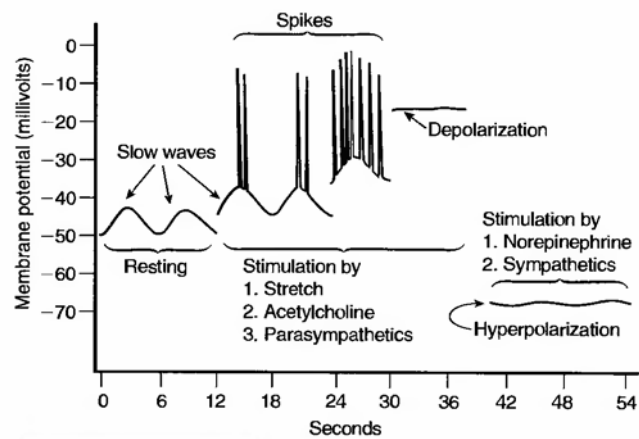


Figura 5 - Ondas lentas e potenciais em ponta (Guyton; Hall, 2000).

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.

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).

No sistema gastrointestinal, existe um mecanismo de controle essencial exercido por três tipos de reflexos (Grundy, 2006; Schemann, 2005):

1. Reflexos integrados com o sistema nervoso entérico; que controlam as secreções gastrintestinais, o peristaltismo, as contrações de mistura e os efeitos inibitórios locais.
2. Reflexos do intestino para os gânglios simpáticos pré-vertebrais que retornam ao trato gastrointestinal; são reflexos de longa transmissão (Reflexo gastrocólico, enterogástricos e colonoileal).
3. Reflexos do intestino para a medula espinhal, ou para o tronco cerebral, que retornam ao trato gastrintestinais; reflexos que controlam a atividade motora gástrica, de dor e defecação.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos farmacológicos do α -pineno e do β -pineno em músculo liso intestinal de rato in vitro.

Objetivos específicos

Determinar o efeito do α -pineno e do β -pineno sobre o tônus basal da musculatura lisa intestinal de rato;

Esclarecer o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação do α -pineno e do β -pineno sobre a contratilidade do músculo liso;

Verificar se as atividades do α -pineno e do β -pineno estão presentes nas contrações induzidas por agonistas excitatórios do músculo liso;

Descrever o mecanismo de ação para os efeitos farmacológicos encontrados do α -pineno e do β -pineno.

3. METODOLOGIA

Animais e preparação dos tecidos

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.

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).

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, duodeno e o íleo 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 para a obtenção de tiras de aproximadamente 1 cm da região do fundo. 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 8).

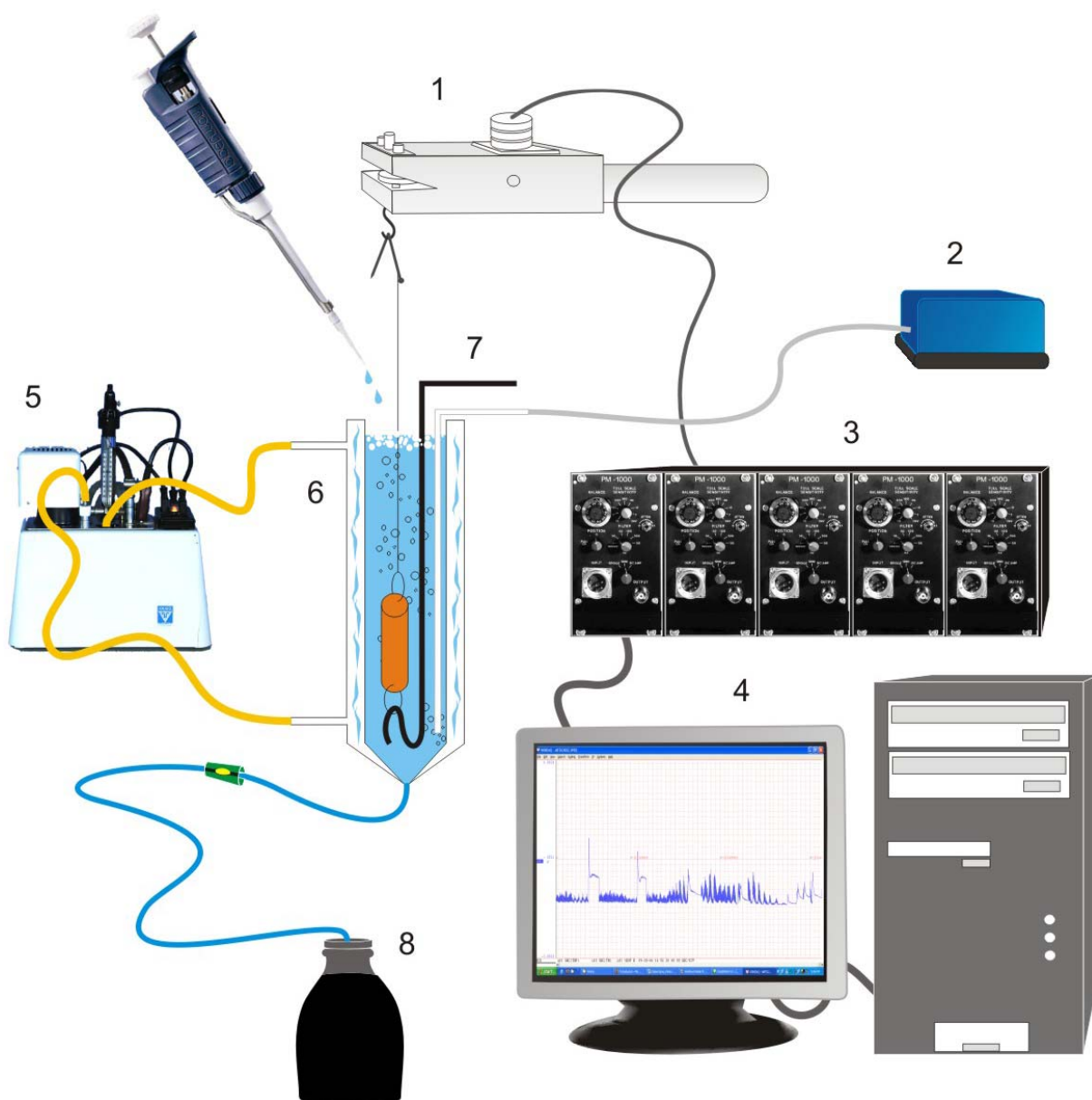


Figura 6 - Esquema simplificado dos equipamentos utilizados nos experimentos de contratilidade in vitro.

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.

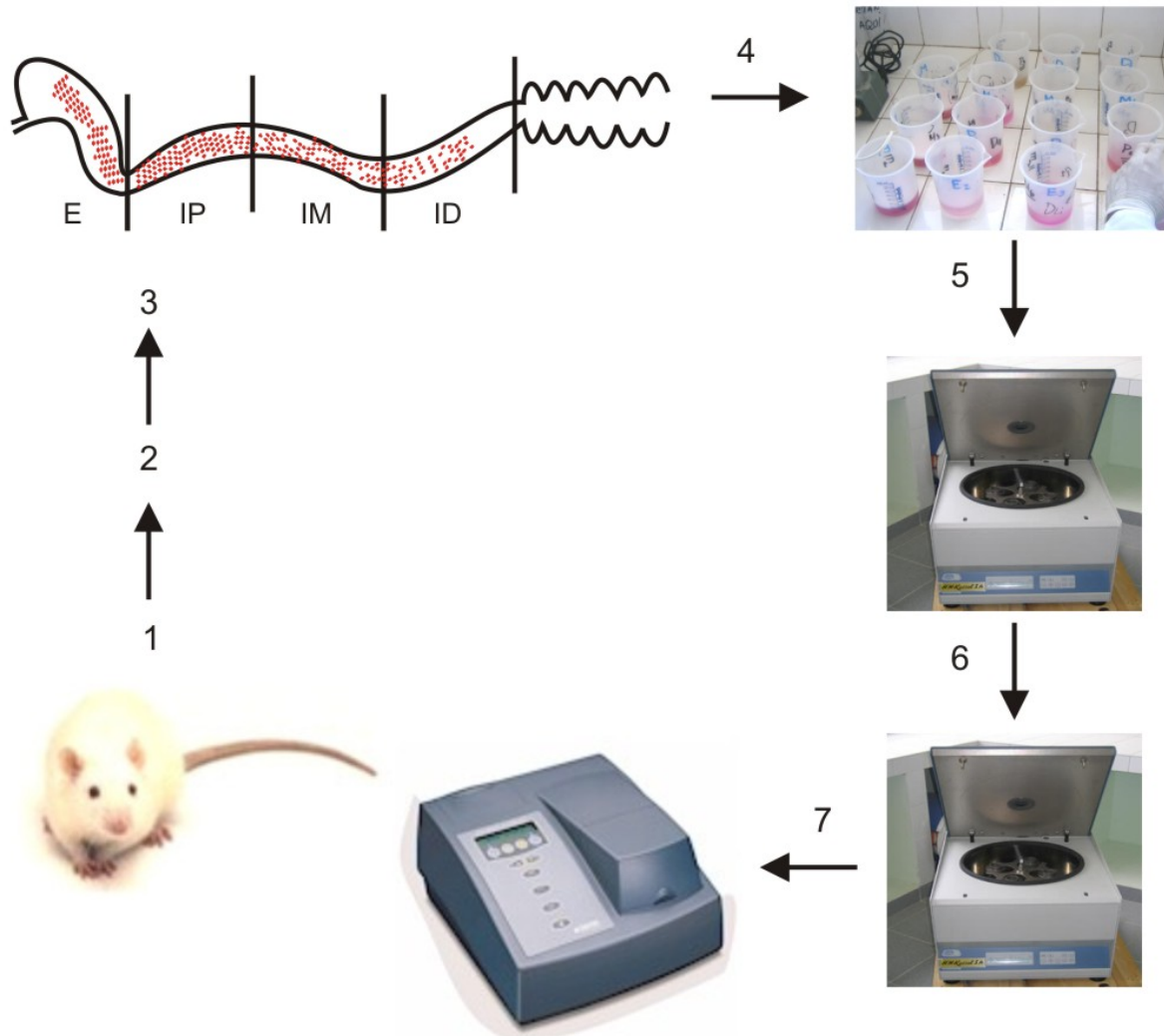


Figura 7 - Esquema simplificado da metodologia dos experimentos de retenção fracional de corante.

1) Os animais foram alimentados com α - ou β -pineno (1, 100 e 300 mg/kg) por via oral. 2) Após 20 min. foi feita a gavagem com refeição teste (vermelho fenol glicosada a 5%). 3) Sacrifício pós-prandial (10 min. após a gavagem). 4) Preparação do homogenato em 100 ml de NaOH 0,1N. 5) Retirada de 10 ml do homogenato para centrifugação por 10 min. 6) Retirada de 5 ml do sobrenadante adicionado a 500 μ l de TCA para centrifugação por 20 min. 7) Retirada de 3 ml do sobrenadante adicionado a 4 ml de NaOH 0,5N para leitura no espectrofotômetro.

Soluções e drogas

Nas soluções utilizadas neste estudo, em que concentrações de potássio (K^+) foram aumentadas (90 mM), diminuiu-se a concentração de sódio (Na^+) de maneira a manter-se a mesma osmolaridade, exceto nos experimentos com soluções hipertônicas, nos quais o K^+ foi adicionado à solução sem diminuir-se a concentração de qualquer outro íon. 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.

O α -pineno e o β -pineno, purificados e isolados, foram adquiridos da empresa Sigma[®] Chemical, assim como as demais drogas utilizadas no estudo. As soluções de α -pineno e β -pineno foram preparadas imediatamente antes de seu uso no experimento, dissolvidas, em alguns experimentos, com Tween 80 e agitadas com a utilização do aparelho Vortex. A concentração final do solvente (Tween 80) dentro da câmara de perfusão não ultrapassou 0,2%.

Protocolos experimentais

Após o período de equilíbrio (aproximadamente 30 minutos, tempo destinado para a adaptação da preparação às novas condições), os tecidos foram expostos a solução despolarizante com alta concentração de K^+ (60 mM), repetidas vezes até que fossem obtidas duas respostas de mesma amplitude (este período durou aproximadamente 30 minutos além do tempo necessário para o equilíbrio da preparação). A maior parte dos resultados apresentados é expressa como percentual da média destas duas últimas contrações.

As curvas concentração-efeito para o α -pineno e o β -pineno foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações crescentes (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600, 1000 e 3000 μ M), adicionados isoladamente e de forma cumulativa no banho (5 minutos para cada concentração). Apenas nos casos em que o objetivo foi quantificar a inibição da contração muscular produzida por um agente contraturante, as preparações foram previamente expostas ao α -pineno e ao β -pineno por um período de 5 min sendo, então, estimuladas com o agente indutor de contração, ainda na presença do α - ou do β -pineno.

Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de duodeno isolado de rato

Após equilíbrio da preparação, o α -pineno e o β -pineno, foram adicionados de forma crescente (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600, 1000 e 3000 μ M) 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 aos monoterpenos, 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.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por K^+ e ACh

A exposição prévia da preparação a uma dada concentração de α - ou β -pineno (10 a 3000 μ M) foi usada para avaliar os efeitos dessas substâncias sobre as contrações induzidas por concentrações submaximais de K^+ (60 mM) ou por acetilcolina (ACh, 3 μ M). Também foram realizados alguns experimentos utilizando o solubilizante (Tween 0,2%), realizado apenas para as maiores concentrações (1000 e 3000 μ M) dos terpenos. Após o equilíbrio do tecido configurado pela estabilização das respostas contráteis iniciais, a resposta subsequente induzida pelos agentes contraturantes K^+ ou ACh na ausência de α - ou β -pineno foram consideradas como controle para comparação das demais obtidas na presença dos monoterpenos.

Efeito do 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 ao KCl ou 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 quelante de Ca^{2+} EGTA (sigla em inglês de *ethylene glycol tetraacetic acid*, 200 μ M),

permanecendo assim por cinco minutos. Ainda na presença de solução sem Ca^{2+} e com EGTA, o tecido foi estimulado por KCl 60mM ou 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 α - ou β -pineno por 5 min.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh em meio sem cálcio na presença de EGTA

Sabe-se que a ativação de receptores colinérgicos em tecido intestinal promove contração por liberar os estoques intracelulares de Ca^{2+} via ativação de receptores ativados por IP_3 (Abdel-Latif, 1989; Kobayashi *et al.*, 1989). Assim como nos experimentos anteriores, esse protocolo foi iniciado com três contrações de KCl 60 mM na presença de Tyrode normal. Em seguida, o tecido foi lavado com Tyrode sem Ca^{2+} , o EGTA foi adicionado (200 μM) à cuba e foi induzida uma contração com ACh 3 μM . Essa última etapa foi repetida três vezes a fim de se certificar do esvaziamento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} ao manter-se baixa a concentração extracelular de Ca^{2+} , impedindo-se, assim, seu reenchimento. Esse mesmo procedimento foi realizado também após o pré-tratamento do tecido com α - ou β -pineno (1 mM).

Efeito do α -pineno e do 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 μM) foi adicionado à cuba e, passados 5 minutos, o tecido foi estimulado com uma concentração supramaximal de ACh (60 μM). 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 α - ou β -pineno (1 ou 3 mM) 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 α - ou β -pineno. A primeira contração obtida na ausência do α - ou β -pineno foi considerada como a contração controle.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por cafeína

Sabe-se que a cafeína é capaz de liberar Ca^{2+} dos estoques intracelulares por ativação do mecanismo chamado liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} , CICR (da sigla em inglês *calcium-induced calcium release*) via ativação de receptores de rianodina (Bradley *et al.*, 2002). A fim de saber se o α - ou o β -pineno interferem na contração do músculo liso ativada por essa via, em tecidos mantidos em solução de Tyrode normal e à temperatura ambiente, foram realizadas duas contrações com KCl 60 mM para estabilização do tecido nessas condições. Após essa etapa, foi utilizada cafeína (20 mM) para evocar uma contração. Em seguida, o tecido foi novamente contraído por duas vezes com KCl 60mM. A contração com cafeína (20 mM) foi novamente repetida, agora na presença de α - ou de β -pineno (1 mM). A primeira contração obtida na ausência do α - ou β -pineno foi considerada como a contração controle. O mesmo protocolo descrito acima, também foi realizado em tecidos mantidos em meio sem Ca^{2+} e com EGTA (200 μ M).

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do íleo isolado de rato induzida por Ca^{2+} em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA e verapamil

O tecido, lavado com Tyrode sem Ca^{2+} e na presença de EGTA (200 μM) e verapamil (10 μM), foi contraído com CCh (100 μM) para esvaziamento do Ca^{2+} armazenado na célula. Em seguida, após a lavagem do CCh e mantendo-se o tecido em meio sem Ca^{2+} e na presença de EGTA (200 μM) e verapamil (10 μM), foi adicionado CaCl_2 (2 mM) para promover a contração mediada pelos canais ativadas por estoque. Essa contração foi reproduzida duas vezes para confirmar a estabilidade da resposta contrátil ativada por essa via. O evento anterior foi reproduzido na presença de α -pineno ou de β -pineno 1mM e 3mM.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na retenção gástrica de líquidos

Para a realização deste protocolo foram utilizados 6 ratos wistar machos (160-200 g) para cada grupo experimental. Os ratos foram divididos em 3 grupos principais: controle, α -pineno e β -pineno. O α -pineno e o β -pineno foram administrados nas doses de 1, 10 e 100 mg/Kg. Os animais receberam por via oral (gavagem) as referidas doses e após 20 minutos foi feita a gavagem com solução marcadora (Glicose 5%, Vermelho Fenol 0,75 mg/ml de H_2O). Decorrido 10 minutos da gavagem os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o piloro e a região da cárdia foram pinçados e o trato gastrointestinal foi 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 condicionados em uma proveta contendo uma solução de NaOH (100ml, 0,1N) e, desta maneira, foi determinado o volume das vísceras. Em seguida o conteúdo da proveta foi despejado em um béquer e homogeneizado por 30

segundos. Uma amostra de 10ml desse homogenato foi colocada e centrifugada por 10 minutos (2800 rpm). Em seguida foi retirado 5ml 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, 3ml do sobrenadante foi adicionado a 4ml 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) para a posteriori relacionar o percentual da retenção de vermelho fenol de cada segmento pelo total de vermelho fenol em todos os segmentos multiplicado por 100.

Efeito do α -pineno e do β -pineno nas contrações induzidas por ACh em tiras de fundo de estômago isolado de rato

A exposição prévia da preparação a uma dada concentração de α - ou β -pineno (1 a 3000 μ M) foi usada para avaliar os efeitos dessas substâncias sobre as contrações induzidas por concentrações submaximais de acetilcolina (ACh, 3 μ M). Após o equilíbrio do tecido configurado pela estabilização das respostas contráteis iniciais, a resposta subsequente induzida pelo agente ACh na ausência de α - ou β -pineno foi considerada como controle para comparação das demais obtidas na presença dos monoterpenos.

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).

4. RESULTADOS

Efeito do α -pineno e do β -pineno no tônus basal de duodeno isolado de rato

Usados separadamente, o α - ou o β -pineno (1 a 3000 μ M), de maneira dependente de concentração ($p < 0,001$, ANOVA) diminuíram o tônus basal. O efeito relaxante foi evidenciado de maneira significativa ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) a partir de 100 μ M para o β -pineno e 600 μ M para o α -pineno (figura 10). A inibição do tônus basal foi parcialmente reversível ($p < 0,05$, teste t pareado) após 15 minutos da retirada dos monoterpenos por lavagens sucessivas da preparação com Tyrode. Nesse tempo, a recuperação do tônus correspondeu a $357,01 \pm 73,18$ % e $221,10 \pm 30,02$ % do relaxamento total obtido na concentração de 3000 μ M de α - ou β -pineno, respectivamente.

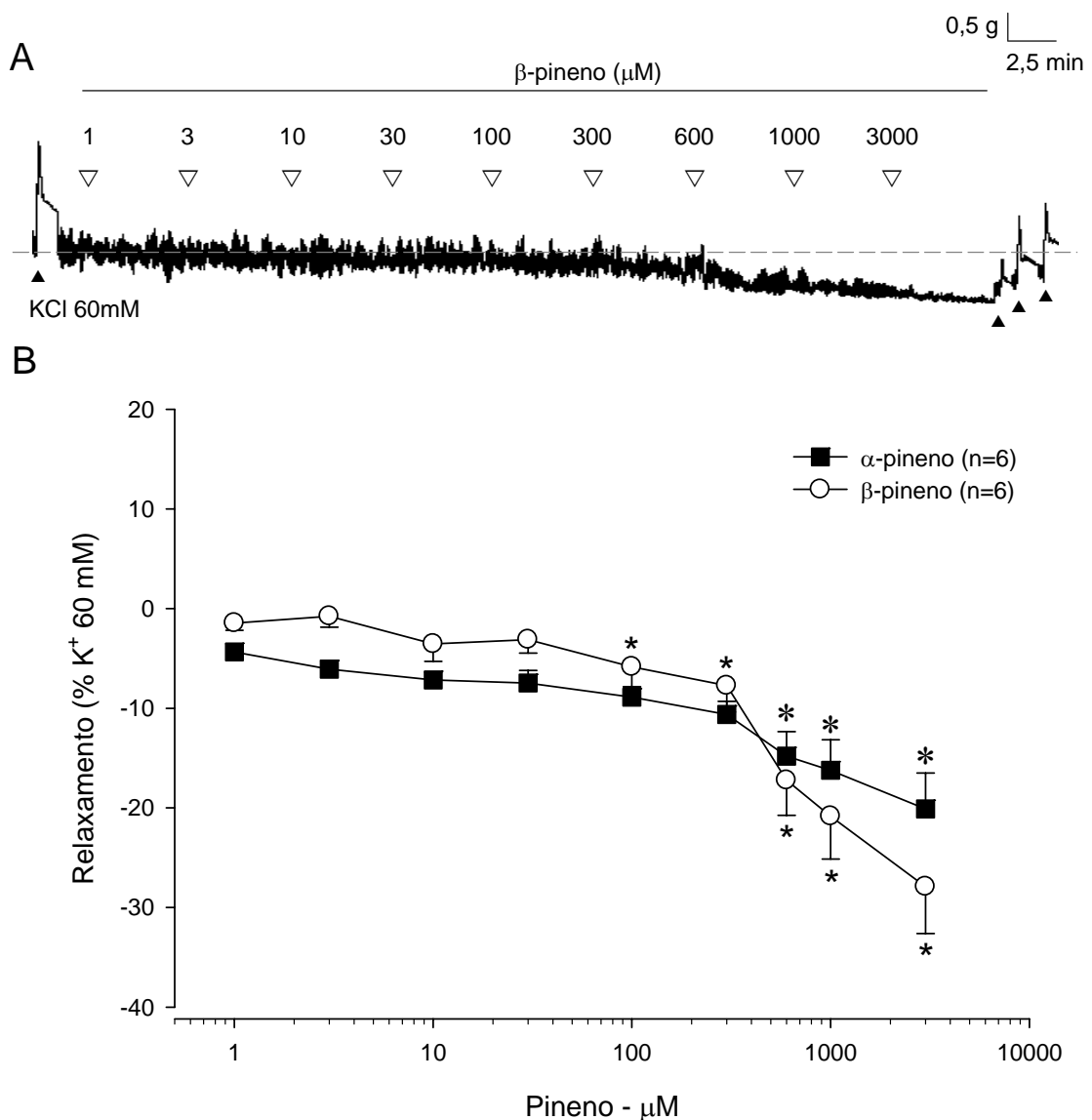


Figura 8 - Efeito relaxante do α - e do β -pineno sobre o tônus basal de duodeno isolado de rato.

(A) Traçado típico de experimento com β -pineno demonstrando seu efeito relaxante sobre o tônus basal de duodeno isolado de rato. O β -pineno (1 a 3000 μ M) 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. (B) O gráfico mostra as médias do efeito relaxante do α -pineno (\blacksquare , n=6) e do β -pineno (\circ , n=6) no tônus basal de duodeno isolado de rato. Os valores estão expressos como percentual da contração induzida por K60. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * e *, p < 0,05, teste de Bonferroni, comparados ao tônus basal no período controle.

