

COD. AERVO: 71198

R 13841195/03 08/06/05 BES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Faculdade de Medicina

Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Pós-Graduação em Farmacologia

ESTUDO FARMACOLÓGICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ALPINIA*
ZERUMBET (PERS) B. L. BURT *et* R. M. E SEUS PRINCIPAIS
CONSTITUENTES QUÍMICOS, 4-TERPINEOL E 1,8-CINEOL, EM
MÚSCULO LISO RESPIRATÓRIO DE RATO

Maria Amélia Carneiro Bezerra

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia do Departamento de
Fisiologia e Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para
outorga do Título de Doutor em Farmacologia.

615.32
B4692

Orientador:
Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

Fortaleza

2004



Bezerra, Maria Amélia Carneiro

Estudo farmacológico do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt *et* R. M. e seus principais constituintes químicos, 4-terpineol e 1,8-cineol, em músculo liso respiratório de rato / Maria Amélia Carneiro Bezerra - Fortaleza, 2004. 237f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Pós-Graduação em Farmacologia, 2004.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

1. *Alpinia zerumbet* – erva aromática. 2. *Alpinia zerumbet* – estudos farmacológicos. 3. Terpineol. 4. Cineol. I. Autor. II. Título.

CDD 581.7

Maria Amélia Carneiro Bezerra

Estudo farmacológico do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M. e seus principais constituintes químicos, 4-terpineol e 1,8-cineol, em músculo liso respiratório de rato

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em: 22/ 04/ 2004

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso
Professor titular da UECE (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa
Professor titular da UFC

Prof^a Dr^a Valdenize Tiziane
Professora adjunta da UFVA

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Professor adjunto da UFC

Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas
Professor adjunto da UECE



Aos meus pais,
Vicente e Ivone



AGRADECIMENTOS

A Deus, todo poderoso, por me fazer existir e pelo seu infinito amor. Eu Te agradeço Senhor de todo meu coração e conto todas as tuas maravilhas, pois Tu és bendito, não rejeitou a minha oração nem desviou de mim a tua misericórdia. Minha alma O engrandece e o meu espírito se alegra. Dedico-Te esta vitória como forma de gratidão, pois Tu és digno.

Aos meus pais, Vicente Dias Bezerra e Ivone Carneiro Bezerra, pela educação e pelos ensinamentos de temor a Deus, justiça, honestidade e amor ao próximo.

Aos meus irmãos, em especial a minha irmã Ana Lúcia Carneiro Bezerra, pela ajuda imensurável e encorajamento durante as várias etapas de minha vida.

Ao prof. José Henrique Leal Cardoso, meu orientador, pela sua inestimável e competente orientação na área científica, pelos seus conhecimentos, paciência e pela sua disponibilidade em atender-me nos momentos que necessitei (e como foram muitos!). Prof. Henrique muito obrigada.

Ao prof. Manassés Claudino Fonteles, meu eterno orientador, pela minha iniciação científica e pelo apoio em toda minha caminhada científica. Eu o reconheço como pessoa responsável pelo meu ingresso na área da farmacologia. Prof. Manassés, jamais esquecerei da acolhida no seu laboratório.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú, na pessoa do magnífico reitor prof. José Teodoro Soares, por viabilizar a realização deste trabalho.

À prof^a Elizabeth Moraes, pela dedicação ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pela compreensão e presteza em atender-me sempre que necessitei.

À prof^a Selene Maia de Moraes pela extração do óleo essencial e análise química.

À prof^a Aline Alice Cavalcante Albuquerque, pelo seu exemplo de competência, e pela minuciosa correção deste trabalho, principalmente das referências bibliográficas.

Ao prof. Pedro Jorge Caldas Magalhães, a quem admiro profundamente. Pedro sua ajuda foi grandiosa para conclusão deste trabalho.

A João Luis Carvalho de Souza, por compartilharmos momentos de descontração e ajuda na elaboração dos traçados dos registros experimentais.

Aos profs. Paulo Lavor Porto, Roberto Oscar Brasil e Christiane Calado Lima pela convivência e companheirismo.

À prof^a Maria S. G. Pessoa, pela amizade e pelo auxílio na formatação final.

À Silvia Maria Azevedo de Lima e Áura Rhanes Yida pela atenção, pelos trabalhos prestados á secretaria da Pós Graduação em Farmacologia.

Ao Pedro Militão de Albuquerque Neto, técnico do laboratório de eletrofisiologia da UECE e Francisco José Ferreira dos Santos (Frank), responsável pelo biotério.

À bibliotecária Albaniza Maria de Oliveira pela elaboração da ficha catalográfica.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudo.

A todos minha gratidão

“Depois de apoiar-se nos ombros de Kepler, Galileu e outros, Newton conduziu a humanidade à beira do vasto mar do conhecimento. Ernest Rutherford, Marie Curie e Niels Bohr descobriram a partícula de Leucipo. Alberto Einstein identificou a imensa força escondida nessa partícula e redefiniu tempo e espaço. Edwin Hubble olhou pelo telescópio e viu as galáxias afastando-se. Charles Darwin observou a enorme diversidade da vida vegetal e animal e viu um ancestral comum. Pelo microscópio, Schleiden, Schwann, Flemming e Weismann perceberam que estavam vendo a fonte de toda vida e crescimento. Em gerações de ervilhas, Gregor Mendel viu fatores hereditários não detectáveis sendo transmitidos conforme algum processo desconhecido. East, Margon e outros identificaram esse processo. Francis Crick e James Watson abriram o texto secreto da vida, do qual as primeiras palavras foram escritas na 1ª célula há 4 bilhões de anos. (...) O conhecimento é o nosso destino. O *Homo sapiens* continuará a buscar as respostas a novas questões. Desenvolveremos novos conceitos, novas teorias e continuaremos nossa investigação para entender o mundo natural. (...) Buscamos o desconhecido, o profundo, o obscuro, o nunca visto e temos dentro de nós a capacidade para uma sabedoria ainda maior.”

Texto extraído do livro “As sete maiores descobertas científicas de todos os tempos” escrito por David Eliot Brody e Arnold R. Brody

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	16
LISTA DE FIGURAS	20
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUÇÃO	28
1.1 <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers) B. L. Burt et R. M.	28
1.1.1 Classificação, origem, descrição botânica e distribuição topográfica	28
1.1.2 Uso popular	30
1.1.3 Estudos farmacológicos	32
1.2 Terapêutica farmacológica e óleos essenciais	38
1.3 4-Terpineol	42
1.4 1,8-Cineol	48
1.5 Organização morfofuncional e histológica do sistema respiratório	54

1.6 Anatomofisiologia do músculo liso respiratório	56
1.7 Propriedades elétricas de células de músculo liso respiratório	58
1.8 Controle neural das vias aéreas	61
1.8.1 Inervação colinérgica	62
1.8.2 Inervação adrenérgica	63
1.8.3 Inervação não adrenérgica e não colinérgica	64
1.8.3.1 Taquicininas	65
1.8.3.2 Peptídeo intestinal vasoativo	67
1.8.3.3 Óxido nítrico	68
1.9 Bioquímica da contração do músculo liso respiratório	69
1.9.1 Acoplamento excitação contração	69
1.9.2 Proteínas contráteis	75
1.9.3 Fosforilação da molécula de miosina e contração do músculo liso respiratório	77
1.9.4 Receptores de membrana e transdução de sinal	78
1.9.5 Mecanismos moduladores da contração do músculo liso	86
1.10 Justificativa	91
2 OBJETIVOS	93
2.1 Geral	93



2.2 Específicos	93
3 MATERIAIS E MÉTODOS	95
3.1 Materiais	95
3.1.1 Amostra de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers) B. L. Burt et R. M.	95
3.1.2 Óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers) B. L. Burt et R. M.	95
3.1.3 4-Terpineol e 1,8-cineol	95
3.1.4 Soluções fisiológicas	96
3.1.5 Drogas	96
3.2 Métodos	97
3.2.1 Extração e análise química do óleo essencial	97
3.2.2 Modelo experimental para registro de contração isométrica em músculo liso <i>in vitro</i>	99
3.2.3 Protocolos experimentais	100
3.3 Análise estatística	106
4 RESULTADOS	107
4.1 Efeitos farmacológicos do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers) B. L. Burt et R. M. (OEAz) em músculo liso <i>traquealis</i> de rato	107
4.1.1 Efeito intrínseco do OEAz sobre o tônus basal	107

4.1.2	Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺	107
4.1.3	Efeito do OEAz na presença de L-NAME sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺	110
4.1.4	Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺ (Pers) B. L. Burt et R. M.	113
4.1.5	Efeito do OEAz na presença de L-NAME sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	113
4.1.6	Efeito do OEAz na presença de cafeína sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de K ⁺	115
4.1.7	Efeito do OEAz na presença de indometacina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	118
4.1.8	Efeitos comparativos do OEAz e epinefrina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	121
4.1.9	Efeito do OEAz na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca ²⁺ em músculo liso <i>traquealis</i> despolarizado por 80 mM de K ⁺ (0Ca ²⁺ nominal)	121
4.1.10	Efeito do OEAz sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico	123
4.1.11	Efeito do OEAz sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) na presença de nifedipina	126
4.1.12	Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh) na presença de solução zero Ca ²⁺	127
4.1.13	Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	127

4.1.14	Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)	130
4.1.15	Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por 5-hidroxitriptamina (5-HT)	130
4.1.16	Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	134
4.2	Efeitos farmacológicos do 4-terpineol (TERP) em músculo liso <i>traquealis</i> de rato	134
4.2.1	Efeito intrínseco do TERP sobre o tônus basal	134
4.2.2	Efeito do TERP sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+	137
4.2.3	Efeito do TERP sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	137
4.2.4	Efeito do TERP na presença de L-NAME sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	140
4.2.5	Efeitos comparativos do TERP e epinefrina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	140
4.2.6	Efeito do TERP sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico	143
4.2.7	Efeito do TERP sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) na presença de nifedipina	143
4.2.8	Efeito do TERP sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh) na presença de solução zero Ca^{2+}	145
4.2.9	Efeito do TERP sobre contrações induzidas por prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)	145

4.2.10	Efeito do TERP sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	149
4.3	Efeitos farmacológicos do 1,8-cineol (CIN) em músculo liso <i>traquealis</i> de rato	149
4.3.1	Efeito intrínseco do CIN sobre o tônus basal	149
4.3.2	Efeito do CIN sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺	152
4.3.3	Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	152
4.3.4	Efeito do CIN na presença de cafeína sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de K ⁺	155
4.3.5	Efeitos comparativos do CIN e epinefrina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	155
4.3.6	Efeito do CIN na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca ²⁺ em músculo liso traqueal despolarizado por 80 mM de K ⁺ (0Ca ²⁺ nominal)	158
4.3.7	Efeito do CIN sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico	160
4.3.8	Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	163
4.3.9	Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	163
5	DISCUSSÃO	167
5.1	Considerações gerais	167



5.2 Efeitos sobre o tônus basal	167
5.3 Estudos relacionados	169
5.4 Mecanismo de ação do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i>	170
5.5 Mecanismos de ação do 4-terpineol e 1,8-cineol	181
6 CONCLUSÕES	191
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AEC	Acoplamento excitação-contração
ADP	Difosfato de inositol
AMP_c	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de inositol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CaM	Calmodulina
CaMkII	Proteína quinase II dependente de calmodulina
PRGC	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI₅₀	Concentração efetiva que bloqueia 50% do efeito máximo
CIN	1,8-cineol
CO₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOCA	Acetato de deoxicorticosterona
FRDE	Fator de relaxamento derivado do endotélio
E_k	Potencial de difusão do potássio
E_m	Potencial transmembrana
EGTA	Ácido etileno-bis (β -amino-etil-éter-N,N,N',N'-tetracético)
EPIN	Epinefrina
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GMP_c	Guanosina monofosfato cíclico
HA	Histamina

HC	Cadeia pesada da molécula de miosina
HMM	Meromiosina pesada
5-HT	5-hidroxitriptamina
IgE	Imunoglobulina E
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
K 60	Solução contendo 60 mM de K ⁺
LC₂₀	Cadeia leve da molécula de miosina
LMM	Meromiosina leve
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LTC₄	Leucotrieno C ₄
LTD₄	Leucotrieno D ₄
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Miosina quinase de cadeia leve
NANC	Fibra nervosa não adrenérgica e não colinérgica
NEP	Endopeptidase neutra
NIF	Nifedipina
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido nítrico



NOS	Óxido nítrico sintetase
O₂	Oxigênio
OEAz	Óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (Pers.) B. L. Burt et R. M.
OECn	Óleo essencial de <i>Croton nepetaefolius</i>
OECz	Óleo essencial de <i>Croton zehntneri</i>
OEMv	Óleo essencial de <i>Mentha villosa</i>
PAF	Fator de ativação plaquetária
PG	Prostaglandina
PGE	Prostaglandina E
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F ₂ alfa
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PHI/M	Peptídeo histidina-isoleucina-metionina
PKC	Proteína quinase C
PKCε	Proteína quinase C tipo épsilon
PLC	Fosfolipase C
PH	Potencial hidrogeniônico
PIP₂	Fosfatidilinositol difosfato
CCOR	Canais de cálcio operados por receptores
RS	Reticulo sarcoplasmático
RV	Receptor vanilóide
RV₁	Receptor vanilóide tipo 1
RVL₂	Receptor vanilóide subtipo L ₂
SNA	Sistema nervoso autônomo
SP	Substância P
TEA	Tetraetilamônio

TERP	4-terpineol
TXA₂	Tromboxano A ₂
CCVD	Canais de cálcio dependentes de voltagem
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
UFC	Universidade Federal do Ceará
[Ca²⁺]_i	Concentração intracelular de cálcio
[ØCa²⁺]	Solução de Tyrode isenta de cálcio
[K⁺]_e	Concentração extracelular de potássio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Alpinia zerumbet</i> (Pers) B. L. Burt et R. M.	29
FIGURA 2	Estrutura química do 4-terpineol	45
FIGURA 3	Estrutura química do 1,8-cineol	50
FIGURA 4	Preparação dos anéis de traquéia	101
FIGURA 5	Sistema para registro de contrações em músculo liso	102
FIGURA 6	Efeito intrínseco do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato	108
FIGURA 7	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺ em músculo liso traqueal de rato	109
FIGURA 8	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sem e com dimetilsulfóxido (DMSO) sobre contrações induzidas por 60 Mm de K ⁺ em músculo liso traqueal de rato	111
FIGURA 9	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) na presença de L-NAME [500 µM] sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺ em músculo liso traqueal de rato	112
FIGURA 10	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	114

FIGURA 11	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) na presença de L-NAME [500 μ M] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	116
FIGURA 12	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) na presença de cafeína [1 mM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	117
FIGURA 13	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sem e com cafeína sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	119
FIGURA 14	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) [200 μ g/mL] na ausência e presença de indometacina [2 μ M] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	120
FIGURA 15	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) [600 μ g/mL] sobreposto ao relaxamento induzido pela epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	122

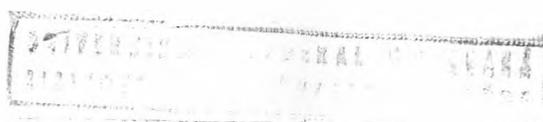
FIGURA 16	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) [1000 µg/mL] na presença de cafeína [5 mM] sobre contrações induzidas pela adição de Ca ²⁺ na solução do banho em músculo liso traqueal de rato despolarizado por 80 mM de K ⁺	124
FIGURA 17	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) em músculo liso traqueal de rato	125
FIGURA 18	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) na presença de 10 µM de nifedipina (nif) em músculo liso traqueal de rato ..	128
FIGURA 19	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) [600 µg/mL] sobre contrações induzidas por 60 µM de acetilcolina (ACh) em solução isenta de Ca ²⁺ em músculo liso traqueal de rato	129
FIGURA 20	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre contrações induzidas por prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α}) em músculo liso traqueal de rato	131
FIGURA 21	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 30 µM de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	132
FIGURA 22	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre contrações induzidas por 10 µM de 5-hidroxitriptamina (5-HT) em músculo liso traqueal de rato	



	HT em músculo liso traqueal de rato	133
FIGURA 23	Efeito do óleo essencial de <i>Alpinia zerumbet</i> (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 10 μ M de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	135
FIGURA 24	Efeito intrínseco do 4-terpineol (TERP) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato	136
FIGURA 25	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+ em músculo liso traqueal de rato	138
FIGURA 26	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	139
FIGURA 27	Efeito do 4-terpineol (TERP) na presença de L-NAME (500 μ M) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	141
FIGURA 28	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobreposto ao relaxamento induzido por epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	142
FIGURA 29	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [10 μ M] em músculo liso traqueal de rato	144
FIGURA 30	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [10 μ M] na presença de nifedipina [10 μ M] em músculo liso traqueal de rato	146

FIGURA 31	Efeito do 4-terpineol (TERP) [600 µg/mL] sobre contrações induzidas por 60 µM de acetilcolina (ACh) na ausência de Ca ²⁺ em músculo liso traqueal de rato	147
FIGURA 32	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina F _{2α} (PGF _{2α})	148
FIGURA 33	Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 10 µM de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	150
FIGURA 34	Efeito intrínseco do 1,8-cineol (CIN) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato	151
FIGURA 35	Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre contrações induzidas por 60 mM de K ⁺ em músculo liso traqueal de rato	153
FIGURA 36	Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺ ...	154
FIGURA 37	Efeito do 1,8 cineol (CIN) na presença de cafeína [1 mM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	156
FIGURA 38	Efeito do 1,8-cineol (CIN) em ausência e presença de cafeína sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K ⁺	157

FIGURA 39	Efeito do 1,8-cineol (CIN) [600 $\mu\text{g/mL}$] sobreposto ao relaxamento induzido pela epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+	159
FIGURA 40	Efeito do 1,8-cineol (CIN) [1000 $\mu\text{g/mL}$] na presença de cafeína [5 mM] sobre contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na solução do banho em músculo liso traqueal de rato despolarizado por 80 mM de K^+	161
FIGURA 41	Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [10 μM] em músculo liso traqueal de rato	162
FIGURA 42	Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$)	164
FIGURA 43	Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 10 μM de 5-hidroxitriptamina (5-HT)	165



RESUMO

Alpinia zerumbet (Pers) B. L. Burt. et R. M. é uma planta aromática da família Zingiberaceae, denominada popularmente “colônia”, utilizada como medicinal em várias partes do mundo. Neste trabalho, objetivou-se caracterizar os efeitos farmacológicos do óleo essencial de *A. zerumbet* (OEAz) e seus principais constituintes químicos, 4-terpineol (TERP) e 1,8-cineol (CIN), sobre o músculo liso respiratório de rato. Foram utilizados anéis traqueais montados em câmara de superfusão para órgão isolado *ex vivo*. OEAz, TERP e CIN (1-1000 µg/mL) não alteraram o tônus basal, exceto para OEAz (100 µg/mL) e CIN (600 µg/mL) que induziram pequena contração. OEAz (1-1000 µg/mL) bloqueou, com similar potência, contrações induzidas por acetilcolina (ACh; 30 µM), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}; 30 µM), 5-hidroxitriptamina (5-HT; 10 µM) e 60 mM de K⁺ (IC₅₀= 280,76 µg/mL, 194,73 µg/mL, 315,05 µg/mL e 162,56 µg/mL, respectivamente). OEAz relaxou preparações pré-contraídas e mantidas em presença de PGF_{2α}, 5-HT e K⁺. Relaxou, também, preparações previamente relaxadas pela epinefrina (EPIN). O relaxamento induzido pelo OEAz não foi alterado pela presença de L-ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME; 500 µM), cafeína (1 mM) e indometacina (2 µM). OEAz (600 µg/mL) bloqueou contrações induzidas por ACh (60 µM) em soluções nutritivas com nifedipina (10 µM) ou em solução zero Ca²⁺. OEAz (1000 µg/mL) bloqueou completamente a contração induzida por Ca²⁺ em solução com 80 mM de K⁺ na presença de cafeína (5 mM). TERP (1-1000 µg/mL) bloqueou contrações induzidas por ACh e PGF_{2α} com potências similares (IC₅₀= 342,88 µg/mL e 129,64 µg/mL, respectivamente) e com menor potência a contração induzida por 60 mM de K⁺ (IC₅₀= 24,90 µg/mL). TERP (600 µg/mL) relaxou preparações submetidas à EPIN. Esse relaxamento, entretanto, não diferiu daquele na ausência deste mediador. Na mesma concentração, TERP bloqueou a contração induzida por ACh (60 µM) em soluções nutritivas com nifedipina (10 µM) ou em solução zero Ca²⁺. CIN (1-1000 µg/mL) bloqueou a contração induzida por 60 mM de K⁺ e com menor potência a induzida por 30 µM de ACh. Também induziu relaxamento, com potências similares, em preparações pré-contraídas e mantidas em presença de PGF_{2α} (30 µM) e 60 mM de K⁺ (IC₅₀= 479,13 µg/mL e 78,98 µg/mL, nesta ordem). CIN (600-1000 µg/mL) não relaxou a contração induzida por 5-HT (10 µM) e nas concentrações de 30-600 µg/mL potencializou as contrações induzidas por ACh. Na concentração de 600 µg/mL, relaxou preparações submetidas à EPIN. O relaxamento induzido pelo CIN foi amplificado pela cafeína (1 mM). CIN (1000 µg/mL) amplificou as contrações induzidas por 1,0; 3,0 e 10 mM de Ca²⁺ em solução com 80 mM de K⁺ e 5 mM de cafeína, não bloqueando os efeitos de altas concentrações extracelulares de Ca²⁺. Os resultados deste estudo demonstraram que OEAz e TERP possuem efeito antiespasmódico em músculo liso *traquealis* de rato, enquanto o CIN apresenta efeito espasmogênico quando envolvido o neurotransmissor colinérgico.

Palavras-chave: *Alpinia zerumbet*, óleo essencial, 4-terpineol, 1,8-cineol, músculo liso respiratório.

ABSTRACT

Alpinia zerumbet (Pers) B. L. Burt. et R. M., popularly called "colônia" in Brazilian Northeastern, is an aromatic plant of the Zingiberaceae family that is used in folk medicine all over the world. Thus, this study aimed to characterize the pharmacological effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* (EOAz) and its two major chemical constituents, 4-terpineole (TERP) and 1,8-cineole (CIN) on mouse respiratory smooth muscle. Tracheal rings were mounted in a superfusion chamber for isolated *ex vivo* muscle. EOAz, TERP and CIN at 1-1000 $\mu\text{g/mL}$ did not affect basal tone except for EOAz (100 $\mu\text{g/mL}$) and CIN (600 $\mu\text{g/mL}$) that induced a small contraction. EOAz (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) blocked with similar potency the contraction induced by acetylcholine (ACh; 30 μM), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$; 30 μM), 5-hydroxytryptamine (5-HT; 10 μM), and 60 mM K^+ (IC_{50} = 280.76 $\mu\text{g/mL}$, 194.73 $\mu\text{g/mL}$, 315.05 $\mu\text{g/mL}$, and 162.56 $\mu\text{g/mL}$, respectively). EOAz relaxed pre-contracted preparations that were maintained in presence of $\text{PGF}_{2\alpha}$, 5-HT, and K^+ . Furthermore, EOAz relaxed preparations previously submitted to epinephrine. EOAz-induced muscle relaxation was not altered by the presence of $l\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME; 500 μM), caffeine (1 mM), and indomethacin (2 μM). EOAz (600 $\mu\text{g/mL}$) blocked the contractions induced by ACh (60 μM) in nutrient solutions with nifedipine (10 μM) or in zero Ca^{2+} solution. EOAz (1000 $\mu\text{g/mL}$) fully blocked Ca^{2+} -induced contractions in solution with 80 mM K^+ in the presence of caffeine (5 mM). TERP (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) blocked ACh and $\text{PGF}_{2\alpha}$ -induced contractions with similar potencies (IC_{50} = 342.88 $\mu\text{g/mL}$ and 129.64 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and with lower potency the 60 mM K^+ -induced contraction (IC_{50} = 24.90 $\mu\text{g/mL}$). TERP (600 $\mu\text{g/mL}$) relaxed preparations submitted to EPIN. It did not differ from that one in absence of the adrenergic mediator. At the same concentration TERP blocked the contraction induced by ACh (60 μM) in nutrient solutions with nifedipine (10 μM) or in zero Ca^{2+} solution. CIN (1-1000 $\mu\text{g/mL}$) blocked the contraction induced by 60 mM K^+ and with lower potency that one induced by 30 μM ACh. Also relaxed with similar potencies pre-contracted preparations that were maintained in presence of $\text{PGF}_{2\alpha}$ (30 μM) and 60 mM K^+ (IC_{50} = 479.13 $\mu\text{g/mL}$ and 78.98 $\mu\text{g/mL}$, respectively). CIN (600-1000 $\mu\text{g/mL}$) did not relax the contraction induced by 5-HT (10 μM) and at 30-600 $\mu\text{g/mL}$ amplified the ACh-induced contractions. At 600 $\mu\text{g/mL}$ relaxed preparations submitted to EPIN. CIN-induced relaxation was amplified by caffeine (1 mM). At 1000 $\mu\text{g/mL}$ CIN amplified the contractions induced by 1.0; 3.0, and 10 mM Ca^{2+} in 80 mM K^+ and 5 mM caffeine solution and did not blocked the effects of high Ca^{2+} concentrations. The results of this study suggest that EOAz and TERP have antispasmodic activity on mouse respiratory smooth muscle. On the other hand it was demonstrated that CIN has a spasmogenic effect when the colinergic mediator is involved.

Keywords: *Alpinia zerumbet*, essential oil, 4-terpineole, 1,8-cineole, smooth muscle, respiratory muscle.



1 INTRODUÇÃO

1.1 *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M.

1.1.1 Classificação, origem, descrição botânica e distribuição topográfica

Alpinia zerumbet (Pers) B. L. Burt. et R. M. (Sinonímia: *Alpinia speciosa* K. Schum, *Alpinia nutans* Roscoe, *Globba nutans* Redoute, *Contimbium speciosum* Holtt, *Zerumbet speciosum* Wendl, *Renealmia nutans* Andrews e *Languas speciosa* Small) é uma planta aromática da família Zingiberaceae, nativa da Ásia oriental (MATOS, 2000) e adaptada na América tropical (BRAGA, 1976, 1960).

É uma erva aromática, rizomatosa, ereta, com colmos lisos verde claros, agrupados em touceiras. Portadora de folhas longas, lanceoladas, pontudas, verdes de margens ciliadas, levemente aromáticas e com inflorescências terminais coloridas de amarelo e vermelho (Fig. 1 a e b). Dificilmente origina frutos no clima de Fortaleza. Introduzida no Brasil por D. Pedro II, que plantou o primeiro exemplar no Jardim Botânico no Rio de Janeiro, na época do Brasil colonial, o que levou à vulgarização do termo colônia, simplificação da expressão: planta da colônia (MATOS, 1994; MATOS, 2000).

Conhecida por vários nomes populares como: Dégonflé, Grand-dégonflé, Lavande, Lavande blanche, Guérit-Tout em Guadalupe; Atoumau em Martinica; Shell Plant em Barbados; Shell Flower, Shellflower Ginger e Shell Ginger nos Estados Unidos. No Brasil é

a



b



FIGURA 1- *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt. et R. M. **a.** Planta, **b.** Inflorescência. Fonte: www.jardimdeflores.com.br

conhecida como Lírio de Santo Antônio, Jasmim Bravo e Colônia (BRAGA, 1976; BRASIL-SILVA *et al.*, 1977; PRUDENT *et al.*, 1993).

Esta espécie possui cachos de flores cuja forma assemelha-se em alguns aspectos à orquídea (Fig. 1 b) (PRUDENT *et al.*, 1993), sendo por isso vulgarizada nos Estados brasileiros como planta ornamental formando grandes touceiras pelo crescimento de pés-filho (MATOS, 1994). Como planta ornamental era cultivada nos jardins do Cairo e Alexandria, além de ser cultivada para estabilizar rios, canais, diques e fortalecer terrenos em lugares úmidos (TACKHOLM, 1969).

É comum no Sudeste bem como nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. É cultivada em torno das cidades de Manaus e Belém (LUZ *et al.*, 1984). No Ceará, é encontrada em abundância na Serra de Guaramiranga, Messejana e em sítios, hortas e jardins da periferia da cidade de Fortaleza. *A. zerumbet* faz parte do programa estadual de fitoterapia “Projeto Farmácias Vivas”, sendo largamente cultivada nos Hortos de Plantas Medicinais em municípios do Estado do Ceará (MATOS, 1996).

1.1.2 Uso popular

No gênero *Alpinia*, várias espécies são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e usadas principalmente na Ásia.

Hastes de *Alpinia spicata* Jacq encerram ácido oxálico e são utilizadas como tônico, diurético e depurativo. Ao suco ácido e mucilaginoso que delas se obtém, quando ainda frescas, são atribuídas propriedades refrigerante, antipirética, útil contra nefrite, inflamações da uretra, “catarro” da bexiga, cálculos renais, gonorréia e leucorréia (CORREA, 1926).

A droga natural “yakuchi”, preparada de frutos de *Alpinia oxyphylla* Miguel, originária da China, é usada largamente na medicina oriental (ITOKAWA *et al.*, 1981a).

Alpinia officinarum Hance é usada como constituinte de algumas fórmulas na medicina chinesa para aliviar desordens gastrointestinais (ITOKAWA *et al.*, 1981a). Rizomas de *A. officinarum* Hance são usados na medicina oriental tradicional principalmente para tratar problemas estomáquicos e diarréia (KIUCHI *et al.*, 1992). Esta espécie de *Alpinia* tem sido reportada como detentora de efeito vasodilatador coronariano, usada para tratamento do infarto do miocárdio e insuficiência coronária (KEJI, 1984).

Na Malásia, os rizomas de *Alpinia galanga* são vendidos nos mercados, para uso na preparação de carnes e molhos ou são desidratados ao sol e transformados em pó que é usado para condimentar alimentos (POOTER *et al.*, 1985). Sementes de *Alpinia intermedia* são usadas como estomáquicos e aromatizantes como o sêmen do Amomi (ITOKAWA *et al.*, 1987a).

A. zerumbet é usada na medicina popular, tanto no Brasil como nos países asiáticos, de onde é originária, com diversas finalidades terapêuticas. No Brasil é usada como antiasmático, calmante, diurético e anti-hipertensivo (MATOS, 1987). Nas Antilhas francesas o decocto das folhas é utilizado no tratamento do meteorismo, a infusão das folhas e flores como anticatarral e o infusato das folhas como diurético. No Oeste da Índia, é usada para tratar dores de cabeça (STHELE & STHELE, 1958). No Japão, as sementes são utilizadas como estomáquicas (KIMURA *et al.*, 1966). Na China é usada no tratamento de gastrite e úlcera gástrica (HSU, 1987).

Os rizomas, em forma de pó, são usados como antidiarréicos, no tratamento de úlcera gástrica, tosse e artrite. O rizoma em decocto é usado

no tratamento de cistite. As folhas são usadas em infusão para tratamento de asma; de micoses de pele, pêlos e unhas; como purificador sanguíneo; como anti-hipertensivo; calmante e antiestresse (CORREA, 1926).

No Nordeste do Brasil, *A. zerumbet* é usada popularmente como anti-hipertensivo e diurético, sob a forma de chá ou infusão, de emprego generalizado entre cardíacos e hipertensos (MATOS, 2000). No Amazonas, é usada como agente cardiovascular e hipotensor (LUZ *et al.*, 1984). No Sul do Brasil, o chá das folhas é reportado como detentor de função anti-hemorroidária (PRUDENT *et al.*, 1993).

1.1.3 Estudos farmacológicos

Espécimes do gênero *Alpinia* destacam-se na literatura por apresentarem significativos efeitos terapêuticos ratificados cientificamente.

O extrato metanólico de sementes de *Alpinia galanga* Wild, uma droga chinesa estomáquica, é detentor de atividade inibitória contra úlcera de Shay em ratos (MITSUI *et al.*, 1976). O óleo essencial obtido de rizomas frescos e desidratados de *A. galanga* possui atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, fungos e alguns dermatófitos (JANSSEN & SCHEFFTER, 1985). Em “screening” antitumoral, com 60 (sessenta) espécies de plantas medicinais, o extrato alcoólico preparado de rizomas da referida espécie mostrou significativo efeito contra sarcoma 180, na forma ascítica, em ratos (ITOKAWA *et al.*, 1987c). “Screening” farmacológico *in vitro*, realizado com o fim de descobrir inibidores da xantina oxidase, entre drogas brutas orientais e extrato de plantas, mostrou que rizomas de *A. galanga* Swartz inibem esta enzima e podem ser candidatos como droga para o tratamento da hiperuricemia articular (gota). Um diterpeno antimicrobiano identificado

como (E)-8 beta, 17-epoxilabid-12-eno-15, 16 diol foi isolado de *A. galanga*. O referido composto potencializou a atividade antifúngica da quercetina e chalcone contra *Candida albicans* (HARAGUCHI *et al.*, 1996). Outras atividades biológicas desta espécie incluem: odorífero (especiaria), antibacteriano e inseticida (NORO *et al.*, 1988).

Uma variedade de compostos fenólicos, potentes inibidores da síntese de prostaglandinas (PGs), foi isolado de algumas plantas, entre elas *Alpinia officinarum*. Os inibidores da biossíntese de PGs estão diretamente associados com atividades antiinflamatória e antiagregação plaquetária. O extrato aquoso de seus rizomas inibiu significativamente a PG sintetase. Seus rizomas são usados como componentes de algumas fórmulas na medicina chinesa para aliviar desordens gastrintestinais (KIUCHI *et al.*, 1992).

Dos frutos de *Alpinia oxyphylla* Miguel foi isolado um princípio cardiotônico, esta substância inibe de maneira dependente de concentração a Na^+/K^+ -ATPase em átrio isolado de cobaio e produz efeitos inotrópicos negativos. Esse princípio também possui atividade antagonista de cálcio em aorta de coelho (SHOJI *et al.*, 1984). O extrato metanólico de frutos desidratados de *A. oxyphylla* suprime a formação de tumores em ratos e indução de apoptose em células HL-60, sugerindo que esta espécie possui atividades anticarcinogênica (LEE *et al.*, 1998). Em “screening” para substâncias inseticidas naturais obtidas de drogas brutas da China, o extrato metanólico de *A. oxyphylla* também foi reportado como detentor de atividade larvicida sobre *Drosophila melanogaster* Meigen. Do referido extrato, um sesquiterpeno foi isolado e identificado como nootkatone, ao qual foi atribuído o efeito larvicida (MIYAZAWA *et al.*, 2000).

Diarilheptanóides como calixina H, epicalixina H blefarocalixinas A e B foram isolados de sementes de *Alpinia blepharocalyx* K. Schum

(PRASAIN *et al.*, 1998a). Essa classe de composto possui efeito inibidor sobre a síntese de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados com lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro*. Todos os diarilheptanóides testados inibiram a produção de NO de maneira dependente de concentração, com $CI_{50} = 36 - 568 \mu M$. Entre os compostos estudados, o blefarocalixina B apresentou maior efeito inibitório sobre a produção de NO com $CI_{50} = 36 \mu M$ (PRASAIN *et al.*, 1998b). Um novo diarilheptanóide, isolado de sementes de *A. blepharocalyx*, 1,7-bis (4-hidroxifenil-3-hidroxi-1,3-heptadieno-5-ona), mostrou significativa inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno, ácido araquidônico e adenosina difosfato em sangue de humanos (DOUG *et al.*, 1998). Epicalixina F e calixina 1, dois novos diarilheptanóides foram isolados de uma fração residual do extrato etanólico desta planta. Epicalixina F mostrou potente atividade antiproliferativa contra fibrosarcoma HT-1080 e carcinoma 26-L5 de colo com valores para DE_{50} de $1,71 \mu M$ e $0,89 \mu M$, respectivamente (GEWALI *et al.*, 1999).

Dois diarilheptanóides identificados como katsumadaina A e katsumadaina B foram isolados de sementes de *Alpinia katsumadain* e suas estruturas químicas identificadas. Estes compostos mostraram ser detentores de atividade antiemética em emese induzida por sulfato de cobre em pintos (YANG *et al.*, 1999).

O extrato metanólico de rizomas de *Alpinia zerumbet* possui atividade inibitória contra histamina e cloreto de bário em íleo isolado de cobaio (ITOKAWA *et al.*, 1981b). LEE *et al.*, (1982), demonstraram que o extrato metanólico de sementes da referida espécie apresenta atividade antioxidante maior do que o butil-hidroxitolueno, enquanto o extrato hexânico mostrou não deter tais propriedades antioxidantes.

Rizomas de *A. zerumbet* detêm atividade antiulcerogênica e este feito tem sido atribuído aos diterpenos e compostos fenólicos como 5,6-diidro-kavaina e diidro-5,6-diidro-kavaina presentes nesta planta (HSU, 1982, 1987, 1988).

O extrato hidroalcoólico de folhas frescas de *A. zermubet* reduziu de forma dose dependente a pressão arterial de cão e rato e aumentou a diurese. Em átrio isolado de anfíbio, o extrato induziu redução da frequência de batimentos e na força de contração. O referido extrato também induziu potencialização do tempo de sono em rato (FONTELES *et al.*, 1988; MENDONÇA *et al.*, 1988a, b; MENDONÇA *et al.*, 1991).

Estudos farmacológicos do extrato aquoso de folhas de *A. zerumbet* demonstraram ação hipotensora na pressão arterial de ratos, tanto por administração endovenosa em ratos anestesiados como por administração oral crônica à animais em vigília. Este efeito não foi alterado por bloqueadores específicos como atropina, propranolol e hexametônio. Este extrato bloqueou de maneira não competitiva as contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico em jejuno e ducto deferente de rato e reto abdominal de batráquio (VANDERLINDE *et al.*, 1986; VANDERLINDE *et al.*, 1988; VANDERLINDE, 1990).

Laranja *et al.* (1991 e 1992) avaliaram o efeito da administração aguda do chá das folhas de *A. zerumbet* à voluntários humanos hígidos. Os autores concluíram que esta espécie de *Alpinia* induz ato da diurese e redução da pressão arterial sistólica e diastólica. Não foram observados efeitos nos parâmetros eletrolíticos e na função renal. Estes achados provavelmente excluem efeito glomerular do(s) princípio(s) ativo(s) desta planta.

Frações fixas, obtidas por extração em solventes de diferentes polaridades eluídos em colunas de cromatografia de sílica gel, a partir das

folhas de *A. zerumbet*, foram investigada na pressão arterial de ratos normotensos e em músculo liso intestinal de cobaio. Com exceção da fração metanólica, as frações orgânicas não apresentaram efeito significativo na pressão arterial de rato (BEZERRA, 1994; BEZERRA & FONTELES, 1994).

Flavonóides, como catequina, epicatequina e alpinetina com propriedades anti-hipertensivas, foram isolados das folhas de *A. zerumbet* (COSTA & MORAIS, 1996; COSTA *et al.*, 1998).

As folhas e rizomas de *A. zerumbet* contém kavalactonas, kavaina e dehidrokavaina que dão à planta as mesmas propriedades farmacológicas da kava kava (KUSTER *et al.*, 1999). A ação anti-hipertensiva é atribuída às substâncias químicas presentes no extrato e no óleo essencial. Esta espécime combina ações relaxantes e antiestresse do kava kava com ação anti-hipertensiva (MATOS, 1994).

Os derivados do diidro-kavaina isolados de rizomas de *A. zerumbet*, 5,6-deiidro-kavaina e diidro-5,6-deiidro-kavaina inibiram a liberação de trifosfato de inositol (ATP) e agregação em plaquetas de coelho, induzidas por ácido araquidônico (AA) e colágeno, sem alterar as induzidas por difosfato de inositol (ADP), fator de agregação plaquetária (PAF) e trombina. A formação de tromboxano B₂ induzida pelo AA foi também suprimida pelos referidos compostos. O 5,6-deiidro-kavaina inibiu o aumento da concentração intracelular de cálcio induzida por AA, mas não a induzida por colágeno ou trombina. Os autores sugerem que o efeito antiagregação plaquetária do 5,6-deiidro-kavaina e diidro-5,6-deiidro-kavaina seja devido à inibição da formação do tromboxano A₂ (TENG *et al.*, 1990).

Três derivados foram sintetizados a partir do diidro-5,6-deiidro-kavaina isolado de folhas de *A. zerumbet*. Entre os compostos sintetizados, o dimetil [6-(2-feniletil)-2-oxo-2,4-piran-4-il] fosforotonal

apresentou maior atividade antifúngica contra *Corticium rolfsii* (91 a 100% PPM) (TAWATA *et al.*, 1996).

Flavonóides e kava pironas obtidos do extrato aquoso de folhas frescas de *A. zerumbet* podem ser responsáveis pelas atividades hipotensora, diurética e antiulcerogênica atribuídas a esta espécie. O principal mecanismo vasodilatador dos flavonóides parece ser a inibição da proteína quinase C (PKC). A inibição de fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico ou redução da recaptção de Ca^{2+} pode também contribuir para o efeito vasodilatador dos flavonóides. A atividade antiulcerogênica pode ser explicada por seu efeito sobre o leucotrieno C_4 (LTC_4) e prostaglandina E (PGE) que são conhecidos por ocuparem um importante papel na agressão da mucosa gastrintestinal (MPALANTINOS *et al.*, 1998).

O óleo essencial obtido de folhas de *A. zerumbet* (OEAz) inibiu em concentração de 2 mg/mL *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* e na concentração de 4 mg/mL a *Escherichia coli* (PRUDENT *et al.*, 1993).

O OEAz demonstrou atividade antifúngica quando testado *in vitro* contra cepas de dermatófitos isoladas de pacientes com dermatofitose. O OEAz inibiu 80% das cepas dermatófitas e produziu zona de inibição maior que 10 mm de diâmetro (LIMA *et al.*, 1993).

O OEAz apresentou significativo efeito hipotensor dose-dependente em pressão arterial de ratos normotensos e efeitos miorelaxante e antiespasmódico no músculo liso intestinal de rato e cobaio (BEZERRA, 1994; BEZERRA & FONTELES, 1994; BEZERRA *et al.*, 2000a, b).

Lahlou *et al.* (2002a, b; 2003) demonstraram que aplicação intravenosa de OEAz (1–20 mg/Kg) reduziu de maneira dependente de concentração a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos com hipertensão induzida por acetato de deoxicorticosterona e dieta rica em

cloreto de sódio (DOCA-sal). Um conjunto de argumentos decorrentes de experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* sugere que o efeito hipotensor desse óleo resulte de seus efeitos vasodilatadores diretos sobre a musculatura lisa vascular. Os autores sugerem que este efeito está relacionado ao relaxamento do músculo liso vascular que encontra-se sob efeito do sistema nervoso simpático neste modelo de hipertensão.

O efeito hipotensor atribuído ao extrato hidroalcoólico foi mínimo ou ausente quando a reextração foi feita com solvente polar, e grande quando foi reextraído com solvente não polar (BEZERRA, 1994). Estes resultados corroboram o uso popular de *A. zerumbet* como anti-hipertensivo e sugerem que o princípio ativo hipotensor desta planta seja uma substância lipossolúvel. Estas observações fazem do OEAz um candidato, isolado ou em colaboração com outro(s) agente(s) não volátil(eis), a ser o princípio ativo desta espécie de *Alpinia*.

1.2 Terapêutica farmacológica e óleos essenciais

Óleos essenciais são substâncias voláteis e altamente concentrados que produzem o aroma dos vegetais aromáticos. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríficas e líquidas que recebem a nomenclatura abrangente de óleos voláteis. Podem ainda ser denominados óleos etéreos (devido à sua solubilidade em solventes apolares, como os éteres) ou simplesmente essências, pois a maioria possui aroma agradável e intenso. Possuem baixa solubilidade em água, porém suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas genericamente de hidrolatos (SIMÕES, 2000).

Os óleos essenciais estão localizados em pequenas “bolsas” entre as células e desempenham importante papel na bioquímica vegetal. Assemelham-se à hormônios e funcionam como reguladores e mensageiros,

agem como catalisadores das reações bioquímicas, protegem a planta de parasitas, doenças e ajudam na fertilização atraindo insetos. Os óleos essenciais transmitem informações de uma célula a outra, controlam a multiplicação e renovação celular e são agentes de adaptação da planta ao meio ambiente. Podem ser encontrados no exterior das folhas, na película dos frutos cítricos e casca de algumas árvores (LAVABRE, 1993).

Segundo a International Standard Organization (ISO), óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Sua composição química sofre variação de acordo com a parte do vegetal de onde é extraído (caule, folhas, flores, frutos, sementes e raiz), ao longo do dia e no decorrer do ano e ainda recebe influência do solo e clima. O termo quimiotipo refere-se a espécime vegetal taxonomicamente idêntica, mas diferente em relação à composição química.

Bioquimicamente, as substâncias constituintes dos óleos essenciais são produzidas no “laboratório” celular da planta, cujas reações são facilitadas energeticamente pela radiação solar, absorvida no processo de fotossíntese (MATOS, 2000). Seus constituintes químicos variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre (GUENTHER, 1972; MATOS & FERNANDES, 1975-1978; SIMÕES, 2000).

Os óleos essenciais são moléculas biologicamente ativas, que produzem *in natura* ou através de alteração na estrutura molecular de seus constituintes químicos, compostos de importância terapêutica e científica (TISSERAND & BALACS, 1995). Através de modificações de grupamentos moleculares e estudos de relação entre estrutura química e ação farmacológica, as moléculas ativas dos óleos essenciais têm servido

como protótipo para obtenção de novos fármacos com maior eficácia e seletividade. Estudos com derivados sintéticos de constituintes de óleos com atividade comprovada mostram que modificações de grupamentos de moléculas podem aumentar ou inverter os efeitos farmacológicos (DALMEIER & CARLINI, 1981). Os óleos essenciais são extraídos de diversas plantas por processos específicos, sendo o mais freqüente a destilação por arraste em vapor de água (CRAVEIRO *et al.*, 1981).

Os óleos essenciais apresentam importância econômica sendo largamente usados como aromatizantes e flavorizantes para alimentos e balas (JACOBS, 1948, 1973; LE MOAN, 1973; CRAVEIRO *et al.*, 1977; ITOKAWA *et al.*, 1980 e 1988); em perfumaria, na composição de sabões, desinfetantes e cosméticos; como solventes, repelentes, fungicidas, conservantes, matriz para fabricação de químicos e na preparação de doces caseiros, licores, bebidas refrescantes e aguardente de cana (MATOS & FERNANDES, 1975-1978; CRAVEIRO *et al.*, 1978).

Um milênio antes de Cristo, os óleos essenciais já eram usados com finalidades terapêuticas. A arte milenar da aromaterapia foi aperfeiçoada através dos séculos e é utilizada até hoje devido ao poder terapêutico dos óleos essenciais. Atualmente, além do uso industrial, os mesmos têm sido usados com finalidade médica na aromaterapia, por via oral ou por aplicação à superfície do corpo seguida de massagens. Na Europa, além de serem empregados por aromaterapeutas, são usados na medicina alopática, em casos de insucesso dos tratamentos preconizados pela farmacologia clássica (FRANCHOME & PENOEL, 1995). São também usados no tratamento de enfermidades comuns como dores abdominais, febres, cefaléias, resfriados etc (MCGILVERY *et al.*, 1996).

Vários efeitos farmacológicos dos óleos essenciais foram cientificamente ratificados como antiparasitários, analgésicos, diuréticos

(LUZ *et al.*, 1984), hipotensores (BEZERRA, 1994; LAHLOU, *et al.*, 2002a, b, 2003), antiinflamatórios (MENEZES *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 1997a), anticonvulsivantes (SANTOS *et al.*, 1997b) e gastroprotetor (PAIVA *et al.*, 1998), entre outros.

Vários óleos essenciais possuem efeito antimicrobiano e têm sido identificados como agentes farmacológicos eficazes e potentes contra várias espécies de microorganismos. Alguns são específicos e outros de largo espectro de ação, com uma característica importante dentro da classe de drogas antimicrobiana, de serem um tipo de agente aos quais menos os microorganismos desenvolvem resistência. Alguns óleos essenciais possuem propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras sendo usados no tratamento de doenças alérgicas. Alguns óleos, além dessas propriedades, são também antiespasmódicos, e por isto são usados em doenças alérgicas com envolvimento de músculos lisos, como a asma. Óleos essenciais ricos em ésteres metílicos de fenóis, como o de *Artemisia dracuncululus* possuem propriedades antialérgicas, óleos ricos em terpenos como o de *Picea mariana* são detentores de propriedades antiinflamatórias e ricos em sesquiterpenos como o óleo de *Tenacetum annum* com propriedades anti-histamínicas ou ricos em ésteres, como o óleo essencial do *Citrus aurantium* detentor de propriedades antiespasmódicas são utilizados pela aromaterapia e combinações desses óleos têm sido usadas na Europa, em casos de asma resistentes aos tratamentos convencionais prescritos pela medicina alopática (FRANCHOME & PENOEL, 1995). Óleos essenciais de algumas espécies de *Mentha* são detentores de atividade antioxidante (MÍMICA-DURIC *et al.*, 2003).

Óleos essenciais de plantas comuns do Nordeste do Brasil, como *Croton zehntneri* (OECz), *Croton nepetaefolius* (OECn) e *Mentha x villosa* (OEMv) apresentam grande eficácia em tecidos excitáveis. O OECz possui

propriedades farmacológicas sobre músculos esqueléticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995) e lisos (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1997 e 1998). O OEC_n é detentor de ação sobre o músculo liso vascular (LAHLOU *et al.*, 2000) e possui efeito anti-hipertensivo (LAHLOU *et al.*, 1999 e 2000). O OEM_v apresentou efeitos em células musculares esqueléticas (FOGAÇA *et al.*, 1997), lisas (SOUSA *et al.*, 1997) e é eficaz em reduzir a pressão arterial (LAHLOU *et al.*, 2001).

Alguns constituintes químicos dos óleos essenciais são utilizados em fórmulas anti-sépticas, descongestionantes e antitussígenos ou incorporados a pastas dentais que são utilizadas como anestésicos locais em odontologia (FRANCIS & WOODS, 1961; STICHER & SMITH, 1971; Di STASI, 1996). Os óleos essenciais também são importantes na ecologia e agricultura por possuírem aromas atrativos de insetos úteis na polinização de várias espécies vegetais (MARCUS & LICHTENSTEIN, 1979).

Várias espécies de plantas produtoras de óleos essenciais são abundantes no Nordeste do Brasil e largamente usadas na medicina popular, sendo de grande importância estudos fitofarmacológicos que visem ratificar sua validade como agentes terapêuticos.

1.3 4-Terpineol

4-Terpineol (TERP) (sinônimos: origanol, 4-carvomentenol, terpinen-4-ol, 4-isopropil-1-metil-1-ciclohexan-4-ol, 1- ρ -menten-4-ol) é um terpeno volátil de baixa toxicidade encontrado no óleo essencial de diversas plantas aromáticas (BAREL *et al.*, 1991). É um dos principais constituintes químicos do óleo essencial de *A. zerumbet* (LUZ *et al.*, 1984; PRUDENTE *et al.*, 1993; OLIVEIRA, 1994, LAHLOU *et al.*, 2002a, b, 2003). Em termos percentuais representa o segundo maior constituinte

químico (17,83 %) da amostra do óleo em estudo (Tabela 1). A estrutura química do TERP está ilustrada na figura 2.

Os terpenos são comuns na natureza, principalmente como constituintes de óleos essenciais de diversas espécies vegetais e são assim denominados devido a sua descoberta em plantas do gênero *Terebinthus*. Os compostos terpenos representam a segunda classe com maior número de constituintes químicos biologicamente ativos obtidos de plantas, estando em primeiro lugar os alcalóides (Di STASI, 1995). Estão subdivididos em monoterpenos (10 unidades de carbono), sesquiterpenos (15 unidades de carbono), diterpenos (20 unidades de carbono), sesterpenos (25 unidades de carbono), triterpenos (30 unidades de carbono) e tetraterpenos (40 unidades de carbono) (SEIGLER, 1995). Os compostos terpênicos e associados apresentam várias atividades farmacológicas como: sedativo e analgésico (ascaridole e manoalide), antiinflamatório (paeoniflorin e paeonon), inibidor de calmodulina (ofiobolina A), anti-helmíntico (ofiobolina M e C), relaxante da musculatura lisa (mezerína e octahidromezereína), bloqueador de canal de cálcio (T-canadinol e esteroisômeros), antialérgico (alisol A e B) e colerético (epomediol e taurocolato) (YAMAHARA *et al.*, 1982; BARONE *et al.*, 1983; LEUNG *et al.*, 1984; MAYER *et al.*, 1988; SHARKEY *et al.*, 1989; OKUYAMA *et al.*, 1993; STICHER, 1993; ZYGMUNT *et al.*, 1993; SOUSA *et al.*, 1997; KUBO *et al.*, 1997; PIETRI *et al.*, 1997).

Os monoterpenos citral, cânfora, linalol, carvacrol, *p*-cimeno e 4-terpineol são os terpenos mais comuns na natureza. O carvacrol é usado como anti-séptico, antifúngico e empregado na preparação de sabonetes e essências, e é dotado de ação antimitótica e antiespasmódica. A cânfora é usada em preparações farmacêuticas para o tratamento de dores musculares

Tabela 1- Composição química percentual do óleo essencial de folhas de *A. zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M. coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFC

Componente	RI ^a	Concentração relativa (%)
α -Tujeno	929	7,98
α -Pineno	939	3,03
Sabineno	975	9,21
β -Pineno	974	3,14
β -Mirceno	991	1,38
α -Terpineno	1018	3,17
para-Cimeno	1021	12,98
Limoneno	1031	3,05
1,8-Cineol	1032	17,95
γ -Terpineno	1062	14,45
Terpinoleno	1088	1,66
4-Terpineol	1177	17,83
α -Terpineol	1189	0,73
trans-Cariofileno	1421	0,77
Total	-	97,33

^aOs compostos são listados em ordem de eluição da coluna DB-5

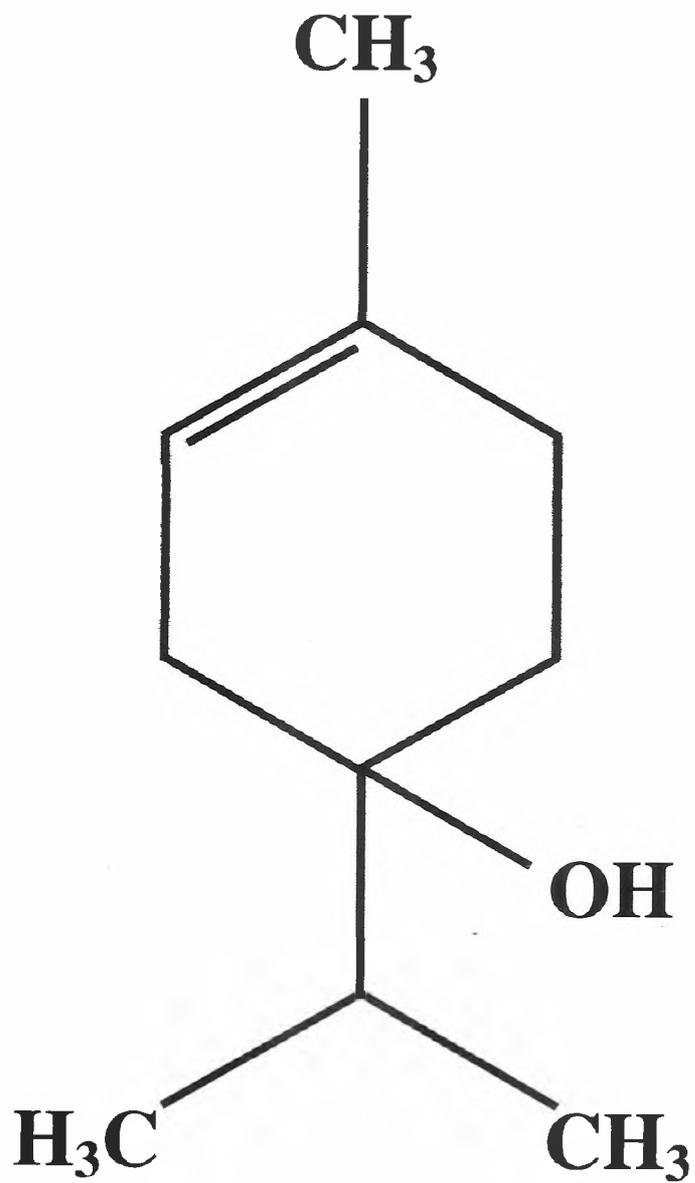


FIGURA 2- Estrutura química do 4-terpineol

e reumatismo, também é empregada como antipruriginoso (Di STASI, 1995). Os monoterpenos são utilizados em varias preparações farmacêuticas como agentes mucolíticos e expectorantes comercializados sem a necessidade de prescrição médica (POZZI, 1989; GRAMICCIONE *et al.*, 1989), e representam uma nova classe de agentes terapêuticos que podem ser usados no tratamento do câncer de mama (RUSSIN, 1989; JIRTLE, 1993).

O TERP é o principal constituinte do óleo essencial de plantas do gênero *Pinus*, *Eucalyptus* e *Melaleuca*. Abundante também no óleo essencial extraído de folhas de *Alpinia zerumbet* (LUZ *et al.*, 1984; PRUDENT *et al.*, 1993; OLIVEIRA, 1994; LAHLOU *et al.*, 2002a b; 2003). Este composto foi identificado como o principal constituinte químico ativo do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* “tea tree oil”, *Melaleuca leucadendron*, *Ocimum gratissimum* e *Achillea fragrantissima* plantas utilizadas popularmente por suas atividades antimicrobianas (BAREL *et al.*, 1991; JEDLICKOVÁ *et al.*, 1992). Apresenta atividade antimicrobiana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (CARSON & RILEY, 1995; RAMAN *et al.*, 1995). Foram descritas também atividades antialérgica e antitussígena (Di STASI, 1995). O TERP é constituinte de alguns inalantes farmacêuticos e xaropes (BAREL *et al.*, 1991; RAMAN *et al.*, 1995; CARSON & RILEY, 1995).

Dos principais constituintes químicos do óleo essencial obtido de rizomas frescos e desidratados de *Alpinia galanga* testados contra bactérias Gram positivas, fungos e alguns dermatófitos, o TERP foi o responsável pelo maior efeito antimicrobiano (JANSSEN & SCHEFFER, 1985).

Esse composto possui atividade hipotensora (BEZERRA *et al.*, 2000b), vasodilatadora e atividades relaxante e espasmolítica da musculatura lisa intestinal (NASCIMENTO 1998).

Estudos com TERP, em pressão arterial de ratos normotensos, espontaneamente hipertensos (BEZERRA, 1994) e hipertensos DOCA-sal (LAHLOU *et al.*, 2002a; b; 2003) confirmaram a hipótese que este composto é um importante contribuinte para o efeito hipotensor do OEAz. O referido apresentou potente efeito hipotensor, que parece depender de ação direta sobre o coração (inotropismo e cronotropismo negativos) e sobre vasos (vasodilatação). O efeito sobre o coração foi demonstrado *in vivo*, em ratos, e *in vitro* em coração isolado de batráquio, coelho e em átrio de cobaio. O TERP possui atividade relaxante vascular demonstrada pela redução do tônus de anéis de aorta de coelho pré-contráidos pela fenilefrina ou 60 mM de K⁺ e pelo aumento no fluxo dos leitos vasculares do mesentério perfundidos sob pressão hidrostática constante. Este composto também induziu relaxamento no tônus basal de duodeno de coelho e redução na atividade mecânica espontânea (peristaltismo) (NASCIMENTO, 1997; NASCIMENTO 1998; NASCIMENTO *et al.*, 1998).

TERP bloqueou a produção de mediadores inflamatórios por monócitos humanos ativados, e suprimiu a produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF_α), interleucina 1-beta (IL-1β), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina E₂ (PGE₂) por monócitos humanos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (HART *et al.*, 2000).

1.4 1,8-Cineol

1,8-Cineol (CIN), monoterpene cíclico, também denominado eucaliptol é o principal constituinte químico, em termos percentuais do óleo essencial de diversas plantas aromáticas (JUERGENS *et al.*, 1998b; MIYAZAWA *et al.*, 2000; TZAKOU *et al.*, 2001; LOUGHRIN & KASPERBAUER, 2003). Este composto possui fragrância refrescante e canforada, sabor pungente (acre), é usado em preparações farmacêuticas de uso tópico, spray nasal, analgésico, desinfetante, como flavorizante de alimentos e na indústria de cosméticos (MIYAZAWA *et al.*, 2000). É usado no tratamento de tosse, dor muscular, reumatismo, asma e cálculo renal (GEREMIA, 1955 *apud* MIYAZAWA *et al.*, 2000; MARGRET, 1999 *apud* MIYAZAWA *et al.*, 2000). Tradicionalmente é recomendado para tratar sintomas de doenças das vias aéreas, exacerbados por infecção. Monoterpenos são descritos para tratar distúrbios obstrutivos crônicos das vias aéreas, principalmente por sua familiar propriedade secretolítica (JUERGENS *et al.*, 1998a e 1998b).

CIN é o principal agente ativo isolado do óleo essencial de *Eucalyptus polybractea* (JUERGENS *et al.*, 1998b). O referido composto é o principal constituinte químico em termos percentuais do óleo extraído de folhas de *Salvia ringens* (TZAKOU *et al.*, 2001), *Hyptis martiusii* (ARAUJO *et al.*, 2003), *Laurus nobilis* L. (MOTEGI *et al.*, 2002) e *Ocimum basilicum* L. (LOUGHRIN & KASPERBAUER, 2003). É o maior constituinte do óleo essencial extraído de folhas e rizomas de *Alpinia smithiae* (JOSEPH *et al.*, 2001) e do óleo essencial extraído de frutos de *Aframomum danielii* (Hook. F.) K. Schum (MARTINS *et al.*, 2001). É um dos principais componentes do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (LUZ *et al.*, 1984; PRUDENTE *et al.*, 1993; OLIVEIRA, 1994, LAHLOU *et al.*, 2002a, b). Em termos percentuais representa o maior constituinte químico

(17,94 %) da amostra do óleo em estudo (Tabela 1). A estrutura química do CIN está ilustrada na figura 3.

A síntese do CIN se dá através da enzima 1,8-cineol ciclase (cineol sintase) que catalisa a conversão do geranyl pirofosfato para simétrico monoterpreno éter 1,8-cineol (CROTEAU *et al.*, 1994). A biotransformação do CIN tem sido estudada intensivamente e vários metabólitos foram identificados como 2-exo-hidroxi-1,8-cineol, (±)-endo-hidroxi-1,8-cineol, (±)-3-exo-hidroxi-1,8-cineol, 2-oxo-1,8-cineol e 3-oxo-1,8-cineol foram identificados em urina de ratos (MIYAZAWA *et al.*, 1989; 1992). O CIN é catalizado pelas enzimas CYP3A para dar origem ao 2-exo-hidroxi-1,8-cineol no sistema microsomal hepático de ratos e humanos. Sugere-se que a enzima do sistema microsomal hepático CYP3A4 seja a principal enzima que catalisa a hidroxilação do CIN pelo sistema microsomal do fígado de humanos (MIYAZAWA *et al.*, 2000; 2001a, b; MIYAZAWA & SHINDO, 2001).

Óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, ricos em CIN, são detentores de atividade antimicrobiana. Dentre os mesmos podemos citar: o óleo essencial de *Jasonia montana* com atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagnophytes*, *Cryptococcus neoformis* e *Candida albicans* (HAMMERSCHMIDT *et al.*, 1993). O óleo essencial extraído de folhas de *Pneumus boldus* possui atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* sp e *Candida* sp. O óleo essencial, extraído de frutos de *Aframomum danielli* (Zingiberaceae) é eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, bem como leveduras e fungos

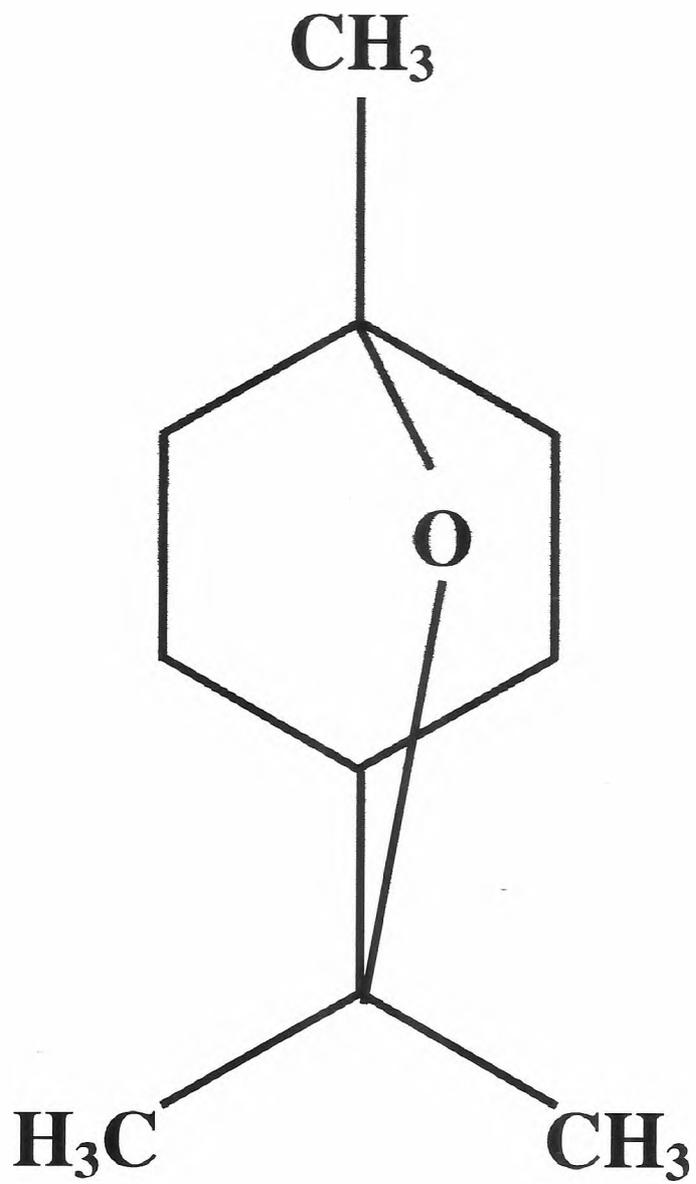


FIGURA 3- Estrutura química do 1,8-cineol

filamentosos (MARTINS *et al.*, 2001). O óleo essencial de plantas do gênero *Eucalyptus* possui atividade bacteriostática, principalmente sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (CIMANGA *et al.*, 2002). O óleo essencial de *Artemisia asiatica* Nakai é detentor de efeito antimicrobiano contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Rhodotorula rubra* e *Aspergillus fumigatus* (KALEMBA *et al.*, 2002). O óleo essencial de *Chrysanthemum boreale* Makino é eficaz contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (KIM *et al.*, 2003). O óleo de *Salvia fruticosa* apresentou significativa atividade antifúngica contra *Rhizoctonia saloni*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solanif* f. Sp cucurbitae (PITAROKILI *et al.*, 2003) e óleos produzidos por espécimes do gênero *Thymus* também são eficazes agentes antibacterianos (FALEIRO *et al.*, 2003).

Óleos essenciais cujo principal constituinte é o CIN, como o óleo essencial de *Pinus pinea* e seus principais componentes químicos, CIN e limoneno, apresentaram atividade acaricidal contra *Tyrophagus putrescentiae* (MACCHIONI *et al.*, 2002). O óleo essencial de *Hyptis martiusii* Benth e seu principal componente CIN apresentaram significativo efeito inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* e *Bemisia argentifolii*, vetores da dengue e praga da mosca branca de frutos, respectivamente (ARAUJO *et al.*, 2003).

O CIN não possui efeito citomutagênico quando investigado seu potencial mutagênico no ensaio *Salmonella microsome* (Ames test) (GOMES-CARNEIRO *et al.*, 1998). Este composto foi um dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de folhas e flores de diversas plantas aromáticas, menos tóxico contra larvas do mosquito *Culex pipiens* (TRABOULSI *et al.*, 2002).

O CIN suprimiu a produção de metabólitos do AA, leucotrieno B₄ (LTB₄) e PGE₂ em monócitos de pacientes com asma brônquica (JUERGENS *et al.*, 1998a). Inibiu a produção de TNF- α , IL-1 β , LTB₄ e TXA₂ produzidos pela estimulação com LPS, em monócitos humanos *in vitro*. Esse é o primeiro registro de um novo mecanismo de ação para os monoterpenos, sugerindo o CIN como forte inibidor de citocinas que pode ser aprovado para tratamento de inflamação das vias aéreas na asma brônquica e outras desordens sensíveis a esteróides (JUERGENS *et al.*, 1998b).

O óleo essencial de *Nepeta italic* L., cujo principal constituinte é o CIN, mostrou significativa atividade analgésica que foi bloqueada pela naloxona. Este efeito não foi observado com estímulo termo-algésico, sugerindo uma atividade específica sobre receptores opióides. Os autores notificaram correlação entre atividade analgésica e quantidade de CIN no óleo da referida espécie (AYDIN *et al.*, 1999). No teste da formalina, o efeito antinociceptivo do CIN foi reversível pelo pré-tratamento do animal com naloxona (SANTOS & RAO, 2000).

O CIN possui efeito supressor sobre inflamação experimental em ratos. Este monoterpeno inibiu o edema de pata induzido por carraginitina e granuloma promovido por fibra de algodão, inibiu o aumento da permeabilidade capilar induzido por ácido acético e a nocicepção química promovida por injeção intraplantar de formalina e ácido acético i.p (SANTOS & RAO, 2000).

O CIN induziu proteção contra injúria hepática induzida por GalN-LPS, através da inibição da produção do TNF- α . É sugerido que o CIN pode ser um agente promissor no combate a patologias associadas ao choque séptico (SANTOS *et al.*, 2001). CIN, bloqueou também a injúria

gástrica promovida por etanol, de modo similar ao ácido nordihidroguanético, um inibidor da lipoxigenase. Em estudo de secreção gástrica, o CIN semelhantemente a cimetidina, um bloqueador do receptor de histamina, inibiu o volume do suco gástrico bem como a acidez total (SANTOS & RAO, 2001).

Os efeitos do óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia* Vohl e de seus constituintes monoterpenos foram investigados sobre a acetilcolinesterase eritrocitária de humanos *in vitro*. Usando método de espectrofotometria de análises cinética, os autores concluíram que o óleo essencial, CIN e α -pineno inibem de modo reversível e não competitivo a acetilcolinesterase (PERRY *et al.*, 2000). O óleo essencial e seus constituintes monoterpenos também inibiram a referida enzima *in vivo*. Este efeito é relevante para o tratamento da doença de Alzheimer (PERRY *et al.*, 2001).

O óleo essencial de *Nepeta italica*, rico em CIN, bloqueou contrações induzidas por ACh em íleo de rato, mas não foi eficaz em inibir o efeito contraturante do neurotransmissor colinérgico em aorta de rato (AYDIN *et al.*, 1999). O CIN, administrado por via intravenosa, em ratos anestesiados e em vigília, induziu hipotensão arterial (LAHLOU *et al.*, 2002b). Os autores sugerem que o referido efeito seja mediado pelo relaxamento da musculatura lisa vascular.

O CIN inibiu o crescimento de células MOIT4B e HL-60 de leucemia humana, mas não interferiu no crescimento de células TATO III de câncer estomacal. O presente estudo mostra que a supressão do crescimento celular pelo CIN, em linhagens de células leucêmicas resulta da indução de apoptose por este composto (MOTEKI *et al.*, 2002).

1.5 Organização morfofuncional e histológica do sistema respiratório

As funções primárias do sistema respiratório são: trocas de gases entre atmosfera e sangue, regulação homeostática do pH corporal, proteção contra substâncias irritantes e patógenos inalados e vocalização. Além destas funções, o sistema respiratório também é fonte de perda significativa de água e calor do corpo. Nos mamíferos, os pulmões são os órgãos encarregados de fornecer O₂ ao organismo e dele retirar o excesso de CO₂. Nos seres humanos a superfície pulmonar encarregada das trocas gasosas é de 70 a 100 m² (uma das maiores áreas de contato do organismo com o meio ambiente). Essa enorme superfície fica retida no interior do tórax, distribuída por 300 milhões de alvéolos pulmonares (SILVERTHORN, 1998). As vias aéreas são mantidas úmidas por uma camada de muco que reveste a superfície epitelial. O muco é secretado por células caliciformes isoladas presentes no revestimento epitelial das vias aéreas, e por pequenas glândulas submucosas. O muco é removido das vias aéreas por meio do epitélio ciliado, comum na zona de condução. A traquéia é revestida por uma mucosa especial chamada mucosa respiratória que apresenta epitélio estratificado ciliado (ROSS *et al.*, 1993).

O sistema respiratório dos mamíferos é compreendido pela zona de transporte gasoso, formado pelas vias aéreas superiores e árvore traqueobrônquica, encarregados de acondicionar e conduzir o ar até a intimidade dos pulmões; pela zona respiratória onde se realizam as trocas gasosas; e por uma zona de transição, interposta, entre as duas primeiras. A árvore traqueobrônquica, ou zona de transporte aéreo estende-se da traquéia até os bronquíolos terminais. A partir da traquéia, a árvore traqueobrônquica se divide progressivamente, em geral por dicotomia. Os brônquios fonte (direito e esquerdo) são considerados como primeira

geração da árvore traqueobrônquica. A segunda geração corresponde aos brônquios lobares, e assim sucessivamente até os bronquíolos terminais (16^a geração) (ZIN & ROCCO, 1999).

A zona de transição se inicia no bronquíolo respiratório caracterizado pelo desaparecimento das células ciliadas do epitélio bronquiolar. Os bronquíolos respiratórios também se diferenciam por apresentarem, espaçadamente, sacos alveolares e por se comunicarem diretamente com os alvéolos por meio de pequenos poros em suas paredes denominados canais de Lambert. A partir do último ramo do bronquíolo respiratório surgem os ductos alveolares, que, por sua vez, terminam em um conjunto de alvéolos, os sacos alveolares. A zona respiratória, então é constituída pelos ductos e sacos alveolares e alvéolos, onde ocorrem as trocas gasosas (ZIN & ROCCO, 1999).

A traquéia apresenta o formato de um tubo vertical, localizado abaixo da laringe. Possui uma porção cervical e uma torácica formada por anéis cartilagosos sobrepostos ligados pela membrana cricotraqueal. Na extremidade posterior da traquéia não existe anel, esta extremidade é de consistência não firme e possui tecido muscular que tensiona as bordas de cartilagem e não deixa que elas se abram, permitindo que a porção posterior possua certa mobilidade. A membrana cricotraqueal reveste externamente todo órgão até a bifurcação onde a traquéia se divide, ponto este denominado carina.

Histologicamente, os tecidos traqueal e bronquiolar são formados por quatro camadas de células: camada mucosa (epitélio pseudo-estratificado cilindro ciliado e uma lâmina própria), camada submucosa, camada de músculo liso com peças de cartilagem e camada adventícia. As células comuns do epitélio traqueobrônquico são ciliadas, caliciformes e células basais. As células ciliadas estão presentes em toda zona de condução e

através dos movimentos dos cílios, varrem o muco desde os pontos mais distais das vias aéreas até a faringe. As células caliciformes estão localizadas entre as ciliadas e sua principal função é a produção de muco. Existem ainda as células basais que funcionam como aporte de novas células (ROSS *et al.*, 1993).

Com a ramificação dos brônquios suas paredes vão gradualmente perdendo alguns componentes, daí a ausência de cartilagem e glândulas submucosas nos bronquíolos da zona de condução. Nestes bronquíolos, o epitélio e fibras musculares lisas são seus principais componentes estruturais. O bronquíolo respiratório, presente na zona de respiração, é constituído por epitélio cilíndrico cúbico. A parede dos alvéolos é delgada, sendo recoberta basicamente por três tipos de células epiteliais: pneumócitos tipo I, pneumócitos tipo II e células em escova (ROSS *et al.*, 1993).

1.6 Anatomo-fisiologia do músculo liso respiratório

O músculo liso é uma estrutura importante para o funcionamento do organismo, uma vez que seu funcionamento anormal contribui para o surgimento de uma série de patologias como hipertensão, aterosclerose, coronariopatia, asma, distúrbios intestinais e apoplexia, entre outras (MURPHY & BRAYDEN, 1995) Várias destas patologias envolvem diretamente o mecanismo de excitação-contracção do músculo liso.

Nos mamíferos, o músculo liso traqueal situa-se na porção dorsal, unindo as extremidades dos anéis cartilagosos. Os anéis cartilagosos estão presentes em toda extensão da traquéia e nos brônquios principais, tornando-se esparsos na extremidade distal da árvore respiratória (COMROE, 1977). O músculo liso traqueal é constituído por uma camada de feixes de fibras musculares lisas com ramificações mínimas e orientação

transversal. O suprimento vascular para o músculo liso é derivado da artéria brônquica (STEPHENS, 1988).

Na maioria dos músculos viscerais, a superfície da célula em repouso é lisa e regular. Nesse tipo de musculatura as junções célula à célula são muito freqüentes. A capacidade do tecido para contrair baseia-se na existência dessas junções (junções gap) que permitem a excitação tanto oriunda de nervos como de células marca-passo e espalham-se por todas as células (SOMLYO, 1985; MOSS & HOFMANN, 1992).

As células de músculo liso, em geral, não apresentam um sistema organizado para o processo de excitação-contração, como o sistema de díades e tríades dos músculos esqueléticos. O retículo sarcoplasmático (RS) existe em forma rudimentar. Apesar disso, apresenta uma organização celular ímpar que é a base de seu mecanismo contrátil (MOSS & HOFMANN, 1992; SPERELAKIS, 1993). Os filamentos contráteis ocorrem paralelamente ao eixo longitudinal da célula. Estes filamentos são unidos, em série, por corpos densos (equivalentes a linha Z) e finalmente com o plasmalema, com corpos densos terminais os quais parecem formar uma espiral ao longo do comprimento da célula. Devido a esse arranjo espiralado, a tensão desenvolvida por uma célula de músculo liso ocorre nas três dimensões, sendo que o componente primário da força é ao longo do eixo longitudinal (SMALL & FOSTER, 1986; MOSS & HOFMANN, 1992).

O sarcolema contém tipos diferentes de proteínas receptoras que podem iniciar ou inibir o processo contrátil (KNOT *et al.*, 1996). Os músculos lisos podem ser ativados por múltiplos tipos de sinais nervosos, estimulação hormonal, estiramento do músculo e por outras formas (MEISS, 1989; SAITO *et al.*, 1994; NIXON *et al.*, 1994).

As células dos músculos lisos das vias aéreas estão dispostas em feixes (300 a 400 células) separados por espaço interfascicular que contém colágeno, elastina, fibroblastos, mastócitos, axônios e vasos sanguíneos (STEPHENS, 1988). O sarcolema do músculo liso traqueal possui uma bicamada lipídica com moléculas de proteínas inseridas. O RS existe como uma estrutura tubular mas não apresenta a organização do RS do músculo esquelético. Apresentam “corpos densos” que são considerados análogos dos discos Z dos músculos estriados. Os “corpos densos” são estruturas que transmitem força mecânica e proporcionam o acoplamento entre os miofilamentos e o estroma do tecido conectivo (GABELLA, 1976; SOMLYO *et al.*, 1980). A contração do músculo liso das vias aéreas induz aumento de resistência à passagem de ar (BERNE & LEVY, 1998).

1.7 Propriedades elétricas de células de músculo liso respiratório

O potencial transmembrana (E_m) em células musculares de traquéia, brônquios e bronquíolos está no intervalo de -45 a -60 mV. O E_m pode aumentar com a redução do diâmetro das vias aéreas (SMALL & FOSTER, 1990).

Em várias células, a contração muscular é precedida por despolarização do E_m e as variações na atividade elétrica da membrana estão relacionadas às funções dos tecidos (MOSS & HOFMAN, 1992).

Em algumas espécies animal, as células musculares das vias aéreas são eletricamente quiescentes. Em traquéia de humanos, gatos e galinhas e brônquios e bronquíolos de caninos não ocorrem oscilações espontâneas do E_m (SMALL & FOSTER, 1990). No entanto, em traquéia de bovinos, caninos e cobaias frequentemente ocorrem oscilações espontâneas do E_m , conhecidas como ondas lentas com amplitude média de 2 a 20 mV

(SMALL, 1982; AHMED *et al.*, 1984; SMALL & FOSTER, 1986). As células musculares lisas de traquéia de cobaio apresentam oscilações espontâneas que podem ser disparadas continuamente ou periodicamente em frequência aproximada de 0,7 a 1,6 Hz. O E_m oscila espontaneamente devido a uma redução gradual na permeabilidade do sarcolema aos íons K^+ e quando é alcançado o limiar para ativar canais de Ca^{2+} se inicia um potencial de ação (MOSS & HOFMANN, 1992). Nos músculos lisos das vias aéreas que possuem atividade espontânea, as células que disparam as ondas lentas de maior frequência funcionam como marca-passo, excitando as células menos ativas no mesmo feixe muscular (McCAIG & SOUHRADA, 1980). O músculo liso das vias aéreas não funciona como sincício perfeito, apesar da existência do acoplamento elétrico entre as células (DIXON & SMALL, 1983).

O mecanismo exato de geração de ondas lentas não está prontamente determinado. Acredita-se que sejam de natureza miogênica uma vez que não são alteradas por bloqueadores ganglionares e neuronais (SANDERS, 1989). As ondas lentas não dependem da síntese de PGs (McCAIG & RODGER, 1986) e são abolidas pelo resfriamento, por inibidores de ATPase, por alterações no E_m (SMALL & FOSTER, 1990) e por inibidores do influxo de Ca^{2+} e em meio isento de Ca^{2+} (AHMED *et al.*, 1985; SMALL & FOSTER, 1990).

Em traquéia de cobaio, o aumento da frequência das ondas lentas está associado com alterações no tônus da musculatura da traquéia, com espasmos induzidos por leucotrieno D_4 (LTD_4), por baixas concentrações de histamina (HA) e acetilcolina (ACh) (AHMED *et al.*, 1984; McCAIG & RODGER, 1986).

Os efeitos eletrofisiológicos de agentes contraturantes podem estar associados com despolarização da membrana plasmática, indução ou

aumento da frequência de ondas lentas e deflagração de potencial de ação (SMALL, 1982) e agentes relaxantes podem estar associados com hiperpolarização e supressão de ondas lentas (SUZUK *et al.*, 1976; SMALL, 1982). Em traquéia de cães e bovinos, o KCl produz espasmos seguidos de despolarização que não deflagra potencial de ação. Em traquéia de cobaio, no entanto, o KCl, em baixas concentrações, não evoca potenciais de ação mas promove atividades de ondas lentas e em concentrações mais elevadas dispara potencial de ação (SMALL & FOSTER, 1990). Os efeitos espasmogênicos do KCl podem depender do influxo de Ca^{2+} através dos canais de membrana dependentes de voltagem (FOSTER *et al.*, 1983).

Os efeitos contraturantes do tetraetilamônio (TEA), em músculo liso traqueal, parecem estar associados com despolarização do sarcolema, promoção de ondas lentas e deflagração de potencial de ação semelhante a “*spikes*” (KANNAN *et al.*, 1983). Similar ao KCl, os efeitos espasmogênicos do tetraetilamônio em músculo liso respiratório, dependem do influxo de Ca^{2+} por meio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (RAEBURN & RODGER, 1984 WEISS *et al.*, 1985).

Em músculo liso traqueal de cobaio, agonistas adrenérgicos como adrenalina, isoprenalina e terbutalina inibem as descargas de ondas lentas despolarizando as células (SMALL, 1982; ALLEN *et al.*, 1985). A hiperpolarização evocada por estes agonistas provavelmente é devida a abertura de canais de K^+ (ALLEN *et al.*, 1985).

Os efeitos espasmogênicos da ACh e HA, em músculo liso das vias aéreas, provavelmente não dependem diretamente da abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (FOSTER *et al.*, 1984; AHMED *et al.*, 1985) nem do influxo de Ca^{2+} através de canais operados por receptores, mas

provavelmente da liberação de estoques de Ca^{2+} intracelular (FOSTER *et al.*, 1983).

1.8 Controle neural das vias aéreas

Há cerca de três séculos, Thomas Bartolinus fez uma descrição dos nervos no pulmão do homem. Em suas observações, notou que o *Nervorum stomachicorum* estava sempre localizado na parte posterior dos tubos brônquicos e que pequenos e grandes ramos nervosos insinuavam-se sobre a porção membranosa externa (BARTOLINUS, 1663). Anos após, Willis descreveu “os usos e ofícios do par intercostal”, e subseqüentemente associou um possível envolvimento desses nervos com a asma (WILLIS, 1679).

As vias aéreas contêm inervação motora e sensorial que controla a função dos músculos, vasos sanguíneos e glândulas. O sistema nervoso autônomo atua tanto na broncoconstrição como na broncodilatação das vias aéreas. A inervação das vias aéreas é feita por quatro classes de nervos autonômicos: nervos colinérgicos, nervos adrenérgicos, nervos excitatórios não adrenérgicos e não colinérgicos e nervos inibitórios não adrenérgicos e não colinérgicos (LAITINEN & LAITINEN, 1987; PALMER & BARNES 1987; BARNES 1988; VAN NIEUWSTADT *et al.*, 1994; ZIN & ROCCO, 1999). Van Nieuwstadt *et al.* (1994) destacaram a existência e diferença quanto a distribuição da densidade dos receptores para os três sistemas colinérgico, adrenérgico e sistema não adrenérgico e não colinérgico (NANC).

De modo geral, existe concordância de que a inervação para a musculatura, vasos sanguíneos e glândulas das vias aéreas é dupla: excitatória e inibitória. A estimulação vagal contrai a musculatura lisa das vias aéreas, aumenta a secreção glandular e relaxa os vasos pulmonares

(HAHN *et al.*, 1978). Estes efeitos são bloqueados pelo sulfato de atropina, sugerindo que são mediados pela ativação dos receptores muscarínicos (WIDDICOMBE, 1963). A estimulação simpática, oposta ao parassimpático, induz relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas, contrai os vasos sanguíneos e inibe a secreção glandular (CABEZAS *et al.*, 1971; KADOWITZ *et al.*, 1976).

1.8.1 Inervação colinérgica

Em todas as espécies, o controle neural dominante das vias aéreas é exercido por nervos parassimpáticos que medeiam a broncoconstrição (OLSEN *et al.*, 1965; BARNES, 1986a; PENDRY, 1993). Esses nervos surgem no núcleo vagal do tronco cerebral, descem através do nervo vago e fazem sinapse em pequenos gânglios localizados em extenso plexo dentro da parede das vias aéreas. Pequenas fibras partem destes gânglios e inervam as células alvo. A estimulação vagal resulta em constrição dos músculos lisos das vias aéreas a qual pode ser aumentada por inibidores de colinesterase ou bloqueada por atropina, indicando que ocorre a liberação de acetilcolina (ACh) que atua em receptores muscarínicos (RICHARDSON & FERGUNSON, 1979; DAWSON, 1984). O sistema nervoso parassimpático possui grande importância na manutenção do tônus da musculatura lisa das vias aéreas de várias espécies, incluindo cobaio e seres humanos (GROSS & SKORODIN, 1984; VAN DER VELDEN & HULSMANN, 1999).

1.8.2 Inervação adrenérgica

A inervação simpática na musculatura lisa respiratória não é bem caracterizada e, dependendo da espécie, pode ser esparsa ou ausente (MANN, 1971; PENDRY, 1993; VAN NIEUWSTADT *et al.*, 1994). Fibras pré-ganglionares terminam no gânglio estrelado extrapulmonar e fibras pós-ganglionares adentram nas vias aéreas, mas sua distribuição exata não foi bem esclarecida. Nas espécies em que falta um suprimento simpático direto, tem sido mostrada varicosidade colinérgica e noradrenérgica em íntima aposição (JONES *et al.*, 1980; DANIEL *et al.*, 1986; PENDRY, 1993).

É sugerido que a musculatura lisa das vias aéreas de humanos está isenta de nervos adrenérgicos (ZAAGSMA *et al.*, 1987). Em 1997a, Rang *et al.*, afirmaram que a musculatura lisa das vias aéreas de seres humanos não sofre influência do sistema simpático. Em bovinos e caninos foi evidenciada moderada inervação adrenérgica na musculatura das vias aéreas (VAN NIEUWSTADT *et al.*, 1994). O' Donnell *et al.*, (1978) e Doidge & Satchell, (1982) confirmaram a presença de fibras adrenérgicas, apesar de esparsas, nas vias aéreas de cobaias, principalmente na traquéia e brônquios, enquanto os bronquíolos apresentaram ausência total desse tipo de inervação. A artéria pulmonar, veia e arteríolas, bem como as artérias brônquicas apresentam uma extensa inervação adrenérgica, com a maioria das fibras presentes no limite médio adventício da artéria pulmonar. O sistema adrenérgico, nestes animais, controla as vias aéreas apenas da traquéia, e a inibição da musculatura lisa mais periférica das vias aéreas é controlada por fatores não-neurais ou pelo sistema inibitório não adrenérgico (O' DONNELL *et al.*, 1978).

Apesar da inexistência de fibras adrenérgicas na musculatura lisa das vias aéreas, em seres humanos, ou existência esparsa em outras espécies animais, os receptores adrenérgicos (tipo β) têm importante papel no relaxamento bronquial. Estes receptores estão abundantemente presentes na musculatura lisa das vias aéreas de humanos e são provavelmente ativados pela adrenalina circulante, promovendo broncodilatação (VAN DER VELDEN & HULSMANN, 1999).

1.8.3 Inervação não adrenérgica e não colinérgica

Além da inervação simpática e parassimpática, evidências sugerem a existência de uma outra via neuronal que não é de natureza adrenérgica nem colinérgica (NANC). Tem-se relatado mecanismos excitatórios broncoconstritor e broncodilatador NANC (PENDRY, 1993; FAME *et al.*, 1994). Richardson (1979) e Barnes (1986a) demonstraram a existência de mecanismos NANC excitatórios e inibitórios nas vias aéreas de animais e seres humanos. A contração neuronal não colinérgica foi demonstrada em vias aéreas de cobaio *in vitro* (GRUNDSTROM *et al.*, 1981).

No sistema NANC existem mediadores que causam relaxamento e mediadores que causam contração da musculatura lisa bronquial que são respectivamente os mediadores inibitórios (broncodilatadores) e excitatórios (broncoconstritores) do NANC. Os mediadores NANC excitatório e inibitório apresentam importante papel na patogênese da asma (JOOS *et al.*, 2000).

Provavelmente, a broncoconstrição produzida pela inervação NANC seja mediada via liberação de taquicininas, tais como substância P (SP) e neurocinina A (NKA) de fibras C sensitivas não mielinizadas. Estas fibras podem ter dupla função, sensitiva aferente e motora eferente (SOLWAY &

EEF, 1991; PENDRY, 1993). Broncodilatação NANC possivelmente é mediada, pelo menos parcialmente, por neuropeptídeos, tais como peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e peptídeo histidina-isoleucina-metionina (PHI/M) (DIAMOND & GILLESPIE, 1982; BELVISE *et al.*, 1993). Tem sido proposto que o óxido nítrico (NO) ou uma substância símile, seja o neurotransmissor em nervos inibitórios NANC (LAMMERS *et al.*, 1992).

1.8.3.1 Taquicininas

São neurotransmissores do sistema nervoso NANC excitatório. Os nervos NANC são constituídos por fibras sensoriais não mielinizadas chamadas fibras C, que contém taquicininas como SP, NKA e neurocinina B (NKB) (HUA *et al.*, 1985). As taquicininas são assim denominadas por induzirem rápida contração da musculatura lisa contrariamente ao que ocorre com as bradicininas (PERNOW, 1983).

A regulação do tônus muscular das vias aéreas de cobaias ocorre em parte pelos mecanismos miogênicos NANC, onde as taquicininas são consideradas como principais mediadores na resposta broncoconstritora deste sistema (KARLSSON, 1986). As taquicininas induzem broncoconstrição em cobaias por ação direta na musculatura lisa bronquiolar. Em outras espécies, inclusive no ser humano, este mecanismo em parte é indireto via estimulação colinérgica (JOOS & PAUWELS., 1993). A contração induzida pela SP, em brônquios e bronquíolos humanos isolados, é dose-dependente e menos potente que a HA ou ACh (JOOS & PAUWELS, 1990).

Fibras nervosas que contém taquicininas estão presentes no aparelho respiratório de várias espécies e a estimulação destas fibras desencadeia efeitos em vários sistemas fisiológicos de várias espécies, incluindo seres humanos (MAGGI *et al.*, 1991b, ZENG & BURCHER, 1994). As fibras

nervosas NANC estão presentes na submucosa, entre as células epiteliais das vias aéreas, nos vasos sanguíneos e na musculatura lisa bronquial de várias espécies (POLAK & BLOOM, 1982, LUNDBERG *et al.*, 1984, MARTLING, 1987). A estimulação de terminações nervosas aferentes induz a liberação de SP e NKA (VAN NIEUWSTADT *et al.*, 1994). A resposta NANC neste caso é devida a liberação antidrômica das taquicininas via nervos sensoriais (BARNES, 1986a).

A síntese das taquicininas ocorre nas células ganglionares sensoriais, e transportadas para áreas periférica e central. A liberação das taquicininas pode ser induzida por diversas substâncias e procedimentos como administração de capsaicina, HA, bradicinina, leucotrieno C₄ (LTC₄), resposta imunológica, estimulação elétrica antidrômica (SARIA *et al.*, 1988; KOHOOGI *et al.*, 1991; LUNDBERG, 1996) e intrusão de íons cálcio em resposta a estímulos despolarizantes (SARIA & LUNDBERG, 1983; SARIA *et al.* 1986; MAGGI *et al.*, 1988).

As taquicininas podem ser liberadas localmente por arco reflexo, ativando receptores específicos de superfície de membranas e produzindo efeitos biológicos (FROSSARD & ADVENIER, 1991). Esses receptores foram identificados por auto-radiografias na musculatura lisa das vias aéreas de cobaios e humanos, distribuídos topograficamente da traquéia até os bronquíolos (JOOS & PAUWELS, 1990). Os receptores taquicininérgicos classificam-se em três tipos, NK-1, NK-2 e NK-3 (FROSSARD & ADVENIER, 1991). A resposta contrátil das taquicininas em brônquio isolado de cobaio é mediada pelos receptores NK-1 e NK-2 (MAGGI *et al.*, 1991a; YUAN *et al.*, 1996).

A ativação destes receptores está associada à estimulação da fosfolipase C, ligada ao fosfatidilinositol. As taquicininas induzem contração da musculatura lisa das vias aéreas pela estimulação da hidrólise

do fosfatidilinositol, com conseqüente formação de inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) que libera íons cálcio de estoques intracelulares (GRANDORDY *et al.*, 1988; LUNDBERG, 1996).

As taquicininas são degradadas por várias enzimas denominadas peptidases, sendo mais conhecida a endopeptidase neutra (NEP). A NEP é também denominada encefalinase e metaloendopeptidase neutra (MATSAS *et al.*, 1983; HOOPER *et al.*, 1985). Esta enzima está presente na camada epitelial e na musculatura lisa das vias aéreas (JOHNSON *et al.*, 1985; SEKIZAWA *et al.*, 1986).

1.8.3.2 Peptídeo intestinal vasoativo

O peptídeo intestinal vasoativo (VIP) é um neurotransmissor inibitório das fibras nervosas NANC. Inicialmente descrito por Said & Mutt (1969) como substância vasoativa. Posteriormente foi obtida de extratos de pulmão (BARNES, 1989), extratos de duodeno de suínos, vias aéreas de felinos, ratos e cobaios (GHATEI *et al.*, 1982) e em outras estruturas de espécies de mamíferos (LILLY, *et al.*, 1993).

Este peptídeo apresenta potente efeito broncodilatador das vias aéreas de várias espécies de animal, incluindo o homem (BARNES, 1989). Em experimentos *in vitro*, o VIP reduz ou previne a broncoconstrição induzida por HA, prostaglandina F_{2α}, serotonina (5-HT), LTD₄ e NKA (SAID, 1987). O VIP ativa a adenilato ciclase da musculatura lisa das vias aéreas induzindo relaxamento em várias espécies (PALMER & BARNES, 1987; BARNES, 1988). Em músculo liso traqueal de suínos, a ação deste neurotransmissor pode ser direta, provavelmente via estimulação de NO (GRIDER *et al.*, 1992; KANNAN & JOHNSON, 1992). No músculo liso das vias aéreas de bovinos, o VIP pode modular a liberação de acetilcolina

ou modificar seu efeito, pois reduz o efeito contrátil deste agonista quando administrado exogenamente (PALMER & SAMPSON, 1985).

O VIP é metabolizado através da NEP (LUNDBERG, 1996). As proteases dos mastócitos também podem hidrolisa-lo. Estudos em pulmão perfundido demonstraram que os metabólitos deste neurotransmissor não possuem ação fisiológica (LILLY *et al.*, 1993).

1.8.3.3 Óxido nítrico

A importância fisiológica do NO se deu a partir dos trabalhos de Furchogtt & Zawadzki, no início da década de 80. Estes pesquisadores estudando a vasodilatação induzida por ACh em aorta de coelho, observaram que esse efeito era dependente da integridade do endotélio e sugeriram que esse agonista liberava uma substância a qual foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (FRDE).

As similitudes dos efeitos farmacológicas do FRDE e do NO, levaram Furchogtt (1988) e Ignarro *et al.*, (1988a, b) a identificarem independentemente que o FRDE seria o NO.

Várias células podem produzir NO, destacando-se células endoteliais, neurônios, neutrófilos (WRIGHT *et al.*, 1989; FIERRO *et al.*, 1995) e macrófagos (Di ROSA *et al.*, 1990). A biossíntese do NO ocorre a partir da L-arginina e do oxigênio molecular, gerando NO e L-citrulina através das enzimas óxido nítrico sintetase (NOS). Foram identificados três subtipos de NOS: a endotelial, a neural (constitutivas), e a induzida. As enzimas constitutivas são importantes na comunicação celular e manutenção de processos fisiológicos, são dependentes de cálcio-calmodulina e produzem NO por curtos intervalos de tempo. A via induzida independe de cálcio-calmodulina, é alterada por corticóides e produz NO por períodos prolongados. Sugere-se que esta via seja mais

importante e a única envolvida em situações fisiopatológicas (RADOMSKI *et al.*, 1990; BATLOUNI & RAMIRES, 1994; GOMÉZ-JIMENEZ *et al.*, 1995).

1.9 Bioquímica da contração do músculo liso respiratório

1.9.1 Acoplamento excitação-contração

Acoplamento excitação-contração (AEC) é a seqüência de eventos elétricos e bioquímicos que induzem o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$; sem considerar os fenômenos bioquímicos da contração propriamente ditos (SPERELAKIS, 1993).

Há um século, foi demonstrado que estímulos elétricos induziam contrações em músculo esquelético de batráquio. Posteriormente, estudos em músculo liso vascular, deixaram claro que contrações induzidas por agonistas poderiam ocorrer com menor ou maior despolarização da membrana plasmática. Desde então, aventou-se a hipótese de componentes elétrico e mecânico no fenômeno de contração muscular. Em 1968, Somlyo & Somlyo denominaram esses eventos de acoplamento eletromecânico e farmacomecânico, respectivamente.

No acoplamento eletromecânico, a regulação da força de contração depende de alterações do potencial transmembrana (E_m) (REMBOLD, 1996). Vários agonistas induzem contração por despolarização das células de músculo liso como 5-HT (NEILD & KOTECHA, 1987), HA (KEEF & ROSS, 1986), endotelina (McPHERSON & ANGUS, 1991) e norepinefrina (NEILD & KOTECHA, 1987; NELSON *et al.*, 1988). Exemplo clássico de acoplamento eletromecânico é a contração induzida pelo potássio. Aumentando-se a concentração extracelular de K^+ , o valor do E_m é

deslocado para valores mais positivos, ativando canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV) e aumentando o influxo de Ca^{2+} e conseqüentemente induzindo contração (NEILD & KOTECHA, 1987; HERMSMEYER *et al.*, 1988).