Efeito do α - e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por K^+ e ACh

Adicionados à solução de banho por um período prévio de 5 minutos, α - ou β -pineno inibiram, de maneira dependente de concentração ($p < 0,001$, ANOVA), as contrações submaximais induzidas por KCl 60mM (Figura 11) ou ACh 3 μ M (Figura 12). Para as contrações induzidas por KCl 60 mM, os valores de CI_{50} corresponderam a 790 [580-1007] mM ($n = 6$) e 770 [500-1180] μ M ($n=6$) para o α -pineno e para o β -pineno, respectivamente. Os efeitos inibitórios foram significativos nas concentrações de 1 mM ($p < 0,001$, teste Bonferroni). Para as contrações induzidas por ACh os valores de CI_{50} corresponderam a 760 [650-870] μ M ($n = 6$) e 620 [520-750] μ M ($n = 6$) para α - e β -pineno, respectivamente. Os efeitos foram significativos nas concentrações de 0,6 mM ($p < 0,05$, teste de Bonferroni). A comparação estatística desses valores não revelou diferença significativa entre eles ($p > 0,05$, teste t não pareado). A inibição das respostas contráteis ao KCl e à ACh foi reversível após retirada dos monoterpenos por lavagens sucessivas da preparação. A realização de experimentos usando apenas o veículo nas concentrações correspondentes às usadas para dissolver o α - ou o β -pineno (1 ou 3 mM) mostrou efeito inibitório apenas para a concentração mais alta. Nesse caso, a resposta contrátil foi reduzida significativamente ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) para $61,2 \pm 10,8\%$ e $73,0 \pm 5,5\%$ das contrações controle induzidas por KCl 60 mM ou ACh 3 μ M, respectivamente. Entretanto, a análise estatística mostrou que esses valores diferem daqueles obtidos para o α - ($14,8 \pm 13,1\%$ e $11,9 \pm 1,9\%$, para KCl e ACh, respectivamente) ou β -pineno ($9,1 \pm 1,7\%$ e $6,2 \pm 1,7\%$, para KCl e ACh, respectivamente) ($p < 0,05$, teste de Bonferroni).

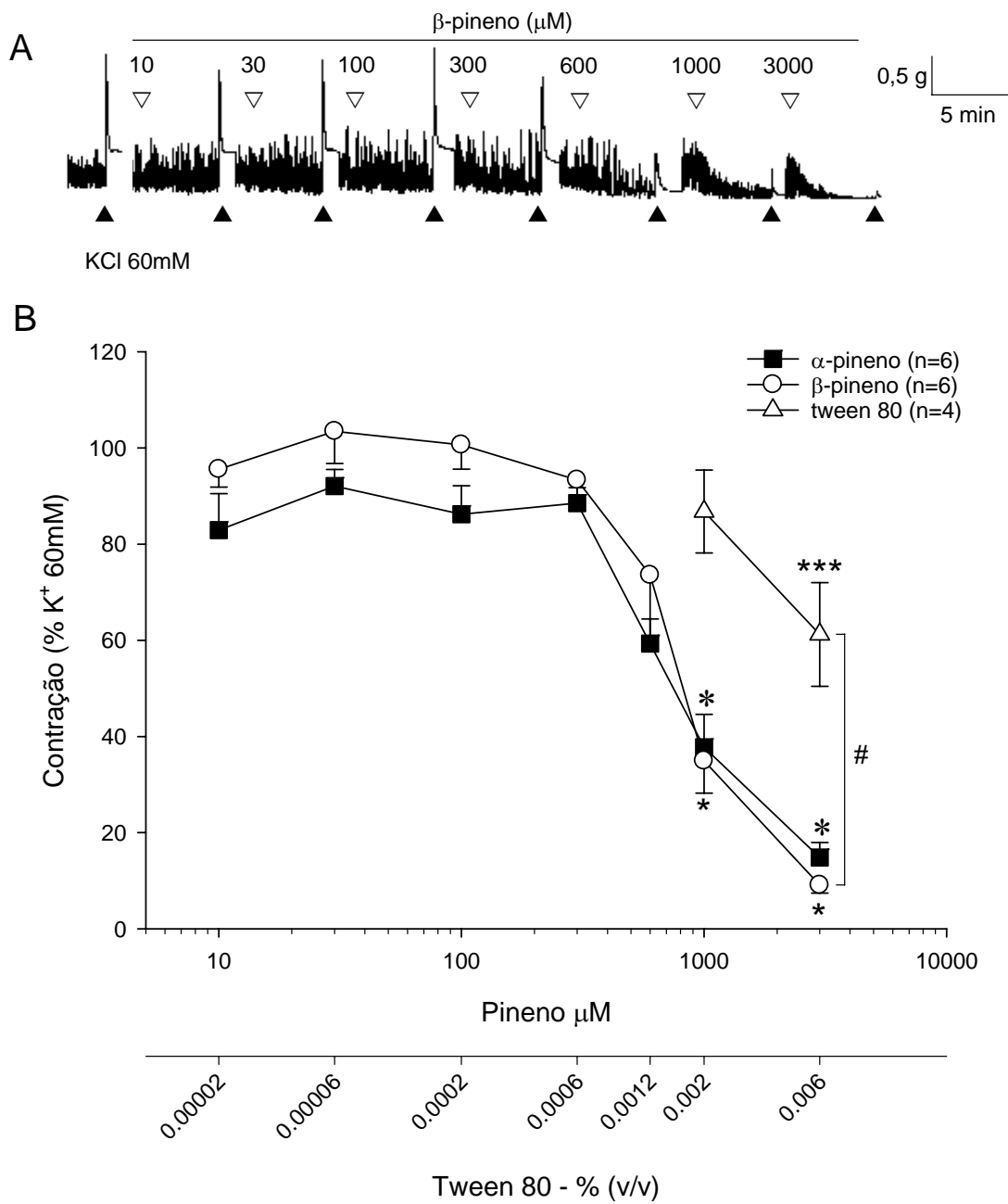


Figura 9 - Efeito inibitório do α -pineno e β -pineno sobre a contração evocada por KCl em duodeno isolado de rato.

(A) Traçado típico usado para demonstrar o efeito inibitório do β -pineno (1 a 3000 μM) na contração induzida por KCl 60 mM. O símbolo (\blacktriangle) indica o momento da aplicação da solução despolarizante durante o experimento. A primeira contração induzida por K^+ 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 K^+ , 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. Os experimentos para estudo do α -pineno foram semelhantes aos descritos acima.

(B) O gráfico mostra a média da inibição da contração induzida por KCl 60 mM pelo α -pineno (\blacksquare , n=6) e β -pineno (\circ , n=6) (1 a 3000 μM) e também pelo Tween 80 (\triangle , n=4, em concentrações correspondentes àquelas usadas com 1000 e 3000 μM de α - ou β -pineno). Os valores estão expressos em percentual da contração controle induzida por KCl 60 mM na ausência de pineno. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * e *, $p < 0,05$, teste de Bonferroni em relação à contração controle para α - ou β -pineno, respectivamente. #, $p < 0,05$, teste de Bonferroni, comparando a resposta obtida pelo α - ou β -pineno (3 mM) e a resposta observada apenas com o veículo.

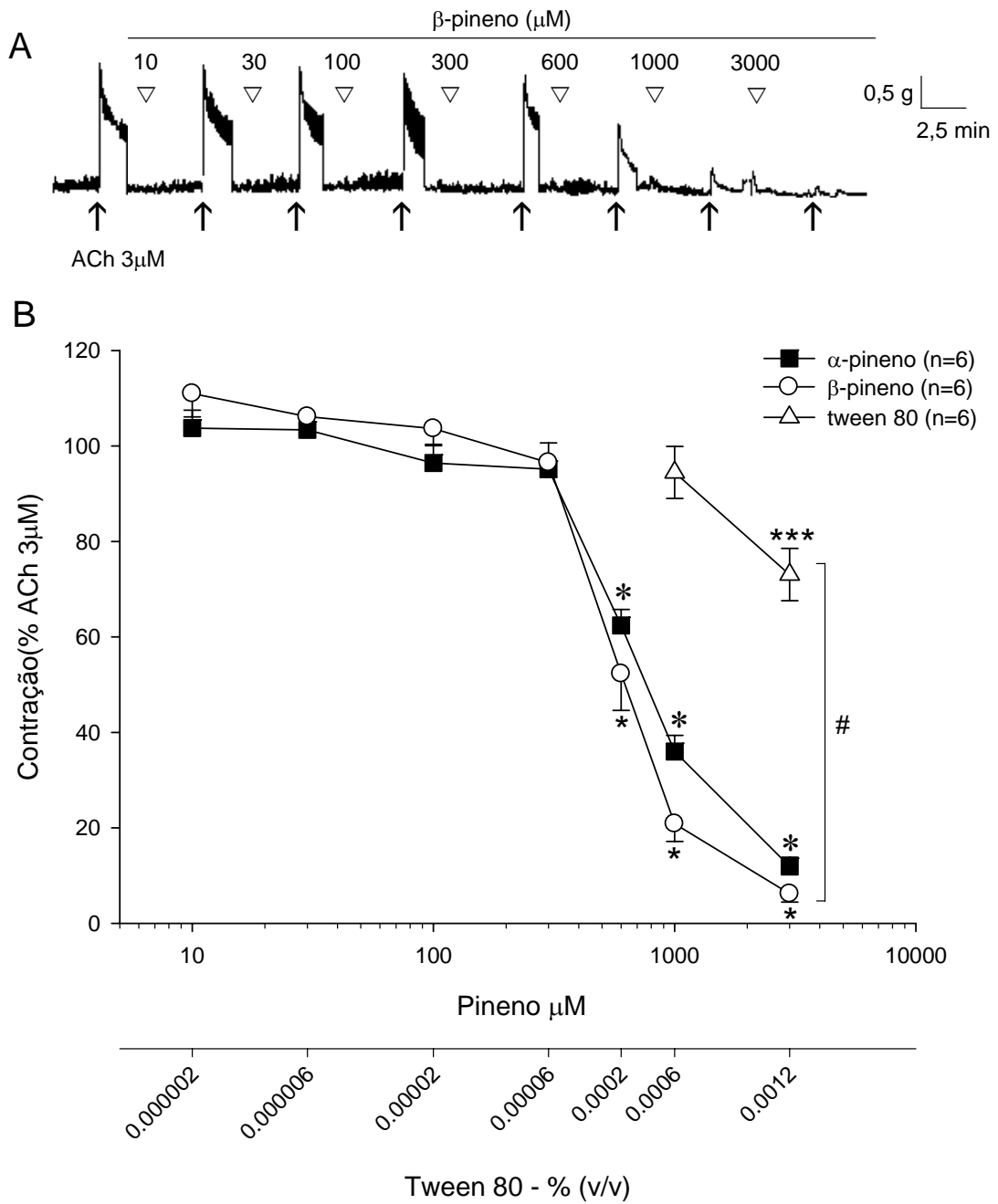


Figura 10 - Efeito inibitório do α -pineno e β -pineno sobre a contração evocada por ACh em duodeno isolado de rato.

(A) Traçado típico usado para demonstrar o efeito inibitório do β -pineno (1 a 3000 μ M) na contração induzida por ACh 3 μ M. O símbolo (\blacktriangle) indica o momento da aplicação da solução colinérgica 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 μ M). 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. Os experimentos para estudo do α -pineno foram semelhantes aos descritos acima.

(B) O gráfico mostra a média da inibição da contração induzida por ACh pelo α -pineno (\blacksquare , n=6) e β -pineno (\circ , n=6) (1 a 3000 μ M) e também pelo Tween 80 (\triangle , n=6, em concentrações correspondentes àquelas usadas com 1000 e 3000 μ M de α - ou β -pineno). Os valores estão expressos em percentual da contração controle induzida por ACh 3 μ M na ausência de pineno. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * e *, p < 0,05, teste de Bonferroni em relação à contração controle para α - ou β -pineno, respectivamente. #, p < 0,05, teste de Bonferroni, comparando a resposta obtida pelo α - ou β -pineno (3 mM) e a resposta observada apenas com o veículo.

Efeito do 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 ao K^+ ou à ACh

Para estudar os efeitos do α - 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 K^+ (60 mM) ou com ACh (3 μM), seguidos da adição gradual de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,1, 1 e 2 mM). Nessas condições, o α - ou o β -pineno 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 $50,2 \pm 3,3\%$ no controle para $10,6 \pm 2,6\%$ e $6,6 \pm 1,1\%$ pelo α - ou β -pineno, respectivamente, nas preparações induzidas por K^+ (Figura 13). Para essa mesma concentração de Ca^{2+} , em preparações estimuladas com ACh, a resposta foi reduzida de $53,9 \pm 5,2\%$ para $24,4 \pm 4,1\%$ e $10,9 \pm 3,5\%$ pelo α - ou β -pineno, respectivamente (Figura 14). A análise estatística dos dados mostra que os valores obtidos para α - ou β -pineno diferem significativamente daqueles observados no controle ($p < 0,05$, *two-way* ANOVA). Os dados estão apresentados em % dos valores obtidos nas primeiras contrações induzidas por KCl 60 mM em Tyrode normal.