Em geral, o AEC em músculo, envolve a despolarização da membrana celular através de canais de Ca^{2+} voltagem dependente que altearam a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (JANSSEN, 2002). Vários estudos envolvendo as propriedades biofísicas e bioquímicas do músculo liso das vias aéreas têm sido desenvolvidos, a fim de entender alterações patológicas que induzem broncoespasmo (STEPHENS, 2002).

No acoplamento farmacomecânico, a regulação da força de contração é feita por ligação de agonistas como neurotransmissores, autacóides ou hormônios a receptores residentes na superfície da membrana citoplasmática, sem necessariamente grandes alterações do E_m (SOMLYO & SOMLYO, 1968; REMBOLD, 1996). A ativação desses receptores pode induzir alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ou alterações da sensibilidade das proteínas contráteis a este íon (ALLEN & WALSH, 1994). O aumento do cálcio intracelular depende basicamente da liberação dos estoques intracelulares ou do influxo de cálcio extracelular. O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ocorrer via ativação direta dos canais de cálcio operados por receptores, independente de alterações no E_m (BOLTON, 1979). Outra via de acesso do cálcio extracelular seria através de canais catiônicos não seletivos (CHEN *et al.*, 1993).

No músculo liso, o AEC pode acontecer tanto por acoplamento eletromecânico como farmacomecânico. A despolarização do sarcolema pode ocorrer tanto por estimulação elétrica direta como por ligação de neurotransmissores e/ou hormônios a receptores existentes na membrana citoplasmática. A contração muscular pode ocorrer também por

combinação destes dois mecanismos (RASMUSSEN *et al.*, 1987; SOMLYO & SOMLYO, 1990; MOSS & HOFMANN, 1992).

Em algumas células, a atividade elétrica da membrana está relacionada às funções dos tecidos. Nestas células, a despolarização da membrana precede a contração muscular. As células musculares lisas da traquéia de cobaio apresentam oscilações espontâneas do E_m conhecidas como “ondas lentas” que podem ser disparadas continuamente ou periodicamente em frequência aproximada de 0,7 a 1,6 Hz. O E_m oscila espontaneamente devido a uma redução gradual na permeabilidade da membrana aos íons K^+ e quando atinge limiar para ativar canais de Ca^{2+} um potencial de ação é deflagrado (MOSS & HOFMANN, 1992). A atividade de “onda lenta” pode estar associada com o aumento do tônus muscular da traquéia (SMALL, 1982; SMALL & FOSTER, 1990), com espasmos induzidos por LTD_4 em traquéia de cobaio (McCAIG & RODGER, 1988) ou por baixas concentrações de ACh ou HA (McCAIG & SHOUHRADA, 1980; AHMED *et al.*, 1984).

Em músculo liso das vias aéreas que apresentam atividade espontânea, as células que deflagram ondas lentas de maior amplitude podem agir como “marca-passos” transmitindo o impulso para as células menos ativas do mesmo feixe muscular (McCAIG & SHOUHRADA, 1980).

O processo contrátil das células musculares lisas é iniciado quando ocorre aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol induzido pelo acoplamento eletromecânico (SOMLYO & HIMPENS, 1986) e/ou farmacológico (SOMLYO & SOMLYO, 1968). O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ é o principal mecanismo regulador da contração do músculo liso, onde o cálcio livre no citoplasma liga-se à calmodulina e ativa a enzima miosina quinase de cadeia leve (MLCK) iniciando o processo de fosforilação da molécula de miosina. Quando uma célula muscular lisa é estimulada, a concentração

o cálcio no citosol oscila de 140 nM para 500 - 700 nM (WILLIAMS & AY, 1986; GERTHOFFER, 1987). Células de músculo liso podem utilizar “pools” extra e intracelular de Ca^{2+} (TRIGGLE & SWAMY, 1983). A elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode ser resultante do influxo de Ca^{2+} por meio dos canais dependentes de voltagem, liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares de armazenamento (retículo sarcoplasmático e mitocôndrias), troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ operando de maneira reversa, influxo por meio de canais iônicos operados por receptores (seletivos para $\text{Ca}^{2+}/\text{ATPase}$) e por meio de canais catiônicos não seletivos, como canais de cloreto ou combinação de qualquer fator acima referido (SPERELAKIS, 1993).

A membrana sarcoplasmática de células de músculo liso possui grande variedade de canais iônicos residentes na bicamada lipídica dessa estrutura. Os canais iônicos são proteínas macromoleculares responsáveis pela transmissão de sinais elétricos que passam através de membranas celulares. Através de técnicas de biologia molecular e eletrofisiologia, têm sido clonados, expressados e caracterizados genes que codificam essas proteínas e canais iônicos (ACKERMAN & CLAPHAM, 1997).

Os canais iônicos podem responder diretamente a alterações no E_m (dependentes de voltagem), a ação de hormônios, autacóides e neurotransmissores (operados por receptores), ou indiretamente, através de ativação de mensageiros secundários ativados pela interação agonista-receptor (KNOT *et al.*, 1996).

Os canais de membrana que permitem acesso ao cálcio extracelular são subdivididos em canais dependentes de voltagem, que são ativados por despolarização da membrana e canais operados por receptores específicos de membranas, que são ativados por diversos agonistas (BOLTON, 1979).

Os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são classificados em canais de cálcio tipos L, T ou N de acordo com a cinética de ativação e inativação, condutância, especificidade iônica e sensibilidade a fármacos e toxinas (SPEDDING & PAOLETTI, 1992). O canal de Ca^{2+} tipo L é o mais importante nas células musculares lisas. Esse canal é caracterizado por elevada seletividade para íons Ca^{2+} (KNOT *et al.*, 1998). Podem adquirir três conformações: repouso, ativado (aberto) e inativo. A ativação depende do E_m , sendo desencadeado pela despolarização da membrana celular. Em alguns músculos lisos, a despolarização induz potencial de ação (BOLTON, 1976). Células de músculo liso traqueal possuem E_m entre -48 mV e -60 mV e potenciais de ação não são usualmente observados (FARLEY & MILES, 1977; FOSTER *et al.*, 1983). A ausência de potencial de ação nas células musculares lisas das vias aéreas foi atribuída à alta condutância da membrana ao K^+ que existe nestas células. A alta condutância ao K^+ suprime os aumentos regenerativos na condutância de Ca^{2+} para desencadear o “*spike*” (KROEGER & STEPHENS, 1975).

O cálcio intracelular, além de interagir diretamente com as proteínas contráteis, pode ativar canais iônicos, como os canais de cloreto ativados por cálcio, podendo levar a despolarização da membrana celular (AKBARALI & GILIES, 1993; LAMB *et al.*, 1994; GREENWOOD & LARGE, 1997, 1998)

Canais de cloreto (Cl^-) estão presentes na membrana celular e nas membranas das organelas subcelulares e servem a uma ampla variedade de funções celulares. Existem diferentes tipos de canais de Cl^- com propriedades biofísicas diferentes (SING *et al.*, 1995). Esses canais estão subdivididos em canais de Cl^- operados por ligantes (*ligand-gated*) como receptores de glicina e ácido gama aminobutírico (GABA), canais de Cl^- reguladores de condutância transmembrana na entidade mórbida fibrose

cística, canais de Cl⁻ ativados pelo cálcio e canais de cloreto ativados pelo volume celular (JENTSCH, 1996; JENTSCH & GUNTHER, 1997).

Em vários tipos de células, o Cl⁻ não está em equilíbrio eletroquímico e a condutância a este íon poderá induzir movimento transmembrana de Cl⁻ que poderá influenciar a atividade elétrica de células musculares e neurônios, volume celular e transporte trans-epitelial (SING *et al.*, 1995; JENTSCH, 1996). No sistema respiratório, a importância do íon Cl⁻ está bem documentada, sendo ratificada com a descoberta da secreção anormal de Cl⁻ no epitélio bronquiolar de pacientes com fibrose cística. As manifestações da fibrose cística originam-se a partir de um defeito na proteína do canal de cloreto que não permite que este íon atravesse a membrana celular. Esta anomalia pode promover desidratação da mucosa que reveste a superfície epitelial, causando obstrução brônquica e infecções crônicas. Nesta patologia, a principal causa morte é o comprometimento da função respiratória (EGAN *et al.*, 1992; ACKERMAN & CLAPHAM, 1997; ZEGARRA-MORAN *et al.*, 1997). Alguns estudos sugerem que anormalidades no transporte de Cl⁻, também podem contribuir para a gênese da asma (ALTON *et al.*, 1996). Nesta patologia, existe hiperreatividade das vias aéreas ligada ao aumento da concentração de Ca²⁺ no músculo liso respiratório, podendo haver envolvimento dos canais de Cl⁻ ativados por Ca²⁺ (MORLEY, 1994).

Corrente de cloreto ativada por Ca²⁺ foi demonstrada em traquéia de cão e cobaio (JANSSEN & SIMS, 1994; NAKAJIMA *et al.*, 1995). Em miócitos de traquéia, ACh e HA induzem liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares ativando canais de Cl⁻ ativados por Ca²⁺, levando à despolarização da célula (JANSSEN & SIMS, 1993a, b).

1.9.2 Proteínas contráteis

As células musculares lisas contêm miofibrilas que fazem parte do aparato contrátil destas células. Para compreensão dos mecanismos do AEC do músculo liso, faz-se necessário, certo entendimento sobre a bioquímica das proteínas contráteis.

Os componentes protéicos do elemento contrátil do músculo liso respiratório das vias aéreas são semelhantes aos encontrados em outros músculos lisos e incluem actina, miosina, tropomiosina, caldesmon, calponina, MLCK e proteínas fosfatases (GERTHOFFER, 1991). Actina e miosina são consideradas as duas principais proteínas do maquinário contrátil das células musculares lisas das vias aéreas (ALDESTEIN & EISENBERG, 1980; GUNST & TANG, 2000).

A molécula de miosina é uma grande proteína assimétrica, constituída de seis cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (HC) e dois pares de cadeias leves (LC₂₀). As cadeias pesadas formam uma α -hélice em forma de bastão, com aproximadamente 230 KDa cada. As cadeias leves constituem cada uma das duas cabeças da molécula de miosina, com aproximadamente 20 KDa (LC₂₀) e 17 KDa (LC₁₇). A miosina pode ser dividida em duas porções de domínios funcionais: a meromiosina leve (LMM) que representa a região de interação com outras moléculas para formar o filamento de miosina e a meromiosina pesada (HMM) composta principalmente pelas cabeças e porção intermediária com a cauda, que se correlaciona com as pontes cruzadas. A HMM pode ser subdividida em segmentos S₁ e S₂. O S₁ representa as porções globulares que fazem parte da cabeça propriamente dita e contém os sítios de hidrólise do ATP e ligação com a actina. O S₂ é a parte fina intermediária entre o corpo e as cabeças (ALLEN & WALSH, 1994; GUNST & TANG, 2000).

Os filamentos finos (7 nm de diâmetro), formados principalmente por actina, são compostos de dois polímeros lineares de proteína globular de 42 KDa em forma de hélice (ALLEN & WALSH, 1994; GUNST & TANG, 2000).

A descoberta de duas novas proteínas envolvidas no processo contrátil do músculo liso favoreceu o entendimento dos processos bioquímicos da contração. Essas proteínas são: caldesmon (SOBUE *et al.*, 1981) e calponina (TAKAHASHI *et al.*, 1986) ambas ligadas à actina, à calmodulina e à tropomiosina, e capazes de *in vitro* inibirem a MgATPase, enzima envolvida no processo de fosforilação da miosina (BARRON *et al.*, 1979).

Caldesmon (peso molecular 89 KDa) é encontrada no filamento de actina ao lado da tropomiosina, arranjada continuamente ao longo do eixo da hélice dupla do filamento fino (MOODY *et al.*, 1990; VIBERT *et al.*, 1993; LI *et al.*, 2000). Caldesmon na presença de tropomiosina pode inibir a atividade da actomiosina ATPase (MARSTON & REDWOOD, 1993). Durante a contração do músculo liso das vias aéreas, caldesmon é fosforilada, sugerindo que esta proteína pode está envolvida na regulação da contração no referido músculo (GERTHOFFER & POHL, 1994).

Calponina (peso molecular 34 KDa) é uma proteína específica do músculo liso que se liga ao complexo Ca^{2+} -calmodulina. Evidências sugerem que, quando ligada a actina inibe a formação de pontes cruzadas, e ao ser fosforilada e desligada desta proteína favorece a formação de pontes cruzadas e a contração muscular (PRITCHARD & MARSTON, 1993).

1.9.3 Fosforilação da molécula de miosina e contração do músculo liso

O mecanismo primário de indução da contração do músculo liso é a fosforilação da molécula de miosina. Os processos de fosforilação e desfosforilação da miosina envolvem duas enzimas, miosina quinase de cadeia leve (MLCK) e miosina fosfatase de cadeia leve (MLCP), respectivamente (IKEBE *et al.*, 1987).

Estímulos hormonais ou neuronais aumentam a $[Ca^{2+}]_i$ pela entrada de Ca^{2+} extracelular via canais de cálcio dependentes de voltagem (CCVD) ou canais de cálcio operados por receptores (CCOR) e pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, principalmente do RS, por meio da ativação dos canais de Ca^{2+} presentes na membrana desta organela, ativados pelo IP_3 (SANDERS & PUBLICOVER, 1994). Em consequência do aumento da $[Ca^{2+}]_i$, quatro íons Ca^{2+} (Ca_4) se ligam a molécula de calmodulina (CaM). A conformação da calmodulina é modificada e seus sítios hidrofóbicos são expostos e interagem ativando a MLCK. O complexo Ca_4 -CaM-MLCK produz uma forma isomérica ativa da MLCK que catalisa a reação de transferência do grupo fosforil da molécula de MgATP para o resíduo de serina 19 das duas cadeias leves de miosina (LC_{20}). A ativação da enzima MgATPase dependente de actina ocorre paralela a fosforilação da miosina, disparando o ciclo de pontes cruzadas da miosina ao longo dos miofilamentos de actina, com geração de força e contração do músculo (KAMM & STULL, 1985; HIRANO *et al.*, 1991; REMBOLD, 1992; GUSEV *et al.*, 1994; ALLEN & WALSH, 1994; HIMPENS *et al.*, 1995).

Em condições fisiológicas, o músculo liso mantém-se sob um estado de contração, denominado tônus basal. Este tônus é restaurado a medida

que a $[Ca^{2+}]_i$ é reduzida. A molécula de MLCK retorna a sua forma inativa, com a dissociação do Ca^{2+} -CaM. Com a inativação da MLCK, a LC_{20} é desfosforilada pela ação da MLCP, revertendo os efeitos funcionais da fosforilação, e induzindo relaxamento muscular (SHIMZU *et al.*, 1994). Os níveis de Ca^{2+} retornam ao normal através do bombeamento deste íon para o meio extracelular, pela bomba de cálcio ou por trocas Na^+/Ca^{2+} e pela recaptação de Ca^{2+} para o RS por meio da bomba de Ca^{2+} presente nesta organela celular (MISSIAEN *et al.*, 1992; SOMLYO *et al.*, 1992; HIMPENS *et al.*, 1995).

1.9.4 Receptores de membrana e transdução de sinal

O acoplamento farmacomecânico é um mecanismo fisiológico importante para contração do músculo liso (SOMLYO & SOMLYO, 1968). Faz-se necessário entender como receptores residentes na superfície do sarcolema transduzem e ampliam os sinais que lhes são enviados (SOMLYO & SOMLYO, 1990; LAMBERT & HOFFMANN, 1993).

A transdução de sinais modulada por autacóides, neurotransmissores e hormônios envolve a ativação de receptores que transpõem a membrana celular e proteínas ligadas ao guanosina trifosfato (proteínas G). Essas proteínas acoplam o receptor a várias enzimas efetoras que atuam sobre substratos citoplasmáticos ou ligados à membranas, gerando mensageiros secundários reguladores (RANG *et al.*, 1997a, b).

Em músculos lisos, de um modo geral, agonistas mobilizadores de Ca^{2+} interagem com receptores de membrana e promovem hidrólise de vários fosfolipídeos de membrana, principalmente fosfatidilinositol e fosfatidilcolina. A hidrólise do 4-5-bifosfato de fosfatitilinositol pela fosfolipase C (PLC) origina dois mensageiros, o inositoltrifosfato (IP_3) e o

diacilglicerol (DAG). O aumento inicial de Ca^{2+} citoplasmático, na maioria das células musculares, ocorre devido a liberação de Ca^{2+} induzida pelo IP_3 do RS, via canais de Ca^{2+} (EXTON *et al.*, 1991; MURTHY *et al.*, 1992; BERRIGE, 1993). A liberação de Ca^{2+} do RS contribui para o componente fásico inicial da contração (meio com Ca^{2+}), e para contração transitória (meio livre de Ca^{2+}). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que estimula a atividade de canais lentos de Ca^{2+} . A entrada de Ca^{2+} por meio destes canais pode favorecer o recarregamento do RS (DANIEL *et al.*, 1992).

No músculo liso de traquéia, Daniel *et al.* (1992) propuseram um mecanismo para o processo de acoplamento excitação-contração. Segundo estes autores, os agonistas agem em seus receptores específicos estimulando o “turnover” de fosfatidilinositol. A ligação do agonista ao receptor ativa a fosfolipase C (mediada por proteína G) que hidrolisa o fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) em DAG e IP_3 . O IP_3 , por sua vez age liberando Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático, via canais liberadores de Ca^{2+} . Esta liberação de Ca^{2+} de estoque interno contribui para o componente fásico inicial da contração (em meio contendo Ca^{2+}), e para a contração transiente (em meio livre de Ca^{2+}). O DAG ativa a proteína quinase C que estimula a atividade de canais de Ca^{2+} . A entrada de Ca^{2+} através destes canais pode contribuir também para o recarregamento do RS.

Desde os experimentos de Dale (1914) que diferenciaram as ações muscarínicas e nicotínicas da ACh e com a posterior identificação e classificação dos subtipos de receptores colinérgicos, está evidente que os efeitos do mediador colinérgico resultam da ativação dos receptores muscarínicos e nicotínicos. No sistema nervoso central, é sugerido que os receptores muscarínicos estejam envolvidos no controle motor, regulação da temperatura e da atividade cardíaca, enquanto os nicotínicos estão

envolvidos na transmissão sináptica cerebral (ROLE & BERG, 1996). Entre os efeitos periféricos, os receptores muscarínicos medeiam contração de músculos lisos, secreções glandulares e funcionamento cardíaco.

A mais recente classificação dos receptores colinérgicos, baseada em técnicas de biologia molecular, define cinco tipos de receptores muscarínicos, M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 (CALFIELD & BIRDSALL, 1998). Os receptores M_1 estão localizados nos gânglios e várias glândulas, os M_2 predominam no miocárdio induzindo efeitos cronotrópico e inotrópico negativos, os M_3 e M_4 são encontrados em músculos lisos. Quanto aos receptores M_5 , sua distribuição topográfica não encontra-se bem definida (REEVER *et al.*, 1997).

Os receptores M_1 , M_3 e M_5 , principalmente os M_3 , são os responsáveis pela contração colinérgica dos músculos lisos dos sistemas gastrointestinal e respiratório (GERTHOFFER, 1991). Esses receptores interagem com a proteína- $G_{q/11}$ estimulando a fosfolipase C com subsequente geração de IP_3 e DAG. O IP_3 induz liberação de Ca^{2+} dos estoques de armazenamento intracelulares enquanto o DAG ativa PKC. Ambas as vias operam como moduladores funcionais na contratilidade do músculo liso (BERRIDGE, 1993; TANAKA & NISHIZUKA, 1994). Os receptores M_2 e M_4 interagem com um grupo diferente de proteína G (G_i e G_o) inibindo a adenilil ciclase com conseqüente redução da concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c). A estimulação desses receptores também pode ativar canais de K^+ operados por receptor, bloqueando a atividade dos CCDV.

Auto-radiografia indica a presença de β -adrenorreceptores no músculo liso respiratório, epitélio, glândulas, alvéolos e mastócitos. Nos seres humanos, praticamente todos os β -receptores das vias aéreas são β_2 ,

exceção para os receptores alveolares que são tanto β_2 quanto β_1 . Ao contrário dos receptores muscarínicos, a densidade de β -receptores aumenta da traquéia para os brônquios. A estimulação dos referidos receptores nas vias aéreas induz relaxamento do músculo liso, inibição da liberação de mediadores pelos mastócitos e maior depuração mucociliar. Os agonistas α -adrenorreceptores não exercem qualquer efeito sobre as vias aéreas normais, mais induzem contração em vias aéreas não hígdas (RANG *et al.*, 1997a, b).

Os receptores β -adrenérgicos pertencem a classe de receptores acoplados a proteínas G intermediárias de sistemas efetores (SCHWINN, 1993). A estimulação dos receptores β induz relaxamento da maioria dos tipos de músculo liso por mecanismos que envolvem aumento da concentração intracelular de AMPc. Este segundo mensageiro parece gerar relaxamento por intermédio da ativação de uma proteína-quinase que fosforila e inativa a quinase da cadeia leve de miosina, e desse modo inibe a contração (RANG *et al.*, 1997a, b). Tem-se proposto que o AMPc, primeiramente reduz a concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma e, em seguida, atuaria diretamente sobre o sistema actina-miosina (BÜLBRING & TOMITA, 1987).

Em 1957, os receptores da serotonina ou hidroxitriptamina (5-HT) foram classificados em dois subtipos, M e D. Foi sugerido que os receptores M se localizavam nas terminações parassimpáticas controlando a liberação de ACh e os receptores D no músculo liso (GADDUM & PICARELLI, 1957).

Estudos biomoleculares e com radioligantes mostraram novas identidades para os receptores serotoninérgicos (PEROUTKA & SNYDER, 1979; BRADLEY *et al.*, 1986). Em 1994, foi aceita a classificação

proposta por Humphrey *et al.* (1993). Esses pesquisadores subdividiram os receptores em famílias e subfamílias com os devidos ajustes das classificações anteriores. A classificação vigente considera os aspectos operacionais de Bradley que eram baseados no reconhecimento do receptor por radioligantes sintéticos e incorpora parâmetros modernos de biologia molecular, como a seqüência de aminoácidos, e mecanismos de transdução de sinais envolvidos na ativação de cada tipo de receptor até a formação de segundos mensageiros (HOYER *et al.*, 1994).

Os receptores serotoninérgicos estão classificados em 5-HT_{1(ABCDEF)}, 5-HT_{2(AC)}, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₅. Considerando os aspectos funcionais, os receptores 5-HT_{1(ABCDEF)} inibem a formação de AMPc, 5-HT_{2(AC)} estimulam a hidrólise do fosfatidilinositol originando IP₃ e DAG, 5-HT₃ estão ligados a canais catiônicos e possuem semelhança com os receptores nicotínicos colinérgicos, 5-HT₄ e 5-HT₅ induzem a formação de AMPc (ULLMER *et al.*, 1996).

Em músculo liso traqueal de cobaio, a 5-HT se liga a receptores 5-HT_{2A}, induzindo contração através do aumento da [Ca²⁺]_i por meio de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem tipo L, liberação de Ca²⁺ do RS e ativação de proteína quinase C (WATTS *et al.*, 1994).

Em 1930, Kurzrot e Lieb relataram a presença de uma substância no sêmen capaz de induzir contrações no músculo liso uterino. Goldblatt e Von Euler descreveram, independentemente, as atividades contráteis musculares e vasodilatadoras presentes no líquido seminal e glândulas reprodutoras acessórias masculinas. Von Euler, em 1973, hipotetizando que essa substância seria produzida na próstata, denominou-a prostaglandina, que de fato é sintetizada na vesícula seminal, mais esta nomenclatura perdura até hoje. Após vinte anos, foi demonstrada que a prostaglandina não seria substância única, mas uma família de compostos. Na década de

60, Bergstrom & Samuelsson determinaram a estrutura molecular de duas prostaglandinas e denominaram E e F (PGE e PGF_{2α}). Posteriormente, verificou-se que várias prostaglandinas são sintetizadas nos tecidos a partir do metabolismo do AA. Hoje os derivados do AA são reconhecidos na comunidade científica como compostos essenciais em vários processos reguladores de funções celulares, mas seus papéis fisiológicos não estão completamente esclarecidos (SANDERS & NORTHRUP, 1983).

Coleman *et al.* (1993) propuseram uma classificação para receptores de prostanóides. De acordo com a potência dos cinco prostanóides naturais sobre preparações distintas, estes autores classificaram cinco receptores, um para cada prostanóide: PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂ e PGE₂, denominados respectivamente, receptores DP, FP, IP, TP e EP. Análogos sintéticos dos prostanóides naturais apóiam esta classificação que foi confirmada quando se passou a dispor de antagonistas destes receptores. Os dados obtidos com compostos sintéticos sugerem que há três subgrupos de receptores para PGE₂: EP₁, EP₂ e EP₃. Estudos com radioligantes corroboram esta classificação (RANG *et al.*, 1997a, b).

Postula-se que a capsaicina exerce ações farmacológicas através da interação com receptores específicos de membrana expressados, predominantemente, em neurônios aferentes primários (SZALLASI & BLUMBERG, 1999; SZALLASI, 1999; DELANY *et al.*, 2001; HWANG & OH, 2002; UNDEM & KOLLARIK, 2002). A capsaicina é o princípio ativo pungente da pimenta picante (malagueta) que induz dor severa e imediata quando aplicada sobre a pele (SIMONE & OCHOA, 1991; PARK *et al.*, 1995). Högyes (1878) foi o primeiro a demonstrar que o extrato hidroalcoólico de pimentão doce (*Capsicum annuum*) induziu redução da temperatura corporal quando administrado por via sistêmica. Mais tarde, o

grupo de Jancsó demonstrou que a capsaicina, o princípio ativo do extrato usado por Högyes, estimulava estruturas hipotalâmicas sensíveis ao calor em animais (JANCSÓ-GÁBOR *et al.*, 1970 *apud* SZALLASI, 1994). O consumo oral de capsaicina induz salivação, em humanos, supostamente pela ativação destas estruturas. Jancsó (1960, 1968) observou que administrações repetidas do referido composto resultam em um estado refratário que ele denominou dessensibilização. Esse pesquisador também enfatizou que a ação bifásica (estimulação inicial seguida de dessensibilização) faz da capsaicina e compostos relacionados, agentes pungentes únicos com potencial terapêutico. Jancsó não somente postulou a existência de receptor de dor sensível a capsaicina, mas também antecipou que nervos sensíveis à esse composto contém neurohormônios pró-inflamação. Estes mediadores hipotéticos foram mais tarde identificados como taquicininas, mais especificamente SP e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC) (BUCK & BURKES, 1986; HOLZER, 1988 *apud* SZALLASI, 1994).

Várias evidências indicam a existência de receptores para capsaicina, denominados receptores vanilóides (RV), em várias espécies de mamíferos. As principais evidências são: **i)** ligação específica da resiniferatoxina, um potente análogo natural da capsaicina, com igual espectro de ação, **ii)** síntese da capsazepina, um antagonista competitivo do RV e **iii)** clonagem do primeiro RV, denominado RV₁ (SZALLASI, 1994; SZALLASI & BLUMBERG, 1999; DELANY *et al.*, 2001; HWANG & OH, 2002; UNIDEM & KOLLARIK, 2002). Os RVs estão localizados nos neurônios sensoriais, neurônios vagais (gânglio nodoso e gânglio jugular), cérebro e, possivelmente, em tecidos não neuronais como mastócitos e glia. O espectro de atividades biológicas dos compostos vanilóides sugere a existência de subtipos para estes receptores (SZALLASI & BLUMBERG,

1999). Recentemente foi identificada uma nova família de gene relacionada com RV₁. Usando técnicas de seqüenciamento gênico e clonagem molecular convencional, Delany *et al.* (2001) identificaram um novo RV que foi denominado RVL-2. Diferente do RV₁ e RVL-1, o referido receptor não foi identificado em corpos celulares do gânglio dorsal e fibras nervosas sensoriais porém, foi identificado no epitélio das vias aéreas, rins e sistema nervoso autônomo (SNA) de seres humanos.

Vários estudos corroboram a existência de RVs nas vias aéreas de várias espécies. Dióxido de enxofre e metadisulfeto de sódio induzem broncoconstrição em pulmão isolado perfundido de cobaio, via estimulação de nervos sensoriais sensíveis a capsaicina (BANNENBERG *et al.*, 1994). Neuropeptídeos e capsaicina estimulam a liberação de citocinas inflamatórias em linhagem de células epiteliais brônquicas de seres humanos (BEAS-2B) (VERONESI *et al.*, 1999, 2000). Nervos sensoriais das vias aéreas estão intimamente ligados a hiperresponsividade traqueobronqueal. Achados recentes sugerem que a bradicinina pode ativar o RV₁ por meio de formação de produtos da lipoxigenase que possuem atividade agonista sobre RV₁ em fibras C aferentes de traquéia de cobaio. Mediadores inflamatórios, através da proteína quinase C e fosfolipase C, sensibilizam RV₁. Tais achados levariam a um melhor entendimento da etiologia pouco elucidada da asma. Neste contexto, a clonagem de RVs pode ser um instrumento para descoberta de novas drogas para o tratamento de doenças respiratórias (SPINA & PAGE, 2002; HWANG & OH, 2002; CARR *et al.*, 2002).

SP e NKA possuem potente efeito pró-inflamação nas vias aéreas. Postula-se que a liberação desses neuropeptídeos de nervos sensoriais aferentes, por vários estímulos, é induzida pela ativação de RV₁. Baseado na co-localização de RV e SP em nervo trigêmeo da mucosa nasal de rato,

sugere-se que a ativação periférica de RV₁ pode desencadear fenômeno mediado por SP, tal como inflamação neurogênica (DINH *et al.*, 2003).

A exposição a partículas poluentes do ar está associada com o aumento da morbimortalidade de doenças das vias aéreas. Evidências sugerem que estímulos induzidos por micropartículas podem ser iniciados pela ativação de receptores sensíveis a prótons, incluindo RVs e canais iônicos sensíveis a ácidos (AGOPYAN *et al.*, 2003). Estes autores demonstraram que micropartículas ativam receptores vanilóides em neurônios ganglionares do trigêmeo de rato e células epiteliais das vias aéreas (BEAS-2B), aumentando AMPc e induzindo liberação de citocinas.

1.9.5 Mecanismos moduladores da contração do músculo liso

Mecanismos bioquímicos diferentes podem contribuir na modulação do tônus de músculo liso (YAMAKAGE, 1990). Esses mecanismos podem incluir modulação da ligação agonista-receptor, alteração do potencial elétrico transmembrana, alteração no influxo de Ca²⁺, regulação da concentração de segundos mensageiros, modulação de atividade enzimática e alterações na sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca²⁺. Portanto, a intensidade e velocidade da força de contração desenvolvidas no músculo dependem da via de excitação que seja ativada, sugerindo que o aparato contrátil pode ser modulado por diferentes vias de transdução de sinais e segundos mensageiros (ALLEN & WALSH, 1994).

Alterações na [Ca²⁺]_i controlam os níveis de fosforilação da molécula de miosina, com conseqüente geração de força e contração. Está evidente, que apenas esta cascata de eventos não é suficiente para elucidar todo o processo biomolecular da contração do músculo liso. Evidências indicam a

existência de mecanismos adicionais dependentes ou independentes de Ca^{2+} , que modulam e corroboram para o entendimento dos mecanismos biomoleculares da contração do músculo liso.

Dados experimentais mostram que agentes vasodilatadores, como nitroprusiato de sódio, reduzem a força de contração mesmo na presença da fosforilação da cadeia leve de miosina sem reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Mc DANIEL *et al.*, 1992). Altas $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduzem a sensibilidade da MLCK ao Ca^{2+} , sugerindo ativação de uma outra proteína quinase II dependente de calmodulina (CaMKII) que é menos sensível ao Ca^{2+} do que a MLCK, sendo ativada quando a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estiver na ordem de 1 μM , concentração superior as condições normais de excitação (500 - 700 nM). O complexo ativado $\text{Ca}_4\text{-CaM-MLCKII}$ fosforilaria a serina 815 e não a 19 pela MLCK, reduzindo a sensibilidade ao Ca^{2+} para que ocorresse fosforilação da LC_{20} (WILLIAM & FAY, 1986; TANSEY *et al.*, 1992).

A dependência da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para fosforilar a cadeia leve de miosina foi denominada de sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} . Esta sensibilidade é alta quando pequeno aumento relativo na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induz grande nível de fosforilação da miosina (SOMLYO & HIMPENS, 1986; HIMPENS *et al.*, 1995), e baixa quando grande aumento relativo na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induz pequeno aumento na fosforilação da molécula de miosina (TANG *et al.*, 1992; NOMURA *et al.*, 1992; HIMPENS *et al.*, 1995).

Foi sugerido, através de mensuramento simultâneo da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da força de contração, que a força contrátil pode ser modulada por alterações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por alterações na sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} ou por ambos (BRUSCHI, *et al.*, 1988; HIMPENS & SOMLYO, 1988; HIMPENS *et al.*, 1990).

A sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} pode ser modulada dependendo do tipo de estímulo. Alta sensibilidade pode ser observada com

estímulos que ativam a proteína G, aumentam IP_3 e liberam Ca^{2+} de estoques intracelulares como histamina, fenilefrina, endotelina e ativadores inespecíficos de proteína G (TANG *et al.*, 1992; SATOH *et al.*, 1993; HIMPENS *et al.*, 1995). Baixa sensibilidade pode ser observada com agentes que só induzem influxo de Ca^{2+} como, despolarização de membrana, ATP e inversão da permuta Na^+/Ca^{2+} com baixa concentração de sódio intracelular (REMBOLD, 1992). A redução da sensibilidade ao Ca^{2+} pode ser causada por balanço alterado entre a atividade da quinase e da fosfatase da cadeia leve de miosina, resultando em uma relação fosforilação/desfosforilação reduzida (HIMPENS *et al.*, 1995).

Grande aumento na $[Ca^{2+}]_i$, *per se*, pode diminuir a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} (KITAZAWA & SOMLYO, 1990; STULL *et al.*, 1990; REMBOLD, 1992). Este mecanismo foi denominado dessensibilização induzida por Ca^{2+} . Segundo Stull *et al.*, (1990), um grande aumento na $[Ca^{2+}]_i$ ativa a proteína quinase II que induz fosforilação da MLCK em um sítio regulatório chamado A. MLCK fosforilada neste sítio, tem baixa sensibilidade ao Ca^{2+} . A redução da sensibilidade ao Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} pode proteger a célula contra os efeitos nocivos resultantes de um aumento prolongado deste íon no citosol, e pode explicar parcialmente, a contração fásica de alguns tipos de músculos lisos (KITAZAWA & SOMLYO, 1990).

Outras vias de sinalização podem estar envolvidas nos mecanismos moduladores da contratilidade do músculo liso. Como a via de sinalização que envolve o AA, um segundo mensageiro lipídico liberado da membrana citoplasmática através da ativação da fosfolipase A_2 , via proteína G, promovendo hidrólise de fosfolípido e gerando AA, que inibe a MLCP. Esta enzima induz desfosforilação e seu bloqueio favorece o estado fosforilado da molécula de miosina com conseqüente aumento da força de

contração do músculo sem, necessariamente, ocorrer alteração na $[Ca^{2+}]_i$ (ALLEN & WALSH, 1994).

Outra via de sinalização seria através da ativação da PKC, independente da $[Ca^{2+}]_i$ e fosforilação da miosina. Contrações lentas mantidas podem ser induzidas por éster de forbol, um ativador da PKC (KAMM *et al.*, 1989). Em outras preparações biológicas pode ocorrer aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e/ou fosforilação da LC₂₀ (OZAKI *et al.*, 1990).

Agonistas muscarínicos e α -adrenérgicos podem ativar uma via de sinalização para contração muscular independente de Ca^{2+} . Estudos em células isoladas mostram que estes agonistas promovem contração via proteína G, ativação da fosfolipase C ou, hidrólise da fosfatidilcolina com conseqüente produção de DAG, este segundo mensageiro além de ativar a PKC, ativaria a proteína quinase C tipo epsilon (PKC- ϵ), uma isoenzima da proteína quinase C, levando a fosforilação de duas outras proteínas ligadas ao filamento de actina, calponina e caldesmon, disparando o mecanismo contrátil. Os ésteres de forbol, semelhantes ao DG, ativariam diretamente a PKC e a PKC- ϵ (NISHIZUKA, 1984; ANDREA & WALSH, 1992; COLLINS *et al.*, 1992).

Allen & Walsh (1994) sugerem que as proteínas caldesmon e calponina modulam o ciclo das pontes cruzadas actina-miosina, ambas ativadas por vias dependentes e independentes de Ca^{2+} . A calponina, quando ligada a actina inibiria a formação de pontes cruzadas e ao ser fosforilada se desligaria da molécula de actina favorecendo a formação de pontes cruzadas e conseqüentemente a contração muscular. Uma vez que a MLCK, CaM e PKC possuam diferentes sensibilidades ao Ca^{2+} e que calponina e caldesmon tenham menos afinidade do que a MLCK ao complexo Ca-CaM, a célula poderia ativar mecanismos diferentes para

controlar a proporção fosforilação/desfosforilação da miosina e calponina e, graças a estes mecanismos pode regular com precisão o estado contrátil do músculo liso. A via de sinalização que envolve a PKC- ϵ poderia ativar diretamente a calponina independente de Ca^{2+} e de sua fosforilação, permitindo a dissociação entre calponina e actina favorecendo a formação de pontes cruzadas e contração. Este mecanismo é condizente com a resposta contrátil lenta induzida pelos ésteres de forbol. A $PGF_{2\alpha}$ também ativa a PKC- ϵ e produz parte de sua resposta contrátil independente de Ca^{2+} (KANASHIRO & KHALIL, 1998).

Estudos recentes apontam o possível papel das mitocôndrias na regulação da $[Ca^{2+}]_i$, sugerindo um papel fisiológico citoprotetor contra elevadas concentrações de Ca^{2+} no citoplasma celular (GUNTER *et al.*, 1994; DUCHEN, 1999).

Segundo Gerthoffer (1991) existem dois sistemas moduladores que agem sobre a contração do músculo liso das vias aéreas: fosforilação das LC_{20} dependentes de Ca^{2+}/CaM e um mecanismo envolvendo filamentos finos e dependentes de Ca^{2+} . O mecanismo de filamentos finos envolve moléculas de caldesmon, calponina ou ambas proteínas agindo concomitantemente com moléculas de tropomiosina.

Na fase inicial da contração, a enzima MLCK é ativada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzindo à fosforilação das cadeias leves de miosina (De LANEROLLE & STULL, 1980; GERTHOFFER, 1986, KAMM *et al.*, 1989). Provavelmente o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ativa também a CaM quinase II. A proteína quinase é ativada pelo DAG (DUNCAN *et al.*, 1987).

Na modulação do sistema contrátil do músculo liso das vias aéreas foi observada a importância do mecanismo regulatório do filamento fino dependente de Ca^{2+} . As proteínas do filamento fino caldesmon e calponina

estão presentes no músculo liso traqueal e estudos preliminares sugerem que estas moléculas protéicas são fosforiladas durante a contração do músculo. O uso de marcadores de Ca^{2+} intracelular sugere que a sensibilidade do aparato contrátil ao Ca^{2+} não é fixa, mas pode ser modulada por segundos mensageiros. Acredita-se que ainda não estão elucidados todos os mensageiros e mediadores que acoplam a ativação dos receptores residentes no sarcoplasma à geração de força pela maquinaria contrátil no músculo liso das vias aéreas (GERTHOFFER, 1991).

1.10 Justificativa

Em estudos anteriores, o óleo essencial de *A. zerumbet*, apresentou efeitos miorelaxante e antiespasmódico em músculo liso intestinal (BEZERRA *et al.*, 2000a). Estudos preliminares indicam que o OEAz é capaz de induzir relaxamento do músculo liso traqueal de rato (BEZERRA *et al.*, 2001). O TERP é eficaz em promover o relaxamento da musculatura lisã vascular (NASCIMENTO, 1997, 1990) e intestinal (NASCIMENTO, 1998).

As células musculares lisas das paredes de vários órgãos são vitais para diversas funções do organismo e seu funcionamento anormal corrobora para o surgimento de diversas patologias (SOMLYO & SOMLYO, 1994). As contrações uterinas que favorecem o nascimento das diversas espécies de mamíferos, o sibilo e a dificuldade de respiração na asma, o espasmo das artérias coronarianas e as cólicas uterinas e intestinais são conseqüências da contração de células musculares lisas presentes em diversos órgãos e sistemas do organismo humano e animal.

O músculo liso respiratório é um tipo de músculo para o qual o suporte terapêutico atual carece de novos agentes que ampliem as opções para auxiliar no tratamento de doenças que induzem broncoespasmos.

Torna-se de grande importância a descoberta de nova(s) substância(s) ativa(s), mais seletiva(s) e com menos efeitos colaterais que ampliem as opções terapêuticas desta patologia.

Portanto, sendo o músculo liso respiratório uma estrutura importante na fisiopatologia das doenças respiratórias e sendo o OEAz detentor de efeitos miorelaxante e antiespasmódico em músculo liso intestinal o que fornece uma potencialidade de uso terapêutico, investigamos os efeitos farmacológicos do OEAz e seus principais constituintes químico, TERP e CIN, no músculo liso das vias aéreas de rato.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar os efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt *et R. M.* (OEAz) e de seus principais constituintes químicos, 4-terpineol (TERP) e 1,8-cineol (CIN), em músculo liso respiratório de rato.

2.2 Específicos

Determinar o efeito intrínseco do OEAz e seus principais constituintes químicos sobre o tônus basal do músculo liso respiratório de rato.

Caracterizar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre contrações que independem de receptores específicos, induzidas por altas concentrações de K^+ .

Investigar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico.

Determinar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre contrações induzidas por $PGF_{2\alpha}$.

Pesquisar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre as contrações induzidas por 5-HT.

Investigar o possível envolvimento do OEAz, TERP e CIN na via metabólica do óxido nítrico.

Averiguar a participação de metabólitos do ácido araquidônico no mecanismo de ação do OEAz, TERP e CIN.

Averiguar a participação de canais de cálcio voltagem dependentes no mecanismo de ação do OEAz, TERP e CIN.

Investigar os efeitos do OEAz, TERP e CIN no componente contrátil do neurotransmissor colinérgico que independe do influxo de Ca^{2+} extracelular.

Pesquisar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} em tecido despolarizado por altas concentrações de K^+ (K^+ 80 mM).

Determinar as CI_{50} que caracterizam o efeito do respectivo óleo e constituintes químicos principais sobre o efeito no músculo liso respiratório de rato.

Elucidar o mecanismo de ação do OEAz, TERP e CIN no músculo liso respiratório de rato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Amostra de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M.

A. zerumbet foi coletada em fevereiro de 2001, no Horto de Plantas Medicinais, localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-Ce.

A referida espécie foi classificada por A. M. A. Costa, no Herbário Prisco Viana Bezerra, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde encontra-se arquivada a exsicata com N^o de registro 27.138.

3.1.2 Óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M.

O óleo essencial de *A. zerumbet* foi extraído das folhas por destilação e arraste de vapor d'água. A extração do óleo foi feita no Laboratório de Química da Universidade Estadual do Ceará, com rendimento aproximado de 3% do peso seco das folhas.

3.1.3 4-Terpineol e 1,8-cineol

O 4-terpineol (TERP) (PM= 154,25; d= 0,93 g/mL; τ = 96% v/v) foi obtido da Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA). O 1,8-cineol (C₁₀H₁₈O) (PM= 154,3; d= 0,92 g/mL; R. 10; S. 16) foi adquirido da Sigma Chemical (St. Luis, MO, EUA).

3.1.4 Soluções fisiológicas

A solução fisiológica nutritora de Tyrode modificada, onde fora alterada a concentração de K^+ de 1,68 mM (TYRODE, 1910) para 5 mM, foi preparada com água deionizada contendo a seguinte composição química em concentração milimolar [mM]: NaCl 136; KCl 5; $CaCl_2$ 2; $MgCl_2$ 0,98; $NaHCO_3$ 11,9 e glicose 5,5.

A solução com alta concentração de K^+ [60 mM ou 80 mM] foi obtida pela substituição isotônica do NaCl por quantidade isomolar de KCl, a fim de não alterar a osmolaridade e a força iônica da solução. A solução com zero cálcio [$\emptyset Ca^{2+}$] foi preparada sem inclusão de $CaCl_2$ e adição de 2 mM de EGTA para quelação do cálcio residual. Para correção do potencial hidrogênionico (pH) foi(ram) utilizado(s) hidróxido de sódio [1M] e/ou ácido clorídrico [1N].

Os sais utilizados no preparo das soluções foram obtidos das companhias Sigma Chemical (St. Luis, MO, USA), Merck Sharp Dohme (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.1.5 Drogas

As drogas utilizadas nos ensaios biológicos foram: cloridrato de acetilcolina (ACh), ácido etilenoglicol-bis (β -amino-etil-N,N,N'N'-tetracético) [EGTA], N-nitro-L-argininametil éster (L-NAME), nifedipina (NIF), indometacina (IND), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e cafeína.

Para o preparo das soluções estoques de ACh, L-NAME, $PGF_{2\alpha}$, EGTA, 5-HT e cafeína utilizamos água deionizada como solvente. A NIF e IND foram preparadas em álcool etílico. A NIF durante o preparo e manuseio na hora do experimento foi protegida da luz (BAUER *et al.*,

1995). As soluções de OEAz, TERP e CIN foram preparadas no dia do experimento diretamente em solução fisiológica de Tyrode modificada. Foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente, levando-se em conta que a concentração final máxima de DMSO nas preparações biológicas foi $\leq 0,1\%$. Desde que o DMSO fora utilizado como solvente para OEAz, TERP e CIN, seu efeito foi avaliado em grupos controles pareados nas concentrações de 3×10^{-7} a 3×10^{-4} v/v equivalentes àquelas utilizadas como solubilizante destas substâncias. As soluções estoques foram acondicionadas em diversas alíquotas e mantidas a 4°C .

As drogas utilizadas foram de pureza analítica, obtidas das companhias Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA), Mercke (Darmstadt, Alemanha) e Calbiochem (San Diego, CA, EUA). Com exceção da $\text{PGF}_{2\alpha}$, fabricada por Rhodia-Mérieux Veterinária Ltda (Paulínia, SP, Brasil) e NIF pelo laboratório Bayer (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração e análise química do óleo essencial

O óleo essencial de *A. zerumbet* foi extraído de folhas por destilação com arraste de vapor d'água, em aparelho tipo Clevenger, segundo Craveiro *et al.*, 1976.

O processo de extração do óleo seguiu o seguinte método: folhas frescas (41,30 Kg) foram cortadas em pequenas partes e colocadas em frasco de vidro, conectado em um dos terminais a um vaso de vidro contendo água em ebulição e o outro terminal a um condensador de água fria. O vapor d'água ao passar através das folhas arrasta substâncias voláteis existentes no material formando uma mistura de vapores. Após a

passagem no condensador ocorreu separação das fases hidrofóbicas e hidrofílicas, separadas por decantação. Na fase hidrofóbica ficou retido o óleo, enquanto a fase hidrofílica foi denominada hidrolato.

A análise do óleo essencial foi feita pelo método de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) (STENNHAGEN *et al.*, 1974; ALENCAR *et al.*, 1984; ADAMS, 1989). O óleo foi analisado usando equipamento Hewlett-Packard 5971 GC/MS, nas seguintes condições:

- * Coluna: capilar de DB-5-dimetilpolisiloxane com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno.

- * Gás de arraste (carreador): Hélio (1 mL/min).

- * Programa: 50-180°C a 4°C/min. em seguida 180-280°C a 20°C/min.

- * Temperatura do injetor: 250°C.

- * Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV).

Os espectros de massa obtidos dos constituintes foram também comparados com padrões em biblioteca do computador no aparelho, bem como por comparação visual com espectros de catálogos e observação dos índices de Kovats (ADAMS, 1995). Os constituintes identificados estão listados em ordem de eluição de uma coluna não-polar na Tabela 1. Esta análise foi feita no Parque de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Ceará (PADETEC).

A presença dos dois principais constituintes, 1,8-cineol e 4-terpineol, foi confirmada através da análise do espectro ^1H e ^{13}C -NMR desses compostos comparado com o espectro do óleo. Os compostos foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Os espectros de RNM ^1H e

RNM¹³C foram registrados em um Bruker Avance DRX-500 MHz instrument, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética (CENAUREM). Rotação óptica do óleo: $[\alpha]_D^{20}$ (+) 41,7.

3.2.2 Modelo experimental para registro de contração isométrica em músculo liso *in vitro*

Foram usados ratos (*Ratus norvegicus*) Wistar Kyoto, adultos, machos, com peso entre 200-350 gramas, oriundos do Biotério do Instituto de Biomedicina UFC/HEMOCE. Os animais foram sacrificados por concussão cerebral. A traquéia foi removida através de incisão longitudinal da pele na face ventral do pescoço. As glândulas parótidas e os músculos hióideo e esterno-cleido-mastoideo foram afastados, a traquéia removida e transferida para placa de Petri com solução fisiológica de Tyrode modificada. Os tecidos anexos foram desprezados e a mesma seccionada transversalmente em anéis (1,0 cm de comprimento) e fixados através de peças triangulares manufaturadas com fio de aço inoxidável (Fig. 4). A preparação de traquéia foi montada segundo Castilo & De Beer (1948). Os anéis foram montados verticalmente em câmara de superfusão para órgão isolado (capacidade 10 mL), contendo solução fisiológica de Tyrode modificada, aerada continuamente por borbulhamento de ar, mantida a 37⁰C e pH 7,4. Uma extremidade foi conectada a uma peça triangular e esta a uma base fixa e a outra extremidade a um transdutor de força isométrico (Grass, modelo FT 0.3, Quincy, MA, EUA), conectado a um pré-amplificador. As respostas mecânicas (contração ou relaxamento) do músculo foram registradas isometricamente, com transdutores de força acoplados a pré-amplificadores. Os dados foram gravados por microcomputador através do programa WINDAQ versão 1.65 (DATAQ

Instruments, Inc., EUA) (Fig. 5). Esta técnica foi rigorosamente seguida para todos os ensaios biológicos de contratilidade do músculo liso respiratório.

3.2.3 Protocolos experimentais

Sob aspectos gerais, todos os protocolos experimentais foram iniciados após um período de 1 hora de estabilização da preparação em câmara de superfusão para órgão isolado contendo solução fisiológica de Tyrode modificada. Em seguida, a fim de observar a integridade biológica do ensaio (viabilidade do tecido), eram evocadas contrações com 60 mM de K^+ e somente tecidos com contrações padrões e reproduzíveis eram utilizados. Este procedimento inicial foi seguido em todos protocolos experimentais de contratilidade do músculo liso respiratório. Todos os protocolos do presente estudo foram realizados, separadamente, em grupos diferentes de animais. A maioria dos resultados aqui apresentados foi expresso como percentual da contração potássica inicial que era aferida como controle .

Avaliamos o efeito intrínseco do OEAz, TERP e CIN sobre o tônus basal do músculo liso traqueal, bem como seus efeitos sob contrações induzidas por 60 mM de K^+ , ACh, $PGF_{2\alpha}$ e 5-HT. Investigamos também a participação do NO, metabólitos do AA bem como do componente contrátil da ACh que independe do Ca^{2+} extracelular e os efeitos do óleo e seus principais constituintes na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca^{2+} em tecido despolarizado com 80 mM de K^+ .

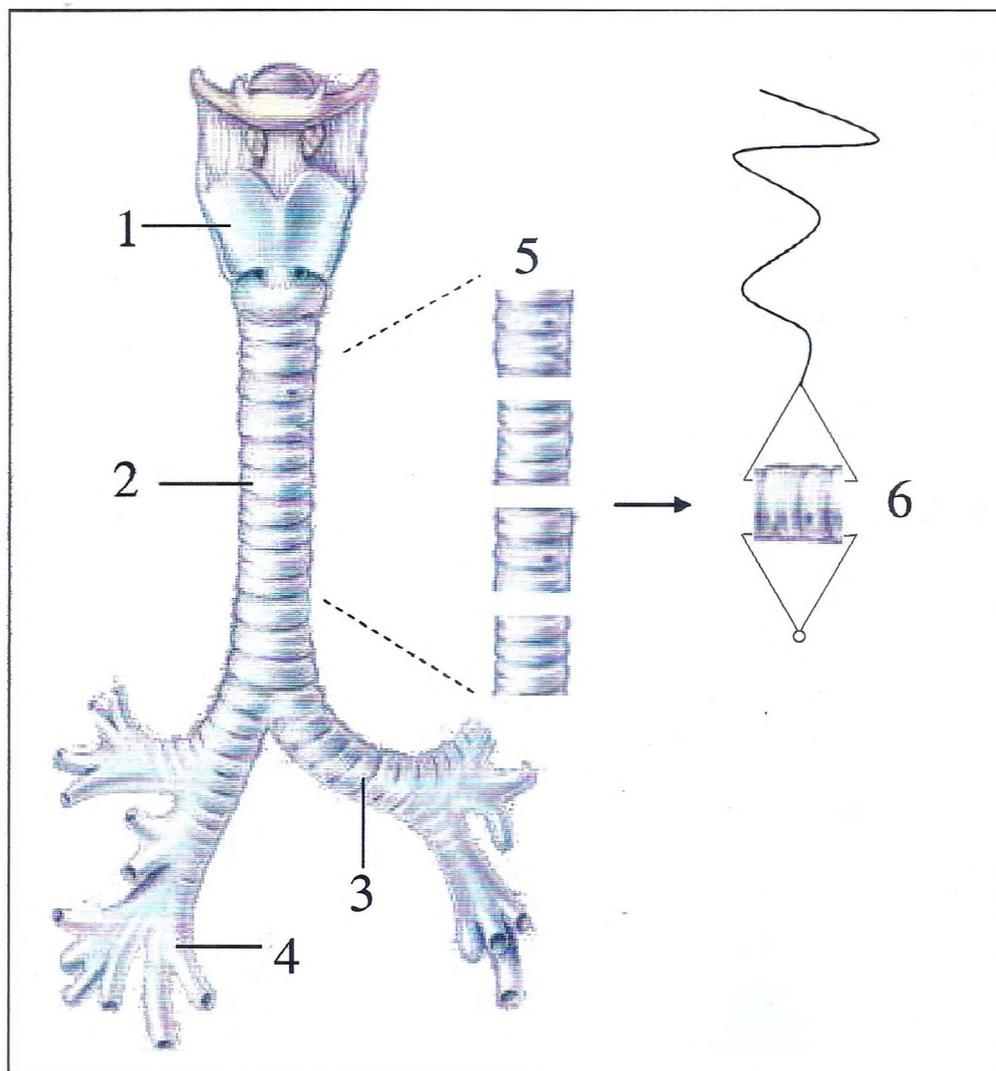


FIGURA 4- Preparação dos anéis de traquéia. 1- Laringe, 2- Traquéia, 3- Brônquios, 4- Bronquíolos, 5- Anéis de traquéia, 6- Anel de traquéia montado em hastes de metal.

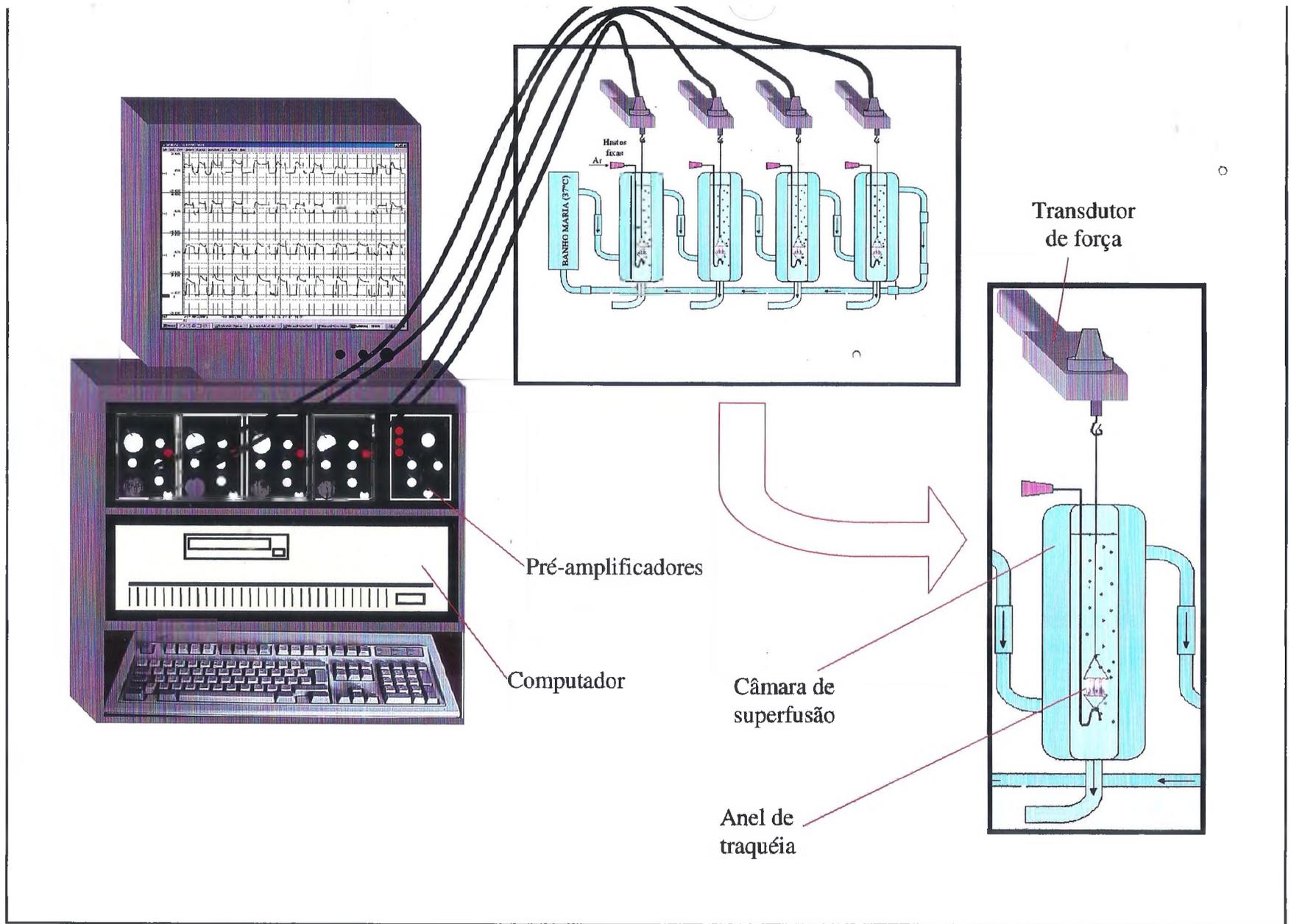


FIGURA 5- Sistema para registro de contrações em músculo liso

Para avaliarmos os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre o tônus basal do músculo liso respiratório, utilizamos concentrações cumulativas adicionadas diretamente ao banho, incubadas por 5 minutos. Antes do início da primeira aplicação das substâncias em estudo, registrava-se a linha de base durante 5 minutos. Alterações para cima da linha de base foram consideradas como contração e alterações para baixo consideradas como relaxamento. Para mostrar que as possíveis alterações existentes eram induzidas pelas substâncias em estudo, controles pareados sem exposição as referidas drogas foram feitos, a fim de mensurar o relaxamento espontâneo do tônus muscular. Seus traçados foram registrados no mesmo intervalo de tempo do tecido tratado. A fim de demonstra a integridade fisiológica do tecido muscular após aplicação da última concentração da substância em estudo, a preparação era lavada com solução fisiológica de Tyrode modificada, por 1 hora, onde avaliávamos a resposta da preparação à 60 mM de K^+ .

A fim de investigar os efeitos do OEAz e seus principais constituintes químicos sobre contrações induzidas por altas concentrações de K^+ , o músculo liso respiratório foi submetido a duas condições experimentais distintas: i) inicialmente OEAz, TERP ou CIN foram previamente adicionados ao banho por um período de 5 minutos e em seguida evocadas contrações subseqüentes com 60 mM de K^+ ; ii) com a contratura potássica estabelecida em estado estacionário (músculo mantido despolarizado por altas concentrações de K^+), os agentes em estudo foram adicionados em concentrações crescentes e de modo cumulativo. Em ambos os casos, a remoção do óleo ou seus constituintes da preparação com solução fisiológica de Tyrode modificada, por 1 hora, foi suficiente para recuperação do músculo ao estímulo potássico.

Para investigar os efeitos do OEAz, TERP e CIN sobre contrações induzidas por ACh, PGF_{2α} e 5-HT foram usadas concentrações dos referidos agonistas que produziram aproximadamente 80% da máxima resposta contrátil do músculo em cada experimento (concentrações submaximais). As curvas concentração-efeito para determinar a resposta de cada agente contraturante foram obtidas pela exposição da preparação a concentrações crescentes adicionadas à solução do banho por um período suficiente para visualização do platô de determinado efeito. Após determinação da curva concentração-efeito, obtinhamos duas contrações consecutivas de amplitudes semelhantes induzidas pela concentração submaximal do agonista que eram tratadas como controle. A partir daí, foi verificado o efeito de concentrações crescentes de OEAz, TERP ou CIN, incubadas por 5 minutos, na resposta contrátil subsequente para cada agonista. Em geral, as concentrações para ACh, PGF_{2α} e 5-HT foram 10 μM, 30 μM e 10 μM respectivamente. Após remoção da última aplicação da substância em estudo com solução fisiológica de Tyrode, por 1 hora, testamos a recuperação da resposta inicial para os referidos agentes contraturantes.

Para averiguar os efeitos do OEAz e seus principais constituintes químicos no componente contrátil da ACh que independe do Ca²⁺ extracelular, realizamos experimentos eliminando o Ca²⁺ extracelular. Inicialmente, em condições normais de Ca²⁺, avaliamos a responsividade da preparação aplicando 60 mM de KCl. Em seguida, obtivemos uma contração induzida por ACh que foi tratada como controle em relação a contração deste agonista em meio isento de Ca²⁺. Após a preparação estabilizar-se na linha de base, aplicamos solução de Tyrode zero-cálcio [\emptyset Ca²⁺] contendo 2 mM de EGTA, por 10 minutos, seguido-se de

aplicações subseqüentes e consecutivas de ACh até que a resposta a este agonista fosse completamente abolida. Nestas condições, mensurou-se a amplitude da contração induzida por 60 μM de ACh na presença e ausência de OEAz ou CIN incubados por 5 minutos. A recuperação da resposta contrátil foi realizada após 1 hora em condições fisiológicas de Ca^{2+} .

Para investigar os efeitos do óleo e seus principais constituintes sobre contrações induzidas por ACh em presença de nifedipina (NIF), inicialmente foram evocadas contrações com 60 mM de K^+ , a concentração de NIF foi suficiente para bloquear a contração evocada por 60 mM de K^+ em solução contendo 2 mM Ca^{2+} . Em seguida foram feitas curvas concentração-efeito para ACh na ausência e presença de nifedipina (1 μM). Para avaliarmos o efeito do OEAz ou TERP em presença deste bloqueador de Ca^{2+} , incubamos previamente a preparação com NIF, por 5 minutos e em seguida incubadas por 5 minutos, as drogas em estudo. A remoção do OEAz ou TERP através de lavagens sucessivas com solução fisiológica de Tyrode modificada e repouso da preparação por 1 hora foram suficientes para recuperação da preparação.

Para averiguar os efeitos do OEAz e CIN na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca^{2+} em músculo liso traqueal despolarizado por 80 mM de K^+ , foi usada uma solução despolarizante com 80 mM de KCl onde não fora adicionado CaCl_2 (solução zero cálcio nonimal) para reverter a contração induzida por altas concentrações de K^+ . Após 20 minutos de lavagem com esta solução, a preparação atingiu os níveis de tensão relativos ao estado de repouso. Em seguida foi aplicada ACh (60 μM), onde fora registrado completo bloqueio da contração promovida pelo referido agonista. Em seguida foram incubadas cafeína (5 mM) por 3 minutos e a substância em estudo por 5 minutos, e na seqüência

foi feita adição de concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,01 – 30 mM). Após remoção do óleo ou seus constituintes, e repouso de 1 hora, foram evocadas contrações com 80 mM de K^+ e ACh, a fim de investigar a integridade final da preparação.

3.3 Análise estatística

Os resultados são expressos como médias de “n” observações \pm erro padrão da média (e.p.m), onde “n” representa o número de observações. São considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentam probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$). Para comparação de dois grupos usamos o teste t pareado ou não pareado. Para comparação de dois ou mais grupos experimentais utilizamos análise de variância (ANOVA) e testes de múltipla comparação que são citados na seção de resultados e/ou na legenda das figuras. Para comparação de tratamentos foi utilizada ANOVA de duas variâncias. As CI_{50} foram calculadas por interpolação semilogarítmica com limite de 95% de confiança e são expressas como média geométrica mais intervalo de 95% de confiança [IC_{50} , 95%], sendo consideradas como a concentração efetiva capaz de inibir 50% do efeito máximo.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt et R. M. (OEAz) em músculo liso *traquealis* de rato

4.1.1 Efeito intrínseco do OEAz sobre o tônus basal

Inicialmente avaliamos o efeito intrínseco do OEAz sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato (Fig. 6, n= 12).

O OEAz (0,1 – 600 µg/mL) alterou significativamente o tônus basal apenas nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, induzindo contrações que correspondem a $9,98 \pm 6,52$ e $8,40 \pm 6,77\%$ do controle, respectivamente. Foi considerada como controle a contração inicial induzida por 60 mM de K^+ ($1,07 \pm 0,12$ g, n= 12), (Fig. 6a).

4.1.2 Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+

Aplicação de 60 mM de cloreto de potássio (K^+ 60 mM) induziu contrações reproduzíveis com amplitude média de $1,08 \pm 0,11$ g (n= 8). Na presença de OEAz (1 – 300 µg/mL), as contrações foram inibidas de maneira dependente de concentração com CI_{50} de 162,56 µg/mL [101,23 - 261,03 µg/mL, n= 8]. Na concentração de 300 µg/mL houve redução para $40,27 \pm 6,34\%$ do valor controle (Fig. 7). A contração inicial induzida por 60 mM de K^+ foi considerada como controle (Fig. 7a) . O efeito inibitório

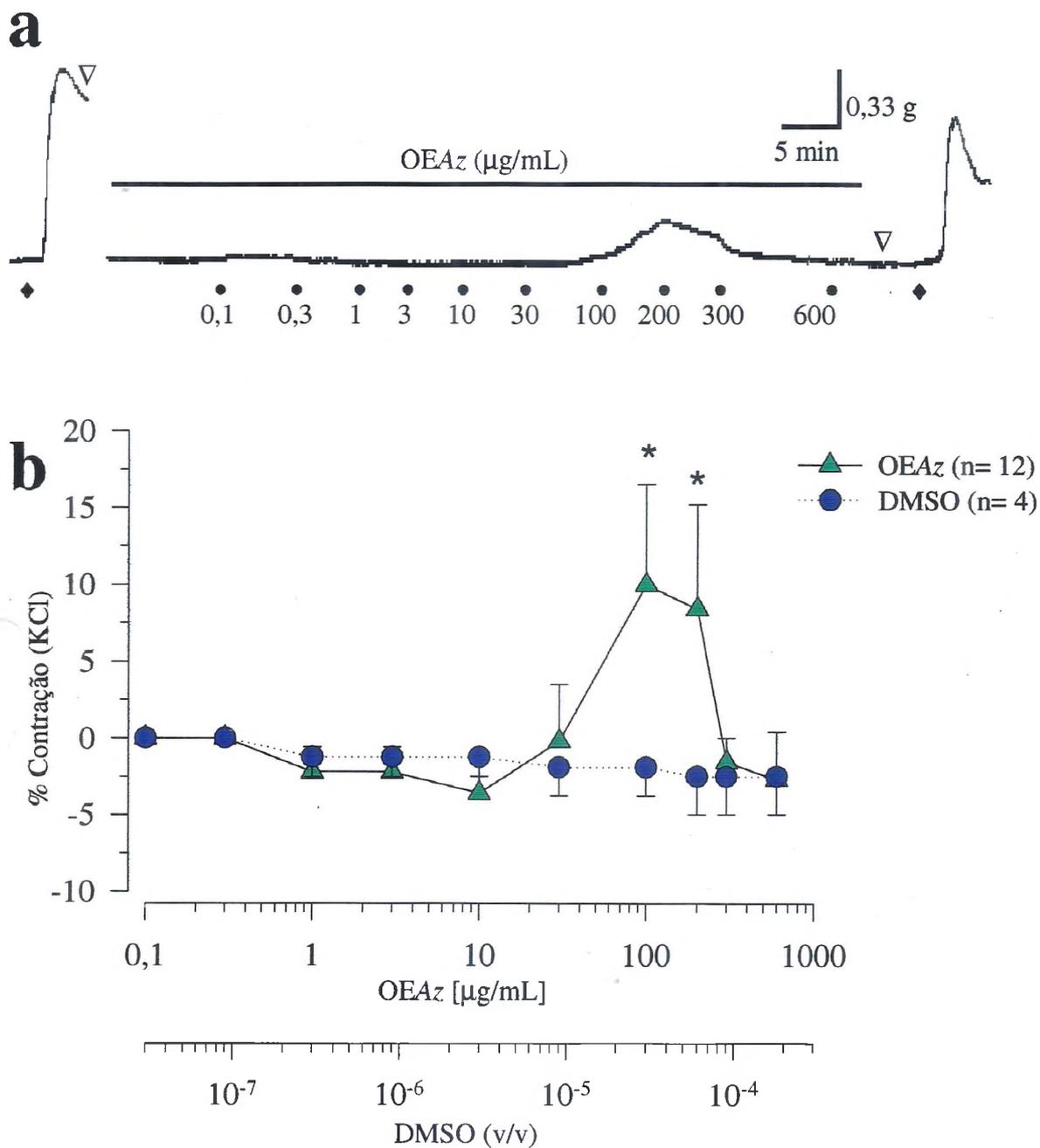


FIGURA 6- Efeito intrínseco do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado digital original ilustrando o efeito próprio do OEAz sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato. Iniciado com uma contração induzida por 60 mM de K⁺. (♦) indica substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 60 mM de K⁺; (▽) lavagem com Tyrode modificada e (•) adição de OEAz nas concentrações indicadas. **b)** Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (contração inicial de K⁺) (p<0,05; teste de Bonferroni).

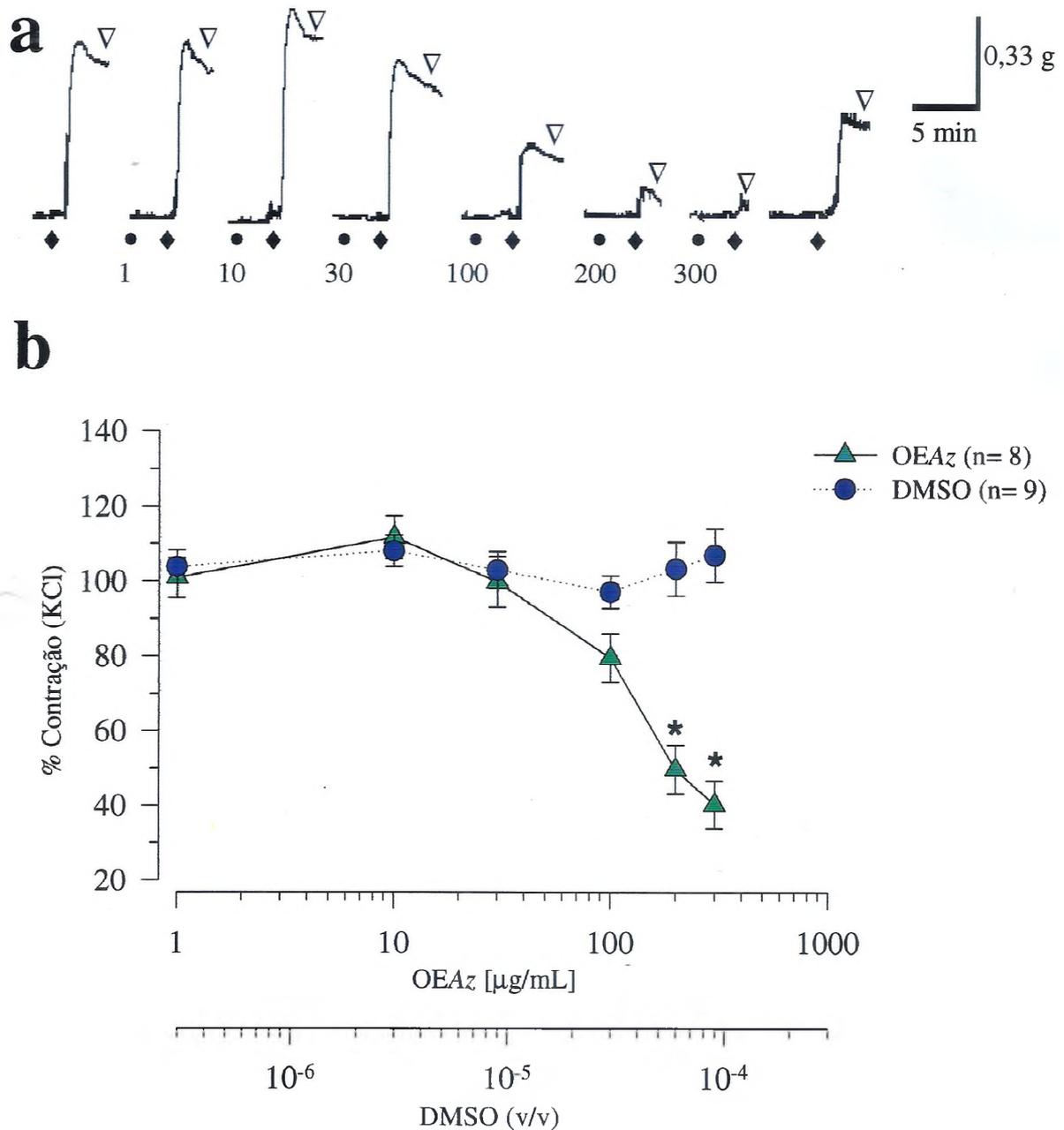


FIGURA 7- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+ em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original mostrando bloqueio das contrações potássicas por concentrações crescentes de OEAz. (●) indica início da incubação da preparação com OEAz ($\mu\text{g/mL}$) nas concentrações indicadas; (◆) substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 60 mM de K^+ e OEAz; (▽) lavagem com Tyrode modificada. **b)** Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das contrações induzidas pelo K^+ em presença de concentrações crescentes de OEAz. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (contração inicial de K^+) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

do OEAz foi reversível após a eliminação do óleo do tecido pela lavagem com solução fisiológica de Tyrode.

Desde que utilizamos dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1% como solubilizante do óleo, controles pareados foram expostos ao DMSO em concentrações equivalentes àsquelas utilizadas com OEAz, demonstrando que o referido solubilizante não interfere na preparação biológica (Fig. 7, n= 9). A fim de corroborar esta informação, realizamos experimentos pareados, OEAz sem e com DMSO, onde concluímos que os efeitos antiespasmódicos induzidos pelo OEAz não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis) (Fig. 8). Os valores de IC_{50} para OEAz sem e com DMSO foram 122,77 $\mu\text{g/mL}$ [63,74 – 236,48 $\mu\text{g/mL}$, n= 7] e 162,56 $\mu\text{g/mL}$ [101,22 – 261,03 $\mu\text{g/mL}$, n= 7] respectivamente e não diferem significativamente quando comparadas entre si (teste t pareado).

4.1.3 Efeito do OEAz na presença de L-NAME sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+

Avaliamos a participação do óxido nítrico (NO) no efeito inibitório do OEAz sobre contrações induzidas por 60mM de KCl.

Para este fim, incubamos previamente a preparação durante 20 minutos com L-NAME (500 μM) um antagonista competitivo da NO-sintetase. A partir daí, foi adicionado ao banho OEAz (10 – 300 $\mu\text{g/mL}$) e evocadas contrações por 60 mM de K^+ . O L-NAME não interferiu significativamente no efeito inibitório do OEAz sobre as contrações promovidas por 60 mM de K^+ no músculo liso traqueal de rato ($p < 0,05$, ANOVA de duas variáveis) (Fig. 9, n= 16). Os valores das CI_{50} do

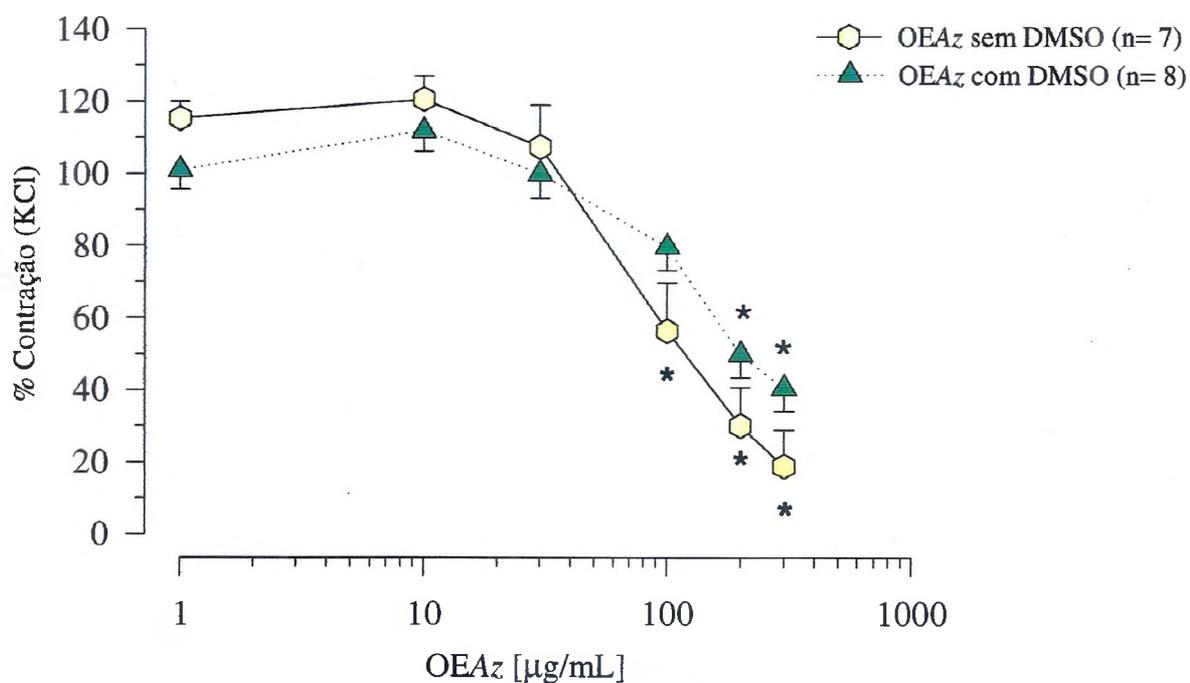


FIGURA 8- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sem e com dimetilsulfóxido (DMSO) sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+ em músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz sem e com DMSO; (*) indica diferença significativa dos pontos da curva com seus respectivos controles (contratura potássica inicial sem OEAz), ($p < 0,05$; teste de Bonferroni).

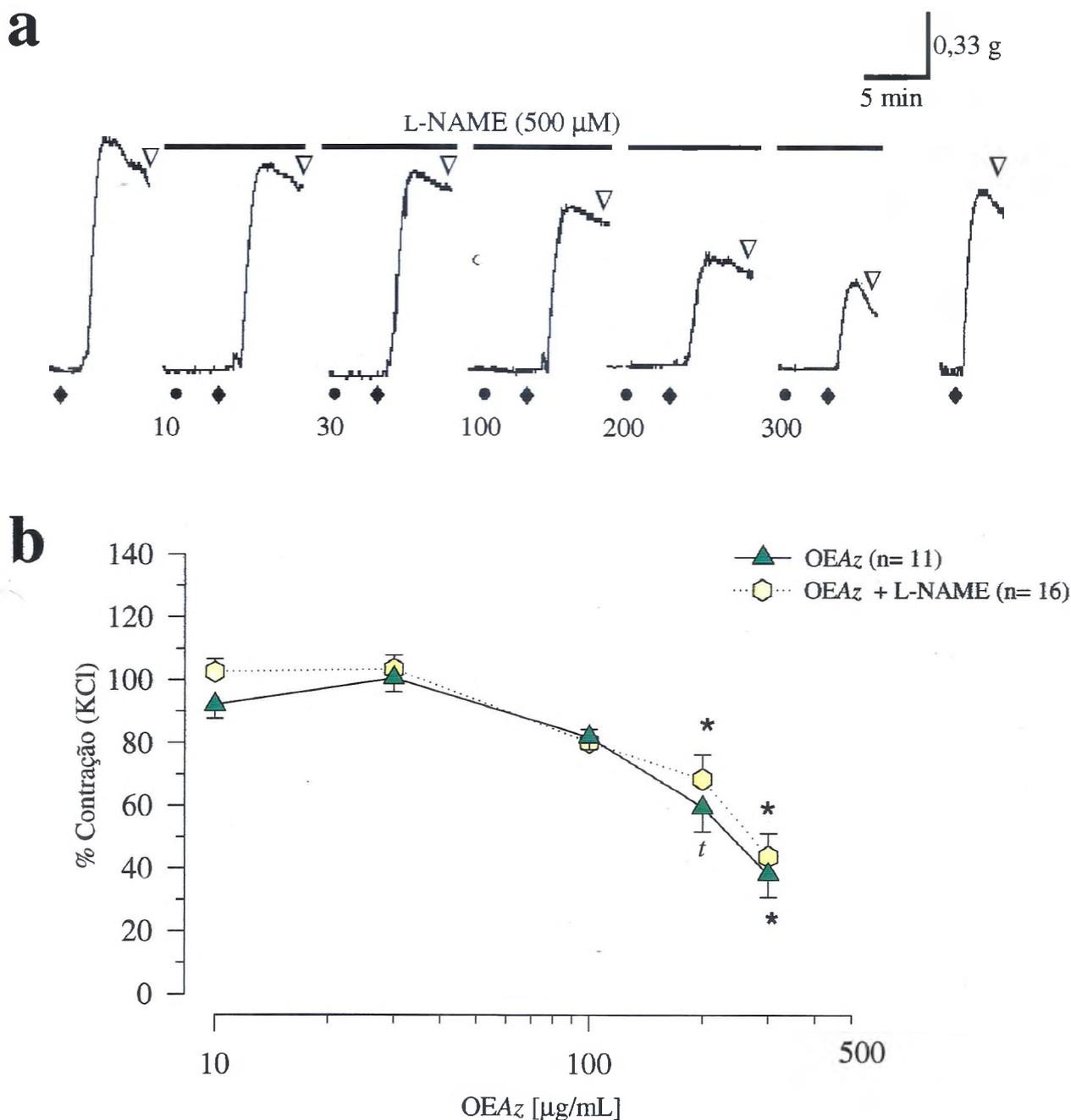


FIGURA 9- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) na presença de L-NAME (500 µM) sobre contrações induzidas por 60 mM de K⁺ em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original ilustrando o bloqueio das contrações potássicas pelo OEAz na presença de L-NAME. (◆) indica substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 60 mM de K⁺; (●) adição de OEAz (µg/mL) nas concentrações indicadas e (▽) lavagem com Tyrode modificada. **b)** Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz na ausência e presença de L-NAME. (*) indica diferença significativa entre os pontos da curva com seus respectivos controles (contratura potássica inicial); (p<0,05; teste de Bonferroni); (t) indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05; teste t pareado).

OEAz na ausência e presença de L-NAME foram 162,56 $\mu\text{g/mL}$ [101,23 – 261,03 $\mu\text{g/mL}$] e 165,23 [103,82 – 262,97 $\mu\text{g/mL}$] respectivamente e não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis).

4.1.4 Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+

Aplicação de 60 mM de cloreto de potássio (KCl) em anéis de traquéia de rato induziu contrações tônicas equivalentes a $0,70 \pm 0,08$ g. O OEAz induziu relaxamento quando aplicado na fase tônica da resposta contrátil induzida por solução despolarizante (60 mM de KCl). Na presença do OEAz (1 – 600 $\mu\text{g/mL}$, $n= 9$), a contratatura potássica foi revertida de modo dependente de concentração com CI_{50} de 78,98 $\mu\text{g/mL}$ [56,74 – 109,93 $\mu\text{g/mL}$, $n= 9$]. O efeito inibitório do OEAz nas concentrações de 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$ foi $100 \pm 0\%$ em relação ao valor controle (contração potássica inicial) (Fig. 10). Após o período de 1 hora a última exposição ao óleo, obtivemos completa recuperação da contratatura potássica e relação ao controle.

4.1.5 Efeito do OEAz na presença de L-NAME sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+

Em outro grupo de animais, investigamos o possível envolvimento da via do NO na reversão da contratatura potássica pelo OEAz em traquéia de rato.

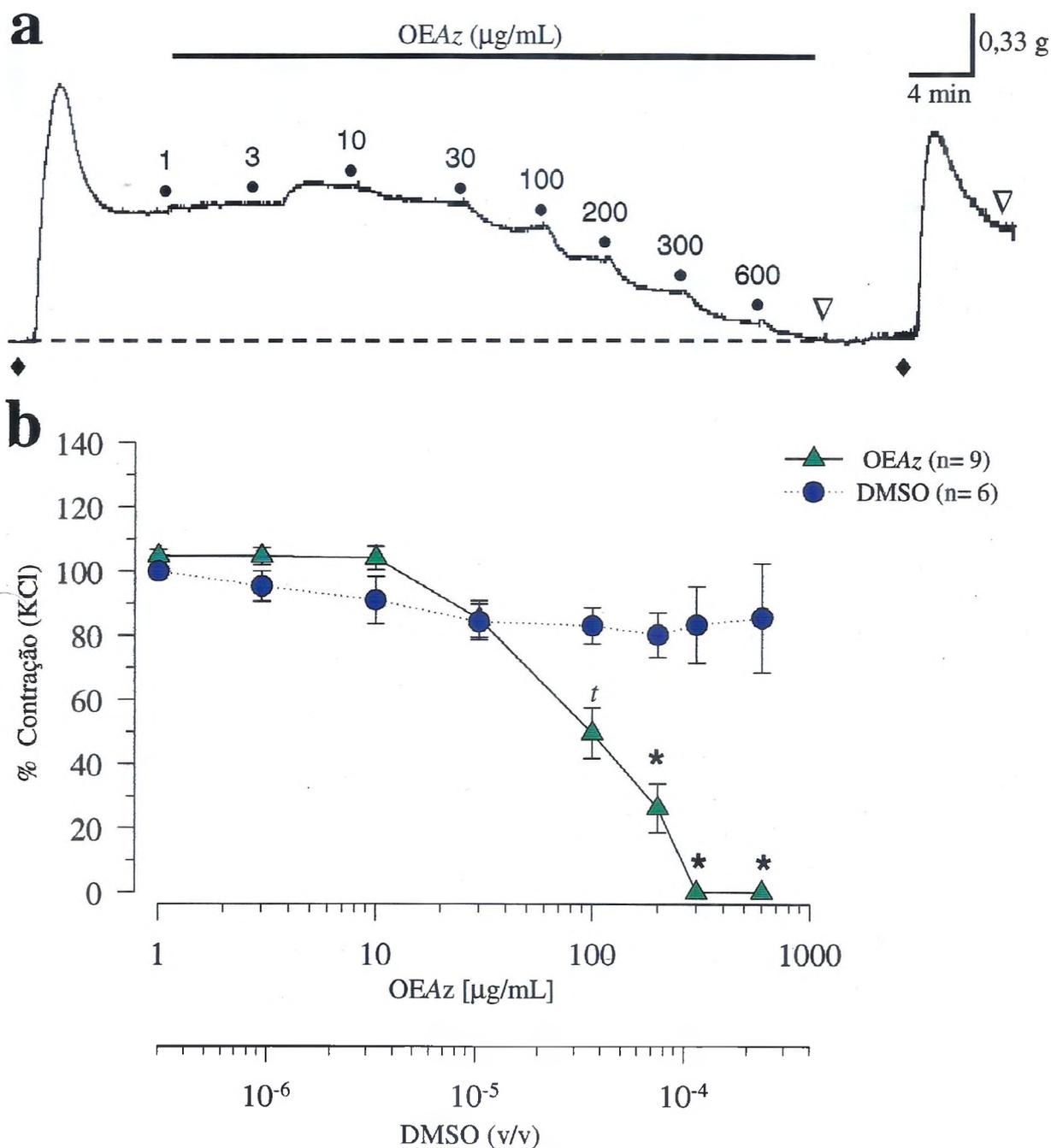


FIGURA 10- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . a) Traçado original ilustrando o efeito antiespasmódico do OEAz sobre a contração mantida por 60 mM de K^+ . (\blacklozenge) indica substituição da solução de Tyrode modificada por Tyrode contendo 60 mM de K^+ ; (\bullet) adição de OEAz nas concentrações indicadas e (∇) lavagem com Tyrode modificada. b) Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz no músculo pré-contraído. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do OEAz em relação ao controle (contração potássica inicial), ($p < 0,05$; teste de Bonferroni), (t) indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, teste t pareado).

O efeito espasmolítico do OEAz não foi significativamente alterado pelo pré-tratamento do tecido com L-NAME (500 μ M). O OEAz (0,1 – 600 μ g/mL) na presença de L-NAME reverteu a contratatura potássica (K 60mM), com CI_{50} de 125,95 μ g/mL [68,92 – 230,14 μ g/mL]. Na ausência desse bloqueador da óxido nítrico sintetase, o OEAz reverteu a contratatura potássica com valor para CI_{50} de 93,69 μ g/mL [42,68 – 205,63 μ g/mL] (Fig. 11, n= 13). Os valores das CI_{50} não foram significativamente diferentes quando comparados entre si ($p < 0,05$, teste de Bonferroni).

Os efeito do OEAz, na ausência e presença de L-NAME, diferem significativamente do controle (contração inicial de potássio) ($p < 0,05$, teste de Bonferroni e teste t pareado), mas não diferem quando comparados entre si ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis).

4.1.6 Efeito do OEAz na presença de cafeína sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 80 mM de K^+

Foram induzidas contrações com alta concentração de K^+ (K^+ 80 mM). Com a contratatura potássica estabelecida (contração tônica), foi aplicado 1 mM de cafeína, esperados 5 minutos e em seguida adicionadas de forma cumulativa concentrações crescentes de OEAz. O OEAz (1 – 1000 μ g/mL) na presença de cafeína reverteu de modo dependente de concentração a contratatura potássica com CI_{50} de 153,92 μ g/mL [125,46 – 188,84 μ g/mL, n= 9]. As concentrações de 300, 600 e 1000 μ g/mL induziram relaxamento na ordem de $82,60 \pm 3,36$; $96,00 \pm 2,83$ e $96,96 \pm 2,28\%$ respectivamente (valores significativamente diferentes do controle, $p < 0,05$, teste de Dunn) (Fig. 12). Os efeitos antiespasmódicos induzidos pelo OEAz na ausência e presença de cafeína não diferem

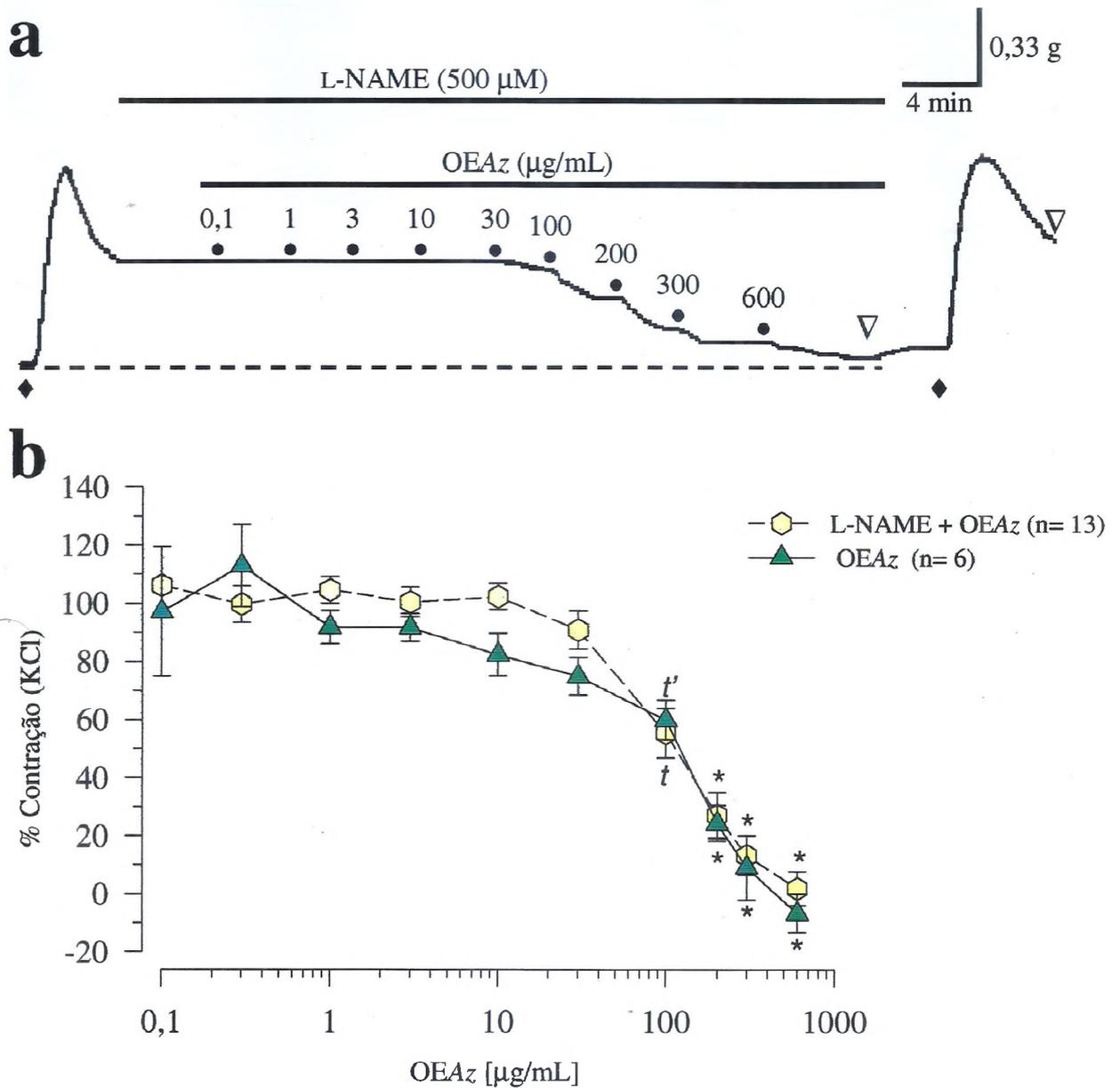


FIGURA 11- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) na presença de L-NAME [500 μ M] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . **a)** Traçado original ilustrando o efeito antiespasmódico do OEAz na presença de L-NAME sobre a contração potássica tônica. (\blacklozenge) indica substituição da solução Tyrode modificada por Tyrode contendo 60 mM de K^+ ; (\bullet) adição de OEAz nas concentrações indicadas e (∇) lavagem com Tyrode modificada. A barra horizontal superior indica presença de L-NAME [500 μ M] no banho. **b)** Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz no músculo pré-contraído em presença de L-NAME. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do OEAz em relação ao controle (início da contração tônica), ($p < 0,05$; teste de Bonferroni), (t) e (t') indicam diferença significativa em relação aos respectivos controles ($p < 0,05$; teste t pareado).

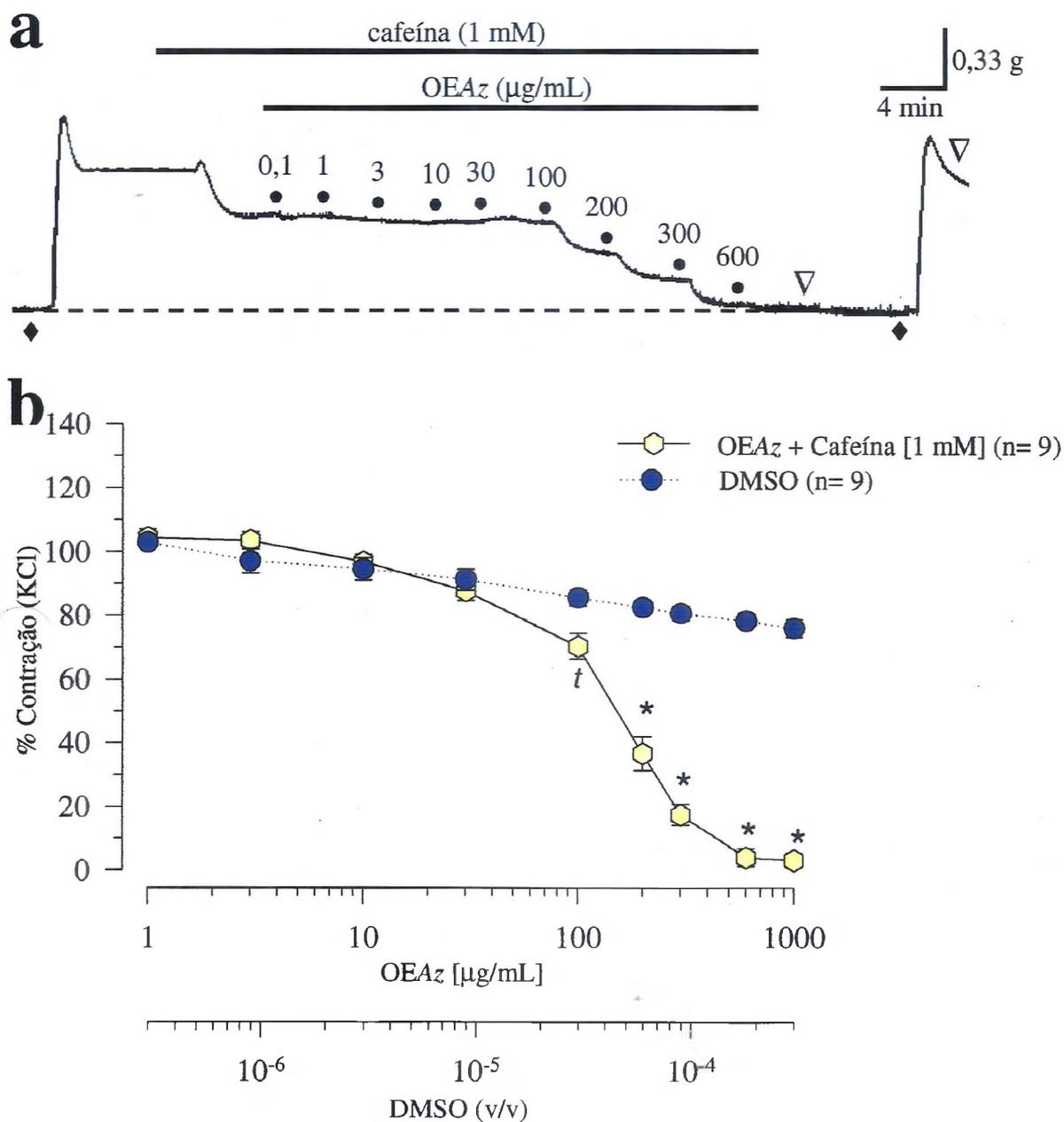


FIGURA 12- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) na presença de cafeína [1 mM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . **a)** Traçado original ilustrando o efeito antiespasmódico do OEAz na presença de cafeína sobre a contração potássica tônica. (\blacklozenge) indica substituição da solução Tyrode modificada por Tyrode contendo 60 mM de K^+ ; (\bullet) adição de OEAz nas concentrações indicadas e (∇) lavagem com Tyrode modificada. A barra horizontal superior indica presença de cafeína [1 mM] no banho. **b)** Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz no músculo pré-contraído em presença de cafeína. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do OEAz em presença de cafeína em relação ao controle (início da contração tônica), ($p \leq 0,05$; teste de Dunn), (t) indica diferença significativa em relação controle ao ($p < 0,05$; teste t pareado).

significativamente quando comparados entre si ($p < 0,05$, ANOVA de duas variâncias) (Fig. 13). Em todos experimentos, a lavagem da preparação com Tyrode modificada, por 1 hora, foi suficiente para resposta do músculo ao estímulo despolarizante do potássio (recuperação).