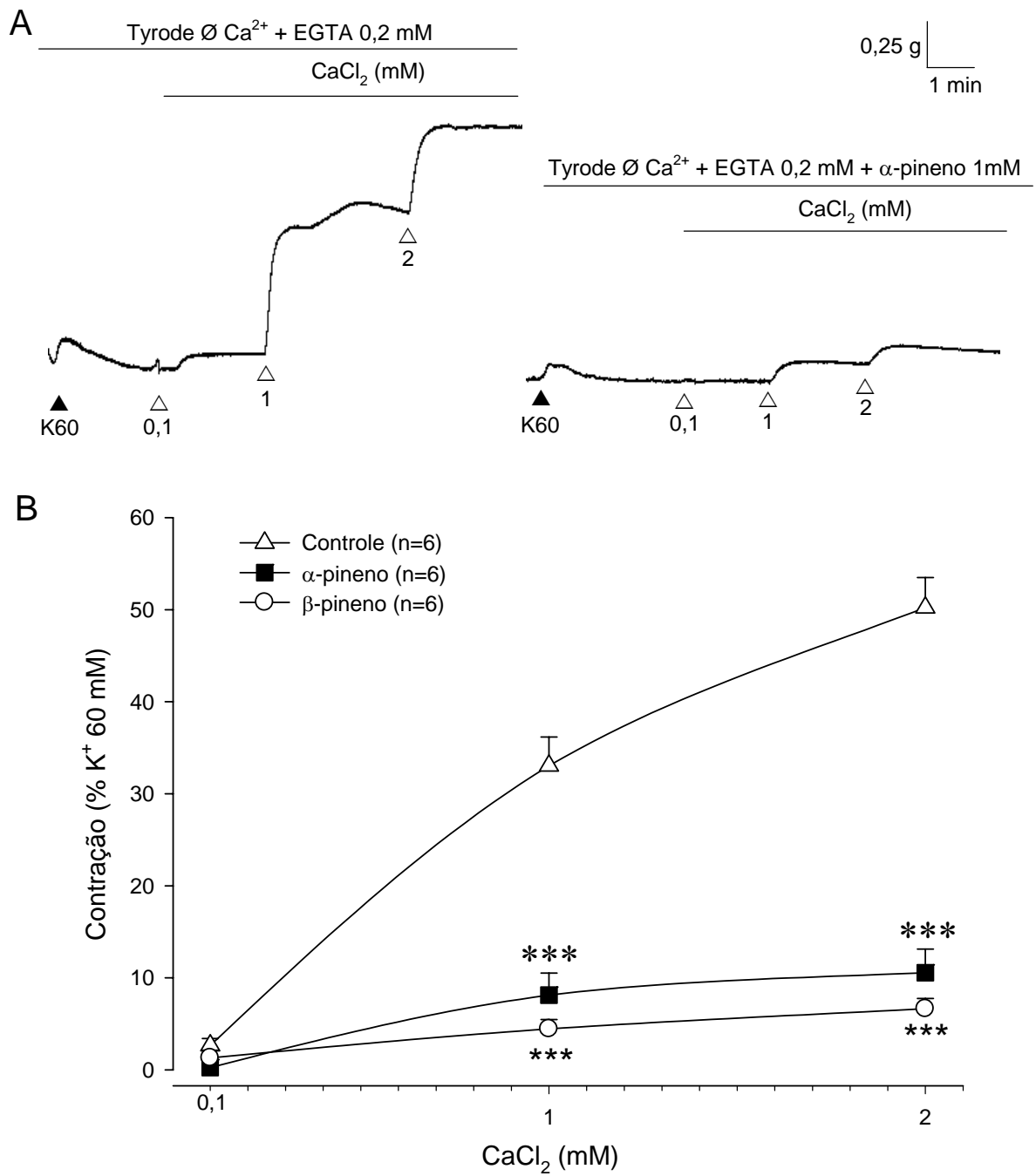


Figura 11 - Efeito do α - e do β -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de KCl

(A) Traçado típico 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+} ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$) com EGTA 0,2 mM na ausência (traçado à esquerda) e na presença do α -pineno (1 mM, 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). Após cada curva contrátil induzida por Ca^{2+} , a preparação foi lavada por um período de aproximadamente 10 min para adicionar a concentração de α -pineno (1 mM). As etapas de lavagens não foram registradas para que o traçado fosse mostrado de forma a facilitar a visualização dos efeitos. Os experimentos para estudo do β -pineno foram semelhantes aos descritos acima.

(B) O gráfico mostra a média das contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na ausência (\triangle , n=6) ou presença de α -pineno (\blacksquare , 1 mM, n = 6) e β -pineno (\circ , 1 mM, n = 6). 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.). *** e ***, $p < 0,001$, teste de Holm-Sidak para os efeitos obtidos para α - ou β -pineno, respectivamente, em relação à resposta obtida no controle.

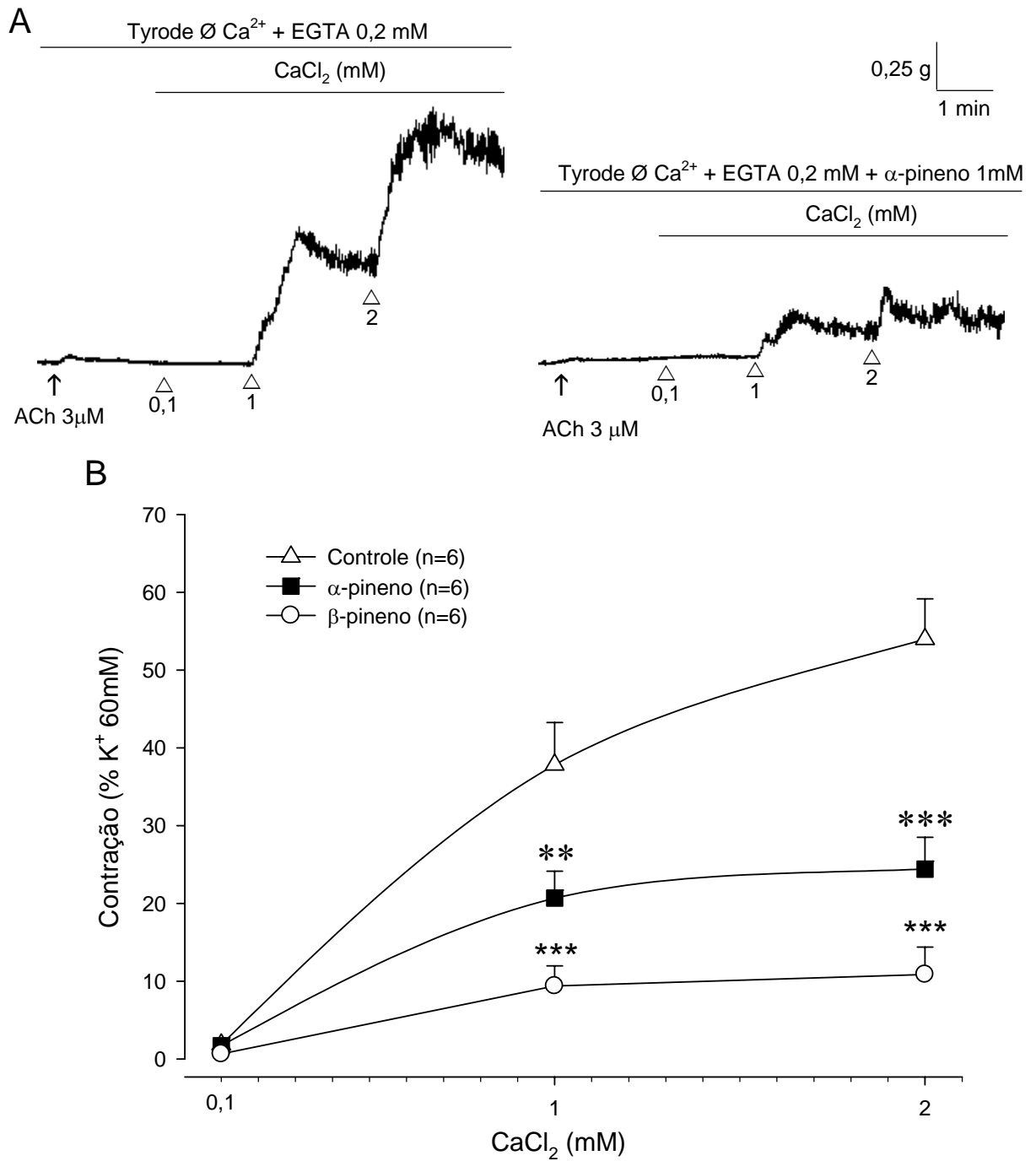


Figura 12 - Efeito do α - e do β -pineno sobre a contração induzida pela adição de Ca^{2+} em preparações mantidas em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA na presença de ACh.

(A) Traçado típico 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+} ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$) com EGTA 0,2 mM na ausência (traçado à esquerda) e na presença do α -pineno (1 mM, 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). Após cada curva contrátil induzida por Ca^{2+} , a preparação foi lavada por um período de aproximadamente 10 min para adicionar a concentração de α -pineno (1 mM). As etapas de lavagens não foram registradas para que o traçado fosse mostrado de forma a facilitar a visualização dos efeitos. Os experimentos para estudo do β -pineno foram semelhantes aos descritos acima.

(B) O gráfico mostra a média das contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na ausência (Δ , n=6) ou presença de α -pineno (\blacksquare , 1 mM, n = 6) e β -pineno (\circ , 1 mM, n = 6). 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.). ** ($p < 0,01$), *** e **** ($p < 0,001$) teste de Holm-Sidak para os efeitos obtidos para α - ou β -pineno, respectivamente, em relação à resposta obtida no controle.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por ACh em meio sem cálcio na presença de EGTA

Para avaliar o efeito do α - ou β -pineno sobre contrações mediadas pelo Ca^{2+} liberado de estoques intracelulares foram executados experimentos com preparações mantidas em solução sem Ca^{2+} ($\emptyset \text{Ca}^{2+}$) com EGTA (0,2 mM), estimuladas com ACh. Sob essas condições, a ACh (3 μM) produz contração fásica característica, cuja amplitude corresponde a $18,4 \pm 3,3$ % da contração induzida por K^+ 60 mM (n = 6) (Figura 15). Além da redução em sua amplitude, nota-se também a incapacidade de sustentação dessa contração, ao contrário do que se observa quando a ACh é usada na mesma concentração em meio contendo Ca^{2+} (Figura 15, painel A). O pré-tratamento dos tecidos com α - (1 mM) ou β -pineno (1 mM) produziu redução significativa ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) da contração para $7,7 \pm 1,5$ % e $5,0 \pm 1,2$ % da contração obtida por K^+ 60 mM inicial.

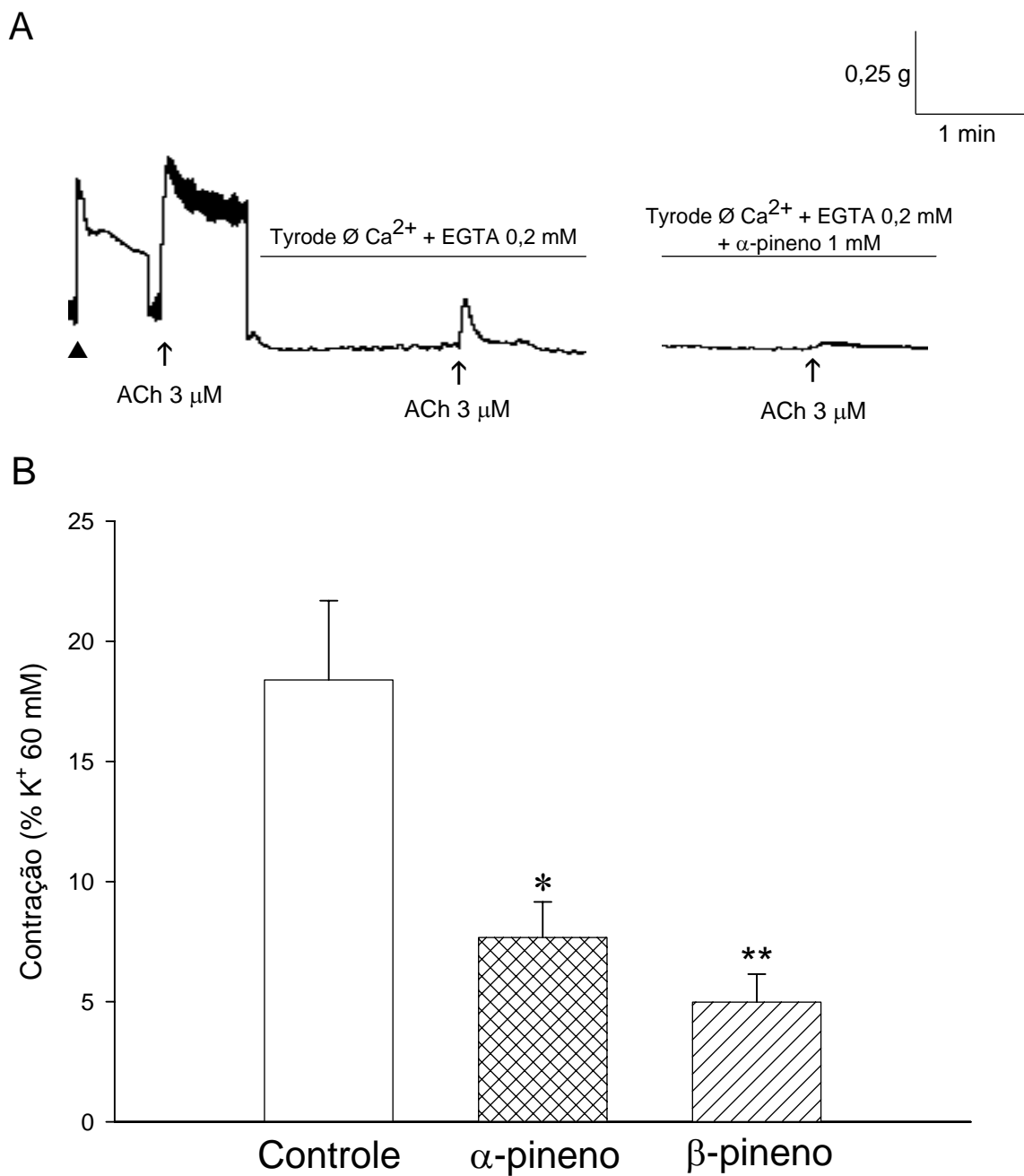


Figura 13 - Inibição da contração induzida por ACh pelo α -pineno e β -pineno em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA.