4.1.7 Efeito do OEAz na presença de indometacina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+

Para avaliarmos a participação do possível envolvimento das prostaglandinas (PGs) no efeito do OEAz na musculatura lisa de traquéia de rato, incubamos a preparação com 2 μ M de indometacina.

O OEAz (200 μ g/mL) na ausência e presença desse bloqueador da cicloxigenase reverteu a contração potássica para ($8,20 \pm 5,32\%$ e $-2,68 \pm 2,5\%$ e) do valor controle, respectivamente. O efeito inibitório foi revertido após sucessivas lavagens da preparação com solução fisiológica de Tyrode (Fig. 14, $n= 11$). A amplitude do relaxamento evocado pelo OEAz na ausência e presença de indometacina difere significativamente do controle ($p < 0,05$: teste de Dunn). A indometacina não interferiu significativamente sobre o efeito relaxante induzido pelo OEAz no músculo liso das vias aéreas de rato ($p < 0,139$; ANOVA de duas variáveis).

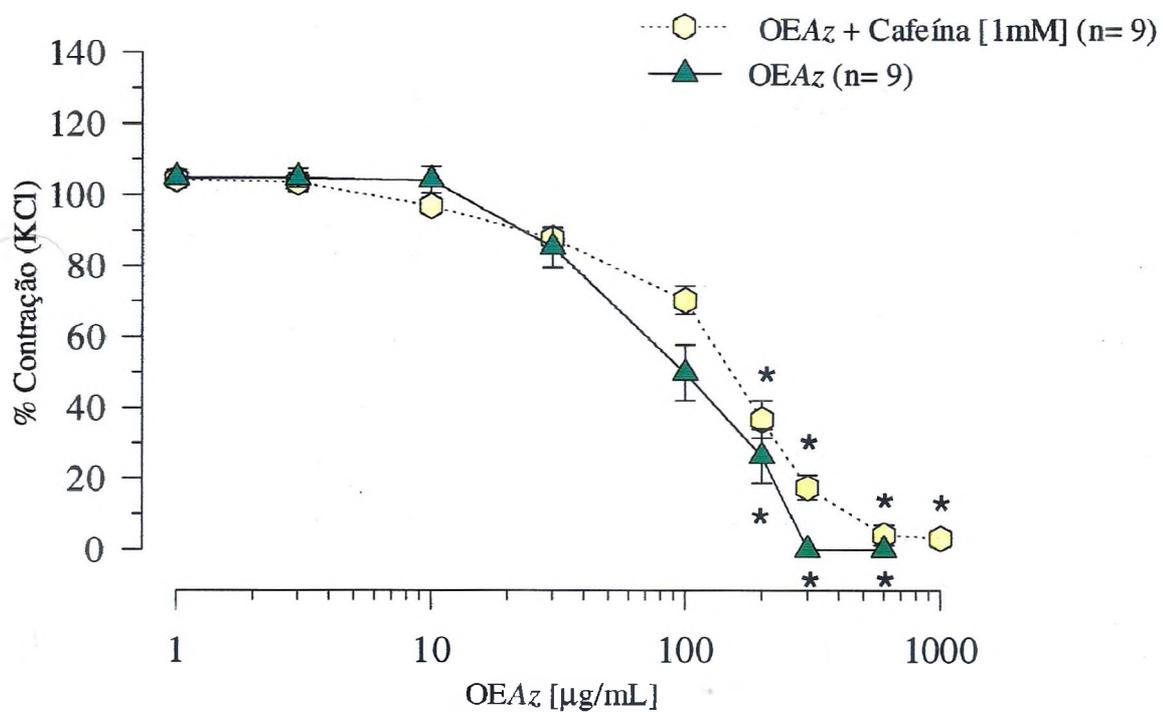


FIGURA 13- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sem e com cafeína sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz sem e com cafeína; (*) indica diferença significativa entre os efeitos do OEAz na ausência e presença de cafeína e seus respectivos controles (início da contração tônica), ($p \leq 0,05$; teste de Bonferroni).

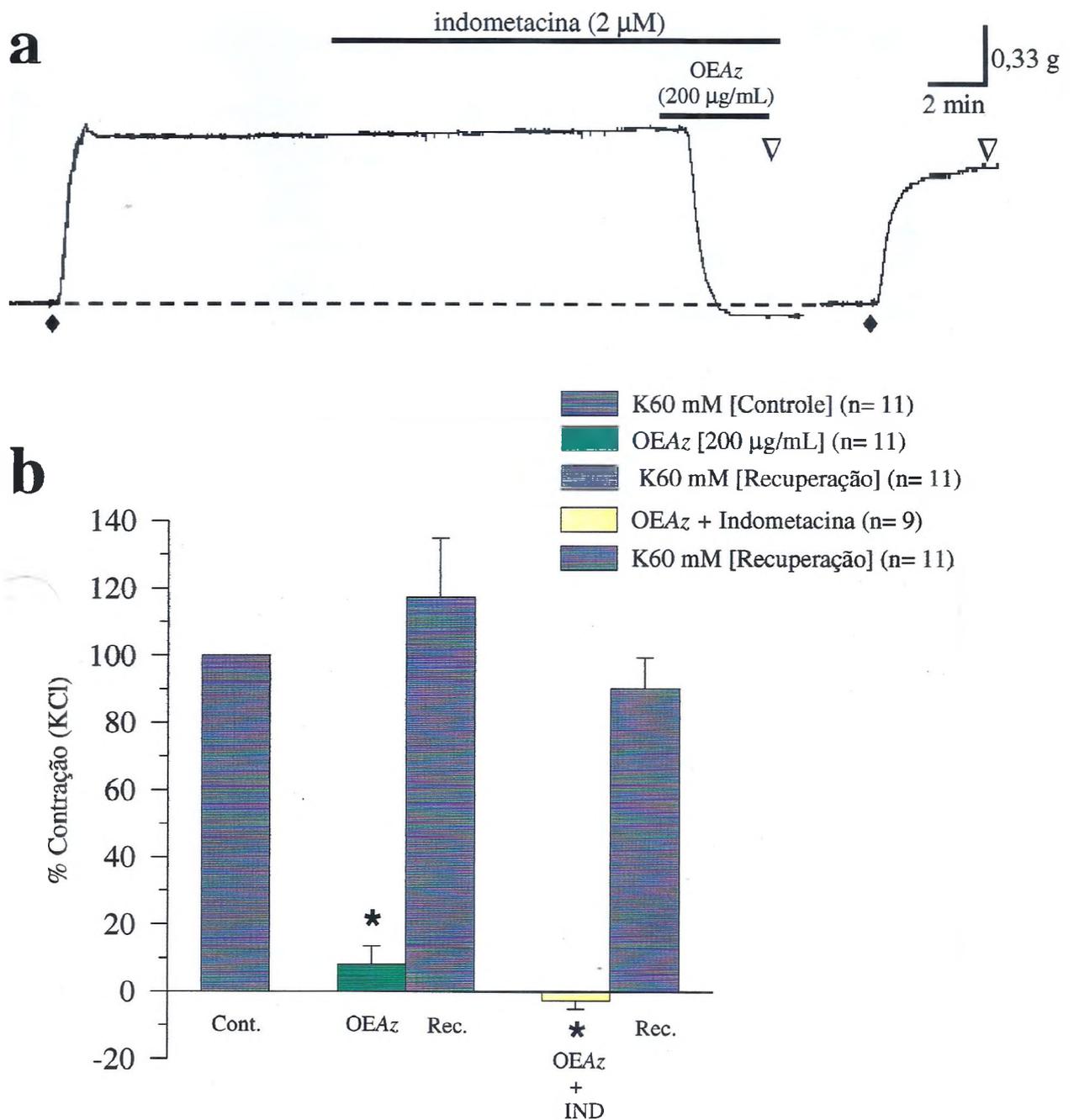


FIGURA 14- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) [200 $\mu\text{g/mL}$] na ausência e presença de indometacina [2 μM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . **a)** Traçado original ilustrando o efeito do OEAz [200 $\mu\text{g/mL}$] sobre a contração potássica tônica em presença de indometacina. (◆) indica substituição da solução Tyrode modificada por Tyrode contendo 60 mM de K^+ ; a barra superior indica presença de indometacina no banho e (▽) lavagem com Tyrode modificada. **b)** Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz no músculo pré-contraído em presença de indometacina. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (início da respectiva contração tônica), ($p \leq 0,05$; teste de Bonferroni).

4.1.8 Efeitos comparativos do OEAz e epinefrina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺

Desde que a estimulação dos receptores adrenérgicos do músculo liso *traquealis* pode ser uma possível causa do relaxamento traqueal induzido pelo OEAz, investigamos a resposta antiespasmódica do referido óleo sobreposta ao efeito da epinefrina. Preparações mantidas contraídas por 60 mM de K⁺, obtiveram um relaxamento de 18,11 ± 3,61%, 42,94 ± 2,92% e 46,53 ± 5,99% através da adição cumulativa de 1; 10 e 100 µM de epinefrina, respectivamente. A adição de 600 µg/mL de OEAz induziu relaxamento de 82,2 ± 4,13% (Fig. 15, n= 6). A amplitude do relaxamento evocado pelas concentrações de 10 e 100 µM de epinefrina e 600 µg/mL de OEAz difere significativamente do controle (p < 0,05, teste de Dunn), e o relaxamento induzido pelo OEAz foi significativo quando comparado com o efeito antiespasmódico clássico da epinefrina no músculo liso respiratório (p < 0,05; ANOVA de duas variâncias).

4.1.9 Efeito do OEAz na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca²⁺ em músculo liso *traquealis* despolarizado por 80 mM de K⁺ (0Ca²⁺ nominal)

Para realização deste protocolo, foi usada solução despolarizante com 80 mM de K⁺, onde não fora adicionado CaCl₂ (solução zero Ca²⁺ nominal), para reverter contrações iniciais evocadas por K⁺ 80 mM. Após 20 minutos de lavagem com solução zero Ca²⁺, a preparação atingiu os

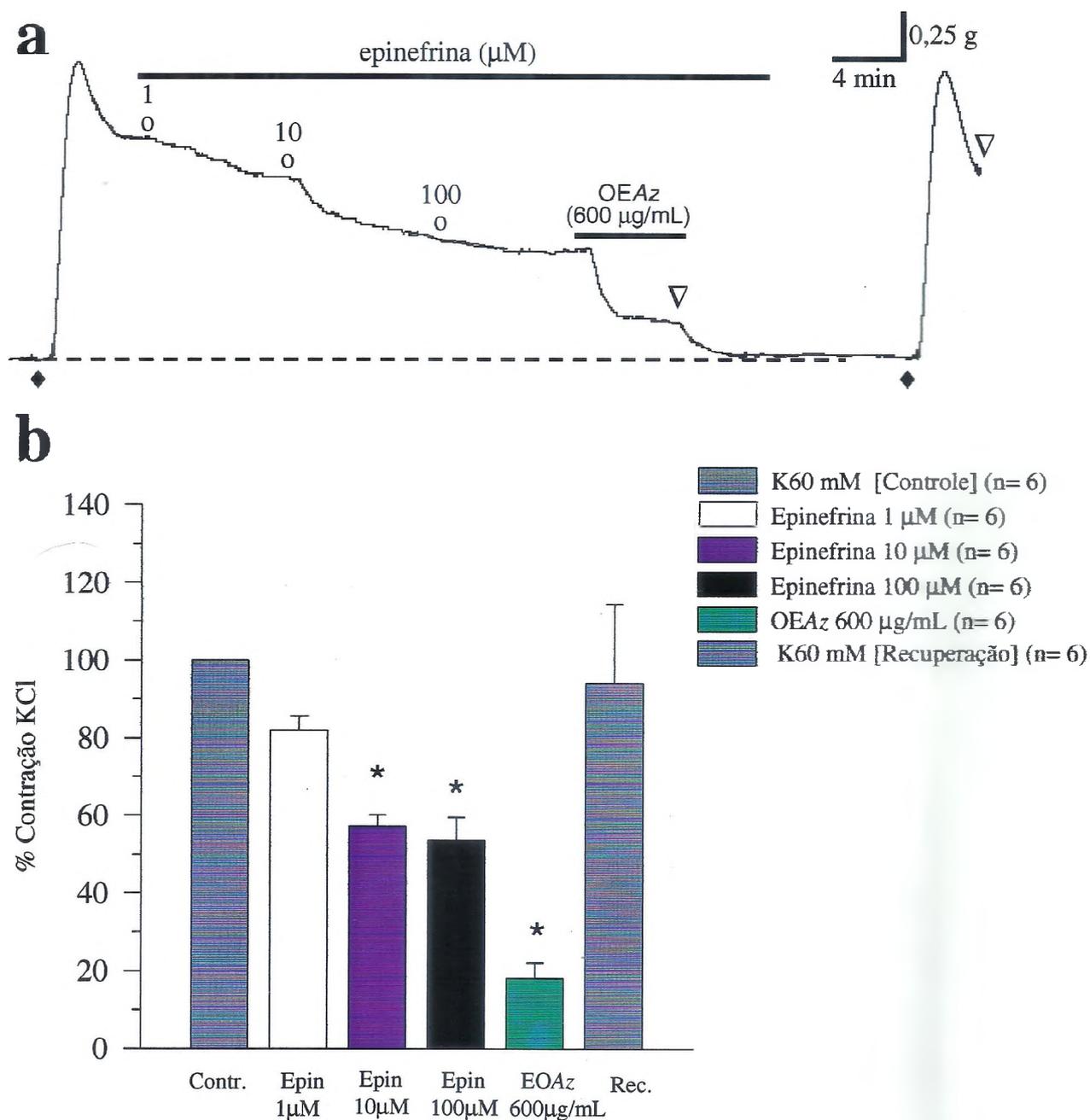


FIGURA 15- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) [600 $\mu\text{g/mL}$] sobreposto ao relaxamento induzido pela epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . a) Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre contração potássica tônica relaxada pela epinefrina. (o) Indica aplicação de epinefrina nas concentrações indicadas; (\blacklozenge) substituição da solução Tyrode modificada por Tyrode contendo 60 mM de K^+ ; (∇) lavagem com Tyrode modificada. b) Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz no músculo pré-contraído em presença de epinefrina. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (início da respectiva contração tônica), ($p < 0,05$; teste de Bonferroni).

níveis de tensão relativos ao estado de repouso. Em seguida foram aplicados 5 mM de cafeína, esperados 5 minutos e aplicados 60 μM de ACh para ratificar a inexistência de Ca^{2+} intracelular. Após o bloqueio da contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico, foram adicionados cafeína e OEAz (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e subseqüente concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,01 – 10 mM). A adição de Ca^{2+} na referida condição experimental induz aumento de tensão promovido pelo influxo do íon através dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (BOLTON, 1979).

O OEAz (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), na presença de cafeína, inibiu as contrações evocadas pelo Ca^{2+} (0,01 mM – 10 mM), desviando à direita a curva concentração-efeito para adição de concentrações crescentes de Ca^{2+} (Fig. 16). Após remoção do OEAz e lavagens com solução fisiológica de Tyrode, em período de 1 hora, as contrações de K^+ 80 mM representaram $69,18 \pm 1,23\%$ da amplitude do início do ensaio, indicando recuperação da preparação.

4.1.10 Efeito do OEAz sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico

O OEAz (10 – 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inibiu a contração submaximal de acetilcolina [ACh] (\cong 70 a 80% da amplitude da contração máxima) em traquéia de rato (Fig. 17, n= 7).

O OEAz em concentrações de 200, 300 e 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bloqueou de forma reversível contrações submaximais induzidas por 10 μM de ACh com CI_{50} de 280,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [215,23 – 366,18 $\mu\text{g}/\text{mL}$] em traquéia de rato.

A magnitude da inibição da curva submaximal de ACh pelo OEAz nas concentrações de 300 e 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de $43,21 \pm 9,17\%$ e $90,70 \pm$

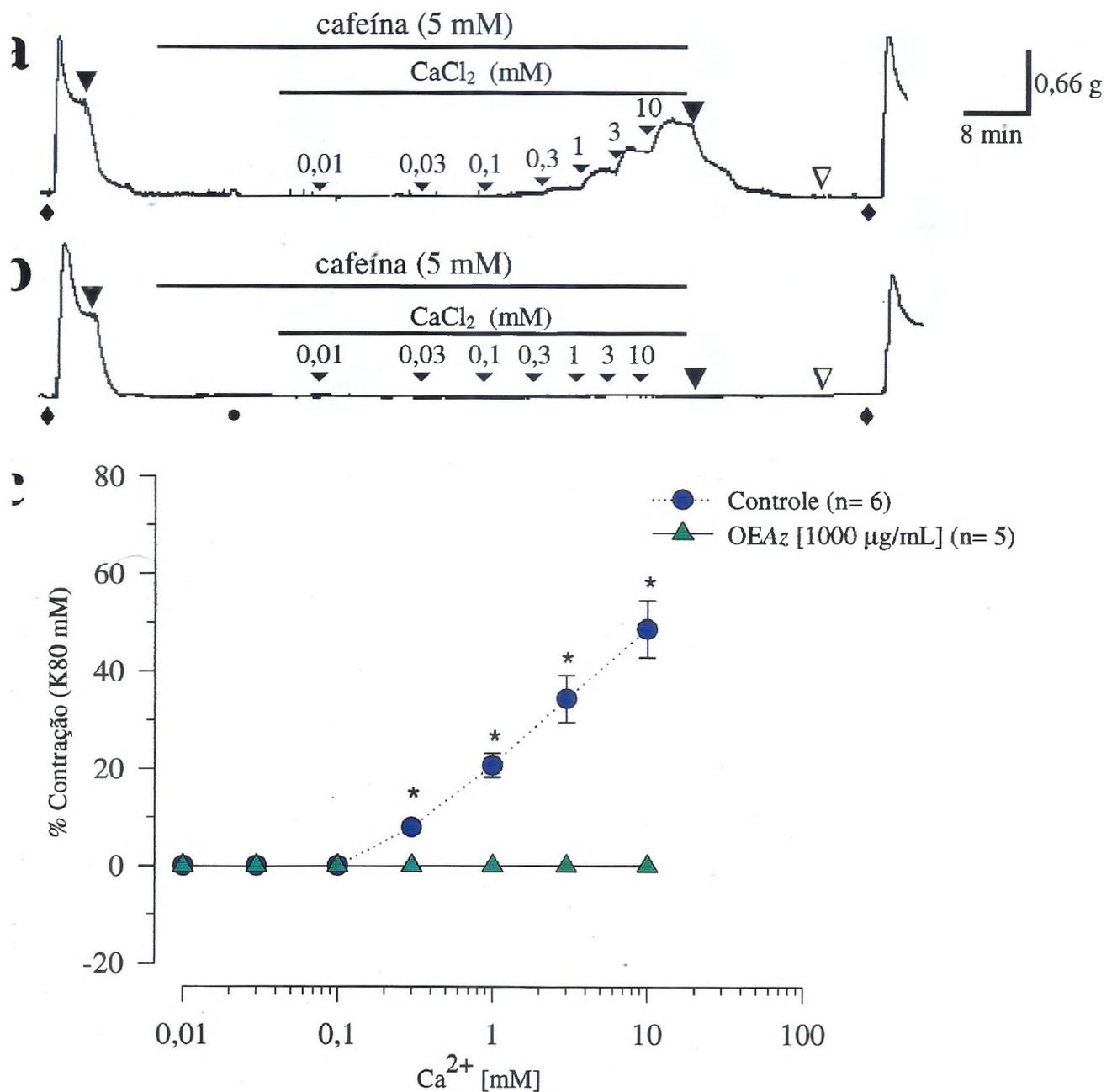


FIGURA 16- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) [1000 μ g/mL] na presença de cafeína [5 Mm] sobre contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} na solução do banho em músculo liso traqueal de rato despolarizado por 80 mM de K^+ . a e b) Traçados originais ilustrando a curva de Ca^{2+} na presença de cafeína, (b) na presença de OEAz; (•) indica adição de OEAz [1000 μ g/mL] à preparação; (♦) substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 80 mM de K^+ ; (▼) lavagem com solução Tyrode (80 mM de K^+ isenta de Ca^{2+}); a barra superior indica presença de cafeína; (▼) adição de Ca^{2+} nas concentrações indicadas e (∇), lavagem com Tyrode modificada. c) Gráfico mostrando médias \pm e.p.m do efeito do OEAz no músculo despolarizado sobre contrações induzidas pela adição de Ca^{2+} . (*) indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05; teste de Dunn).

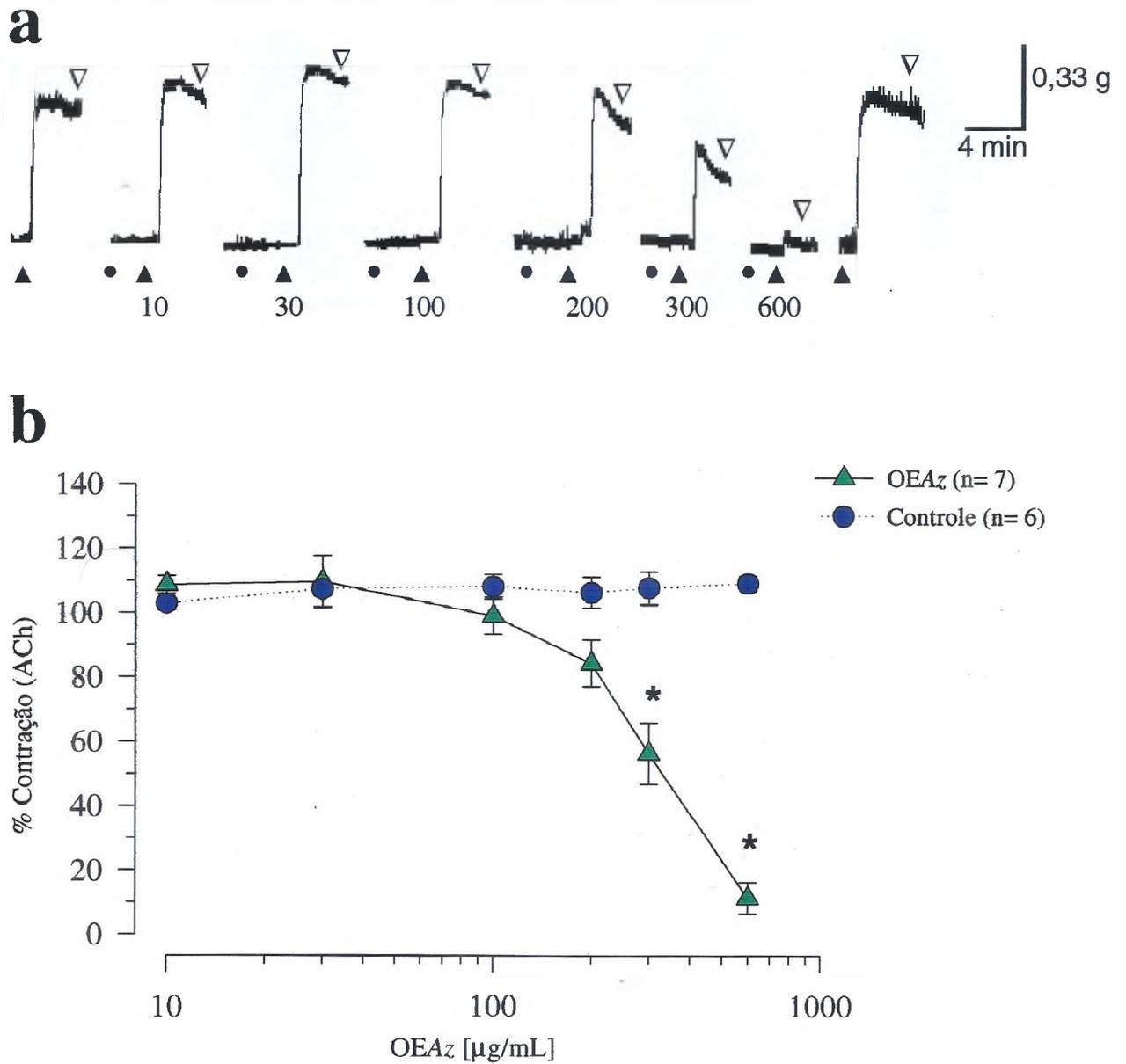


FIGURA 17- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original ilustrando o efeito do OEAz, em concentrações crescentes, na amplitude das respostas contráteis da traquéia em resposta à ACh [10 μM]. (▲) indica adição de ACh; (●) adição de OEAz (μg/mL) nas concentrações indicadas e (▽) lavagem com Tyrode modificada. **b)** Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz nas contrações induzidas por ACh. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva em relação ao controle (resposta inicial) (p<0,05; teste de Dunn).

1,94% respectivamente quando comparada com o controle (contração inicial induzida pela ACh). A amplitude desse bloqueio difere significativamente do controle ($p < 0,05$, teste de Dunn). O efeito sobre a inibição da curva de ACh foi revertido após lavagens da preparação com solução Tyrode modificada. O percentual de recuperação foi de $76,72 \pm 11,05\%$, nas referidas condições experimentais.

4.1.11 Efeito do OEAz sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) na presença de nifedipina

Desde que o cálcio participa do mecanismo contrátil induzido por diversos agonistas, avaliamos o possível envolvimento desse íon no mecanismo de ação do OEAz. Em um dos protocolos utilizamos nifedipina, um clássico bloqueador dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, e em outro, solução Tyrode zero Ca^{2+} [ØCa^{2+}]. As figuras 18 e 19 mostram o efeito do OEAz no componente da contração colinérgica que independe do influxo de Ca^{2+} extracelular.

Investigamos o efeito do OEAz no componente da contração induzida por ACh que não é bloqueado pela nifedipina. $10 \mu\text{M}$ de nifedipina foram eficazes em abolir a contração induzida por 60 mM de K^+ . Bloqueadores de canais de cálcio inibem a contração induzida por altas concentrações de K^+ , onde é significativa a participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Entretanto, o componente tônico da contração promovida por ACh é insensível a este efeito pela maior influência dos canais operados por receptores (BOLTON, 1979). Pré-exposição da preparação por 5 minutos, a uma dada concentração de OEAz ($10 - 600 \mu\text{g/mL}$), reduziu de maneira dependente de concentração, a contração

submaximal subsequente induzida por ACh (3 μ M) na presença de nifedipina (10 μ M), com CI_{50} de 158,4 μ g/mL [49,9 – 502,1 μ g/mL, n= 7] (Fig. 18). Os efeitos promovidos pelas concentrações de 300 e 600 μ g/mL foram significantes quando comparados com o controle ($p < 0,05$, teste de Bonferroni).

4.1.12 Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh) na presença de solução zero Ca^{2+}

Aplicação de solução isenta de Ca^{2+} (sem adição de $CaCl_2 + 0,2$ mM de EGTA), aboliu a resposta contrátil induzida pelo KCl (60 mM) indicando a total eliminação de Ca^{2+} extracelular (Fig. 19a). Nestas condições experimentais, o OEAz (600 μ g/mL) reduziu significativamente a amplitude da contração induzida por ACh (60 μ M) para $43, \pm 6,2\%$ do valor controle (Fig. 19, n= 16) ($p < 0,05$, ANOVA, teste de Dunn). O bloqueio dessa contração foi revertido após 60 min. de lavagem da preparação com solução de Tyrode [$\emptyset Ca^{2+}$].

4.1.13 Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)

O efeito do OEAz sobre contrações submaximais induzidas por $PGF_{2\alpha}$ está ilustrado na figura 20.

O OEAz (1 – 600 μ g/mL), incubado por 5 minutos, reduziu a contração submaximal subsequente induzida por $PGF_{2\alpha}$, com CI_{50} de 194,73 μ g/mL [138,99 – 272,77 μ g/mL, n= 4]. O bloqueio induzido pelo

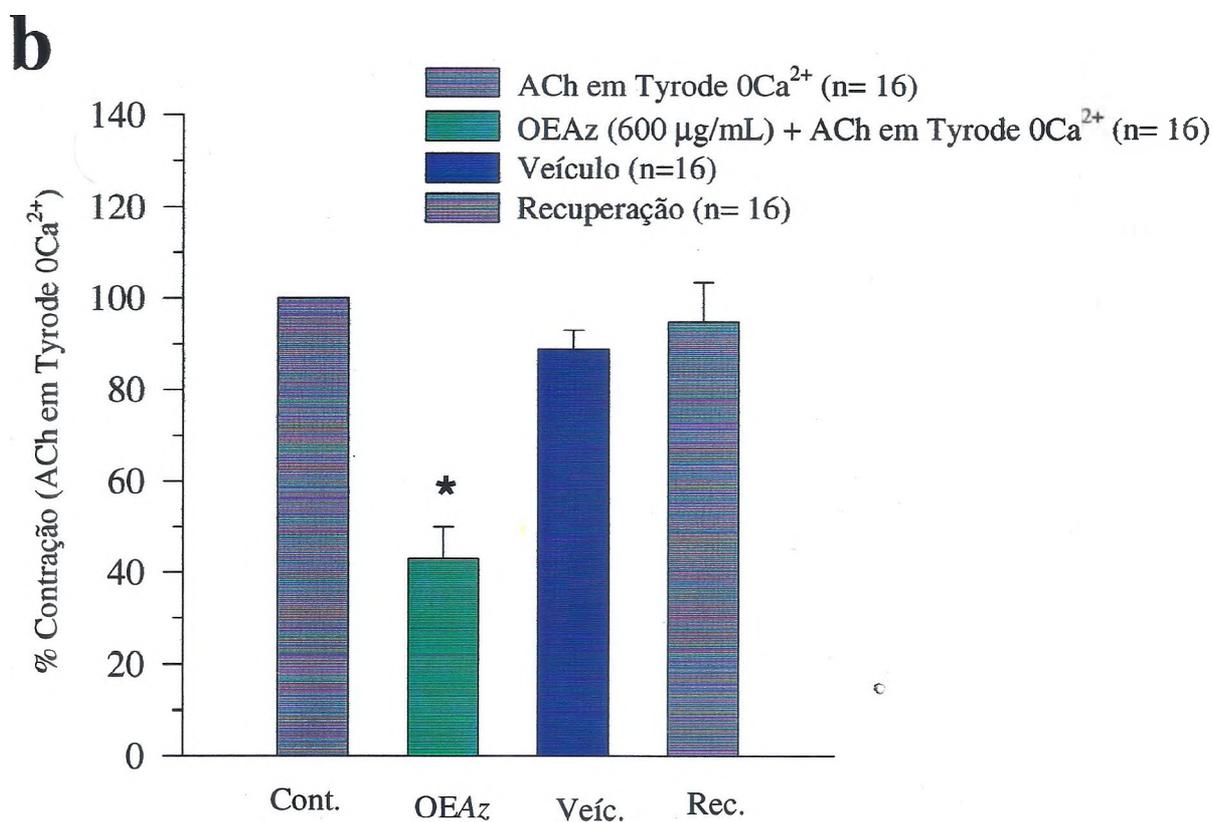
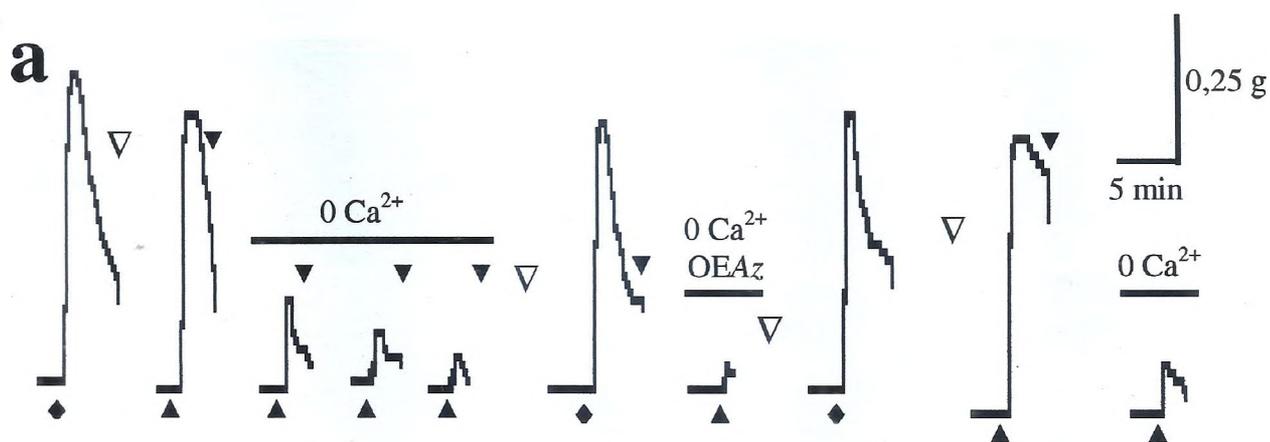


FIGURA 19- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) [600 µg/mL] sobre contrações induzidas por 60 µM de acetilcolina (ACh) em solução isenta de Ca²⁺ em músculo liso traqueal de rato. a) Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre a contração induzida por ACh [60 µM] na ausência de Ca²⁺. (▲) indica adição de ACh; (▽) lavagem com Tyrode modificada e (▼) lavagem com Tyrode zero Ca²⁺. b) Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz nas contrações induzidas por ACh. (*) indica diferença significativa do efeito do OEAz em relação a amplitude da resposta inicial (ACh 60 µM em 0Ca²⁺) (p<0,05; teste de Bonferroni).

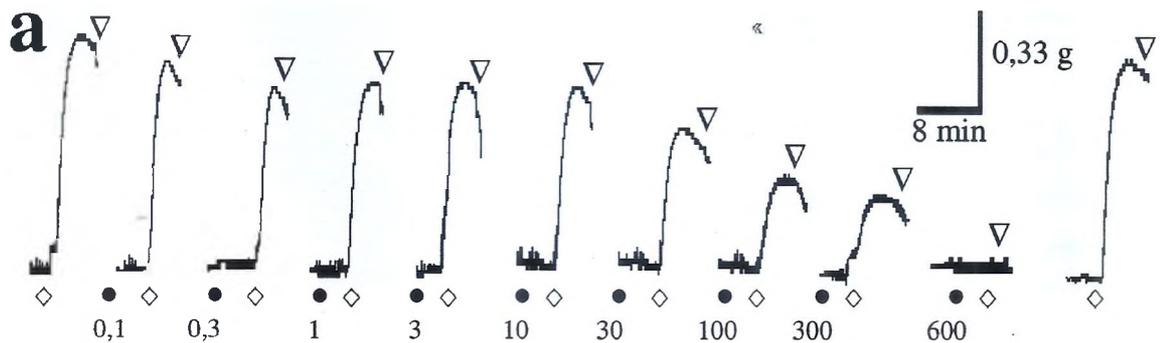
OEAz, nas concentrações de 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$ foi $79,88 \pm 8,67\%$ e $100 \pm 0,0\%$, respectivamente (Fig. 20). Estes valores diferem significativamente do controle ($p < 0,05$, teste de Dunn).

4.1.14 Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$)

Adição cumulativa de OEAz (200 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), na fase tônica da resposta contrátil induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$ (30 μM), promoveu relaxamento dependente de concentração com CI_{50} de 296,04 $\mu\text{g/mL}$ [243,61 – 359,83 $\mu\text{g/mL}$, $n = 8$]. Nas concentrações de 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, o relaxamento evocado pelo OEAz, foi de $83,92 \pm 7,34\%$ e $96,22 \pm 5,63\%$, respectivamente e diferem significativamente do controle (início da contração tônica) ($p < 0,05$, teste de Dunn). (Fig. 21).

4.1.15 Efeito do OEAz sobre contrações induzidas por 5-hidroxitriptamina (5-HT)

Foi feita a curva dose resposta para 5-HT em músculo liso *traquealis* de rato para determinação da concentração submaximal ($\cong 70$ a 80% da amplitude da contração máxima). Aplicação de 5-HT (10 μM) nesta preparação induziu contrações tônicas equivalentes a $0,974 \pm 0,184$ g ($n = 9$). Na presença de OEAz (300 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), as contrações foram bloqueadas dependentemente de concentração (Fig. 22). Nas concentrações de 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ o bloqueio das contrações foi $69,58 \pm 7,70\%$ e $94,47 \pm 5,53\%$ em relação ao controle, respectivamente e diferem



b

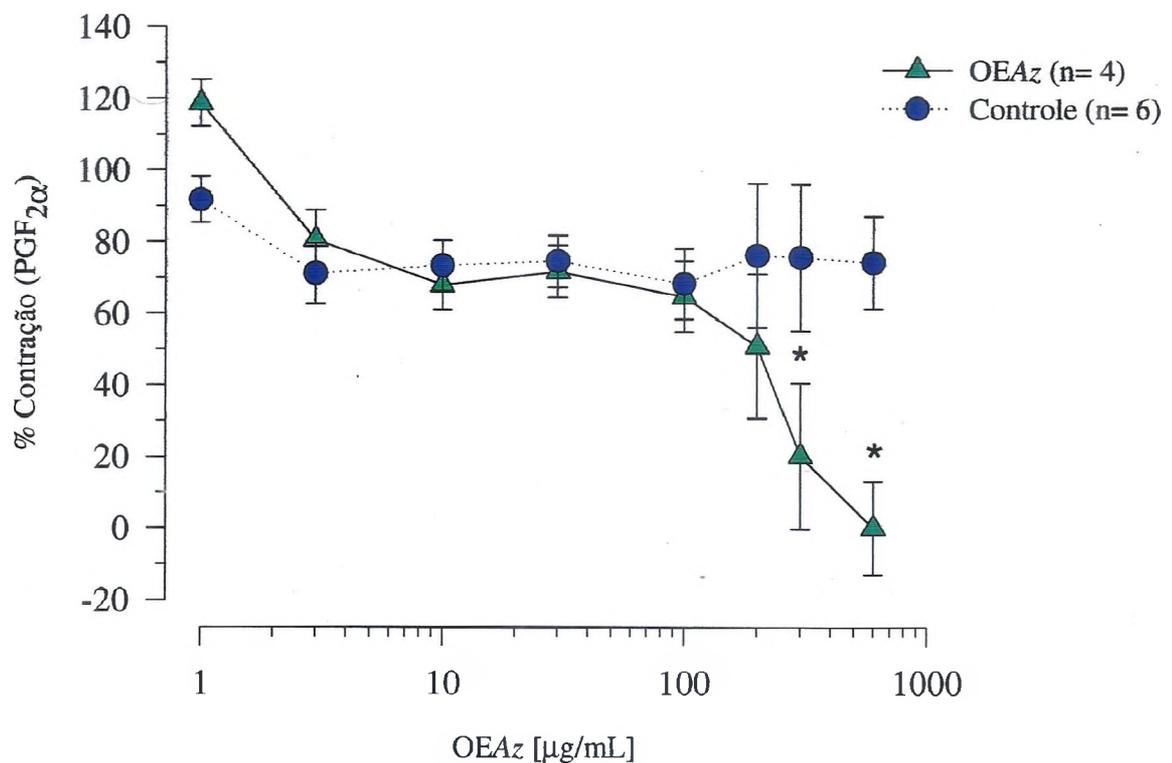


FIGURA 20- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre contrações induzidas por prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre as contrações induzidas por PGF_{2α} [30 μM]. (◇) indica adição de PGF_{2α}; (▽) lavagem com Tyrode modificada; (●) adição de OEAz (μg/mL), nas concentrações indicadas. **b)** Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz nas contrações induzidas por PGF_{2α}. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do OEAz em relação a amplitude da resposta inicial (PGF_{2α}) (p<0,05; teste de Dunn).

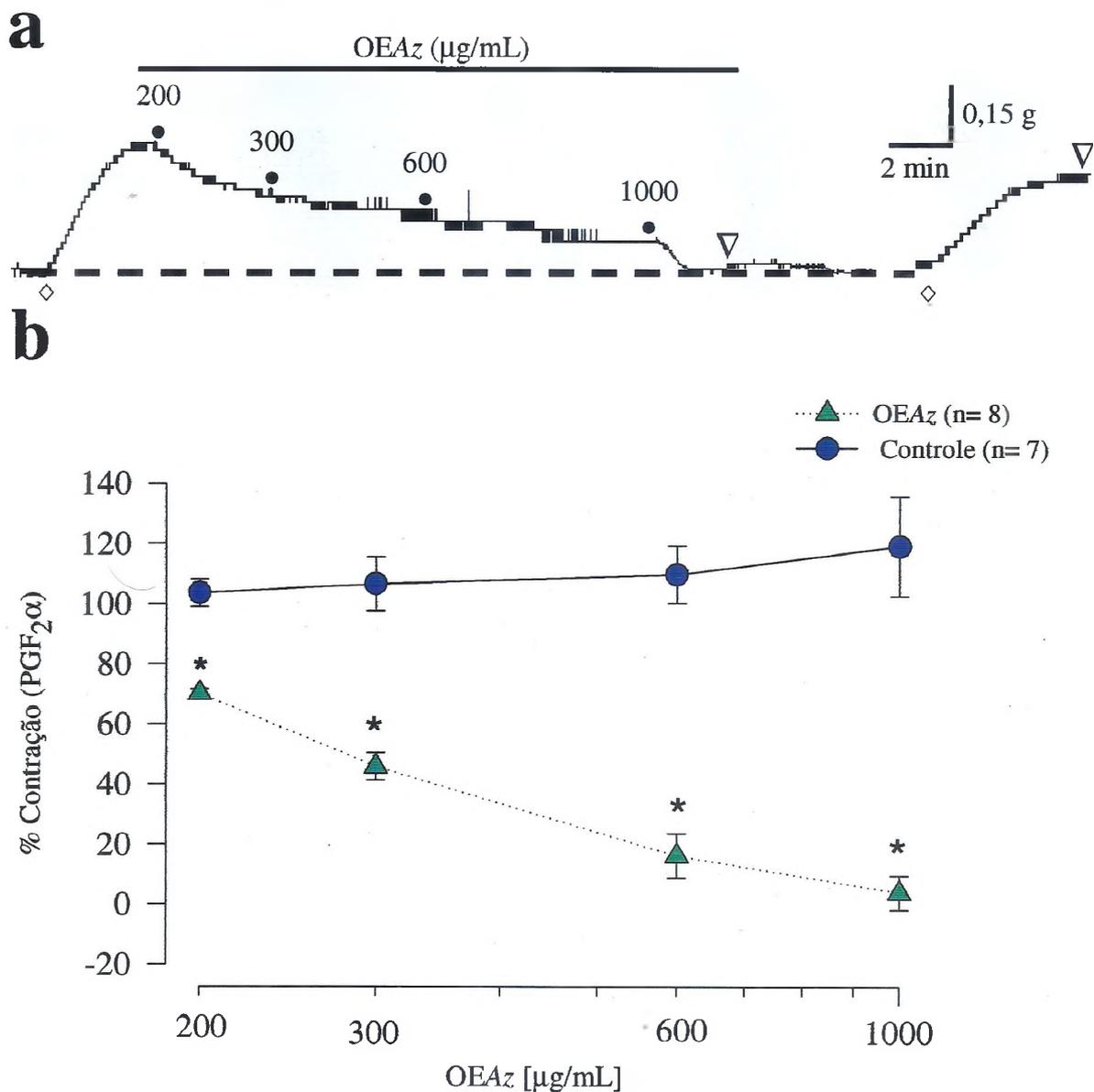


FIGURA 21- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 30 µM de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). a) Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído por PGF_{2α}. (◊) indica adição de PGF_{2α}; (▽) lavagem com Tyrode modificada; a barra superior indica presença de OEAz nas concentrações indicadas e (•) adição de OEAz. b) Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz na contração induzida por PGF_{2α}. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do OEAz em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração mantida) (p<0,05; teste de Dunnet).

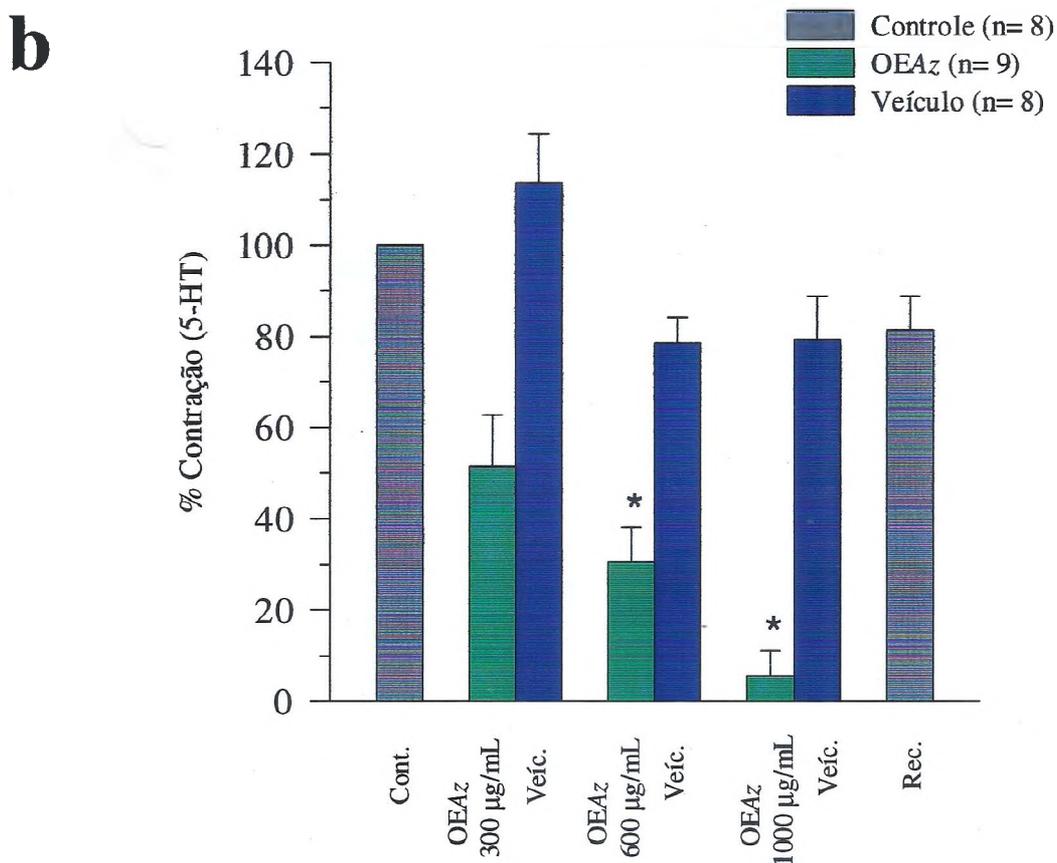
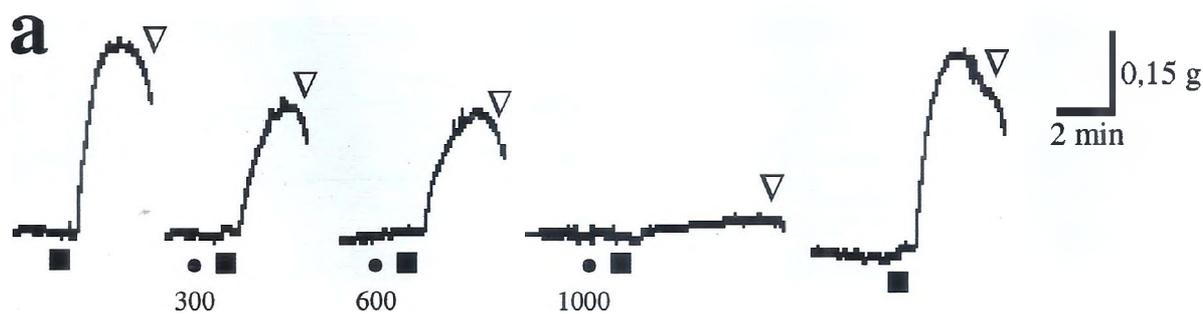


FIGURA 22- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre contrações induzidas por 10 μ M de 5-hidroxitriptamina (5-HT) em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre contrações induzidas por 5-HT. (■) indica adição de 5-HT; (▽) lavagem com Tyrode modificada; (●) adição de OEAz (μ g/mL) nas concentrações indicadas. **b)** Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo OEAz nas contrações induzidas por 5-HT. (*) indica diferença significativa do efeito do OEAz em relação à amplitude da resposta inicial (5-HT) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

significativamente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunn). O efeito inibitório foi reversível após eliminação do óleo da preparação pela lavagem com solução fisiológica de Tyrode modificada.

4.1.16 Efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5-hidroxitriptamina (5-HT)

Aplicação de 5-HT ($10 \mu\text{M}$) em anéis de traquéia de rato induziu contrações tônicas equivalentes a $0,637 \pm 0,088 \text{ g}$ ($n= 8$). O OEAz ($600 \mu\text{g/mL}$) induziu relaxamento quando aplicado na fase tônica da resposta contrátil induzida por este autacóide. O efeito inibitório do OEAz ($600 \mu\text{g/mL}$) foi $68,57 \pm 4,08\%$ em relação ao valor controle e foi significativamente diferente do controle (início da contração tônica) ($p < 0,05$, teste de Dunn). Após o período de 1 hora, a contração induzida por 5-HT foi recuperada em $67,36 \pm 4,90\%$ (Fig. 23).

4.2 Efeitos farmacológicos do 4-terpineol (TERP) em músculo liso *traquealis* de rato

4.2.1 Efeito intrínseco do TERP sobre o tônus basal

Inicialmente avaliamos o efeito próprio do TERP sobre o tônus basal do músculo liso *traquealis* de rato.

Para averiguar o efeito intrínseco do TERP sobre o tônus basal do músculo liso traqueal foram adicionadas concentrações crescentes de forma cumulativa de TERP ($0,1 - 1000 \mu\text{g/mL}$). O referido composto não induziu alterações significativas no tônus basal do músculo liso traqueal de rato nas referidas condições experimentais (Fig. 24, $n= 8$).