(A) Traçado típico de 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 3 μ M. Nota-se um pico inicial seguido de pequeno decaimento até atingir valor estacionário característico de fase tônica da contração. Após exposição do tecido a solução sem Ca^{2+} com EGTA (0,2 mM) nota-se redução da contração induzida por ACh e perda da capacidade de manutenção da segunda fase da contração. Após período de lavagens para reenchimento dos estoques, a repetição do protocolo na presença de α - (1 mM) ou β -pineno (1 mM) demonstrou redução da amplitude dessa contração.

(B) O gráfico mostra as médias do efeito inibitório do α -pineno (1mM, n=6) e do β -pineno (1mM, n=6) sobre a contração induzida por ACh 3 μ M em Tyrode \emptyset Ca^{2+} e EGTA 0,2mM. Os valores estão expressos em percentual da contração induzida por KCl 60mM realizadas no início dos experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). * e **, $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, para os efeitos inibitórios do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle.

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

Para avaliar o efeito do α - 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 (Figura 16, painel A). 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 $29,0 \pm 4,1\%$ da contração induzida por K^+ 60 mM inicial. O pré-tratamento dos tecidos com α - (1 e 3 mM) produziu redução significativa ($p < 0,05$, teste de Bonferroni) da contração para $10,6 \pm 2,7\%$ e $12,5 \pm 2,2\%$ da contração obtida por K^+ 60 mM (Figura 16, painel B). Por outro lado, o β -pineno (1 e 3 mM) reduziu essa contração apenas na concentração de 3 mM, que correspondeu a $5,5 \pm 1,3\%$ da resposta K^+ 60 mM.

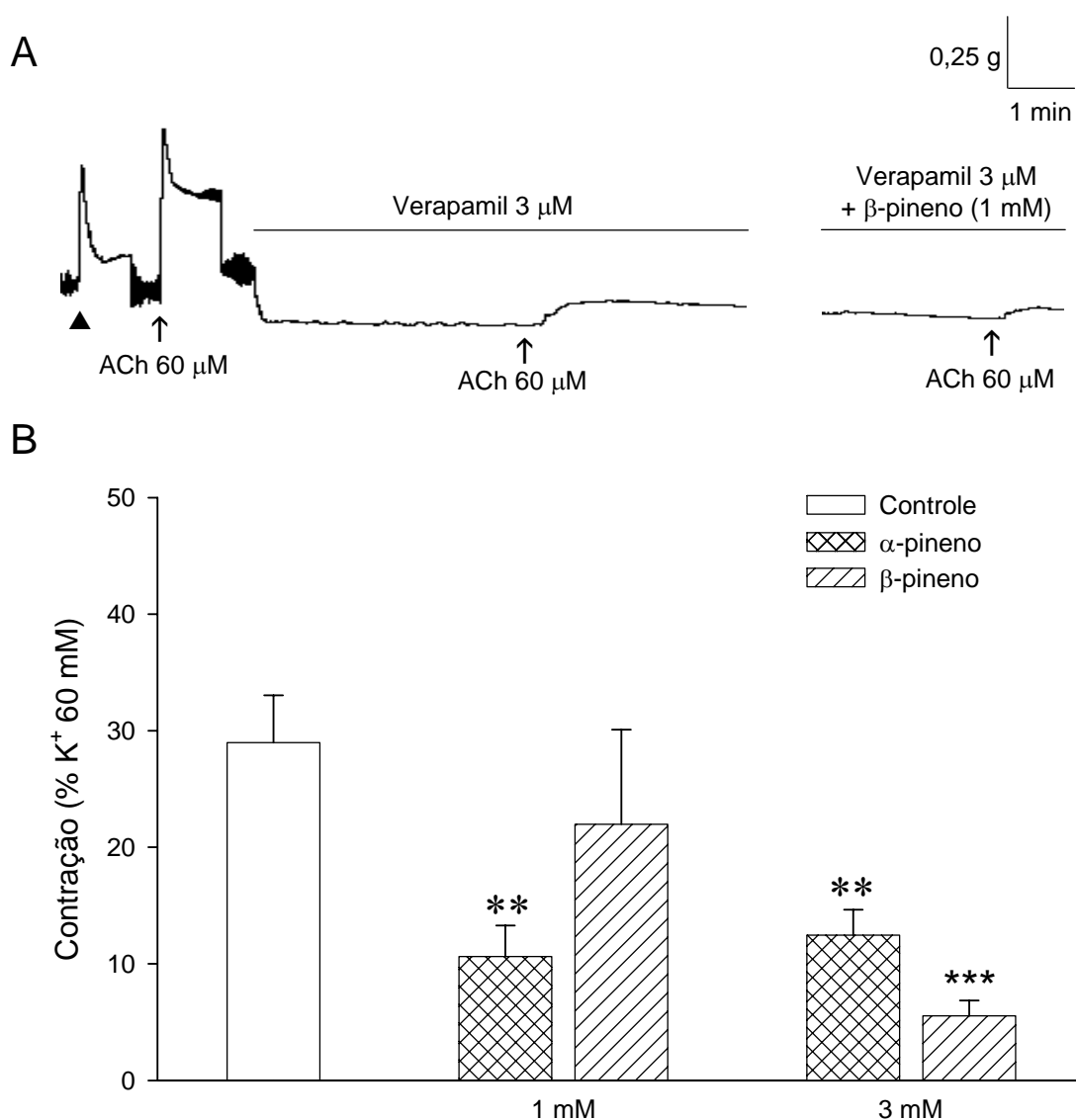


Figura 14 - Redução da contração tônica da ACh pelo α -pineno e β -pineno em Tyrode normal com Verapamil.

(A) Traçado típico de 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 α - (1 e 3 mM) ou β -pineno (1 e 3 mM) demonstrou redução da amplitude dessa contração.

(B) O gráfico mostra as médias do efeito inibitório do α -pineno (1mM, n=6) e do β -pineno (1mM, n=6) sobre a contração induzida por ACh 60 μ M em Tyrode com verapamil (3 μ M). Os valores estão expressos em percentual da contração induzida por KCl 60mM realizadas no início dos experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). ** e ***, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente, para os efeitos inibitórios do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por cafeína em Tyrode normal

Para a realização dos protocolos descritos a seguir, os tecidos foram mantidos à temperatura ambiente ($\cong 25^{\circ}\text{C}$), a fim de se estudar os efeitos do α - ou β -pineno sobre as contrações induzidas pela liberação de Ca^{2+} induzida pelo próprio Ca^{2+} . Da mesma forma que os experimentos anteriores, os tecidos foram estimulados inicialmente com solução despolarizante contendo K^{+} 60 mM (\blacktriangle , Figura 17, painel A). A adição de cafeína (20 mM) produziu contração fásica cuja amplitude foi correspondente a $47,8 \pm 3,2\%$ ($n = 12$) da resposta potássica controle. A repetição desse procedimento demonstra que a contração induzida pela cafeína é reprodutível e de amplitude constante (Figura 17, painel A). Na presença de α - (1 mM) ou β -pineno (1 mM), a resposta contrátil induzida pela cafeína foi potencializada para $72,1 \pm 9,0$ e $88,8 \pm 10,6\%$ da resposta controle, respectivamente.

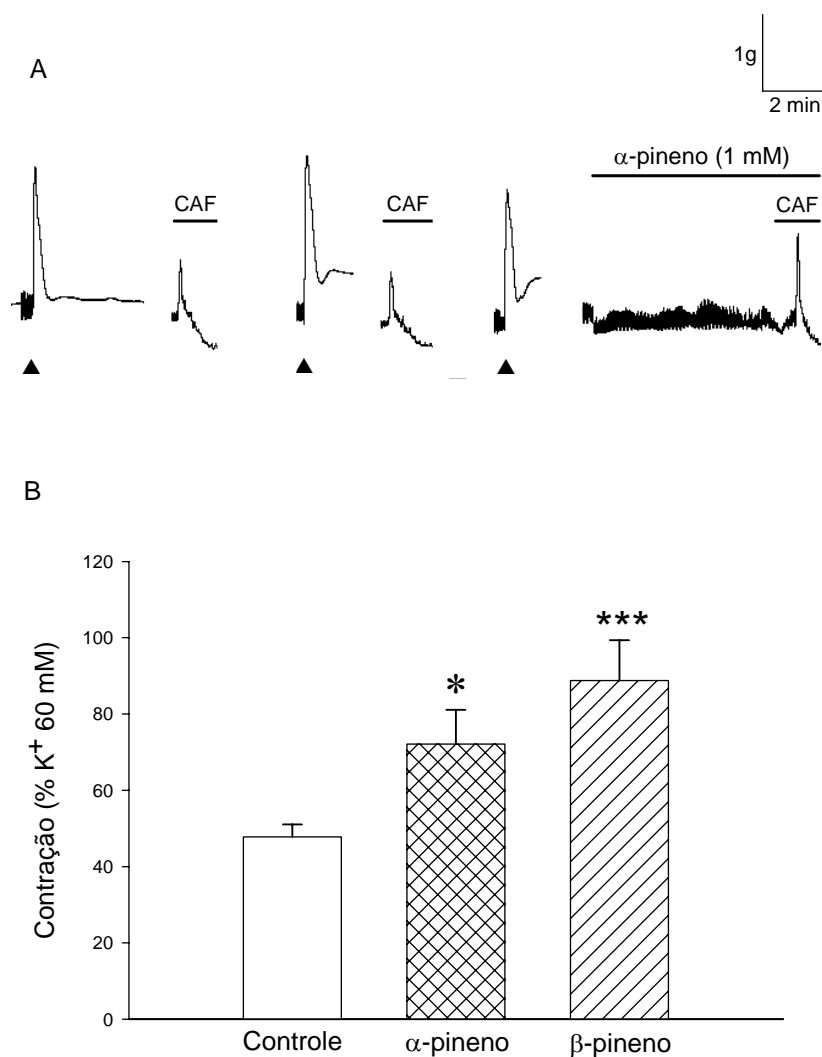


Figura 15 - Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por cafeína em Tyrode normal.

(A) Traçado típico de experimento com duodeno isolado de rato mantido em Tyrode normal em temperatura ambiente ($\cong 25^{\circ}\text{C}$). O tecido foi estimulado inicialmente com K^{+} (60 mM, ▲). Após lavagem da preparação com Tyrode normal, o tecido foi estimulado com cafeína (CAF, 20 mM). Note a redução do tônus basal após a contração fásica promovida pela cafeína. A repetição desse procedimento demonstra a reprodutibilidade da resposta contrátil induzida pela cafeína. Contrações subseqüentes de K^{+} foram relaizadas para garantir reenchimento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} .