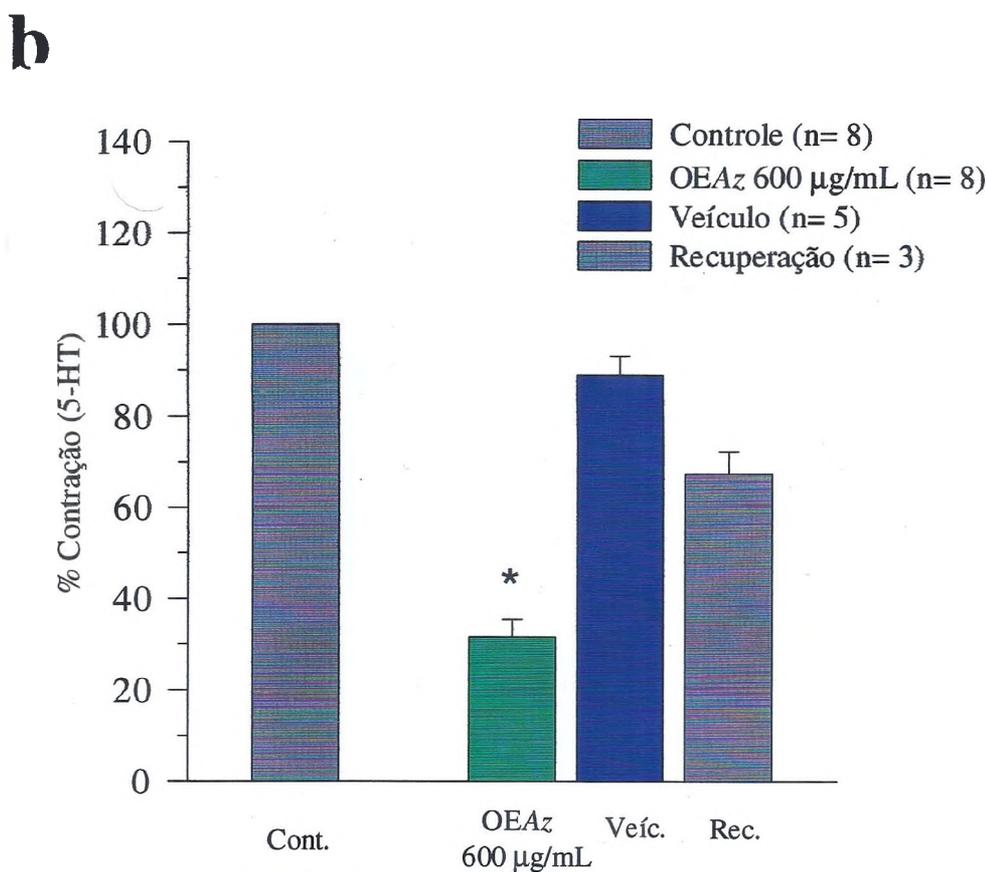
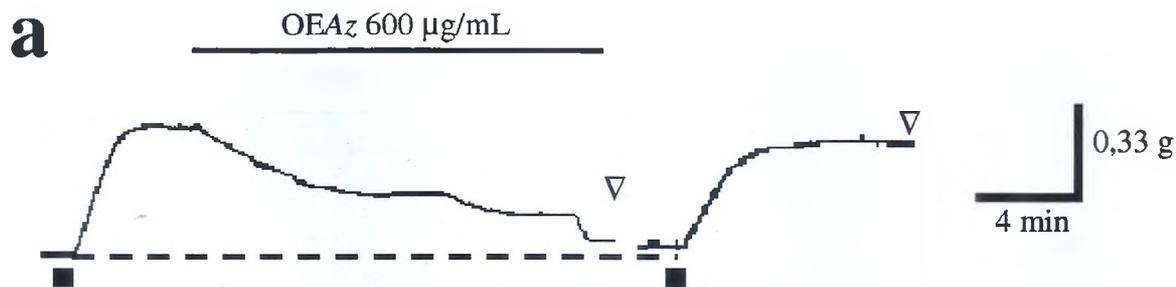


FIGURA 23- Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 10 µM de 5-hidroxitriptamina (5-HT). **a)** Traçado original ilustrando o efeito do OEAz sobre o músculo pré-contraído por 5-HT. (■) indica adição de 5-HT; (∇) lavagem com Tyrode modificada; a barra superior indica presença de OEAz. **b)** Gráfico mostrando média + e.p.m da alteração promovida pelo OEAz na contração induzida por 5-HT. (*) indica diferença significativa do efeito do OEAz em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração tônica) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

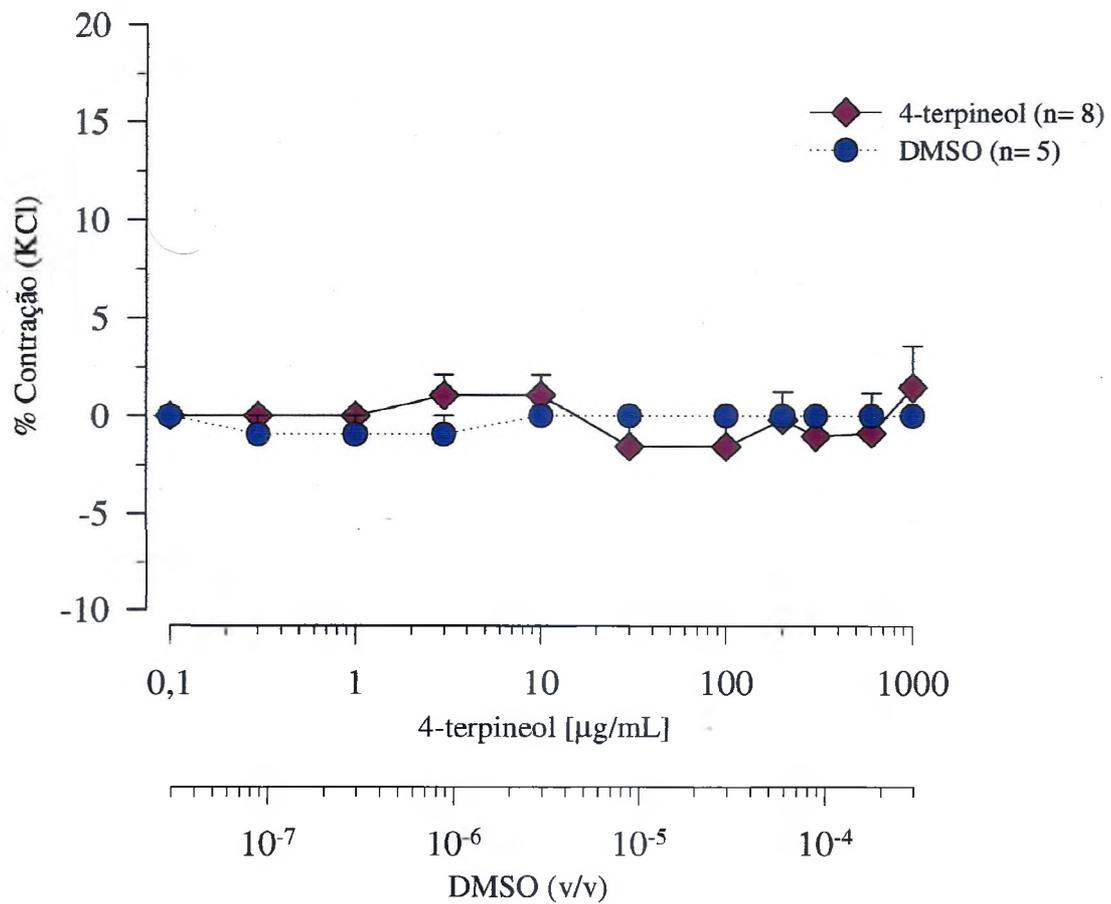


FIGURA 24- Efeito intrínseco do 4-terpineol (TERP) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo TERP.

4.2.2 Efeito do TERP sobre contrações induzidas por 60 mM de K⁺

Prévia exposição da preparação a concentrações crescentes de TERP (1 – 100 µg/mL), por 5 minutos, reduziu a contração subsequente induzida por K⁺ (60 mM), com CI₅₀ de 24,90 µg/mL [17,07 – 36,32 µg/mL, n= 8]. A concentração de 100 µg/mL reduziu em 100% a contração potássica quando comparada com o controle (Fig. 25). O efeito inibitório do TERP sobre a contração induzida por KCl foi significativamente diferente do controle (p < 0,05; teste de Dunn).

4.2.3 Efeito do TERP sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺

Aplicação de 60 mM de cloreto de potássio (KCl) em anéis de traquéia de rato induziu contrações tônicas equivalentes a 0,81 ± 0,13 g. O TERP induziu relaxamento quando aplicado na fase tônica da resposta contrátil induzida por solução despolarizante (60 mM de KCl).

O efeito do TERP sobre preparações pré-contraídas por KCl está representado na figura 26. A adição cumulativa de TERP (1 – 600 µg/mL) induziu relaxamento do tônus da preparação de traquéia, pré-contraída com 60 mM de K⁺, com CI₅₀ de 40,84 µg/mL [23,84 – 69,95 µg/mL, n= 9]. Este efeito foi dependente de concentração e significativamente diferente do controle (p < 0,05; teste de Dunn).

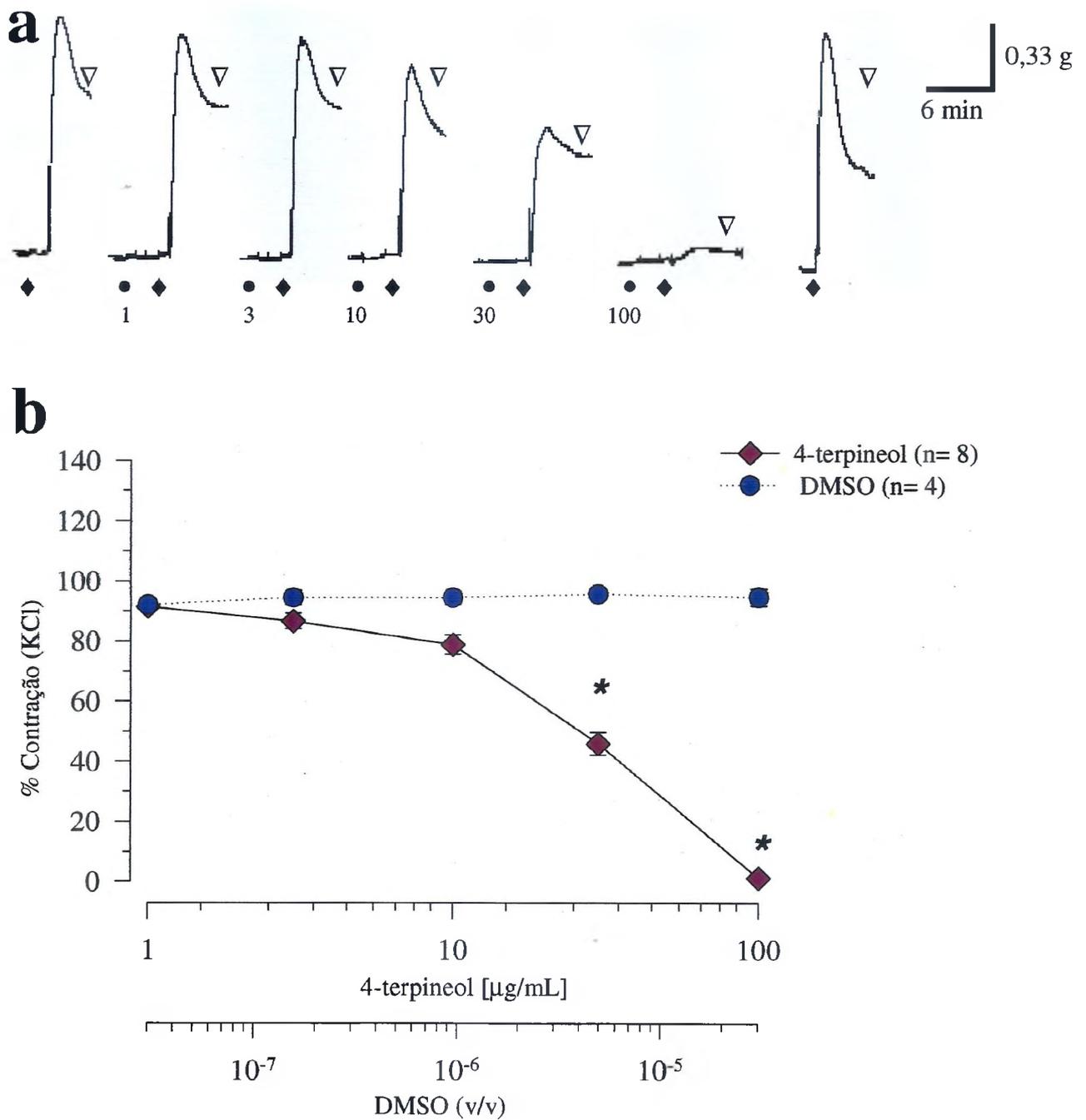


FIGURA 25- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+ em músculo liso traqueal de rato. a) Traçado original ilustrando o bloqueio das contrações potássicas pelo TERP. (●) indica início da incubação da preparação com TERP ($\mu\text{g/mL}$) nas concentrações indicadas; (◆) substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 60 mM de K^+ e TERP; (▽) lavagem com Tyrode modificada. b) Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das contrações induzidas por K^+ em presença de concentrações crescentes de TERP. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (contração potássica inicial) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

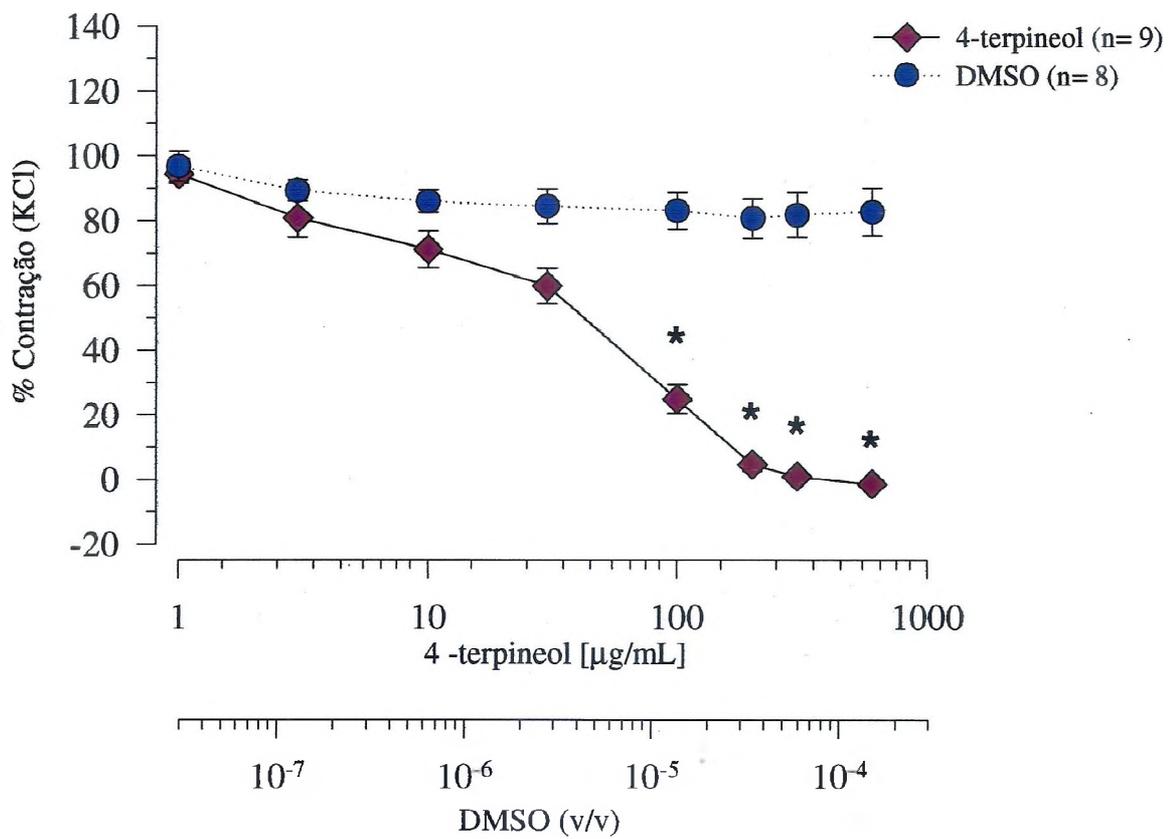


FIGURA 26- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraindo pela presença mantida de 60 mM de K⁺. Gráfico mostrando médias ± e.p.m do efeito do TERP em preparações pré-contraindo por 60 mM de K⁺; (*) indica diferença significativa entre o efeito do TERP e a situação controle (contração tônica de 60 mM de K⁺) (p<0,05; teste de Dunn).

4.2.4 Efeito do TERP na presença de L-NAME sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺

A fim de investigar a participação do óxido nítrico (NO) sobre a reversão da contratura potássica (K⁺ 60 mM) pelo TERP, incubamos a preparação com L-NAME (500 μM), por 20 minutos. Este bloqueador da síntese de NO não alterou significativamente o relaxamento induzido pelo TERP do tônus traqueal induzido por 60 mM de K⁺. Os valores para CI₅₀ do TERP (1 – 600 μg/mL) sem e com L-NAME foram 37,65 μg/mL [21,33 – 66,46 μg/mL; n= 4] e 44,70 μg/mL [33,93 – 58,86 μg/mL, n= 11] respectivamente. Não existiu diferença significativa entre o efeito desse constituinte do OEAz em ausência e presença de L-NAME (p < 0,05; ANOVA de duas variâncias) (Fig. 27).

4.2.5 Efeitos comparativos do TERP e epinefrina sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺

A fim de compararmos o efeito relaxante do TERP com o efeito clássico do neurotransmissor adrenérgico, investigamos a resposta desse constituinte do OEAz, sobreposta ao efeito antiespasmódico clássico da epinefrina. A adição cumulativa de 1; 10 e 100 μM de epinefrina induziu relaxamento de 16,70 ± 2,97%, 41,78 ± 3,36% e 46,53 ± 5,99%, respectivamente. Mantendo a preparação em presença deste mediador, a adição de 600 μg/mL de TERP evocou relaxamento de 96,13 ± 2,41% (Fig. 28, n= 6). A amplitude do relaxamento induzida por 10 e 100 μM de epinefrina e 600 μg/mL de TER difere significativamente do controle (p <

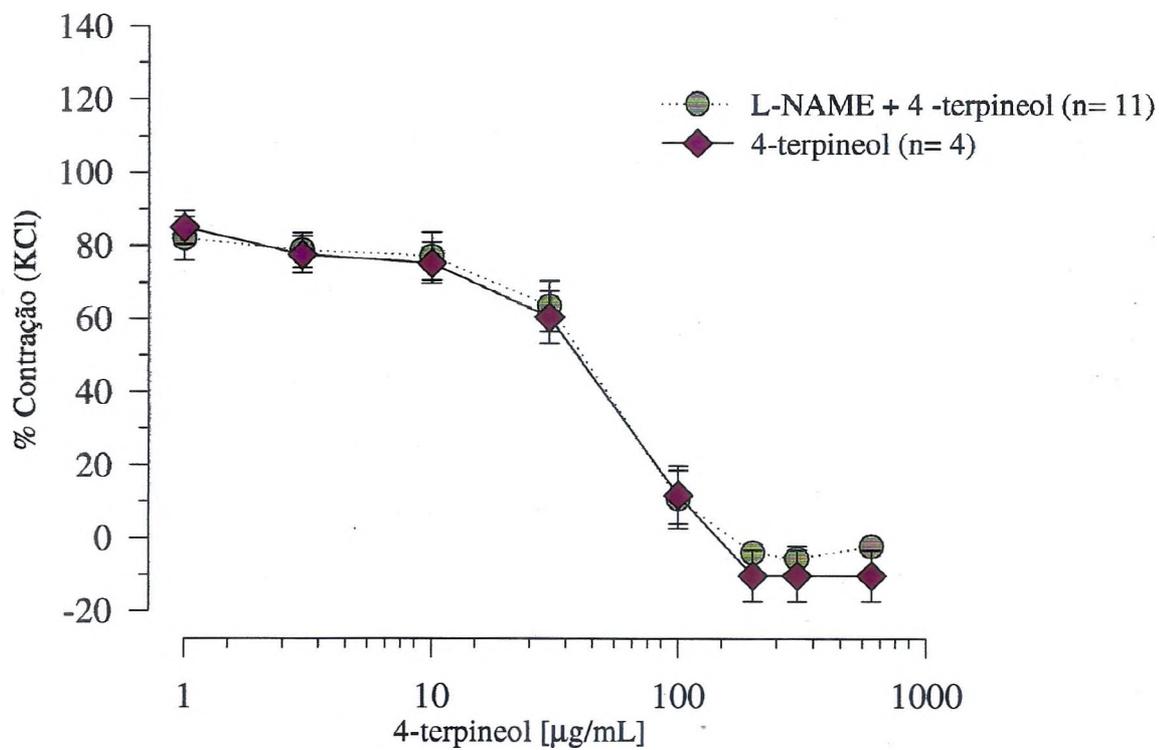


FIGURA 27- Efeito do 4-terpineol (TERP) na presença de L-NAME [500 µM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺. Gráfico mostrando médias ± e.p.m do efeito do TERP sobre a reversão da contração potássica na ausência e presença de L-NAME.

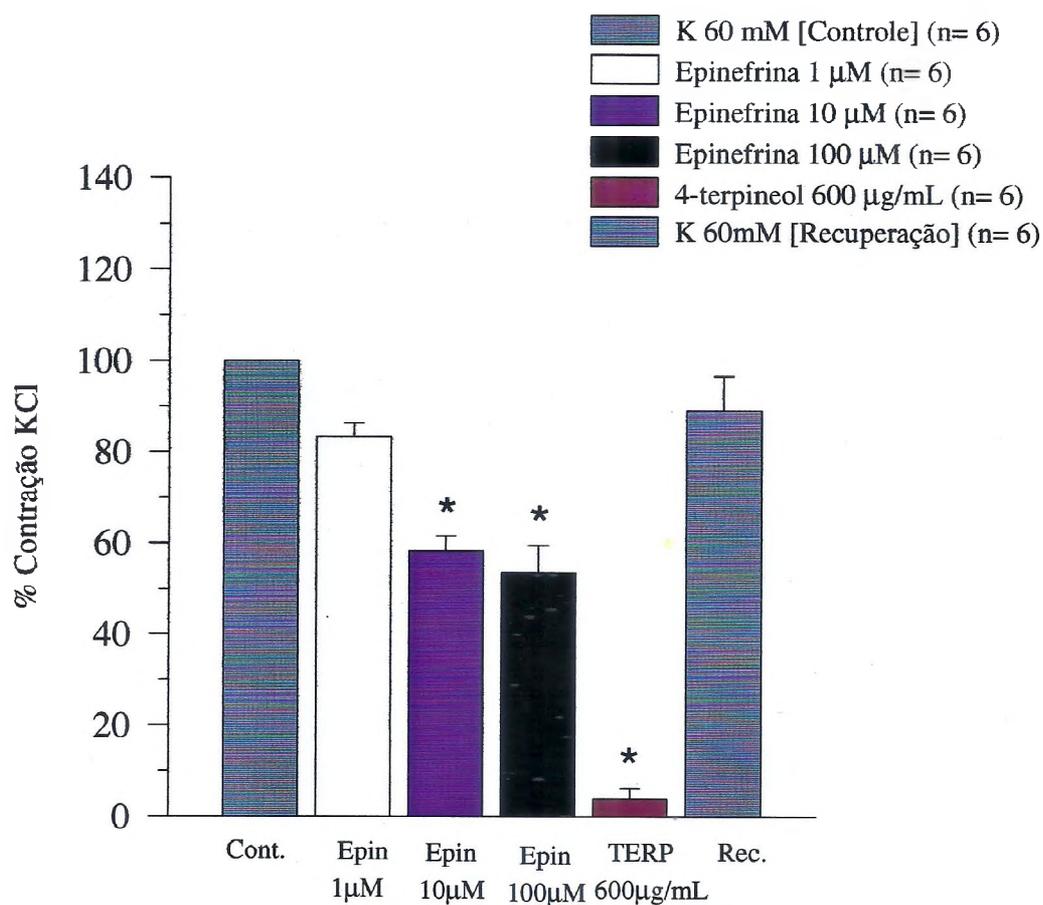


FIGURA 28- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobreposto ao relaxamento induzido por epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . Gráfico mostrando médias + e.p.m dos efeitos promovidos pela epinefrina e TERP no músculo pré-contraído por 60 mM de K^+ . (*) indica diferença significativa em relação ao controle (início da contração tônica) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

,05; teste de Dunn), e o relaxamento evocado pelo TERP foi significativo quando comparado com o efeito antiespasmódico clássico do referido neurotransmissor adrenérgico no músculo liso das vias aéreas ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis).

4.2.6 Efeito do TERP sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico

Pré-exposição da preparação por 5 minutos, a concentrações crescentes de TERP (1 – 600 $\mu\text{g/mL}$) reduziu a resposta contrátil induzida pela submaximal de ACh ($\cong 70\%$ da máxima), com CI_{50} 342,88 $\mu\text{g/mL}$ [245,75 – 478,30 $\mu\text{g/mL}$, $n= 6$]. A magnitude de inibição da curva submaximal de ACh pelo TERP nas concentrações de 400; 500 e 600 $\mu\text{g/mL}$ foi de $46,70 \pm 3,36\%$, $64,17 \pm 3,01\%$ e $100,0 \pm 0,0\%$ respectivamente, quando comparada com o controle (Fig. 29). Estes valores diferem significativamente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunn). O efeito sobre a inibição da curva de ACh foi revertido após lavagem da preparação com solução fisiológica de Tyrode. O percentual de recuperação foi $93,79 \pm 8,33\%$ nas referidas condições experimentais.

4.2.7 Efeito do TERP sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) na presença de nifedipina

As figuras 31 e 32 ilustram o efeito do TERP no componente contrátil da ACh que não depende do influxo de Ca^{2+} extracelular (BOURREAU, 1991).

A pré-exposição da preparação por 5 minutos, a uma dada concentração de TERP (1 – 600 $\mu\text{g/mL}$), reduziu a contração submaximal subsequente ($\cong 70\%$ de saturação) induzida por ACh (3 μM) na presença de

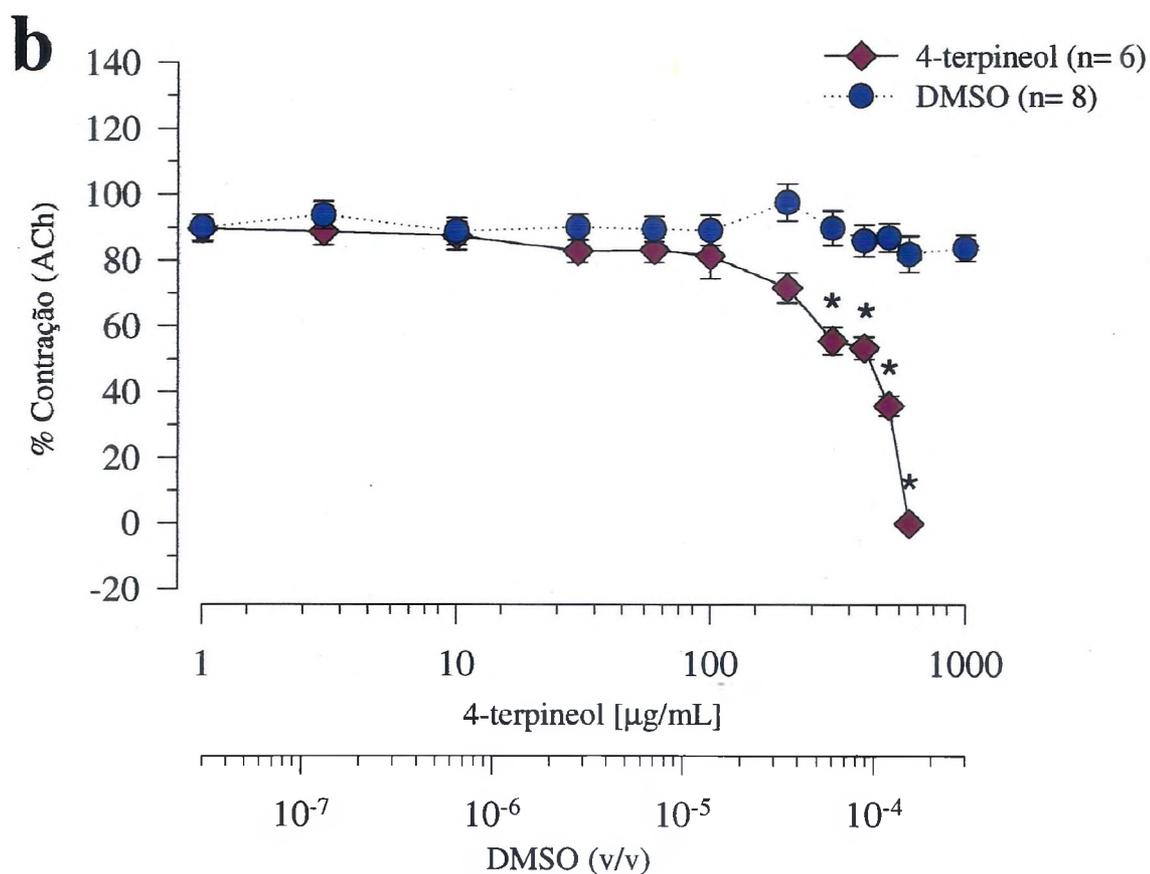
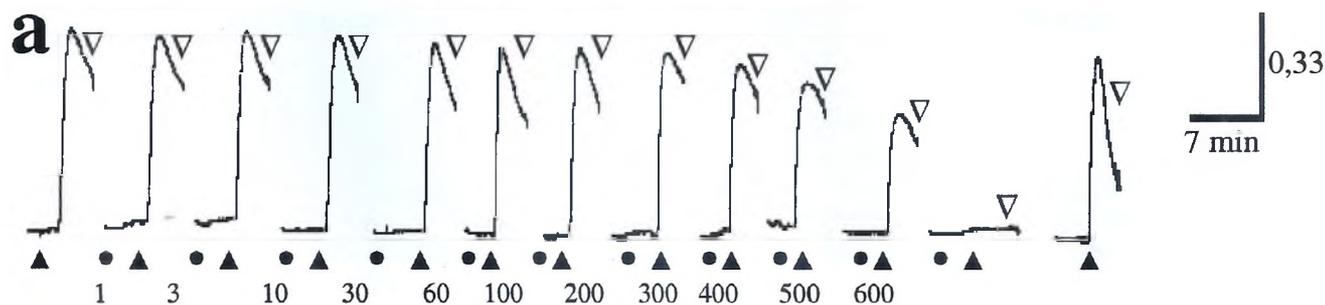


FIGURA 29- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [$10 \mu\text{M}$] em músculo liso traqueal de rato. a) Traçado original ilustrando o efeito inibitório de concentrações crescentes de TERP sobre a contração submaximal de ACh; (\blacktriangle) indica adição de ACh; (\bullet) adição de TERP ($\mu\text{g/mL}$) nas concentrações indicadas e (∇) lavagem com Tyrode modificada. b) Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo TERP nas contrações de ACh. (*) indica diferença significativa do efeito do TERP em relação ao controle (resposta à ACh) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

10 μM de nifedipina, com CI_{50} de 263,06 $\mu\text{g/mL}$ [88,86 – 778,93 $\mu\text{g/mL}$, $n= 5$] (Fig. 30).

4.2.8 Efeito do TERP sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh) na presença de solução zero Ca^{2+}

O TERP (600 $\mu\text{g/mL}$, $n= 6$) reduziu significativamente a amplitude da contração induzida por ACh (60 μM) em solução nominal zero Ca^{2+} [Ca^{2+}] para $15,74 \pm 6,15\%$ do valor controle (Fig. 31) ($p < 0,05$; ANOVA, teste de Dunn) O efeito sobre a inibição da contração induzida por 60 μM ACh em Tyrode 0Ca^{2+} foi revertido após 60 min. de lavagem da preparação com solução [Ca^{2+}]. O percentual de recuperação foi de $103,60 \pm 8,41\%$ nas referidas condições experimentais.

4.2.9 Efeito do TERP sobre contrações induzidas por prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$)

O TERP (100 – 1000 $\mu\text{g/mL}$), incubado por 5 minutos, reduziu a contração submaximal subsequente induzida por $\text{PGF}_{2\alpha}$, com CI_{50} de 129,64 $\mu\text{g/mL}$ [114,40 – 146,90 $\mu\text{g/mL}$, $n= 13$]. O bloqueio induzido pelo TERP, nas concentrações de 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi $-7,01 \pm 6,58\%$ e $-13,54 \pm 6,84\%$ em relação ao controle, respectivamente (Fig. 32). Estes valores diferem significativamente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunn).

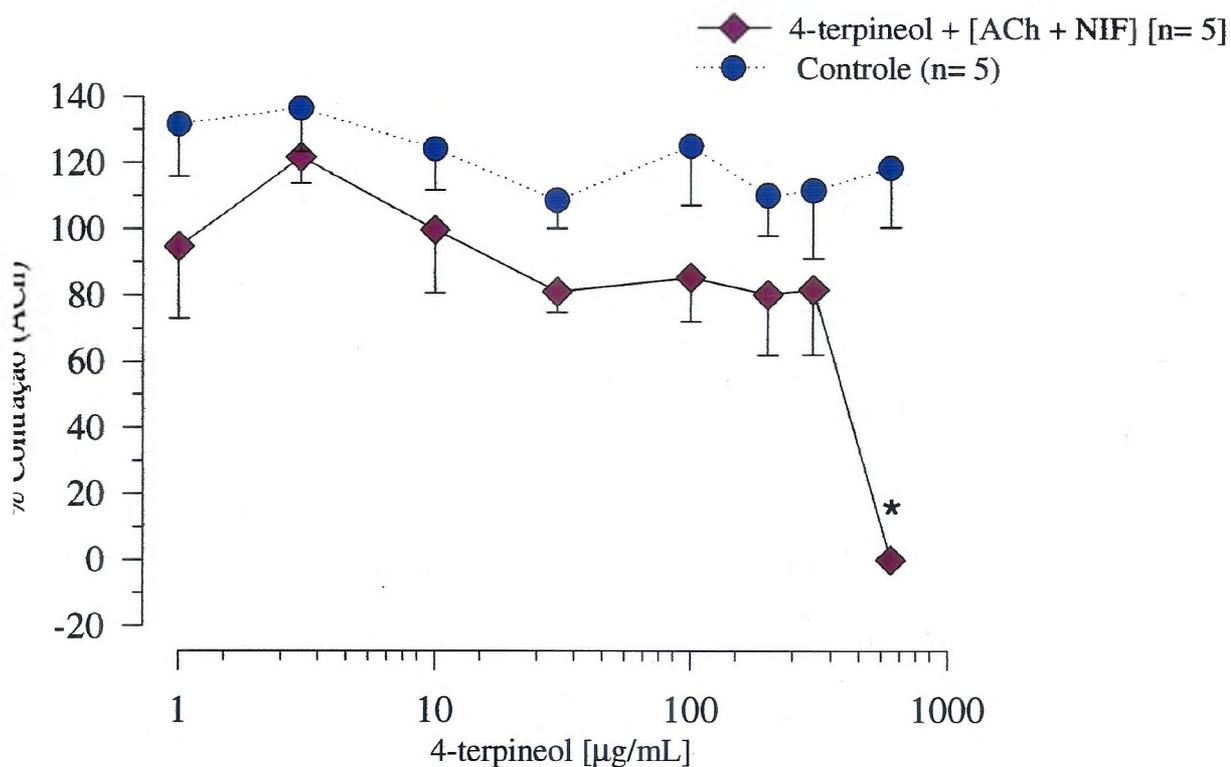


FIGURA 30- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [10 µM] na presença de nifedipina [10 µM] em músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias – e.p.m das alterações promovidas pelo TERP na presença de nifedipina. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva em relação ao controle (resposta a ACh na presença de nifedipina) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

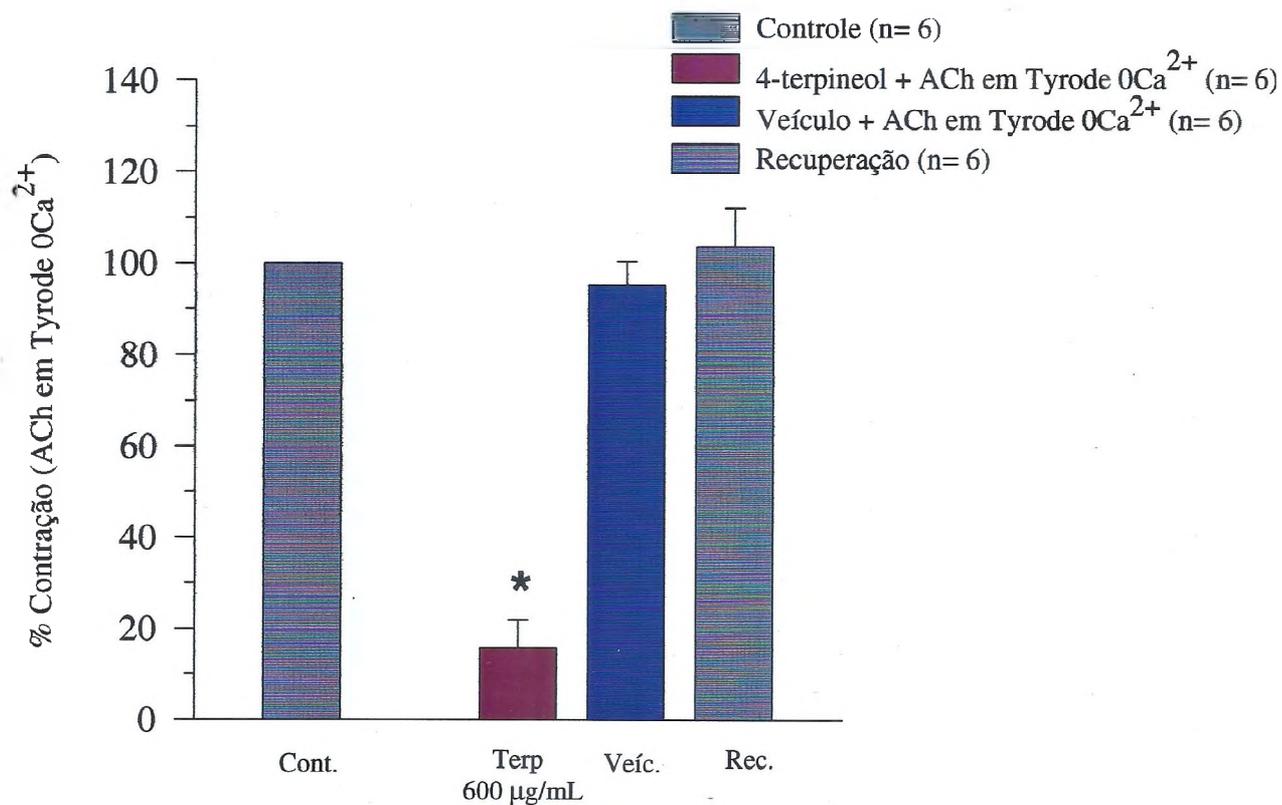


FIGURA 31- Efeito do 4-terpineol (TERP) [600 µg/mL] sobre contrações induzidas por 60 µM de acetilcolina (ACh) na ausência de Ca²⁺ em músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo TERP na contração induzida pela ACh em solução isenta de Ca²⁺; (*) indica diferença significativa em relação ao controle (ACh em solução 0Ca²⁺) (p<0,05; teste de Dunn).

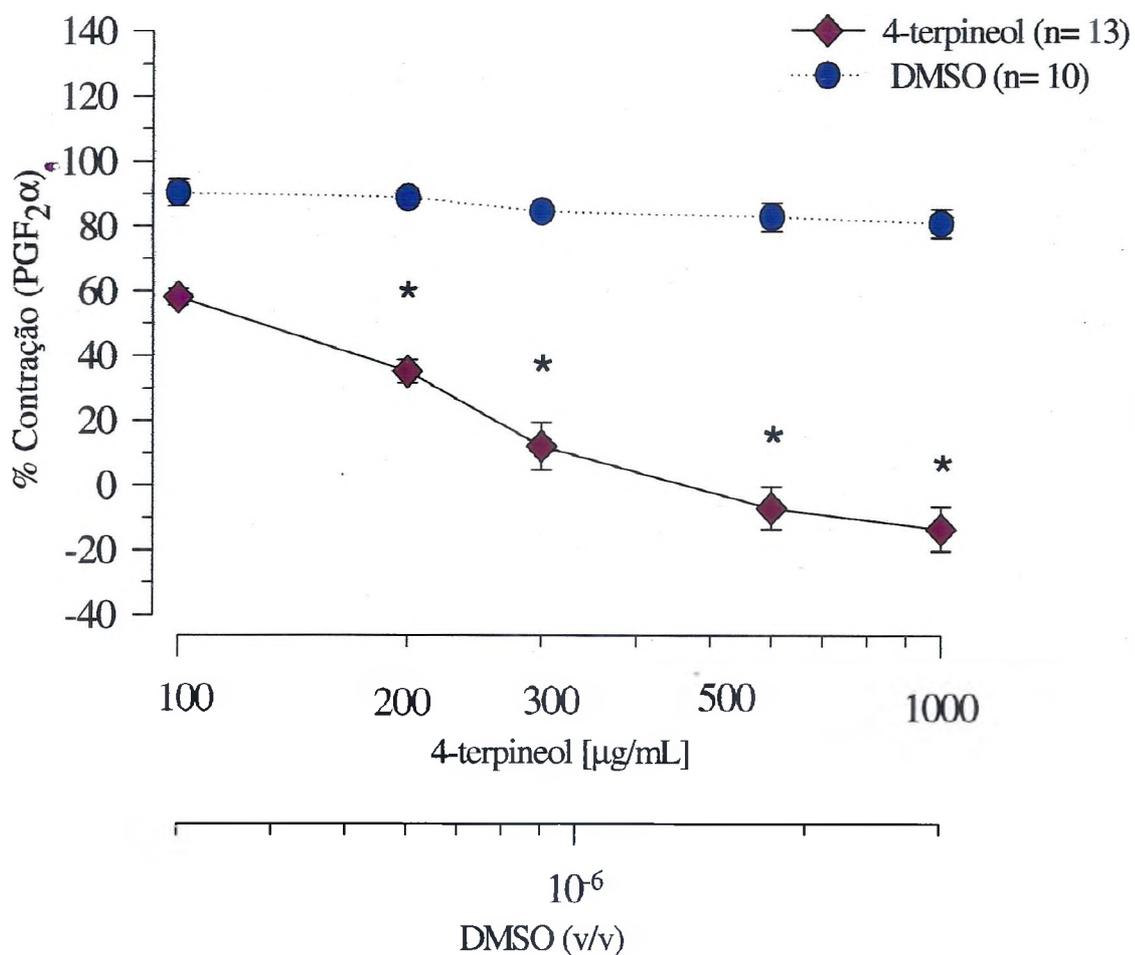


FIGURA 32- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo TERP em preparações pré-contraídas por PGF_{2α}; (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do TERP em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração tônica) (p<0,05; teste de Dunn)

4.2.10 Efeito do TERP sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5-hidroxitriptamina (5-HT)

Aplicação de 10 μM de 5-HT evocou contrações reproduzíveis em músculo liso traqueal de rato, com amplitude média de $0,583 \pm 0,120$ g (n= 8). Quando TERP (600 $\mu\text{g/mL}$) foi aplicado na fase tônica da resposta contrátil, induziu relaxamento de $87,86 \pm 5,99\%$ e este efeito foi significativamente diferente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunn). O efeito contraturante da 5-HT foi recuperado após eliminação do TERP da preparação pela lavagem com solução fisiológica de Tyrode normal e repouso de 1 hora (Fig. 33).

4.3 Efeitos farmacológicos do 1,8-cineol (CIN) em músculo liso *traquealis* de rato

4.3.1 Efeito intrínseco do CIN sobre o tônus basal

Para averiguar o efeito intrínseco do CIN sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato foram adicionadas concentrações crescentes de forma cumulativa de CIN (1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$). O CIN alterou significativamente o tônus basal apenas na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, aumentando-o para valor de força que correspondeu a $5,06 \pm 2,20\%$ (n= 8) da contração induzida por 60 mM de K^+ ($1,11 \pm 0,15$ g, n= 8) ($p < 0,05$; teste de Dunn) (Fig. 34). Após remoção do CIN da preparação por sucessivas lavagens com solução fisiológica de Tyrode modificada, o tônus basal foi recuperado.

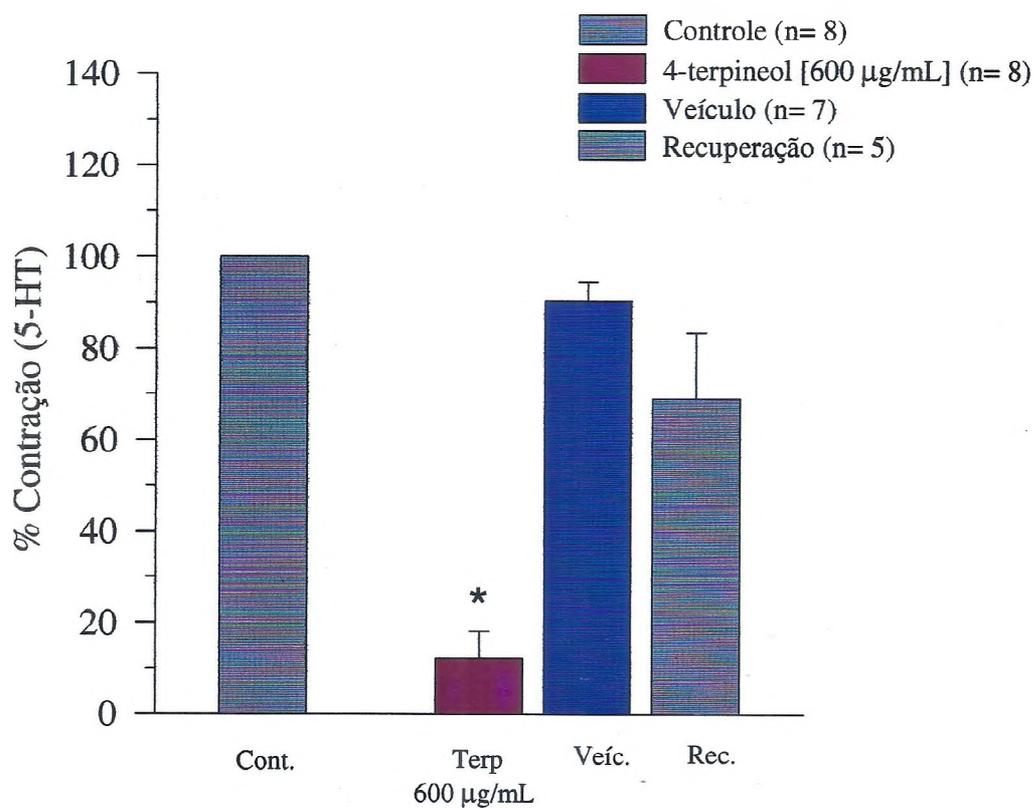


FIGURA 33- Efeito do 4-terpineol (TERP) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 10 µM de 5-hidroxitriptamina (5-HT). Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo TERP [600 µg/mL] sobre as contrações induzidas por 5-HT. (*) indica diferença significativa do efeito do TERP em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração tônica) ($p \leq 0,05$; teste de Dunn).

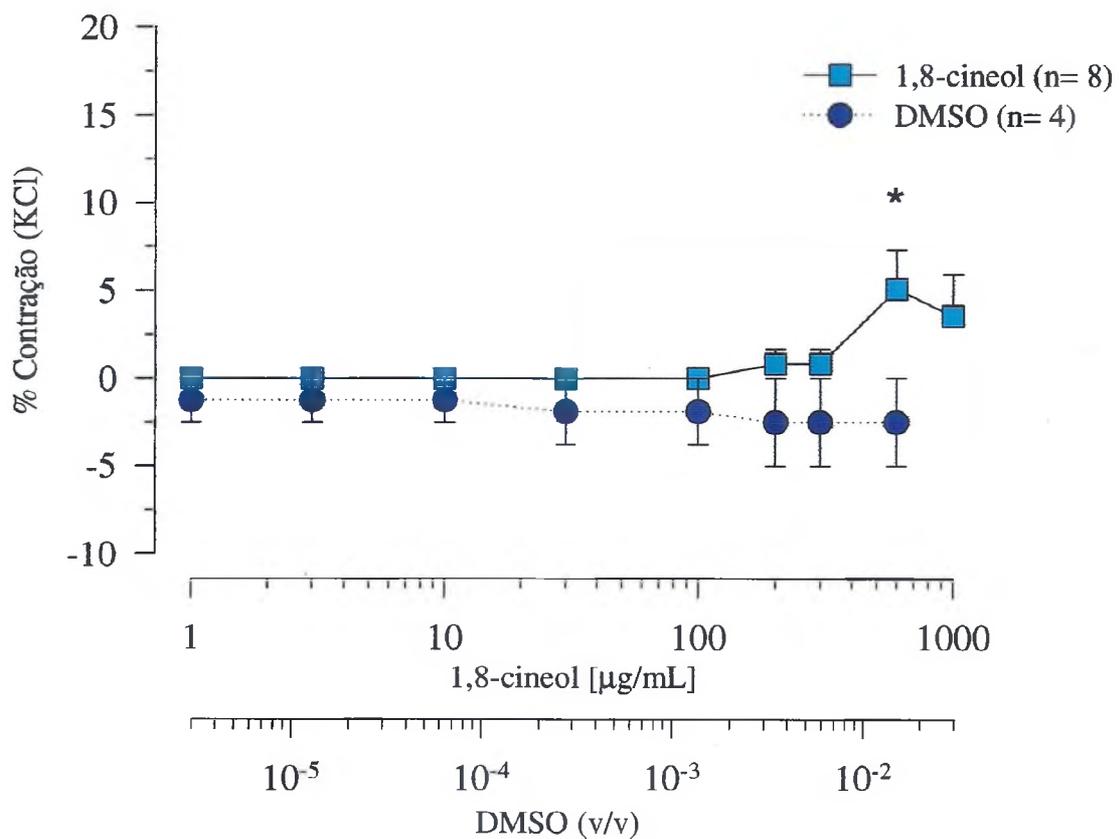


Figura 34- Efeito intrínseco do 1,8-cineol (CIN) sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo CIN no tônus basal. (*) indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle (contração inicial de potássio) ($p < 0,05$; teste de Bonferroni).

4.3.2 Efeito do CIN sobre contrações induzidas por 60 mM de K⁺

O CIN apresentou efeito inibitório dependente de concentração sobre contrações induzidas por alta concentração de K⁺ (60 mM). O CIN (1 – 1000 µg/mL) previamente adicionado à preparação por 5 minutos, preveniu as contrações subseqüentes induzidas por 60 mM K⁺ com CI₅₀ de 361,39 µg/mL [244,39 – 534,44 µg/mL, n= 6]. Na concentração de 1000 µg/mL houve redução estatisticamente significativa de 96,21 ± 2,49% em relação ao valor controle (p < 0,05; teste de Dunn) (Fig. 35).

4.3.3 Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺

Aplicação de 60 mM de cloreto de potássio (KCl) em anéis de traquéia de rato induziu contrações tônicas equivalentes a 0,98 ± 0,03 g. O CIN induziu relaxamento quando aplicado na fase tônica da resposta contrátil induzida por solução despolarizante (60 mM de KCl). Após atingir o estado estacionário (contração tônica), foram administradas concentrações crescentes de CIN (1 – 1000 µg/mL). O CIN foi capaz de relaxar o músculo pré-contraído com CI₅₀ de 264,61 µg/mL [200,22 – 349,70 µg/mL, n= 9]. As concentrações de 600 e 1000 µg/mL induziram relaxamento estatisticamente significativo de 92,34 ± 1,98 e 100 ± 0,0%, respectivamente (p < 0,05; teste de Dunn) (Fig. 36).

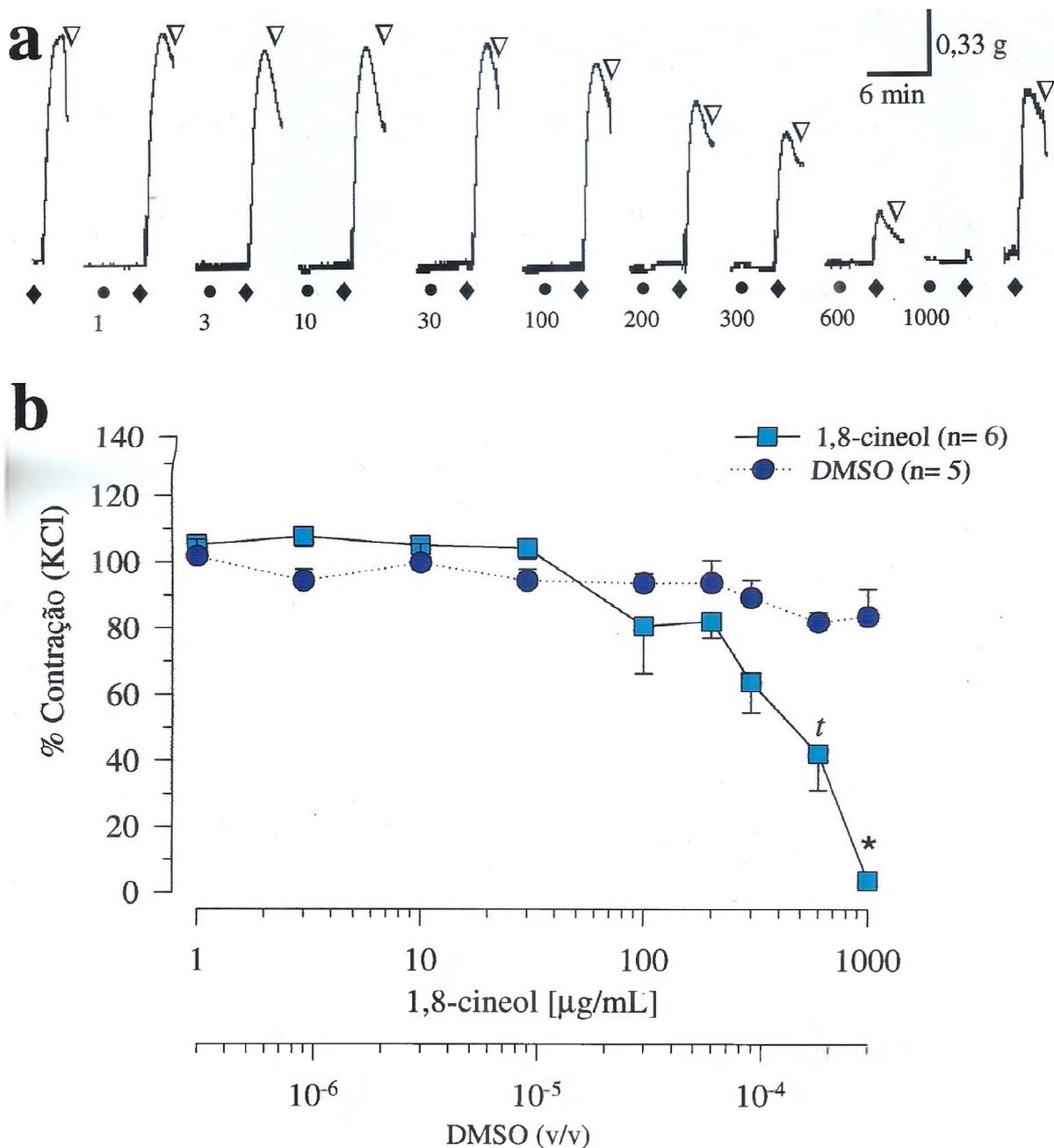


FIGURA 35- Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre contrações induzidas por 60 mM de K^+ em músculo liso traqueal de rato. **a)** Traçado original ilustrando bloqueio das contrações potássicas pelo CIN; (•) indica início da incubação da preparação com CIN ($\mu\text{g/mL}$), nas concentrações indicadas; (♦) substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 60 mM de K^+ e CIN; (▽) lavagem com Tyrode modificada. **b)** Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas por concentrações crescentes de CIN sobre a contração potássica. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (contração inicial de potássio) ($p < 0,05$; teste de Dunn); (t) indica diferença significativa em relação ao controle (teste t pareado).

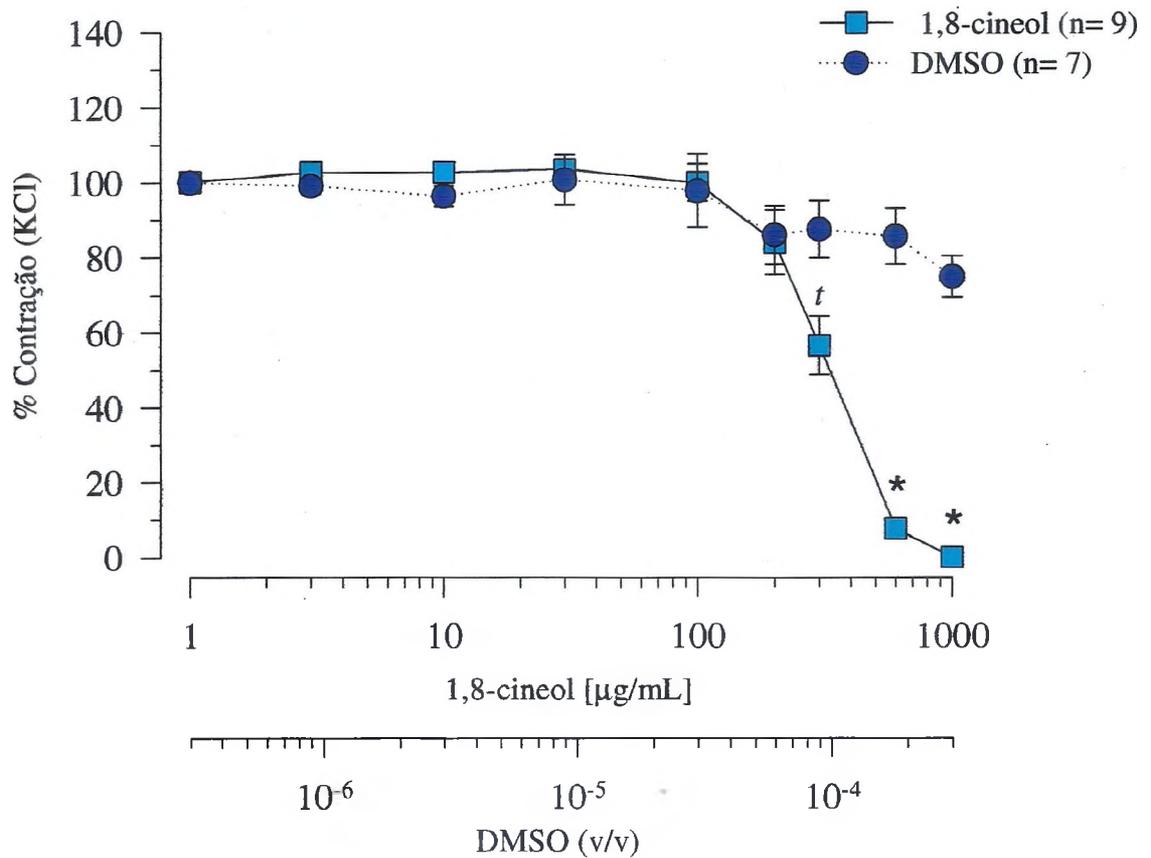


FIGURA 36- Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K⁺. Gráfico mostrando médias ± e.p.m do efeito do CIN em preparações pré-contraídas por 60 mM de K⁺; (*) indica diferença significativa entre o efeito do CIN e a situação controle (contração tônica de 60 mM de K⁺) (p<0,05; teste de Dunn).

4.3.4 Efeito do CIN na presença de cafeína sobre o músculo pré-contraindo pela presença mantida de 80 mM de K⁺

Foram induzidas contrações com alta concentração de K⁺ (K⁺ 80 nM). Com a contratura potássica estabelecida (contração tônica), foi aplicado 1 mM de cafeína, esperados 5 minutos, e em seguida adicionadas de forma cumulativa, concentrações crescentes de CIN. O CIN (1 – 1000 µg/mL) na presença de cafeína reverteu de modo dependente de concentração a contratura potássica com CI₅₀ de 158,67 µg/mL [141,70 – 177,66 µg/mL, n= 9]. As concentrações de 200, 300, 600 e 1000 µg/mL induziram relaxamento na ordem de 63,94 ± 7,06; 79,28 ± 5,43; 93,35 ± 5,02 e 94,59 ± 3,87%, respectivamente (valores significativamente diferentes do controle, p < 0,05; teste de Dunn) (Fig. 37). Os efeitos antiespasmódicos induzido pelo CIN na ausência e presença de cafeína diferem significativamente quando comparados entre se (p < 0,05, teste de Bonferroni) (Fig. 38). Em todos experimentos, a lavagem da preparação com Tyrode modificada, por 1 hora, foi suficiente para resposta do músculo ao estímulo despolarizante do potássio (recuperação).

4.3.5 Efeitos comparativos do CIN e epinefrina sobre o músculo pré-contraindo pela presença mantida de 60 mM de K⁺

Desde que o CIN foi eficaz em inibir e reverter contrações induzidas por alta concentração de K⁺, comparamos este efeito com a ação antiespasmódica da epinefrina no músculo liso respiratório que é mediado pela estimulação de receptores adrenérgicos. Desta forma investigamos a resposta do CIN sobreposta ao efeito antiespasmódico clássico da epinefrina. Em preparações, mantidas contraídas (fase tônica) por 60 mM

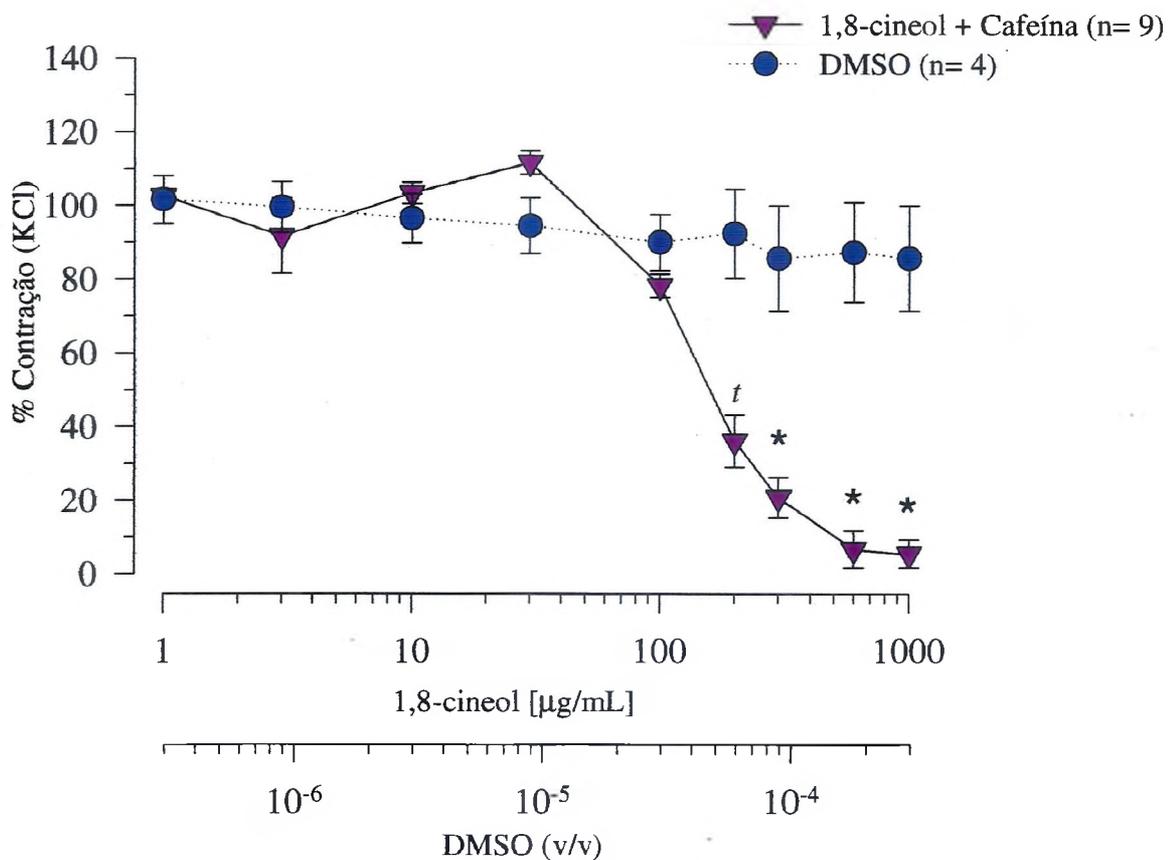


FIGURA 37- Efeito do 1,8-cineol (CIN) na presença de cafeína [1 mM] sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contráido pela presença mantida de 60 mM de K⁺. Gráfico mostrando médias ± e.p.m das alterações promovidas pelo CIN no músculo pré-contráido por 60 mM de K⁺ em presença de cafeína. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do CIN em presença de cafeína em relação ao controle (início da contração tônica) (p<0,05; teste de Dunn), (t) indica diferença significativa do controle (teste t pareado).

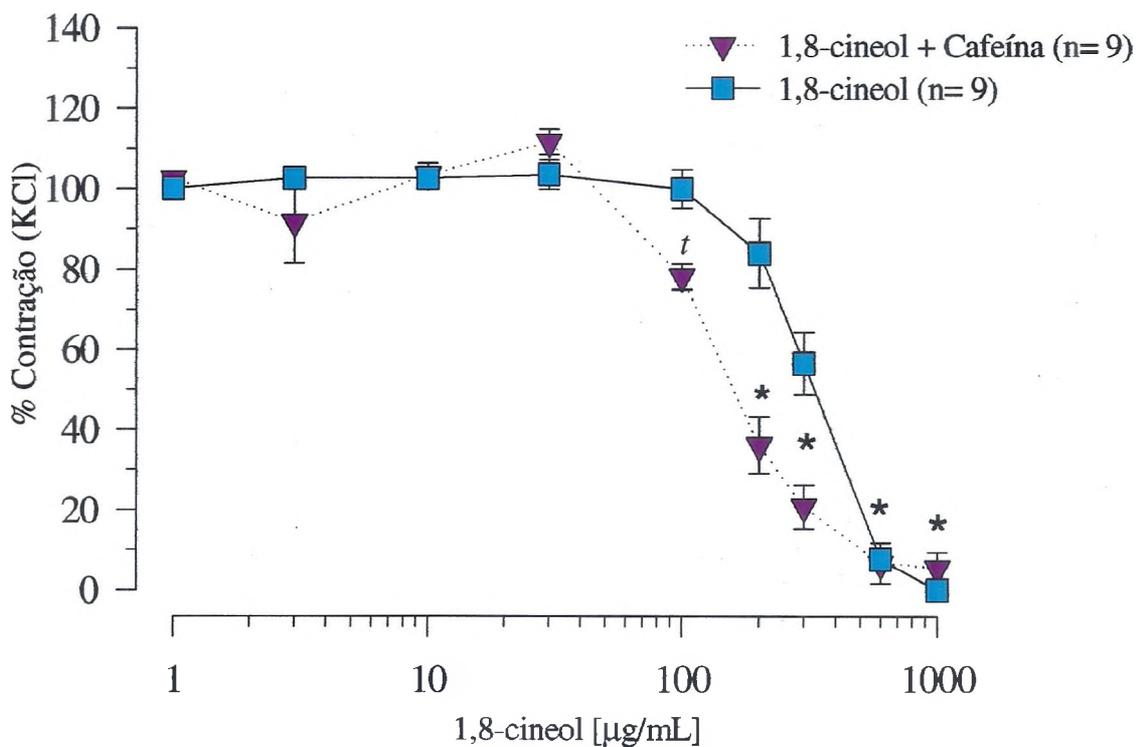


FIGURA 38- Efeito do 1,8-cineol (CIN) em ausência e presença de cafeína sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações induzidas pelo CIN no músculo pré-contraído por 60 mM de K^+ na ausência e presença de cafeína. (*) indica diferença significativa do efeito do CIN na presença de cafeína em relação ao controle (contração tônica) ($p < 0,05$; teste de Dunn), (t) indica diferença significativa em relação ao controle (teste t pareado).

e K^+ , foram adicionados de forma cumulativa 1, 10 e 100 μM de epinefrina que evocaram relaxamento de $13,82 \pm 4,92$; $41,06 \pm 7,03$ e $47,92 \pm 5,02\%$, respectivamente. A adição subsequente de 600 $\mu g/mL$ de CIN induziu relaxamento de $96,24 \pm 1,93\%$ (Fig. 39). A amplitude do relaxamento evocado pelas concentrações de 10 e 100 μM de epinefrina e 600 $\mu g/mL$ de CIN difere significativamente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunnett). O relaxamento induzido pelo CIN foi significativo quando comparado com efeito antiespasmódico clássico da epinefrina no músculo respiratório ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis).

4.3.6 Efeito do CIN na presença de cafeína sobre contrações promovidas pela adição de Ca^{2+} em músculo liso traqueal despolarizado por 80 mM de K^+ ($0Ca^{2+}$ nominal)

Para realização deste protocolo, foi usada solução despolarizante com 80 mM de K^+ , onde não fora adicionado $CaCl_2$ (solução zero Ca^{2+} nominal), para reverter contrações iniciais evocadas por K^+ 80 mM. Após 10 minutos de lavagem com solução zero Ca^{2+} , a preparação atingiu os níveis de tensão relativos ao estado de repouso. Em seguida foram aplicados 5 mM de cafeína, esperados 5 minutos e aplicados 60 μM de ACh para ratificar a inexistência de Ca^{2+} extracelular. Após bloqueio da contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico, foram adicionados

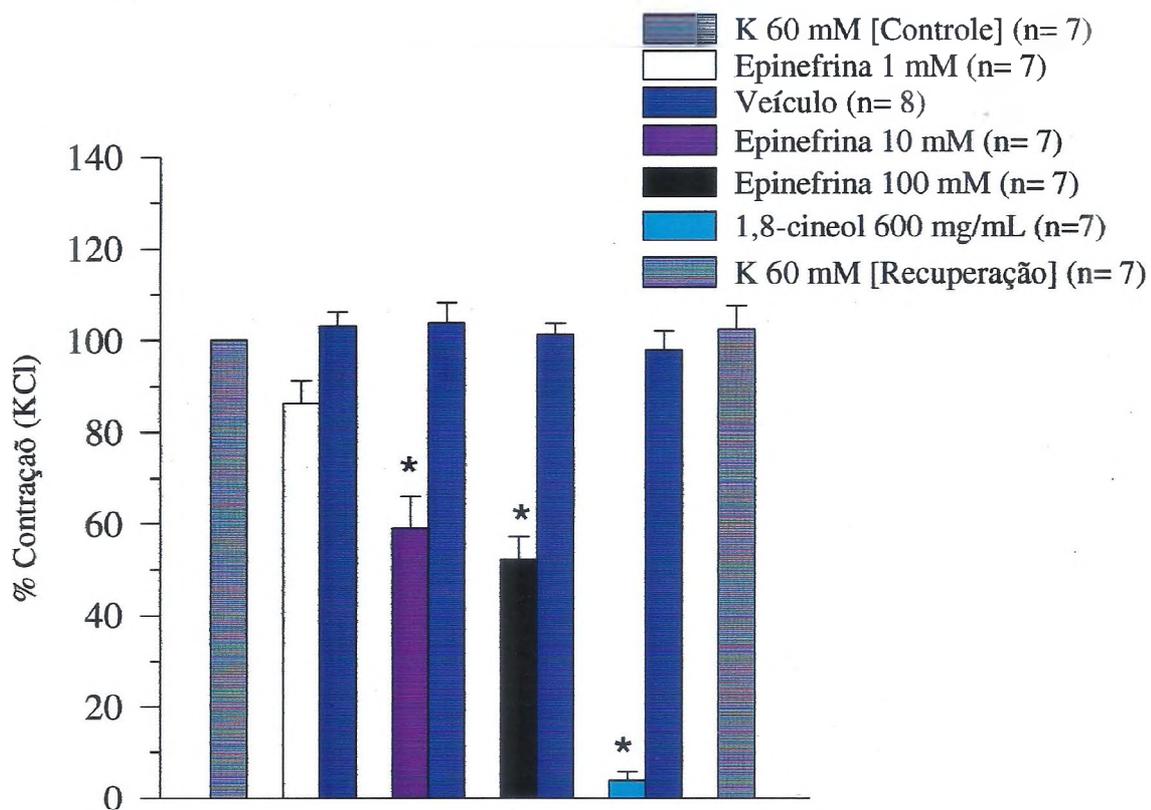


FIGURA 39- Efeito do 1,8-cineol (CIN) [600 $\mu\text{g}/\text{mL}$] sobreposto ao relaxamento induzido pela epinefrina em músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de 60 mM de K^+ . Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas pelo CIN no músculo pré-contraído por 60 mM de K^+ em presença de epinefrina. (*) indica diferença significativa em relação ao controle (início da contração tônica) ($p < 0,05$; teste de Dunn).

caféina e CIN (1000 µg/mL) e subseqüente concentrações crescentes de Ca^{2+} (0,01 – 30 mM). A adição de Ca^{2+} na referida condição experimental induz aumento de tensão promovido pelo influxo do íon através dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (BOLTON, 1979).

O CIN (1000 µg/mL), na presença de caféina, potencializou as contrações mediadas por 1, 3 e 10 mM de Ca^{2+} , desviando à esquerda a curva concentração-efeito com diferença significativa do controle ($p < 0,05$; ANOVA de duas variáveis, teste de Student-Newman-Keuls) para adição de concentrações crescentes de Ca^{2+} (Fig. 40). Após remoção do CIN e lavagens com solução fisiológica de Tyrode, em período de 1 hora, as contrações de K^+ 80 mM representaram $87,16 \pm 5,91\%$ da amplitude do início do ensaio, indicando recuperação da preparação.

4.3.7 Efeito do CIN sobre contrações induzidas pelo neurotransmissor colinérgico

Foram usadas concentrações crescentes de acetilcolina (0,1 µM – 30 µM), a partir daí, foi escolhida a concentração que induziu cerca de 70 a 80% da máxima resposta muscular (concentração submaximal). Em seguida foi verificado o efeito de concentrações crescentes de CIN (0,1 – 1000 µg/mL) na subseqüente concentração submaximal de ACh. O CIN (30, 60, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 µg/mL), adicionados à solução do banho, durante 5 minutos prévios ao agonista promoveu potencialização da contração induzida por ACh (Fig. 41). A magnitude da potencialização da curva de ACh pelo CIN nas concentrações de 100 e 200 µg/mL foi de $177,82 \pm 18,67$ e $176,08 \pm 21,02\%$ quando comparada com o controle. A amplitude da referida potencialização difere significativamente do controle ($p < 0,05$; teste de Dunn). O efeito potencializador sobre a curva de ACh

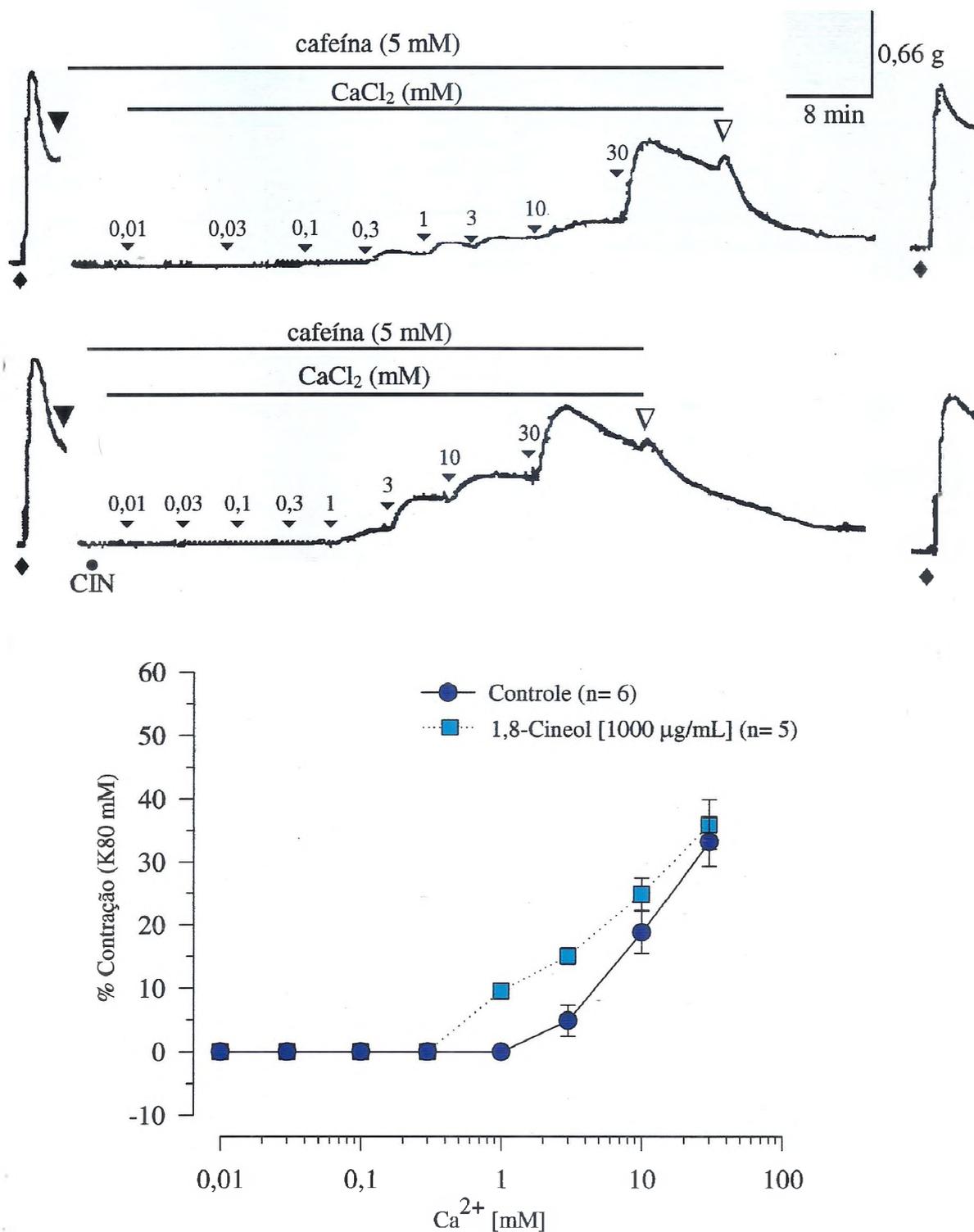


FIGURA 40- Efeito do 1,8-cineol (CIN) [1000 µg/mL] na presença de cafeína [5 mM] sobre contrações induzidas pela adição de Ca²⁺ na solução do banho em músculo liso traqueal de rato despolarizado por 80 mM de K⁺. a e b) Traçados originais ilustrando a curva de Ca²⁺ na presença de cafeína (a) controle e b) presença de CIN; (♦) indica substituição da solução Tyrode modificada por solução contendo 80 mM de K⁺; (▽) lavagem com solução Tyrode (80 mM de K⁺ isenta de Ca²⁺); (●) adição de CIN à preparação; (▽) adição de Ca²⁺ nas concentrações indicadas e (▽) lavagem com Tyrode modificada; as barras superior e inferior indicam presença de cafeína e CaCl₂, respectivamente. c) Gráfico mostrando médias ± e.p.m do efeito do CIN sobre a curva de Ca²⁺ no músculo despolarizado. As curvas diferem significativamente entre si (p<0,05; ANOVA de duas variáveis).

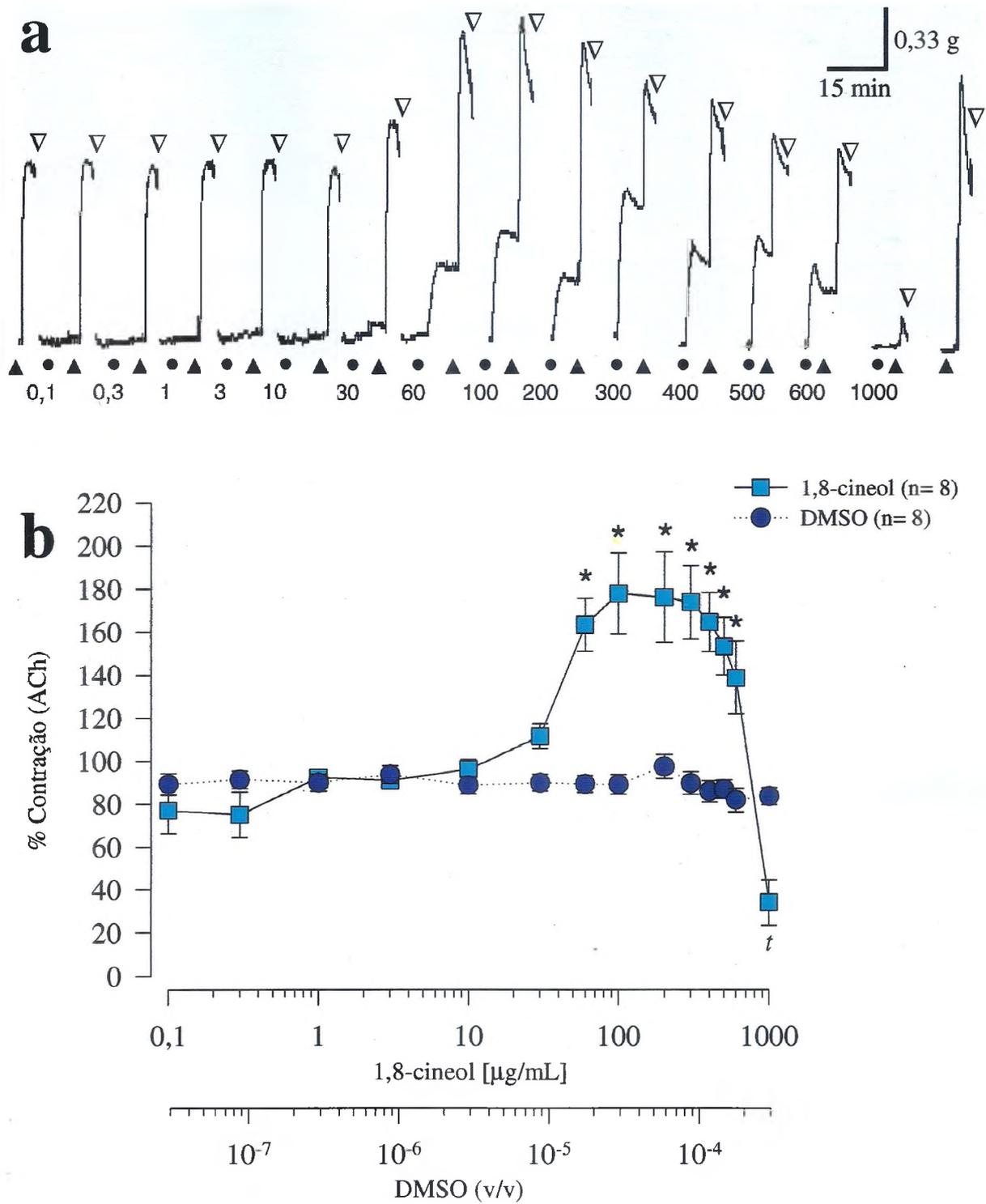


FIGURA 41- Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre a contração submaximal de acetilcolina (ACh) [10 μM] em músculo liso traqueal de rato. a) Traçado original ilustrando o efeito inibitório de concentrações crescentes de CIN sobre a contração submaximal de ACh; (▲) indica adição de ACh; (●) adição de CIN ($\mu\text{g/mL}$), nas concentrações indicadas e (▽) lavagem com Tyrode modificada. b) Gráfico mostrando médias \pm e.p.m das alterações promovidas pelo CIN nas contrações de ACh. (*) indica diferença significativa do efeito do CIN em relação ao controle (resposta a ACh) ($p < 0,05$; teste de Dunn), (t) indica diferença significativa do controle (teste t pareado).

foi revertido após lavagens da preparação com solução fisiológica de Tyrode. O percentual de recuperação foi de $87,50 \pm 5,76$, nas referidas condições experimentais.

4.3.8 Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)

Para investigar o efeito do CIN sobre contrações induzidas por $PGF_{2\alpha}$ em músculo liso respiratório, previamente determinamos a curva concentração efeito para este eicosanóide. A partir daí, escolhemos a concentração que correspondeu a 70 – 80% da máxima resposta muscular em cada ensaio (concentração submaximal). Adição cumulativa (100 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) na fase tônica da resposta contrátil induzida por $PGF_{2\alpha}$ (30 μM) induziu potencialização na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e relaxamento nas concentrações de (300 – 1000 $\mu\text{g/mL}$) com CI_{50} de 479,13 $\mu\text{g/mL}$ [320,92 – 715,48 $\mu\text{g/mL}$, $n= 8$] (Fig. 42). Nas concentrações de 600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ o relaxamento evocado pelo CIN foi de $43,84 \pm 14,47$ e $85,18 \pm 9,27\%$ respectivamente e diferem significativamente do valor controle ($p < 0,05$; teste de Bonferroni).

4.3.9 Efeito do CIN sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 5- hidroxitriptamina (5-HT)

Aplicação de 5-HT (10 μM) em músculo liso traqueal de rato induziu contrações tônicas equivalentes a $0,609 \pm 0,09$ g ($n= 8$). Na presença de CIN (600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) as contrações foram potencializadas atingindo $120,99 \pm 4,09$ e $102,91 \pm 15,25\%$ do valor controle respectivamente (Fig. 43). O efeito do CIN foi reversível após eliminação da droga do tecido pela

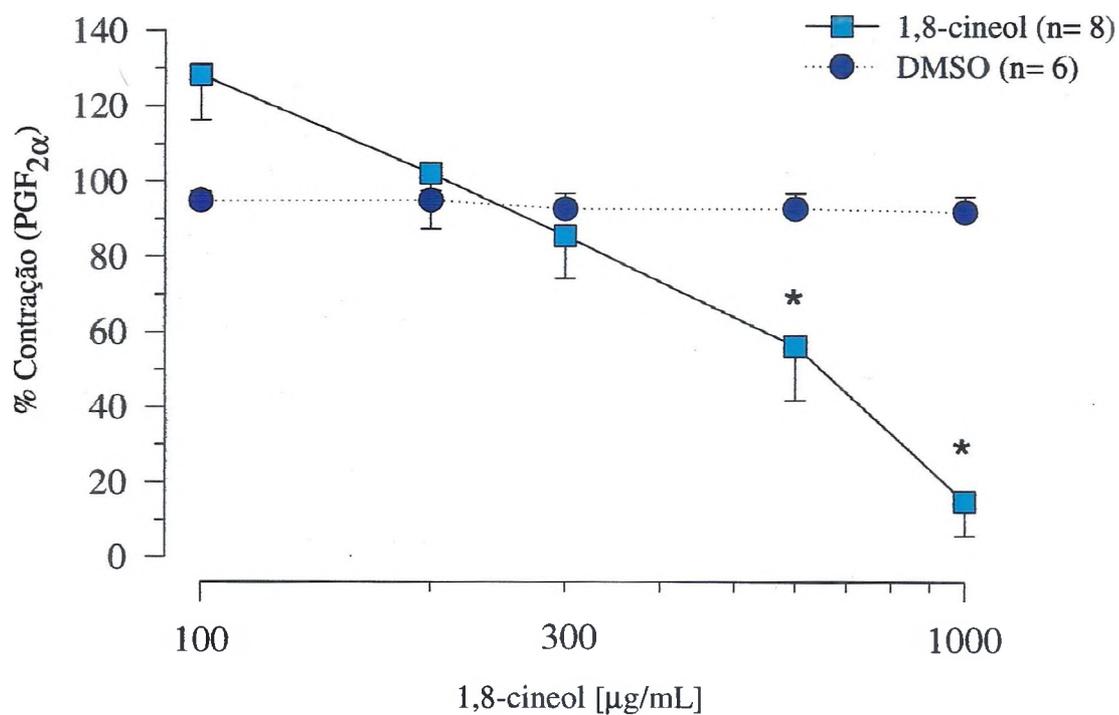


Figura 42- Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo liso traqueal de rato pré-contraído pela presença mantida de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Gráfico mostrando médias - e.p.m das alterações promovidas por CIN nas contrações induzidas por $PGF_{2\alpha}$. (*) indica diferença significativa dos pontos da curva do efeito do CIN em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração tônica) ($p < 0,05$; teste de Bonferroni).

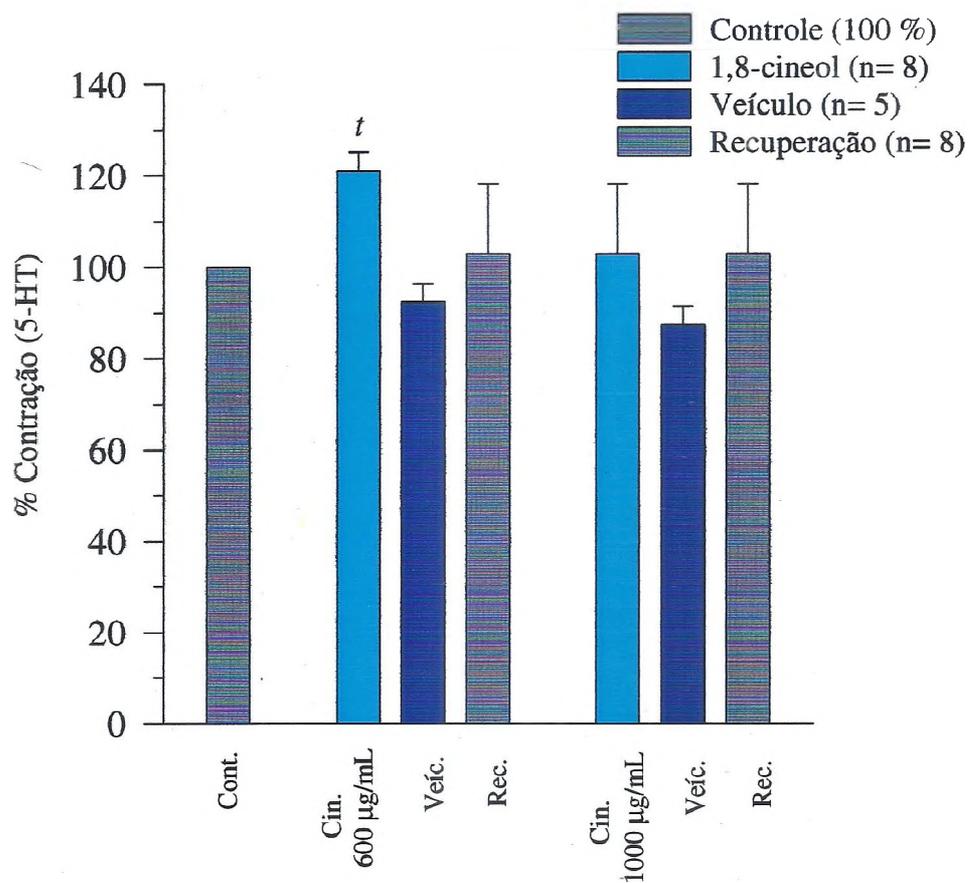


FIGURA 43- Efeito do 1,8-cineol (CIN) sobre o músculo pré-contraído pela presença mantida de 10 µM de 5-hidroxitriptamina (5-HT) em músculo liso traqueal de rato. Gráfico mostrando médias + e.p.m das alterações promovidas por CIN nas contrações induzidas por 5-HT. (*t*) indica diferença significativa do efeito do CIN em relação à amplitude da resposta inicial (início da contração mantida) ($p < 0,05$; teste *t* pareado).

agem com solução fisiológica de Tyrode e recuperou o estímulo inicial 5-HT em $86,54 \pm 7,61\%$.

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

Este estudo demonstra que o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt. et R. M. (OEAz) apresenta efeito antiespasmódico. Este efeito apresentou uma dependência de concentração entre 100 e 1000 µg/mL de OEAz e uma grande eficácia, tanto para o bloqueio do efeito de agentes contraturantes que atuam principalmente pelo acoplamento eletromecânico, como pelo acoplamento farmacomecânico. O OEAz, induz como efeito próprio contrações de pequena amplitude que não se contrapõem ao seu efeito antiespasmódico, como discutiremos a seguir. Estes dados, bem como a caracterização dos efeitos e o estudo do mecanismo de ação dos constituintes principais do OEAz, 1,8-cineol (CIN) e 4-terpineol (TERP), são originais e enriquecem de maneira relevante a literatura científica relacionada a efeitos farmacológicos de óleos essenciais. Tomados conjuntamente com o fato do OEAz possuir relativamente baixa toxicidade $DL_{50} > 2,5$ g/Kg (PINHO, 2002), o estudo sugere que esse óleo essencial apresenta grande potencialidade de utilização terapêutica.

5.2 Efeitos sobre o tônus basal

O óleo essencial de *A. zerumbet*, apesar de induzir contração como efeito próprio (nas concentrações de 100 e 200 µg/mL), apresenta atividade antiespasmódica (bloqueia à contração induzida por outro agente) mesmo na faixa de concentração em que induz contração. Observa-se que este efeito próprio contrátil pode ser considerado de pequena amplitude, vez que sua maior amplitude média (à concentração de 100 µg/mL) não ultrapassou

15 % da contração induzida por 60 mM de K^+ , que é uma concentração submaximal deste íon para ação contraturante. A indução de contração como efeito próprio não é contraditória com o efeito antiespasmódico pois está documentada para outras substâncias como a cafeína. Como no caso do OEAz, o efeito próprio da cafeína, que no músculo *traquealis* tem efeito antiespasmódico, é uma contração de pequena amplitude. O estudo demonstra também que os efeitos do OEAz, em relação aos de seus constituintes principais, CIN e TERP, apresenta semelhanças e diferenças que mostram que a atividade farmacológica do OEAz é apenas parcialmente explicável pelos efeitos desses constituintes principais. Este fato ocorre em relação ao tônus basal. Enquanto o TERP não apresentou nenhuma atividade contraturante como efeito próprio, o CIN o fez. Contudo, a amplitude média da contração induzida pelo CIN não atingiu os valores esperados a partir da hipótese de que esta substância seja a responsável pela referida atividade do OEAz. Como o CIN representa apenas aproximadamente 18% do peso da amostra de OEAz utilizada neste estudo, esperar-se-ia que em concentrações entre 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ele induzisse contrações de amplitude média máxima maior do que aquelas apresentadas pelo óleo essencial *per se*. Os achados não ratificam esta hipótese. Apenas à concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ o CIN induziu contração cuja amplitude não diferiu daquela promovida pelo OEAz, o que induz a aventar a hipótese de que outro(s) constituinte(s) participar(em) na indução do efeito contraturante do OEAz. Neste trabalho não se procurou elucidar o mecanismo de ação do efeito próprio contraturante do óleo e do cineol.

O OEAz, em músculo traqueal, apesar de promover efeito depressor sobre a contração de vários agonistas e relaxar o tônus por eles artificialmente aumentado, não induziu efeito próprio significativo

lepressor do tônus basal. Dado que o OEAz entre 100 e 600 µg/mL, bloqueou as contrações induzidas por PGF_{2α}, essa ausência de relaxamento do tônus basal pelo OEAz poderia parecer de certa forma surpreendente, pois o tônus basal no músculo *traquealis* tem geralmente o tônus aumentado devido à constante produção e liberação de prostaglandinas. Esta ausência de relaxamento do tônus basal, contudo, é provavelmente explicável pelo fato do OEAz também induzir nessa mesma faixa de concentração, efeito próprio contraturante que se opõe e prevalece sobre o efeito relaxante.

5.3 Estudos relacionados

O OEAz apresentou significantes efeitos miorreaxante e antiespasmódico no músculo liso intestinal de rato e cobaio (BEZERRA 1994; BEZERRA & FONTELES, 1994; BEZERRA *et al.*, 2000a, b). O TERP possui atividades relaxante e espasmolítica sobre a musculatura lisa intestinal e efeito hipotensor que é cerca de 100 vezes mais potente em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Este efeito não aparece depender de reflexo autonômico e é sugerido decorrer principalmente dos efeitos cronotrópico e inotrópico negativos desta substância bem como de seu efeito miorreaxante sobre a musculatura lisa vascular (NASCIMENTO, 1998). O TERP (1 – 10 mg/Kg), aplicado por via intravenosa também induziu hipotensão em ratos com hipertensão mantida pelo tratamento com acetato de deoxicorticosterona-sal, provavelmente por efeitos relaxantes sobre o músculo liso vascular (LAHLOU *et al.*, 2002a).

Outros óleos essenciais de plantas aromáticas comuns no Nordeste do Brasil apresentam atividades farmacológicas em várias preparações biológicas relacionadas a tecidos excitáveis de mamíferos. O óleo essencial

de *Croton zehntneri* (OECz) possui propriedades farmacológicas sobre músculos esqueléticos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1995) e lisos (COELHO-DE-SOUZA *et al.*, 1998). O OECz é predominantemente miorelaxante e antiespasmódico, com relativa especificidade para íleo e traquéia, sendo mais potente em relaxar o músculo liso respiratório (COELHO-DE-SOUZA, 1997). O óleo essencial de *Croton nepetaefolius* é detentor de ação miorelaxante e antiespasmódica sobre os músculos lisos intestinal (MAGALHÃES, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998), respiratório (MAGALHÃES, 2002) e sobre o músculo liso vascular (LAHLOU *et al.*, 2000). O óleo essencial de *Mentha x villosa* apresentou efeitos em células musculares esqueléticas (FOGAÇA *et al.*, 1997) e efeitos miorelaxante e antiespasmódico em músculo liso intestinal (SOUSA *et al.*, 1997; SOUSA, 1999) e é eficaz em reduzir a pressão arterial (LAHLOU *et al.*, 2001).

5.4 Mecanismo de ação do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*

O OEAz bloqueia, com igual potência, contrações induzidas por ACh, PGF_{2α} e 5-HT, bem como contrações induzidas pela despolarização com altas concentrações de K⁺ (60 mM), pois as CI₅₀ para esses efeitos não apresentaram diferenças significativas. Isto sugere que ou o OEAz bloqueia a contração por mecanismo inespecífico em relação a receptores para neurotransmissores e autacóides, em uma etapa comum ao mecanismo de sinalização da contração de todos esses agentes ou que o OEAz atua através de vários mecanismos. É provável que esta última hipótese esteja correta, devido à diferença nos mecanismos de ação dos constituintes principais, TERP e CIN, como discutiremos a seguir, que provavelmente fornecerão diferentes contribuições ao mecanismo de ação do óleo. O OEAz também relaxou o tônus artificialmente aumentado pela presença dos agonistas

ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 5-HT e de solução despolarizante [K^+ (60 mM)] com IC_{50} que não diferiram, o que corrobora a hipótese de inespecificidade de atuação em relação a receptores farmacológicos de membrana sarcoplasmática.

O OEAz relaxa o músculo contraído e mantido despolarizado com alta concentração de K^+ (60 mM), situação em que os potenciais de ação nervosos estão inibidos (HILLE, 1984). Altas concentrações de K^+ despolarizam a membrana citoplasmática e inativam os canais de Na^+ responsáveis pelo potencial de ação nervoso (GRAFE *et al.*, 1980), bloqueando qualquer participação neuronal que envolva a transmissão sináptica e a liberação de neurotransmissores. Então, é razoável sugerir-se o não envolvimento do sistema nervoso no referido efeito antiespasmódico do OEAz, ou seja, esse efeito independe de mediação neuronal e, muito provavelmente, é miogênico.