(B) O gráfico mostra as médias da amplitude das contrações induzidas por cafeína na ausência (Controle) e na presença do α -pineno (1mM, n = 6) e do β -pineno (1mM, n = 6) em preparações mantidas em Tyrode normal. 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.). * e ***, $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente, para os efeitos potencializadores do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração do duodeno isolado de rato induzida por cafeína na presença de EGTA em Tyrode sem cálcio

De acordo com a descrição feita no protocolo anterior, o presente experimento foi realizado também à temperatura ambiente ($\cong 25^{\circ}\text{C}$), a fim de se estudar os efeitos do α - ou β -pineno sobre as contrações induzidas pela liberação de Ca^{2+} dos estoques internos e a influência da sua presença no meio extracelular no efeito anteriormente relatado. Da mesma forma que os experimentos anteriores, os tecidos foram estimulados inicialmente com solução despolarizante contendo K^{+} 60 mM (\blacktriangle , Figura 18, painel A). A adição de cafeína (20 mM) produziu contração fásica cuja amplitude foi correspondente a $32,1 \pm 7,1\%$ ($n = 12$) da resposta potássica controle. Quando o tecido foi mantido em meio sem Ca^{2+} essa resposta foi significativamente reduzida para valor correspondente a $9,5 \pm 3,5 \%$ da resposta potássica. (Figura 18). Na presença de α - (1 mM) ou β -pineno (1 mM), a resposta contrátil induzida pela cafeína foi correspondente a $7,2 \pm 2,2\%$ ($n = 6$) e $4,7 \pm 1,3 \%$ ($n = 6$) da resposta controle, respectivamente. Esses valores não foram diferentes daquele obtido na ausência de α - ou β -pineno em meio sem Ca^{2+} ($9,5 \pm 3,5\%$) ($p > 0,05$, ANOVA).

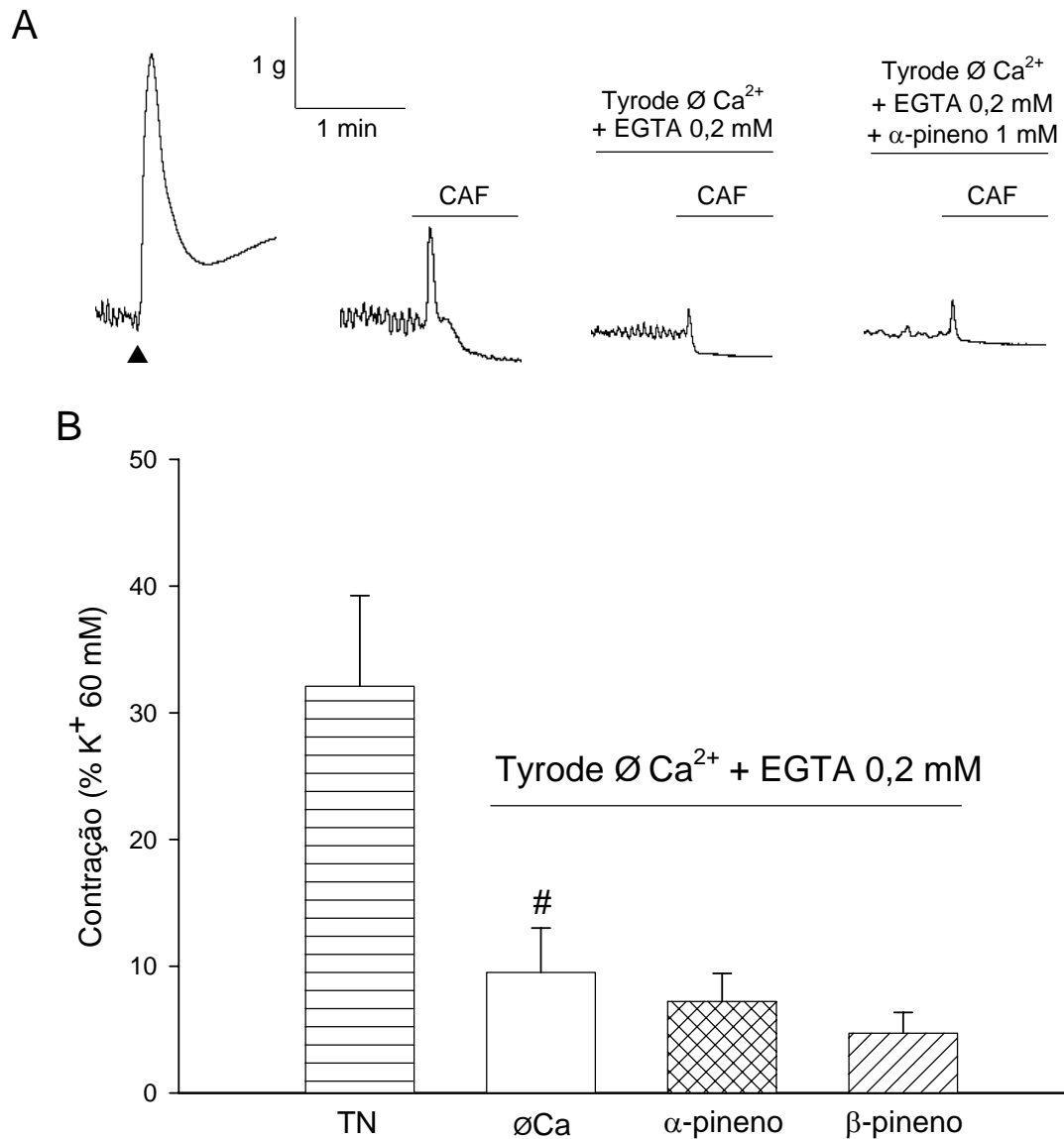


Figura 16 - Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por Cafeína em Tyrode sem Ca^{2+} e com EGTA.

(A) Traçado típico de experimento com duodeno isolado de rato estimulado pela cafeína. Os experimentos foram realizados à temperatura ambiente ($\cong 25^\circ\text{C}$). O tecido foi estimulado inicialmente com K^+ (60 mM, \blacktriangle). Após lavagem da preparação com Tyrode normal, o tecido foi estimulado com cafeína (CAF, 20 mM). Note a intensa e reversível redução do tônus basal após a contração fásica promovida pela cafeína. Em meio sem Ca^{2+} a cafeína produziu resposta contrátil com menor amplitude. Contrações subseqüentes de K^+ foram realizadas para garantir reenchimento dos estoques intracelulares de Ca^{2+} (dados não mostrados na figura).

(B) O gráfico mostra as médias das contrações induzidas por cafeína na ausência, em meio normal com Ca^{2+} (TN) e sem Ca^{2+} (\emptyset Ca), e na presença do α -pineno (1mM, n = 6) e do β -pineno (1mM, n = 6) em Tyrode sem Ca^{2+} contendo EGTA. Os valores estão expressos em percentual da contração induzida por KCl 60mM realizadas no início dos experimentos. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os valores observados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA).

Efeito do α - e do β -pineno na contração induzida por Ca^{2+} após esgotamento dos estoques intracelulares com CCh em íleo isolado de rato mantido em Tyrode sem cálcio com EGTA e Verapamil

Para avaliar as ações do α - ou do β -pineno sobre a entrada de Ca^{2+} mediada por canais operados por estoque, foram realizados experimentos onde os tecidos foram estimulados com altas concentrações de CCh (100 μM). Mantidos em meio sem Ca^{2+} contendo EGTA (0,2 mM), a estimulação com CCh produziu resposta de menor amplitude quando comparada à contração induzida pela mesma concentração em meio com Ca^{2+} (Figura 19, painel A). Após a retirada do CCh por lavagens sucessivas da preparação e a adição de Ca^{2+} (2 mM) o tecido desenvolve resposta contrátil cuja amplitude corresponde a $30,7 \pm 2,1\%$ ($n = 7$) da contração controle induzida por K^+ 60 mM. Essa resposta foi potencializada pela adição prévia de α - (1 mM) ou β -pineno (1 mM) para valores correspondentes a $80,6 \pm 4,7\%$ ($n = 4$) e $51,3 \pm 7,6\%$ ($n = 5$), respectivamente. Esses valores foram estatisticamente significativos em relação ao valor obtido no controle ($30,7 \pm 2,1\%$) ($p < 0,05$, teste de Bonferroni).

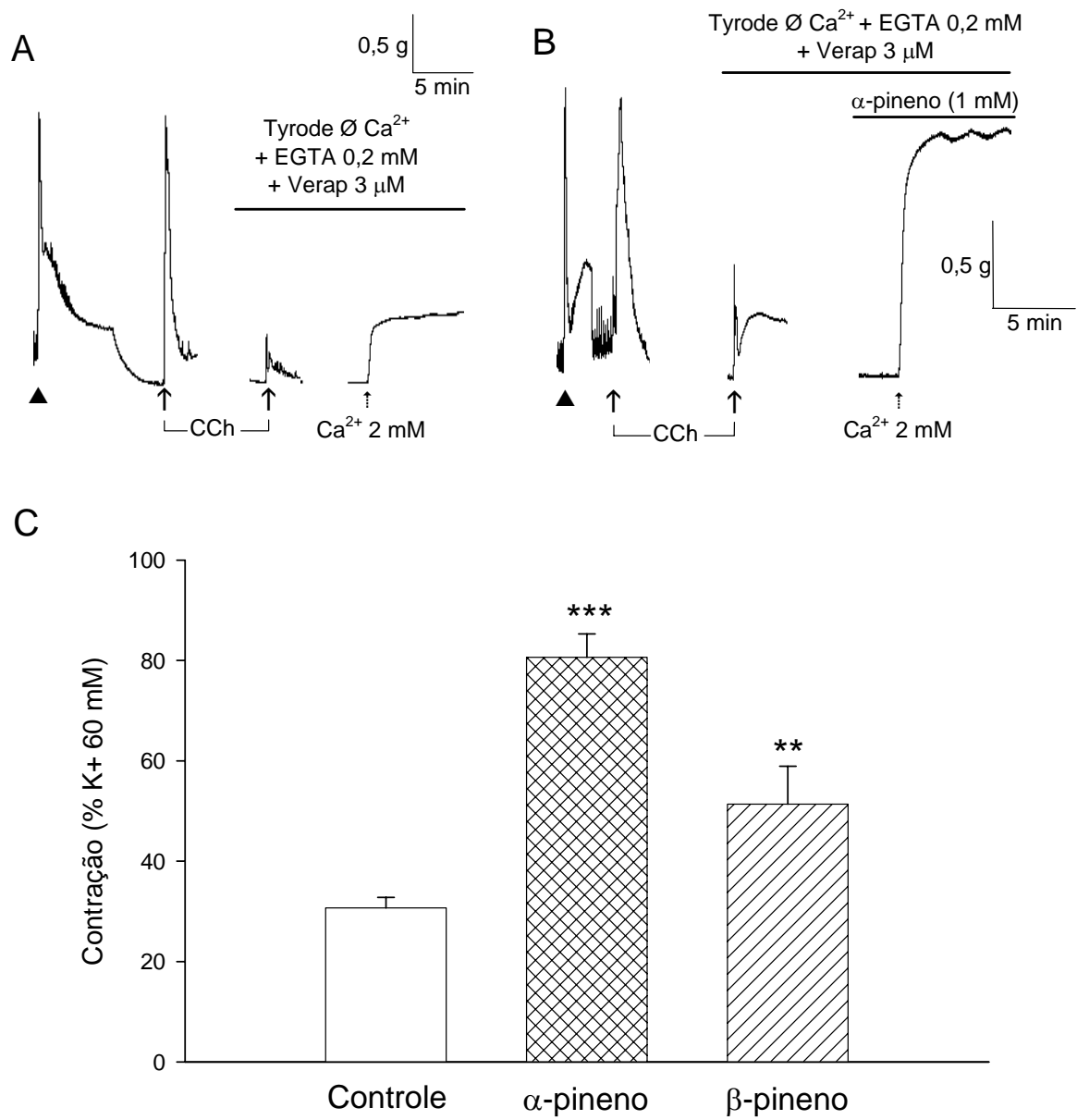


Figura 17 - Efeito do α -pineno e do β -pineno na contração induzida por Cálcio em Tyrode sem Ca^{2+} com EGTA e Verapamil.

(A) Traçado típico de experimento com duodeno isolado de rato estimulado com CCh em meio sem Ca^{2+} . O tecido foi estimulado inicialmente com K^+ (60 mM, ▲). Após lavagem da preparação com Tyrode normal, o tecido foi estimulado com carbacol (CCh, 100 μM) na presença e, em seguida, na ausência de Ca^{2+} . Em meio sem Ca^{2+} o CCh produziu resposta contrátil com menor amplitude. Após retirada do CCh por troca da solução sem Ca^{2+} o tecido foi estimulado com Ca^{2+} (2 mM). (B) Traçado típico de experimento realizado conforme descrição do painel A. Na etapa final de lavagens da preparação para remoção do CCh, foi adicionado α - ou β -pineno (1 mM) antes da adição de Ca^{2+} (2 mM).

(C) O gráfico mostra as médias das contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} do efeito na ausência (controle) e na presença do α -pineno (1mM, n = 4) e do β -pineno (1mM, n = 5) sobre a contração induzida por Ca^{2+} em Tyrode sem Ca^{2+} contendo EGTA. 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.). ** e ***, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, para os efeitos potencializadores do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle.

Efeito do α -pineno e do β -pineno na retenção gástrica

O α - e o β -pineno (1, 100 e 300 mg/kg) foram administrados por via oral e após 20 min foi realizado a gavagem com solução marcadora (Glicose 5%, Vermelho Fenol 0,75 mg/ml de H₂O), 10 min após a gavagem o animal foi sacrificado e seu trato digestório seccionado em estômago, intestino delgado proximal, medial e distal.

Podemos inferir, do estudo da retenção fracional de corante, que o α - e o β -pineno 1 mg/kg (Figura 20), no estômago e nos segmentos proximal, medial e distal do intestino delgado não tiveram efeito significativo, entretanto, nas doses de 100 e 300 mg/kg houve alterações significativas ($p < 0,05$, ANOVA). O Tween 80 (<0,2% v/v) foi utilizado como controle. De acordo com os gráficos abaixo observamos que o α - e o β -pineno 100 mg/kg (Figura 21) e 300 mg/kg (Figura 22) diminuíram a retenção fracional de corante no estômago, indicando uma aumento no esvaziamento gástrico. Observa-se também uma tendência de aumento da retenção de corante no intestino distal, dado que sugere uma passagem rápida (10 min) do marcado do estômago para a porção distal do intestino.

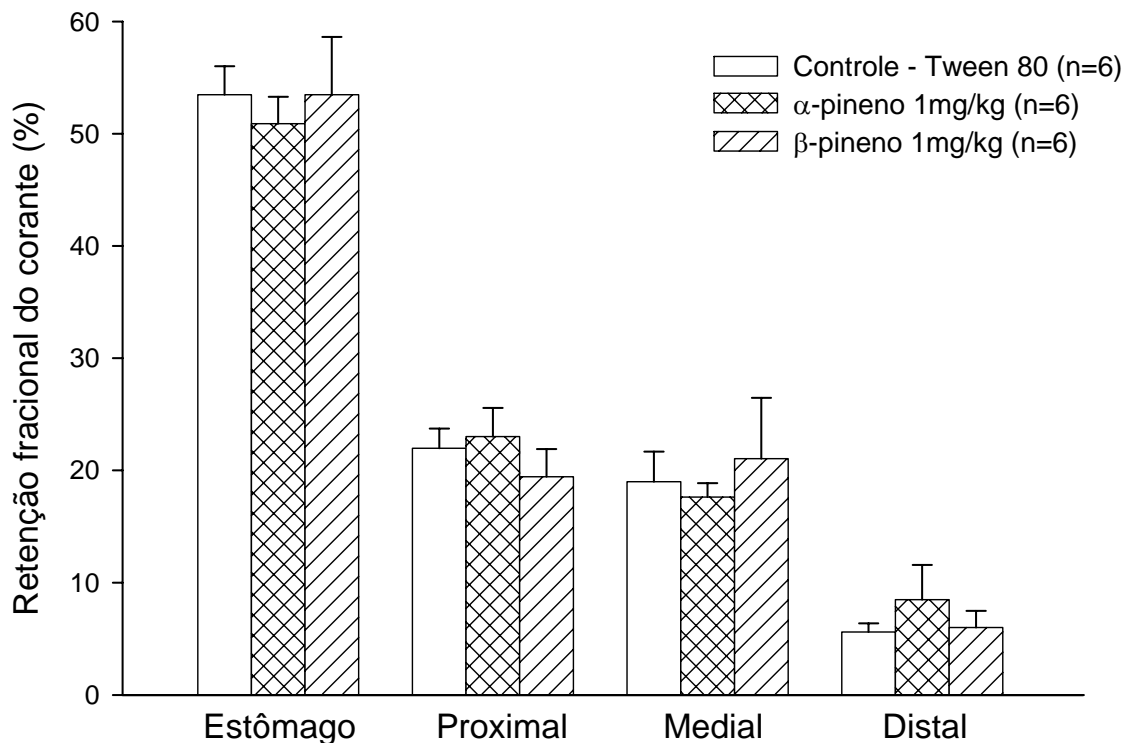


Figura 18 - Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α - ou β -pineno (1mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.

Inicialmente os animais foram tratados, por via oral, com α -pineno (1mg/kg, n=6) ou β -pineno (1mg/kg, n=6). Após 20min foram alimentados com 1,5ml de solução de glicose a 5% + vermelho fenol (0,5mg/ml) e sacrificados após 10min. A recuperação fracional de corante em cada segmento foi obtida por espectrofotometria (560nm), sendo o valor médio da retenção gástrica (%) expresso na forma de barras verticais e o erro padrão da média como linhas verticais.

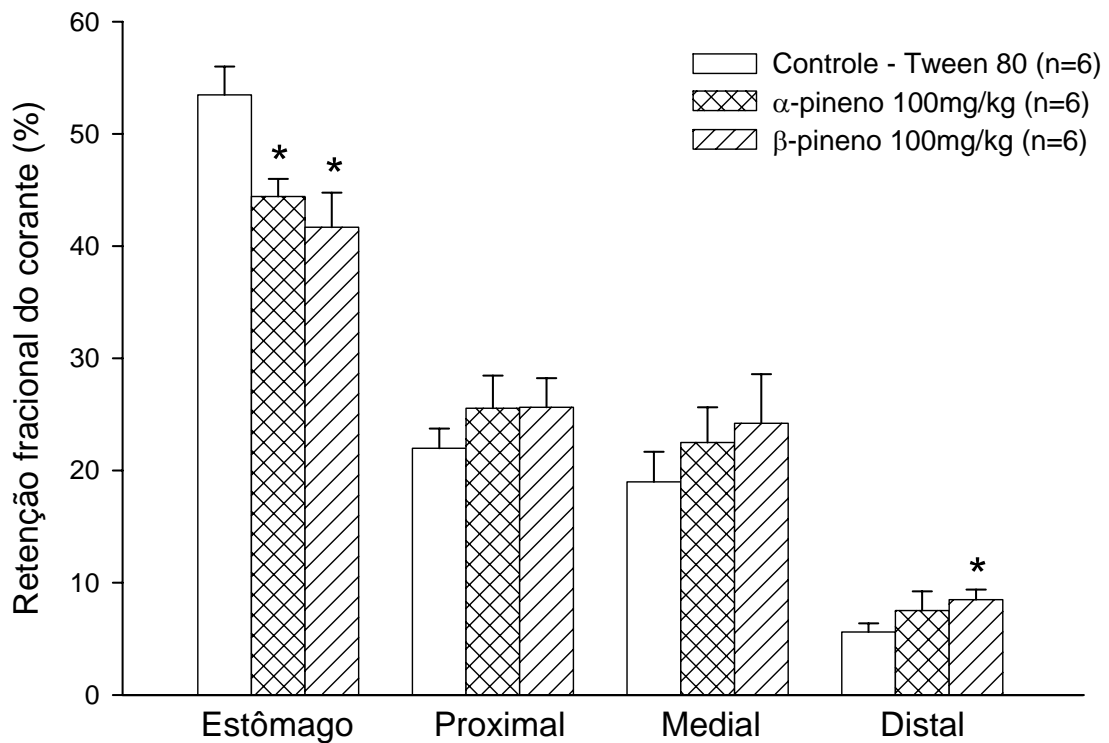


Figura 19 - Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α -pineno ou β -pineno (100mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.

Inicialmente os animais foram tratados, por via oral, com α -pineno (100mg/kg, n=6) ou β -pineno (100mg/kg, n=6). Após 20min foram alimentados com 1,5ml de solução de glicose a 5% + vermelho fenol (0,5mg/ml) e sacrificados após 10min. A recuperação fracional de corante em cada segmento foi obtida por espectrofotometria (560nm), sendo o valor médio da retenção gástrica expresso na forma de barras verticais e o erro padrão da média como linhas verticais. *, $p < 0,05$ (teste-t de Student), para os efeitos do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle

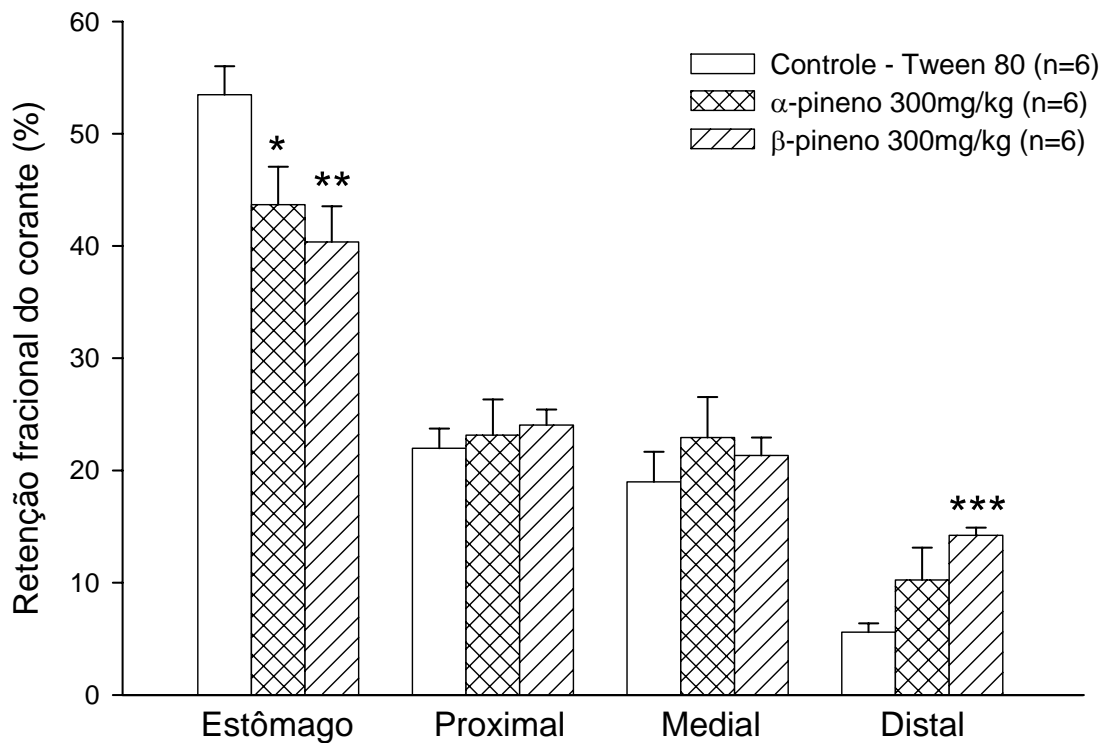


Figura 20 - Recuperação fracional do corante no estômago e intestino delgado (porções proximal, medial e distal) de ratos tratados com α -pineno ou β -pineno (300mg/kg) e estudados aos 10min pós-prandial.

Inicialmente os animais foram tratados, por via oral, com α -pineno (300mg/kg, n=6) ou β -pineno (300mg/kg, n=6). Após 20min foram alimentados com 1,5ml de solução de glicose a 5% + vermelho fenol (0,5mg/ml) e sacrificados após 10min. A recuperação fracional de corante em cada segmento foi obtida por espectrofotometria (560nm), sendo o valor médio da retenção gástrica expresso na forma de barras verticais e o erro padrão da média como linhas verticais. *, ** e ***, $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente (teste-t de Student), para os efeitos do α - e do β -pineno, comparando-os ao controle

Efeito do α -pineno e do β -pineno nas contrações induzidas por ACh em tiras de fundo de estômago isolado de rato

Adicionados à solução de banho por um período prévio de 5 minutos, α - ou β -pineno não produziram alteração das contrações submaximais induzidas por ACh 3 μ M (Figura 23) em tiras de estômago isolado de rato. A amplitude das contrações subseqüentes na presença de concentrações crescentes de α - ou β -pineno não foi significativamente diferente daquela obtida no controle ($p > 0,05$, ANOVA).

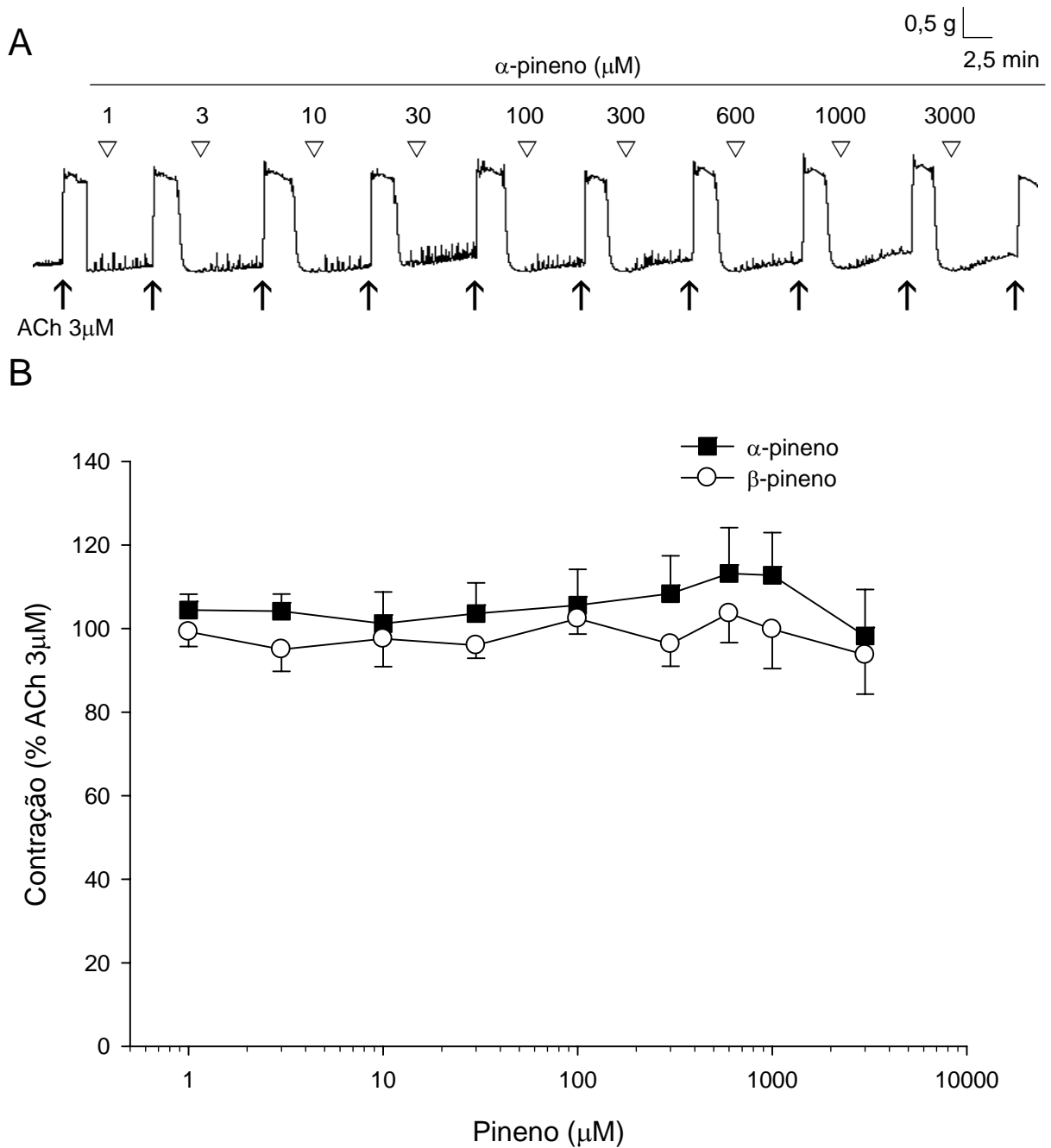


Figura 21 - Efeito do α -pineno ou β -pineno na contração do fundo do estômago isolado de ratos wistar induzida por ACh 3 μM .

(A) Traçado típico usado para demonstrar o efeito do α -pineno (1 a 3000 μ M) na contração induzida por ACh 3 μ M. O símbolo (\blacktriangle) indica o momento da aplicação da solução colinérgica o experimento. A primeira contração induzida por ACh foi obtida ainda na ausência do α -pineno e sua amplitude foi considerada como contração controle. O momento e as concentrações do α -pineno estão indicados pelo símbolo (∇) e pelos valores indicados na figura (em μ M). Após cada contração induzida por ACh, a preparação foi lavada por um período de aproximadamente 10 min para adicionar nova concentração de α -pineno. As etapas de lavagens não foram registradas para que o traçado fosse mostrado de forma a facilitar a visualização dos efeitos. Os experimentos para estudo do β -pineno foram semelhantes aos descritos acima.

(B) O gráfico mostra a média da contração induzida por ACh na presença de α -pineno (\blacksquare , n=6) e β -pineno (\circ , n=6) (1 a 3000 μ M). Os valores estão expressos em percentual da contração controle induzida por ACh 3 μ M na ausência de pineno. As barras verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os valores observados não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que tanto o α - como o β -pineno possuem atividade miorelaxante em preparações de tiras de duodeno de rato *in vitro*, assim como aceleram o esvaziamento gástrico de líquidos em ratos. Considerados em conjunto e, baseados em argumentos colocados a seguir, os dados apresentados nesse trabalho nos permitem concluir que essas ações são mediadas por provável ação preferencial sobre o tecido intestinal sem interferência direta com o comportamento motor gástrico. Sobretudo, suas ações miorelaxantes estão relacionadas à sua capacidade em interferir com a liberação de Ca^{2+} dos estoques internos. O presente trabalho também constitui-se na primeira descrição do efeito pro-cinético do α - e do β -pineno, até então desconhecido na literatura.

Em primeiro lugar, os efeitos relatados para o α - e para o β -pineno não devem estar relacionados a possível efeito tóxico. Nos experimentos executados, a reversibilidade dos efeitos foi um fator sempre observado, mesmo após a adição das concentrações mais altas usadas nos protocolos experimentais. De maneira geral, esses constituintes são considerados pouco tóxicos. Os valores de DL50 são correspondentes a 3700 mg/kg (v.o.) e 4700 mg/kg (v.o.) para o α - e para o β -pineno, respectivamente. Esses valores estão situados em faixa de toxicidade semelhante a de outros constituintes terpênicos como o 1,8-cineol e eugenol, cujos valores são superiores a 2000 mg/kg (Interaminense *et al.*, 2007 in press). Esses constituintes são considerados pouco tóxicos na literatura (Wei *et al.*, 2006). Durante a realização dos experimentos *in vivo* não foram detectadas alterações comportamentais clássicas, tais como grooming (comportamento de limpeza), rearing (levantar-se nas patas traseiras), entre outros, após a administração oral do α - ou do β -pineno, que pudessem indicar algum efeito tóxico.

Quimicamente, α - e β -pineno são monoterpenos, substâncias com 10 carbonos (duas unidades isoprênicas) que apresentam geralmente odores agradáveis e interessantes

propriedades biológicas. São encontrados na natureza em muitas plantas e, por isso, são amplamente empregados na obtenção de aromas e fragrâncias. Como α - e β -pineno são encontradas na composição de diversos óleos essenciais, isso sugere que eles podem 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 *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 miorelaxantes, uma vez que estão relacionadas à inibição das contrações induzidas por BaCl_2 , 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 α - ou β -pineno, atribuindo-os a explicação, pelo menos em parte, das ações farmacológicas desses óleos essenciais.

No presente trabalho, os monoterpenos α - e β -pineno produziram aceleração do esvaziamento gástrico em ratos. Entretanto, ao contrário de drogas pró-cinéticas clássicas, nenhum dos constituintes aqui estudados alterou a contração induzida por concentração submaximal de ACh em tiras de estômago (Schuurkes *et al.*, 1985a e 1985b). Embora de maneira preliminar, essa observação nos permite concluir que, o modo de ação do α - e do β -pineno não está relacionado a atuação direta na musculatura gástrica. Entretanto, experimentos adicionais serão necessários para avaliar seus efeitos sobre esse parâmetro. Uma das possibilidades seria investigar seus efeitos sobre contrações induzidas por estimulação elétrica de campo. Substâncias pró-cinéticas clássicas como a metoclopramida e a domperidona, são conhecidamente eficazes em aumentar a amplitude e a frequência das contrações anrais 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 and α -felandreno interagem com o receptor 5-HT₃ em íleo de rato (Abdel-Aziz *et al.*, 2005; Ryhazi *et al.*, 2007). Portanto, faz-se necessária a investigação dos efeitos do α - e do β -pineno na ativação desse importante sistema regulatório gastrointestinal.

Outro achado interessante desse trabalho é o fato de que, embora não sejam isoladamente ativos nas contrações colinérgicas em tiras de estômago, o α - e o β -pineno apresentam efeito miorelaxante em duodeno de rato. Eles diminuíram o tônus basal de maneira reversível, assim como inibiram respostas contráteis produzidas por agentes contraturantes como K⁺ e ACh. 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 - e β -pineno citados acima, o mecanismo de ação provavelmente estaria relacionado com a entrada de Ca²⁺ através da membrana ou com sua liberação a partir dos estoques internos (Câmara *et al.*, 2003).

Evidenciou-se que tanto o α - 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 Ca²⁺. As contrações induzidas por K⁺ são classicamente associadas a acoplamento eletromecânico, que envolvem a ativação de canais para Ca²⁺ ativados por voltagem (Karakı, 2004). Por outro lado, agonistas como a ACh promovem estimulação mecânica por acoplamento farmacomecânico pela ativação de receptores muscarínicos e abertura de canais operados por receptor (Cuthbert *et al.*, 2004). A comparação dos valores de CI₅₀ revelou que não há diferença estatística em

relação às potências do α - 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 também tenha sido capaz de diminuir a amplitude das contrações potássicas e a das contrações colinérgicas, a intensidade da diminuição pode ser considerada pequena 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 - 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 α - 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 α - 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 esses terpenos também inibiram as contrações induzidas pela liberação de Ca^{2+} dos estoques internos mediadas pelos

mecanismos dependentes da formação de IP₃. 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 IP₃ a partir dos fosfolipídeos de membrana. A inibição da contração fásica observada na presença de α - 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 - nem o β -pineno, inibiram as contrações duodenais mediadas por vias que envolvem a liberação de Ca²⁺ mediada pelo próprio Ca²⁺ (CICR, do inglês calcium-induced calcium release), como observado nos experimentos onde 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 Ca²⁺. Uma das explicações para esse efeito pode estar relacionada à maior liberação dos estoques de Ca²⁺ pela cafeína. A observação desse fenômeno poderia ser feita medindo-se a concentração de Ca²⁺ intracelular frente ao estímulo promovido pela cafeína subsequentemente na ausência e na presença dos monoterpenos. Entretanto, esse efeito parece pouco provável uma vez que na realização dos mesmos experimentos com os tecidos sendo mantidos em meio sem Ca²⁺ 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 Ca²⁺ no meio extracelular. Surge, então, a possibilidade de que o efeito potencializador do α - e do β -pineno seria provocado por aumento da entrada de Ca²⁺ após o esvaziamento dos estoques provocado pela cafeína (Ufret-Vincenty *et al.*, 1995). Essas

observações são decorrentes dos estudos publicados em 1986, onde J.W. Putney Jr. propôs o conceito de um canal para cálcio operado por estoque (SOC), que buscava entender o influxo de cálcio em células não excitáveis, processo originalmente chamado de entrada capacitativa de cálcio (Casteels; Droogmans, 1981). Esse canal “SOC” 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 μM 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, portanto, são consistentes com as observações de Putney. Nos experimentos aqui realizados, a presença de α - e β -pineno produziu 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 - e β -pineno. Entretanto, experimentos adicionais serão necessários para confirmar essa hipótese.

6. CONCLUSÕES

Portanto, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, que os monoterpenos α - e β -pineno, constituintes do óleo essencial de diversas plantas, apresentam efeito procinético em ratos. Em tecidos isolados, esses monoterpenos não afetam a contração colinérgica em tiras de estômago, mas apresentam atividade miorelaxante em tecido duodenal. Essa atividade inibitória deve ser decorrente de provável interferência com os mecanismos celulares que são mediados pela formação de IP_3 . Além disso, como demonstrado 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Imprensa da Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1991, vol. 2.

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.

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.

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.

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.

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 fisiologia 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.

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.

KARAKI, H. Historical techniques: cytosolic Ca²⁺ 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 Ca²⁺ release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **J Biol Chem.** 264(30):17997-8004, 1989.

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**, França, in press.

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.

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.

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.

MITA, M.; WALSH, M. P. α 1-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.

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.

RIYAZI, A.; HENSEL, A.; BAUER, K.; GEISSLER, 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 farmacobiotechnologia.** São Paulo: Editorial Premier, 1997.

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

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.

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.

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.

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.

SCHEMANN M. Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.** 41 Suppl 1:S4-6, 2005.

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.

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.

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.

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.