O relaxamento de preparações pré-contraídas por 60 mM de K^+ , permite outras conclusões. Em presença de 60 mM de K^+ , é improvável que um efeito relaxante se deva a repolarização da membrana sarcoplasmática para valores de potencial transmembrana (E_m) próximos ao potencial de repouso. Isso porque com 60 mM de K^+ no meio extracelular o potencial de reversão do K^+ (E_k) é aproximadamente -20 mV e, devido à retificação retardada, a condutância da membrana ao K^+ é alta, sendo este íon o principal responsável pelo E_m , que se situa em aproximadamente -20 mV (GRAFE *et al.* 1980). Então, o OEAz, não relaxa o músculo liso *traquealis* através da abertura de canais de K^+ da membrana visto que nas condições em que o músculo mantém-se despolarizado, o E_k aproxima-se muito e se mantém junto do E_m . Nesta situação, um abridor de canais de K^+ não induziria relaxamento (QUAST, 1993). Quando um agente relaxa

contrações induzidas por 20 e 30 mM de K^+ , este fato sugere que o agente possui efeito antiespasmódico agindo como ativador de canais de K^+ , mas se o relaxamento envolve músculo pré-contraído por altas concentrações de $[K^+]_e$, igual ou superior a 60 mM, podemos sugerir que este efeito antiespasmódico é independente do E_m e da ativação de canais de K^+ (KNOT *et al.*, 1996). Por estas razões é pouco provável que o relaxamento do músculo traqueal, induzido pelo OEAz, se deva a ativação de canais de K^+ , promovendo repolarização da membrana celular.

Nossos dados mostram que o OEAz é mais eficaz do que a epinefrina (EPIN) para relaxar preparações de traquéia pré-contraídas por 60 mM de K^+ (Fig.15). O relaxamento máximo induzido por 100 μ M de epinefrina não ultrapassou 53% do valor de estado estacionário da contração potássica. Com a preparação mantida em presença dessa concentração maximal e dessensibilizante (100 μ M) de epinefrina, o OEAz induziu relaxamento adicional de 29%, tendo a redução total da contração atingido 82%. Assim, é pouco provável que o relaxamento induzido pelo óleo seja mediado por liberação de catecolaminas ou por estimulação de receptores adrenérgicos. A transmissão sináptica no aparelho respiratório pode também ser alterada e/ou modulada por mediadores designados conjuntamente "NANC" (RICHARDSON, 1979; GRUNDSTROM *et al.*, 1981; BARNES, 1986a, b; PENDRY, 1993; FAME *et al.*, 1994).

Para verificar a interferência de alguns sistemas importantes da fisiologia celular, foi investigado o efeito do OEAz em traquéia, na presença dos bloqueadores da síntese de óxido nítrico e de derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), L-NAME e indometacina, respectivamente. O OEAz bloqueia e reverte a contratura potássica (K^+ 60 mM). Este feito antiespasmódico não foi alterado pelo

antagonista competitivo da NO sintetase, L-NAME e pela indometacina. Em nenhum dos casos houve alteração significativa na amplitude do efeito relaxante. Isto sugere não haver participação dos principais mediadores destes sistemas no relaxamento do músculo liso traqueal pelo referido óleo. Magalhães, 1997 demonstrou que o efeito inibitório do OECn sobre o músculo liso intestinal não foi influenciado por substâncias que interferem na síntese de prostaglandinas e óxido nítrico.

OE4z, na presença de cafeína, relaxa a contração tônica estabelecida por 80 mM de K^+ . O referido óleo poderia agir sobre uma ação primária no retículo sarcoplasmático (RS), alterando por sua vez a $[Ca^{2+}]_i$. Várias drogas que interferem no armazenamento de Ca^{2+} pelo RS, também promovem alterações na $[Ca^{2+}]_i$ e, subsequentemente, na tensão de vários tipos de músculos lisos (WEISSBERG *et al.*, 1989; SEIDLER *et al.*, 1989; SHIMA & BLAUSTEIN, 1992). Células de músculo liso apresentam oscilações espontâneas da $[Ca^{2+}]_i$. Drogas como a cafeína e o 8-(N,N-dietilamino) octil 3,4,5-trimetoxibenzoato bloqueiam completamente essas oscilações na $[Ca^{2+}]_i$, por depletarem Ca^{2+} do RS (WEISSBERG *et al.*, 1989). No músculo intestinal, a rianodina se liga com alta afinidade ao receptor RYR-3 e modula a sensibilidade do canal de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do RS e, em concentrações de $\cong 100 \mu M$, clampeia o canal no estado aberto e depleta Ca^{2+} do RS (LATTANZIO *et al.*, 1987; KUEMMERLE, 1994). O ácido ciclopiazônico bloqueia a enzima $Ca^{2+}/ATPase$ do RS, bloqueando o transporte de Ca^{2+} para referida organela (SEIDLER *et al.*, 1989). Em tecido bronquial de suínos e bovinos, o relaxamento evocado pelo isoproterenol foi significativamente reduzido pelo ácido ciclopiazônico, um inibidor da bomba de Ca^{2+} do RS (JANSSEN *et al.*, 2003). Nos ensaios deste estudo, a presença de cafeína não alterou o relaxamento induzido pelo

OEAz no músculo despolarizado por 80 mM de K^+ , mantendo a potência e a eficácia desse efeito. A cafeína apesar de possuir várias ações em músculos, como bloqueio de fosfodiesterases e alteração da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} , uma de suas principais ações é no receptor da rianodina, modulando a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do RS (WEBER & HERTZ, 1968). O fato da cafeína não alterar os parâmetros dos efeitos relaxantes do OEAz, sobre a contratura potássica mostram que não há uma interação de efeitos em que a presença de um desses dois agentes pudesse amplificar ou inibir o efeito do outro. Está documentado que o OECz e constituintes principais, anetol e estragol, induzem liberação de Ca^{2+} do RS em músculo esquelético que é bloqueada por procaína (ALBUQUERQUE *et al.*, 1984; 1995). Oscilações contráteis, induzidas pelos referidos óleos e constituintes em músculo liso intestinal, foram bloqueadas por cafeína, sugerindo envolvimento desta organela celular (COELHO-DE-SOUZA, 1997).

O OEAz (1000 $\mu\text{g/mL}$), na presença de 5 mM de cafeína, inibiu contrações promovidas pela adição de Ca^{2+} em preparação de músculo liso traqueal despolarizado com 80 mM de K^+ ($\emptyset Ca^{2+}$ nominal). Nessa concentração, a cafeína inibe totalmente o acoplamento farmacomecânico (para ACh e 5-HT) preservando ainda, em grande proporção, o acoplamento eletromecânico. O OEAz, inibiu completamente a resposta contrátil ao Ca^{2+} e o aumento da concentração extracelular do referido íon, mesmo para 10 mM, não foi capaz de reverter este bloqueio totalmente. A adição de Ca^{2+} neste ensaio produz aumento de tensão através do influxo deste íon pelos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (BOLTON, 1979a). Para esse efeito contraturante do íon Ca^{2+} , o principal mecanismo de ação é o influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem,

abertos pela despolarização da membrana sarcoplasmática. A despolarização induzida pelo K^+ também pode promover, como mecanismos secundários: i) liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares através de canais iônicos no RS permeáveis ao Ca^{2+} , que são ativados pelo próprio Ca^{2+} (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}) que contribui para o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (SOMLYO & SOMLYO, 1994); ii) aumento dos níveis intracelulares de IP_3 (KHAC *et al.*, 1992) e iii) alteração da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (YANAGISAWA & OKADA, 1994; AUSINA *et al.*, 1996). Além desse mecanismo (eletromecânico) indutor de contração pela ativação de canal de íons Ca^{2+} voltagem-dependente, outros mecanismos (farmacomecânicos) dependem fundamentalmente dos canais iônicos da membrana do RS ativados pelo IP_3 , a partir da atuação de neurotransmissores ou autacóides, como ACh e histamina, e de outros fármacos, como cafeína, rianodina ou por ADP-ribose cíclica (SITSAPESAN *et al.*, 1994; SOMLYO & SOMLYO, 1994; SOMLYO *et al.*, 1999). A recarga do RS envolve primariamente a Ca^{2+} /ATPase do RS. Tem sido sugerida a existência de outra via de recarga desta organela no músculo liso respiratório (BOURREAU *et al.*, 1991, 1993; JANSSEN & SIMS, 1993a, b; QIAN & BOURREAU, 1999). Assim, o bloqueio do acoplamento eletromecânico pelo OEAz, a partir de uma condição em que o acoplamento farmacomecânico já estava totalmente bloqueado (presença de 5 mM de cafeína), mostra que o OEAz pode bloquear o primeiro tipo de acoplamento por mecanismo que independe do segundo tipo (farmacomecânico). Aqui, é oportuno mencionar que, para garantia de que Ca^{2+} fora depletado do RS, pela cafeína (5 mM) e que o acoplamento farmacomecânico estava bloqueado, antes do início da reposição do Ca^{2+} aplicamos 60 μ M de ACh à solução despolarizante do banho, onde

obtivemos pleno bloqueio da contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico. O bloqueio do acoplamento eletromecânico nas circunstâncias do protocolo relativo à reposição de Ca^{2+} , em presença de cafeína e altas $[\text{K}^+]_e$ (Fig. 16) portanto, sugere que o OEAz pode bloquear a contração por outra via além do bloqueio do mecanismo do IP_3 . Como o OEAz também bloqueou o acoplamento farmacomecânico em circunstâncias em que apenas este acoplamento estava mantido (bloqueio da contração induzida pela ACh em soluções com EGTA e sem adição de Ca^{2+}), como será discutido adiante, pode-se concluir que o bloqueio por ele promovido ao acoplamento farmacomecânico independe do eletromecânico. Tomados em conjunto, estes fatos então sugerem que ou o OEAz possui alguns constituintes que bloqueiam o acoplamento farmacomecânico e outros que bloqueiam o eletromecânico, ou ele bloqueia a contração em uma etapa da cascata do mecanismo da contração em etapa distal a ambos os acoplamentos, bloqueando-os simultaneamente.

O OEAz bloqueia com igual potência contrações induzidas por K^+ , ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 5-HT, com CI_{50} semelhantes, sugerindo mecanismos de ação comuns. As contrações induzidas por agonistas no músculo liso das vias aéreas são similar em muitos aspectos à contração dos músculos lisos vascular e intestinal. Primeiro, a excitação-contração é precedida pela despolarização da membrana, mediada principalmente pela ativação de correntes de Cl^- e de cátions não seletivos, bem como supressão das correntes de K^+ . Estudos de "patch clamp" documentam que as correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem são as principais e suficientes para promoverem contração (JANSSEN & SIMS, 1992, 1993a, b, 1994; JANSSEN, 1996). Segundo, mecanismos independentes de voltagem são primariamente responsáveis pela contração do músculo liso das vias aéreas.

O mais conhecido envolve a liberação de Ca^{2+} do RS. Agonistas colinérgicos, histamina, endotelina, leucotrienos e tromboxano A_2 ativam a fosfolipase C que gera os segundos mensageiros DAG e IP_3 (CHILVERS *et al.*, 1989; 1994). O IP_3 induz liberação de Ca^{2+} estocado no RS que por sua vez promove a contração do músculo liso (SOMLYO *et al.*, 1999). O efeito antiespasmódico do OEAz promovido pelo bloqueio total da contração dos agonistas ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 5-HT não é explicável por ações deflagradas na membrana sarcoplasmática por atuação em receptores específicos. Assim, os achados expostos sugerem que o OEAz esteja agindo através de mecanismos intracelulares que podem envolver desde o processo de transdução de sinais após a ativação do receptor até os eventos mecânico-contráteis propriamente ditos, incluindo modulação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$, redução da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} e/ou alterações da atividade de quinases e fosfatases.

Baseados nestes fatos, foi investigado o efeito do OEAz sobre as contrações de ACh que independem do influxo de Ca^{2+} extracelular e sobre contrações que ocorrem na presença de nifedipina. A contração induzida pela ACh no músculo liso traqueal é decorrente do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular através da liberação de estoques intracelulares e aumento do influxo a partir do meio externo (BOURREAU *et al.*, 1991). Quando a concentração de Ca^{2+} é baixa no meio extracelular, (solução ØCa^{2+} + EGTA), a resposta contrátil evocada pela aplicação de ACh é dependente da liberação de íon de estoques intracelulares (BOLTON, 1979a; BOURREAU *et al.*, 1991). A ACh na presença de bloqueadores de canais de Ca^{2+} como metoxiverapamil (D600) e nifedipina, em concentrações capazes de abolir as contrações promovidas por 60 mM de K^+ , é capaz de induzir contrações de amplitudes reduzidas.

O OEAz reduziu significativamente as contrações remanescentes de ACh na presença de NIF. O óleo impede que o músculo *traquealis* alcance os mesmos níveis de força e conseqüente encurtamento da fibra muscular, alcançados por este agonista na ausência do referido óleo. O bloqueio, pelo OEAz, do componente da contração induzida pela ACh resistente a NIF e independente do Ca^{2+} extracelular, sugere que o bloqueio dos canais de Ca^{2+} da membrana sarcoplasmática é uma hipótese improvável para explicar plenamente o efeito antiespasmódico do OEAz, ou seja, sugere que este efeito do OEAz independe do bloqueio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Para ratificar este argumento, foi testado o efeito deste óleo na presença de NIF, que na concentração usada neste protocolo, promoveu bloqueio total das contrações induzidas por 60 mM de K^+ . Assim, pode-se afirmar que neste ensaio (Fig. 18a) trabalhou-se em condições de total bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem da membrana citoplasmática. Portanto, sugerimos que o OEAz bloqueia o componente da contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico que supostamente independe do influxo de Ca^{2+} do meio extracelular através dos canais dependentes de voltagem.

O OEAz também bloqueou o remanescente da contração induzida por ACh em solução isenta de Ca^{2+} (solução sem adição de $\text{CaCl}_2 + \text{EGTA}$). Nesta solução a concentração de Ca^{2+} é reduzida para valores na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} M, invertendo o gradiente de potencial eletroquímico para este íon, que em presença de condições ideais de permeabilidade ao Ca^{2+} promoveria um influxo passivo deste íon, independente do tipo de transporte. O bloqueio de contrações induzidas por agentes como ACh ou éster de forbol, em meio isento de Ca^{2+} e com agente quelante deste íon (EGTA) sugere uma interferência com mecanismos intracelulares da contração como armazenamento de Ca^{2+} por organelas citoplasmáticas,

modulação de proteínas contráteis e sensibilidade destas proteínas ao Ca^{2+} (REMBOLD, 1996). Esta investigação em solução zero Ca^{2+} ratifica as conclusões obtidas do ensaio usando o remanescente da contração induzida por ACh em presença de nifedipina, sugerindo a hipótese de uma ação intracelular para o OEAz, no músculo liso *traquealis* de rato. Este efeito está em consonância com os resultados obtidos em músculo liso intestinal, onde os autores sugerem que os efeitos miorelaxante e antiespasmódico do OEAz em íleo de rato e cobaio sejam mediados por efeitos intracelulares (BEZERRA *et al.*, 2000a).

Todos os fatos acima, tomados conjuntamente (inclusive no que concerne ao acoplamento eletromecânico), sugerem, como postulado anteriormente, que, ou o OEAz possui um único mecanismo de bloqueio da contração em etapa da cascata do acoplamento excitação-contração e contração propriamente dita, que esteja além da liberação de Ca^{2+} pelo IP_3 e influxo de Ca^{2+} a partir do meio extra celular, ou múltiplos mecanismos de bloqueios, entre os quais estaria o mecanismo do IP_3 . Na segunda hipótese, ela pode advir de vários constituintes possuírem diferentes mecanismos de ação. Em suma, é admissível aventar a hipótese que o óleo essencial de *A. zerumbet* atue em sítios da cadeia de eventos intracelulares que promovem a contração. Admitindo-se a hipótese de atuação em etapa que evolvesse simultaneamente ambos os acoplamentos, este óleo pode estar atuando em etapa(s) importante(s) da cascata de eventos da contração do músculo liso como: i) ligação do íon Ca^{2+} á calmodulina, impedindo a ativação da cadeia leve de miosina; ii) formação do complexo Ca^{2+} /calmodulina/proteína quinase II alterando a fosforilação da cadeia leve de miosina e/ou iii) sensibilidade das proteínas contráteis ao íon Ca^{2+} .

Portanto, o OEAz por um mecanismo provavelmente miogênico, bloqueia o efeito contraturante de vários agonistas espasmogênicos

importantes como K^+ , ACh, $PGF_{2\alpha}$, 5-HT e relaxa o tônus artificialmente aumentado do músculo liso traqueal de rato *in vitro*, com uma amplitude máxima de relaxamento maior do que a induzida pela EPIN, um clássico agente antiespasmódico do músculo liso respiratório. Desde que o OEAz possui baixa toxicidade aguda ($DL_{50} > 2,5$ g/Kg) (PINHO, 2002) e capacidade de bloquear contrações de grande amplitude para a capacidade do músculo liso traqueal, podemos apontar este óleo como um agente farmacológico relevante, potencialmente útil do ponto de vista terapêutico.

Os dados aqui apresentados, concernentes a mecanismo de ação, estão em consonância com os mecanismos de ação propostos para outros óleos essenciais de plantas aromáticas do Nordeste brasileiro. O OECz apresentou efeitos miiorrelaxante e antiespasmódico, com relativa especificidade para íleo e traquéia, agindo em sítios intracelulares, provavelmente envolvendo os mecanismos de armazenamento e liberação de Ca^{2+} do RS (COELHO-DE-SOUZA, 1997). O OECn relaxa o músculo liso intestinal. Este efeito não é dependente da atividade nervosa intramural e não é influenciado por substâncias que interferem na síntese de PGs e NO e ativação de adrenocetores intestinais. Foi sugerido ser pouco provável que o OECn atue pelo bloqueio dos canais de Ca^{2+} da membrana, dependentes de voltagem. Foi demonstrado estarem envolvidos eventos intracelulares na redução da atividade contrátil promovida pelo OECn, principalmente eventos celulares ligados à relação entre a $[Ca^{2+}]_i$ e a produção de força (MAGALHÃES, 1997; MAGALHÃES *et al.*, 1998). O OEMv exerceu efeitos relaxantes na musculatura lisa intestinal que independem do bloqueio na transmissão do impulso nervoso, de receptores nicotínicos ou muscarínicos, de alterações do E_m e do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, embora não possam ser excluídos possíveis efeitos

sobre canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (SOUSA *et al.*, 1997; SOUSA, 1999).

5.5 Mecanismos de ação do 4-terpineol e 1,8-cineol

O TERP não apresentou efeito intrínseco sobre o tônus basal do músculo liso traqueal de rato, nas concentrações e condições experimentais do referido estudo. Já o CIN apresentou pequeno efeito contraturante, que foi máximo e significativo à concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$. As implicações deste efeito para a ação do OEAz já foram discutidas anteriormente. É importante ressaltar que o referido efeito contraturante ocorreu dentro da mesma faixa de valores de concentração em que ocorre seu efeito bloqueador sobre a contração induzida por K^+ , o que torna improvável que seu efeito antiespasmódico seja devido a bloqueio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.

O TERP apresentou efeito relaxante sobre todas as condições de espasmo, as quais o músculo foi submetido, independente do agonista indutor do encurtamento da fibra muscular. O TERP bloqueia as contrações induzidas por ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$, 5-HT e altas concentrações de K^+ . Neste estudo quatro características importantes dos efeitos deste composto foram notificadas: i) enquanto bloqueia a resposta de todos os agentes contraturantes usados, não altera significativamente o tônus basal do músculo, tratando-se possivelmente de um tipo de agente antiespasmódico que seja inócuo sobre o tônus fisiológico do músculo liso *traquealis* e nessa propriedade, o TERP se diferencia do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*; ii) maior potência para deprimir a contratura potássica do que para as contrações induzidas por neurotransmissores e autacóides, sugerindo que possui relativa especificidade para o bloqueio do acoplamento

eletromecânico, indicando possível bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (e nessa propriedade, o TERP também se diferencia do óleo essencial de *Alpinia zerumbet*); **iii**) potência similar para bloqueio das contrações promovidas pelos neurotransmissores e autacóides aqui utilizados, sugerindo um mecanismo inespecífico em termos de receptores para estes agonistas, atuando por um segundo mecanismo de ação (além da hipótese do bloqueio do acoplamento excitação-contração por bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem); **iv**) bloqueio da contração da ACh em presença de solução zero Ca^{2+} ou nifedipina, reforçando a sugestão de um segundo mecanismo de ação.

O TERP mostrou maior potência em inibir contrações evocadas por 60 mM de K^+ bem como relaxar preparações pré-contraídas pela exposição a esta concentração de K^+ na solução nutritiva. As CI_{50} para estes efeitos foram significativamente diferentes das CI_{50} para bloquear contrações promovidas por neurotransmissores e autacóides, indicando relativa especificidade para o acoplamento eletromecânico. Em músculos, o estímulo que promove contração atua através de mecanismos denominados acoplamento excitação-contração e contração propriamente dita. Em músculos lisos, ocorrem dois tipos de acoplamento excitação-contração: o eletromecânico e o farmacomecânico. O acoplamento eletromecânico foi descrito pela primeira vez a cerca de um século atrás a partir de estudos realizados com músculo esquelético de rã (SOMLYO & SOMLYO, 1968; BÜLBRING & TOMITA, 1987; REMBOLD, 1996). O acoplamento eletromecânico é promovido pela despolarização da membrana sarcoplasmática. Esta despolarização aumenta a condutância de canais iônicos da membrana sarcoplasmática, especialmente de canais de Ca^{2+} tipo L, que promovem influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, conseqüentemente aumentando a concentração deste íon no citoplasma. O

principal mecanismo de ação do efeito contraturante de altas $[K^+]_e$ é o influxo de íons Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, abertos pela despolarização da membrana citoplasmática (REMBOLD, 1996). Apesar destes dados mostrarem que o TERP possui relativa especificidade para o bloqueio do acoplamento eletromecânico e indicarem possível ação sobre canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, eles não sugerem se sua atuação nesses canais seria do tipo direta ou indireta.

Em relação ao CIN, o presente estudo demonstrou que ele apresenta efeito relaxante sobre as contrações dos agentes espasmógenos ACh, $PGF_{2\alpha}$, e altas concentrações de K^+ . Sobre a contração induzida pela 5-HT, os dados não foram conclusivos no que concerne a demonstrar o efeito antiespasmódico, pois as concentrações de CIN utilizadas (600 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) não foram efetivas para indução de bloqueio, contudo, não foram testadas concentrações superiores. Notifique-se que entre 30 e 600 $\mu\text{g/mL}$, o CIN potencializou a contração induzida por ACh, e assim, o efeito deste constituinte do óleo foi bifásico em relação à variável independente concentração. Neste estudo várias características importantes dos efeitos do CIN foram notificadas, algumas das quais diferem daquelas do OEAz e/ou do TERP: **i)** enquanto bloqueia a resposta aos agentes contraturantes ACh, $PGF_{2\alpha}$ e altas concentrações de K^+ , não reduz significativamente o tônus basal do músculo, aumentando-o a concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$, o que já foi discutido anteriormente; **ii)** apresenta potências similares para deprimir as contrações induzidas por K^+ e $PGF_{2\alpha}$, e, em relação a estas, somente na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, deprimiu a contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico. Nesse fato o CIN se diferencia do OEAz, que promoveu todos os bloqueios com igual potência, e do TERP, que foi mais potente apenas para bloquear a contração potássica; **iii)** amplificação do

acoplamento eletromecânico em situações em que o acoplamento farmacomecânico está totalmente bloqueado (5 mM de cafeína).

Em relação ao efeito do TERP e CIN em preparações em presença de 60 mM de K^+ é pouco provável que um efeito relaxante nessas circunstâncias se deva a uma repolarização da membrana sarcoplasmática, pois com esta concentração de K^+ no meio extracelular, a condutância da membrana ao K^+ é alta, pela retificação retardada, e $E_m \cong E_k$, pois K^+ é o principal responsável pelo E_m (GRAFE, 1980). Ao mesmo tempo, TERP e CIN provavelmente não relaxam o músculo liso traqueal através da abertura de canais de K^+ da membrana, pela mesma razão exposta acima (o músculo mantém-se despolarizado com $E_m \cong E_k$, ou seja, não há mais espaço para hiperpolarização da membrana por aumento da g_k (QUAST, 1993).

Os ensaios biológicos com altas $[K^+]_e$ permitem levar a outras conclusões a respeito do mecanismo de ação do TERP e CIN, além daquelas acima referidas. Estes compostos relaxam o músculo contraído e mantido despolarizado com altas concentrações de K^+ (60 mM), situação onde os potenciais de ação nervosos e a transmissão sináptica também estão bloqueados (HILLE, 1984). Assim, é pouco provável que o bloqueio das contrações dependa de participação neuronal e, *a fortiori*, os dados sugerem que o efeito antiespasmódico do TERP é miogênico.

Em relação ao interessante padrão de efeito do CIN sobre as contrações induzidas por ACh, $PGF_{2\alpha}$, 5-HT e altas concentrações de K^+ , não temos explicação para o fato da potência de atuação desse constituinte do OEAz ser similar, no que concerne ao bloqueio das contrações induzidas por $PGF_{2\alpha}$ e altas concentrações de K^+ . Já em relação ao fato do CIN não haver bloqueado a 5-HT, observando-se a curva concentração-resposta para

o bloqueio da contração submaximal de ACh por concentrações crescentes de CIN (Fig. 41), vê-se que na faixa de 100 a 600 $\mu\text{g/mL}$ desse constituinte, ele amplificou a resposta contrátil a ACh e apenas com 1000 $\mu\text{g/mL}$ promoveu bloqueio. À luz desse gráfico é razoável questionar-se se relação semelhante não ocorreria com a interação entre CIN e 5-HT, com a diferença apenas da curva do CIN estar deslocada para a direita, ou seja, necessitaríamos de concentrações maiores desse constituinte para detectar seu efeito depressor sobre a contração promovida pelo referido autacóide. Assim, em relação ao fato do CIN não haver bloqueado a 5-HT, resta elucidar se esse fato não é meramente uma consequência de não se haver testado concentrações superiores a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Posto que a ativação de receptores adrenérgicos do músculo liso *traquealis* pode ser aventada como uma possível causa do relaxamento induzido pelo TERP e CIN, investigamos o efeito antiespasmódico destes compostos sobreposto ao efeito da epinefrina (EPIN). O relaxamento máximo induzido pela aplicação de concentrações crescentes de EPIN (até 100 μM) não ultrapassou 46% do valor estacionário dessa contração. Este valor correspondeu à resposta máxima do neurotransmissor adrenérgico, pois o relaxamento adicional correspondente ao aumento da concentração de EPIN de 10 para 100 μM foi mínimo e não significativo. Assim, quando da adição de EOAz à preparação mantida em presença de 100 μM de EPIN os receptores adrenérgicos já estavam supostamente saturados e dessensibilizados, impedindo uma ativação adrenérgica adicional. Mantendo a preparação na presença de EPIN, a adição de 600 $\mu\text{g/mL}$ de TERP relaxou mais 50% e a preparação sofreu um relaxamento total de 96% da contração controle (Fig. 28). Fato totalmente similar ocorreu com CIN (Fig. 39). É pouco provável, portanto, que os relaxamentos de

preparações pré-contraídas por 60 mM de K^+ e mantidas em presença de 100 μ M de EPIN, induzidos por TERP e CIN, sejam mediados por estimulação de receptores adrenérgicos. Assim, podemos concluir que o efeito antiespasmódico induzido por TERP e CIN independe da ativação de receptores adrenérgicos.

Foi investigada a possível participação do NO e PGs sobre o efeito antiespasmódico do TERP. Para verificar envolvimento destas vias, a preparação foi previamente incubada com L-NAME, bloqueador da óxido nítrico sintetase (MOORE *et al.*, 1989) ou indometacina, bloqueador da cicloxigenase (GOODMAN & GILMAN, 1996). Tanto o L-NAME como a indometacina, quando aplicados à preparação contraída devido a despolarização por 60 mM de K^+ não foram capazes de alterar o efeito induzido pelo TERP. Em nenhum dos estudos houve alteração significativa da amplitude do relaxamento. Estes dados sugerem não haver participação dos principais mediadores destes sistemas celulares no efeito antiespasmódico do músculo liso *traquealis*, induzido pelo .

O TERP bloqueia com igual potência contrações induzidas por ACh, $PGF_{2\alpha}$, 5-HT (as CI_{50} para estes efeitos não apresentaram diferenças significativas). Estes dados sugerem a hipótese de que este composto estaria atuando por um segundo mecanismo de ação além do possível bloqueio do acoplamento eletromecânico. Investigou-se a possibilidade do TERP atuar também através de mecanismos que independem do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, portanto mecanismo provavelmente intracelular. Assim, investigaram-se os efeitos do TERP no componente contrátil da ACh que independe do influxo de Ca^{2+} extracelular (BOURREAU, 1991) e também sobre o componente contrátil da ACh que não é bloqueado pela nifedipina (que independe do influxo de Ca^{2+}

extracelular através do canal de Ca^{2+} dependente de voltagem). A contração promovida pelo neurotransmissor colinérgico em músculo liso é decorrente: i) do aumento de Ca^{2+} a partir do meio extracelular (BOLTON, 1979a, b) e ii) da liberação de estoques intracelulares de Ca^{2+} (BOURREAU *et al.*, 1991). Quando a concentração de Ca^{2+} no meio extracelular é baixa, o efeito contrátil observado da ACh em músculo liso traqueal é proveniente da liberação do íon de estoques intracelulares (BOURREAU *et al.* 1991). Por outro lado, na presença de concentrações de NIF capazes de abolir as contrações promovidas por $[\text{K}^+]_e$, resta um componente contrátil mediado pela presença do neurotransmissor na solução do banho nas referidas condições experimentais. Bloqueadores de canais de Ca^{2+} deprimem a contração induzida por K^+ , onde a participação dos canais dependentes de voltagem é significativa. No entanto, o componente tônico da contração evocada por ACh é insensível a estes elementos pela maior influência de canais operados por receptores (BOLTON, 1979). Em ambos os casos ocorreram significativo bloqueio, induzido pelo TERP, da amplitude das contrações colinérgicas. É admissível aventar a hipótese que, embora o TERP seja mais potente em bloquear o acoplamento eletromecânico, independente da fonte de Ca^{2+} , seja intra ou extracelular, o esse composto impede que o músculo alcance os mesmos níveis de força alcançados na ausência deste, ficando assim sugerida uma importante ação intracelular deste constituinte do óleo de *A. zerumbet*.

Em relação ao CIN, no que concerne a atuação através de mecanismos que dependem do influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular, a maior potência de atuação no acoplamento eletromecânico (bloqueio das contrações induzidas por K^+), poderia sugerir que o bloqueio de canais de Ca^{2+} voltagem dependente é seu mecanismo de ação. Esta hipótese é

contrária com a indução de aumento do tônus basal na mesma faixa de concentração. É plausível, então, aventar-se a hipótese de seu mecanismo ser principalmente a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, de características similares às daquelas da cafeína (atuação em receptores rianodínicos). É coerente com esta hipótese: i) a indução de contração de pequena amplitude em concentrações que já bloqueiam o acoplamento eletromecânico (Fig. 34), ii) o sinergismo entre os efeitos inibitórios da cafeína e do CIN (Fig. 38) e iii) a reversão do bloqueio eletromecânico pelo aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (Fig. 40). Há contudo uma grande diferença entre o mecanismo de atuação da cafeína e do CIN. A cafeína apresenta efeito bloqueador mais potente sobre o acoplamento farmacomecânico (contração pela ACh) em relação ao eletromecânico e o oposto ocorre com o CIN. Assim, é provável que essas substâncias atuem através de mecanismos diferentes que têm alguns resultados comuns. É razoável sugerir-se que o mecanismo de ação do CIN envolve de alguma forma o aumento da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares e esta hipótese é reforçada pela grande amplificação da amplitude das contrações induzidas por ACh em faixa de concentração desse constituinte em que ele bloqueia o acoplamento eletromecânico (Fig. 41).

Assim como o óleo total, seus componentes principais também são capazes de induzir efeito antiespasmódico sobre o músculo liso traqueal *in vitro*, embora não seja possível relacionar diretamente a estes componentes uma maior participação no efeito do óleo total, em detrimento do percentual de participação na composição do OEAz (TER 17,83% e CIN 17,95%). É mais provável supor que ocorra uma interação destes constituintes entre si e com outros componentes do óleo, corroborando para o efeito antiespasmódico do OEAz no modelo experimental estudado. Normalmente, os óleos essenciais são usados *in natura*, pois suas

propriedades organolépticas dependem da associação dos vários componentes, que formam o “bouquet” de cada óleo em particular (CRAVEIRO & CALDAS, 1993).

Os dados aqui apresentados, concernentes a mecanismo de ação do TERP, estão em consonância com os mecanismos de ação propostos para este constituinte em outros tipos de músculos lisos. O TERP possui atividades relaxante e espasmolítica da musculatura lisa intestinal de natureza inespecífica que é mediada parcialmente por um efeito intracelular (NASCIMENTO, 1998). Este composto é detentor de efeito hipotensor que é cerca de 100 vezes mais potente em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), este efeito não parece depender de um reflexo autonômico e é sugerido decorrer principalmente dos efeitos cronotrópico e inotrópico negativos desta substância bem como de seu efeito miorrelaxante sobre a musculatura lisa vascular (NASCIMENTO, 1998). O TERP (1 – 10 mg/Kg) aplicado por via intravenosa também induziu hipotensão em ratos com hipertensão mantida pelo tratamento com acetato de deoxicorticosterona-sal, provavelmente por efeitos relaxantes sobre o músculo liso vascular. Lahlou *et al.*, 2002a, 2003) sugerem que o efeito hipotensor do OEAz neste modelo experimental, seja atribuído parcialmente as ações do TERP

Outros constituintes químicos de óleos essenciais de plantas aromáticas possuem efeitos farmacológicos em vários tipos de músculos lisos de mamíferos. O eugenol é um importante constituinte químico do óleo essencial de diversas plantas aromáticas e detentor de várias ações biológicas em músculos lisos. Este composto apresenta algumas semelhanças com o TERP, em termos de efeito e mecanismo de ação. O eugenol induz relaxamento em íleo de rato por uma ação direta no músculo, via mecanismo independente do E_m e influxo de Ca^{2+} extracelular (LEAL-

CARDOSO *et al.*, 2002). O eugenol também possui efeito depressor sobre a contratilidade da musculatura lisa vascular, este efeito é atribuído a inibição da sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+} e bloqueio dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (NISHIJIMA *et al.*, 1999). O óxido de piperitenona, componente principal do óleo essencial de *Mentha x villosa*, possui mecanismo de ação em músculo liso intestinal semelhante em alguns aspectos ao mecanismo de ação do TERP no músculo liso respiratório. Este composto exerce efeito miorreaxante que independe do E_m e influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular e bloqueia com igual potência contrações induzidas por ACh, HA e K^+ , sugerindo que este bloqueio é independente em termos de receptores para neurotransmissores e autacóides (SOUSA, 1999). O TERP mostrou maior potência em deprimir contrações induzidas por $[\text{K}^+]_e$ no músculo liso traqueal, sugerindo relativa especificidade sobre o bloqueio eletromecânico. Estudos sobre o mecanismo de ação do estragol e anetol, em músculos lisos intestinal e traqueal, sugerem que os referidos dependem de ações em sítios intracelulares, provavelmente envolvendo mecanismos de armazenamento e liberação de Ca^{2+} do RS (COELHO-DE-SOUZA, 1997).

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (Pers) B. L. Burt. et R. M. OEAz) e seus principais constituintes químicos, 4-terpineol (TERP) e 1,8-cineol (CIN), possuem efeito antiespasmódico em músculo liso *traquealis* do rato *in vitro*.

O OEAz, com potência similar, bloqueou contrações induzidas por ACh, PGF_{2α} e 5-HT, bem como contrações induzidas pela despolarização com altas concentrações de K⁺ (60 mM) e relaxou contrações previamente estabelecidas por estes agonistas, sugerindo que o OEAz bloqueia a contração por mecanismo miogênico e inespecífico em relação a receptores para neurotransmissores e autacóides.

O OEAz bloqueou as contrações induzidas por ACh em presença de nifedipina ou em preparações com zero Ca²⁺, o que mostra que seu efeito antiespasmódico independe de alterações do fluxo transmembrana citoplasmática de Ca²⁺ e sugerindo que seu sítio de ação seja em uma etapa comum ao mecanismo de sinalização da contração de todos esses agonistas, ou que o OEAz atua através de vários mecanismos.

O efeito do OEAz provavelmente independe da participação do NO e da síntese de derivados do ácido araquidônico e depende parcialmente da atuação em receptores adrenérgicos.

O TERP induziu efeito antiespasmódico sobre o tônus artificialmente aumentado por altas [K⁺]_e e inibiu contrações induzidas por 60 mM de K⁺, ACh, PGF_{2α} e 5-HT. Esse constituinte do óleo de *A. zerumbet* foi mais potente em inibir as contrações potássicas, apontando relativa especificidade sobre o acoplamento eletromecânico.

O TERP bloqueou as contrações induzidas por ACh em presença de nifedipina ou em preparações com zero Ca^{2+} , o que mostra que ele pode exercer efeito antiespasmódico que independe de alterações do fluxo transmembrana citoplasmática de Ca^{2+} e sugerindo que sua atuação pode ocorrer em uma etapa comum ao mecanismo de sinalização da contração dos referidos agonistas.

O efeito do TERP provavelmente independe da participação do NO e da atuação em receptores adrenérgicos.

O CIN apresentou diferenças conspícuas de atuação, em relação ao OEAz e ao TERP, sobre as contrações promovidas por ACh, $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 5-HT e K^+ (60 mM). O CIN mostrou igual potência em bloquear contrações promovidas por 60 mM de K^+ e $\text{PGF}_{2\alpha}$. Sobre a contração induzida pela ACh teve efeito bifásico no que concerne a dependência de concentração, tendo-lhe potencializado no intervalo 30–700 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e deprimido à concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sobre a contração mantida pela 5-HT, o CIN não exerceu efeito.

A presença de 5 mM de cafeína conferiu ao CIN efeito amplificador das contrações promovidas por Ca^{2+} , o que sugere que esse constituinte do óleo de *Alpinia zerumbet* não bloqueia etapas especificamente conectadas ao acoplamento eletromecânico, como ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMAN, M. J. & CLAPHAM, D. E. Ion channels basic science and clinical disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 336, p. 1575-1586, 1997.
- ADAMS, R. P: Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. **Academic. Press.**, London 1989.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy, allured Publishing corporation, carol stream, Illinois, USA., 1995.
- ADELSTEIN, R. S. & EISENBERG, E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. **Adv. Cyclic. Res.** v. 14, p. 361-373. 1980.
- ADELSTEIN, R. S.; PATO, M. D.; CONTI, M. A. The role of phosphorylation in regulating contractile proteins. **Ann. Ver. Biochem.**, v. 49, p. 921-956. 1981.
- AGOPYAN, N.; LI, L.; YU, S.; SIMON, S. A. Negatively charged 2- and 10-microm particles activate vanilloid receptors, increase cAMP, and induce cytokine release. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 15, n. 186, p. 63-76, 2003.
- AHMED, F.; FOSTER, R. W.; SMALL, R. C; WESTON, A. H. Some features of the spasmogenic actions of acetylcholine and histamine in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac.** v. 83, p. 227-233, 1984.
- AHMED, F.; FOSTER, R. W.; SMALL, R. C. Some effects of nifedipine in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac.** v. 84, p. 861-869, 1985.
- AKBARALI, H. I. & GILES, W. R. Ca^{2+} and Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in rabbit oesophageal smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 460, p. 117-133, 1993.
- ALBUQUERQUE, A. A. C.; XAVIER-NETO, J.; DINIZ-FILHO, J.; VIANA, G. B.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, estragole, and anethole on nerve and skeletal muscle. **Revista da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.** v. 24, p 19-27, 1984.

ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON, A. L. & LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri* and of anethole and estragole on skeletal muscles. **J. Ethnopharmacol.**, v.49, p. 41-49. 1995.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectrs library search of volatiles. **J. Nat. Prod.**, n. 47, p. 890-892, 1984.

ALLEN, S. L.; BEECH, D. J.; FOSTER, R. W.; MORGAN, G. P.; SMALL, R. C. Electrophysiological and other aspects of the relaxant action of isoprenaline in guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmac.** v. 86, p. 843-854, 1985.

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

ALTON, E. W. F. W.; KINGSLEIGH-SMITH, D. J.; MUNKONGE, F. M. *et al.* Asthma prophylaxis agents alter the function of an airway epithelial chloride channel. **Am. J. Cell. Mol. Biol.**, 14, 380-387, 1996.

ANDREA, J. E. & WALSH, M. P. Protein kinase C of smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, p. 585-595, 1992.

ARAUJO, E. C.; SILVEIRA E. R.; LIMA, M. A.; NETO, M. A.; DE ANDRADE I. L.; LIMA, M. A.; SANTIAGO G. M.; MESQUITA, A. L. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 13, p. 3760-3762, 2003.

ASH, A. S. F. & SCHILD, H. O. Receptors mediating some actions of histamine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 27, p.427-439, 1966.

AUSINA, P.; SAVINEAU, J.; PINTO, F.; MARTIN, J.; CADENAS, L. Ca^{2+} -independent contraction induced by hyperosmolar K^{+} -rich solutions in rat uterus. **Eur. J. Pharmacol.** v. 312, p. 309-318, 1996.

AYDIN, S.; DEMIR, T.; OZTURK, Y.; BASER, K. H. Analgesic activity of *Nepeta italica* L. **Phytother. Res.**, v. 13, n. 1, p. 20-23, 1999.

BANNENBERG, G.; ATZORI, L.; XUE, J.; AUBERSON, S.; KIMLAND, M.; RYRFELDT, A.; LUNDBERG, J. M.; MOLDEUS, P. Sulfur dioxide and sodium metabisulfite induce bronchoconstriction in the isolated perfused and ventilated guinea pig lung via stimulation of capsaicin-sensitive sensory nerves. **Respiration.**, v. 61, n. 3, p. 130-137, 1994.

BAREL, S.; SEGAL, R.; YASSHPHE, J. The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 33, p. 187-191, 1991.

BARNES, P. J. Neural control of human airways in health and disease. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 134, n. 6, p. 1289-1314, 1986a.

BARNES, P. J. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 83, p. 1013-1026, 1986b.

BARNES, P. J. Cholinergic control of airway smooth muscle. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 134, p. S42-S45, 1987.

BARNES, P. J. Neuropeptides in human airway smooth muscle. **Pharmacol. Ther.**, v. 36, p. 119-129, 1988.

BARNES, P. J. Airways neuropeptides and asthma. In; VANE, J. R.; HIGGS, G. A.; MARISCO, S. A.; NISTICO, G. **Asthma: basic mechanisms and therapeutic perspectives**. Roma: Pythagora, cap. 7, p. 127-139. 1989.

BARNES, P. J. New concepts in the pathogenesis of bronchial hyperresponsiveness and asthma. **J. Allergy. Clin. Immunol.** v. 83, p. 1013-1026, 1989.

BARNES, P. J. New drugs for asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 5, p. 112-1136, 1992.

BARONE, M.; AZZARONE, A.; ANGELINE, A.; ZAMPARELLA, M.; DELLÁQUILA, P.; FRANCAVILLA, A. Effect of epomediolon taurocholate uptake in hepatocytes isolated from normal rats or rats with ethinylestradiol-induced cholestasis. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 72, p. 296-299, 1983.

BARRON, J. T.; BARANY, M.; BARANY, L. Phosphorylation of the 20.000- dalton light chain of myosin of intact arterial smooth muscle in rest and in contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 4954-4956, 1979.

BARTHOLINUS, Y. De pulmonum substantia et motu diatriidle. Accedunt marcelli malpighii de pulmonibus observatione anatomicae. Hafniae (Copenhagen), H. Godiai, p. 38, 1663.

BATLOUNI, M & RAMIRES, J. A. F. I mportância do endotélio na doença arterial coronária e na aterogênese. **Arq. Brás. Cardiol.** v. 62, p. 255-270, 1994.

BAUER, V., REKALOV, V. V., JURÁNEK, I *et al.* Effect of illuminated nifedipine, a potent antioxidant, on intestinal and vascular smmoth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 871-874, 1995.

BELVISE, M. G.; MIURA, M.; STRETTON, D.; BARNES, P. J. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea pig tracheal. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 231, p. 97-102, 1993.

BERNE & LEVY. **Physiology**. Mosby, 1998.

BERRIDGE, M. J. inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, 315-352, 1993.

BERRIDGE, M. J. The AM and FM of calcium signalling. **Nature**, v. 386, 759-760, 1997.

BEZERRA, M.A. C. *Alpinia speciosa* Schum: estudo das frações fixas e do óleo essencial. 1994. 150f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BEZERRA, M. A. C. & FONTELES, M. C. Novas observações sobre o óleo essencial de *Alpinia speciosa* Schum. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., **Resumos...**, 1994.

BEZERRA, M. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N. & FONTELES, M. C. Myorelaxante and antispasmodic effects of the essentia oil *Alpinia speciosa* on rat ileum. **Phyther. Res.**, v. 14, p. 549-551, 2000a.

BEZERRA, M. A. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; FONTELES, M. C.; LEAL-CARDOSO, J. H. Efeito do óleo essencial de *Alpinia speciosa* e de seu principal constituinte químico, 4-terpineol, na pressão arterial de rato normotenso. **Revista da Sociedade Cearense de Cardiologia** v. 1, n. 1, p. 11-15, 2000b.

BEZERRA, M A. C.; FONTELES, M. C.; MORAIS, S. M. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Efeito do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* sobre a

contração induzida pelo neurotransmissor colinérgico em traquéia de rato. **Ciência e tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 13-15, 2001.

BOLTON, T. B. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. **British Medical Bulletin.**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1979a.

BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 59, n. 3, p. 606-717, 1979b.

BOURREAU, J. P.; ABELA, A. P.; KWAN, C. Y.; DANIEL, E. E. Acetylcholine Ca^{2+} store refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 30, n. 261, p. C479-C505, 1991.

BOURREAU, J. P.; KWAN, C. Y.; DANIEL, E. E. Distinct pathways to refill ACh-sensitive internal Ca^{2+} store in canine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, n. 265, p. C28-C35, 1993.

BOUSHEY, A. H.; HOLTZMAN, J. M.; SHELLER, J. R. & NADEL, J. A. Bronchial hyperreactivity. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v.121, p. 389-412, 1980.

BRADLEY, P. B.; ENGEL, G.; FENIUK, W.; FOZARD J. R.; HUMPHREY, P. P. A; MIDDLEMISS, D. N.; MYLECHRANE, E. J.; RICHARDSON, B. P.; SAXENA, P. R. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. **Neuropharmacol.**, v. 25, p. 563-576, 1986.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste especialmente do Ceará**. 2. ed. Imprensa Oficial do Ceará, 1960.

BRAGA, R. Colônia In: **Plantas do nordeste especialmente do Ceará**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1976, p.205.

BRASIL & SILVA, G. A.; SIQUEIRA, N. C. S.; BAUER, S.; SANT'ANA, M. S. O óleo essencial de *Alpinia speciosa* (Wendl) K. Schum do Rio Grande do Sul. **Rev. Centro Ciênc. Bioméd.**, v. 5, p. 51-54, 1977.

BRUSCHI, G.; BRUSCHI, M. E.; REGOLISTI, G.; BORGHETTI, A. Cytosolic Ca^{2+} -force relationship studied with fura-2 during stimulation of rat aortic smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 254, p. 840-854, 1988.

BURCK, S. & BURKES, T. F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. **Pharmacol.**, v. 38, p. 179-226, 1986.

- BÜLBRING, E. & TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 49-96, 1987.
- BUTLER, G. B.; ADLER, K. B.; EVANS, J. N.; MORGAN, D. W.; SZAREK J. L. Modulation of rabbit airway smooth responsiveness by respiratory epithelium: involvement of inhibitory metabolic arachidonic acid. **Am. Ver. Respir. Dis.**, v. 135, p. 1099-1104, 1987.
- CABEZAS, G. A.; GRAF, P. D.; NADEL, J. A. Sympathetic versus parasympathetic nervous regulation of airways in dogs. **J. Appl. Physiol.** v. 31, p.651, 1971.
- CAUFIELD M. P. & BIRDSALL, N. J. M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n. 2, p. 279-290, 1998.
- CAPRON, M.; CAPRON, A.; DRESSAINT, J. P.; TORPIER, G.; JOHANSSON, S. G. O.; PRIN, L. For receptors for IgE on human and rat eosinophils. **J. Immunol.**, v. 126, p. 2087-2092, 1981.
- CARR, M. J.; KOLLARIK, M.; MEEKER, S. N.; UNIDEM, B. J. A role for TRPV1 in bradykinin-induced excitation of vagal airway afferent nerve terminals. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 304, n. 3, p. 1275-1279, 2002.
- CARSON, C. F. & RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the oil essential of *Malaleuca alternifolia*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 78, p. 264-269, 1995.
- CASTILLO, J. C.; DE BEER, E. J. The tracheal chain. A preparation for the study of antispasmodics with particular reference to broncodilator drugs. **J. Pharmacol.** v. 90, p.104-109, 1947, apud HULSMANN, A. R. &
- JONGSTE. S. C. Studies of human airways in vitro: a methodology. **J. Pharmacol. Toxicol. methods.**, v. 30, n. 3, p. 117-132, 1993.
- CHEN, S.; INOUE, R.; ITO, Y. Pharmacological characterization of muscarinic receptor-activated cation channels in guinea-pig ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, n. 3, p. 793-801, 1993.
- CHILVRES, E. R.; CHALLISS, R. A.; BARNES, P. J.; NAHORSHI, S. R. Mass changes of inositol(1,4,5)triphosphate in trachealis muscle following agonist stimulation. **Eur. Pharmacol.**, v. 164, p. 587-590, 1989.

CHILVRES, E. R.; BATTY, I. H.; BARNES, P. J.; NAHORSHI, S. R. Formation of inositol polyphosphates in airway smooth muscle after muscarinic receptor stimulation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 252, p. 786-791, 1990.

CHILVERS, E. R.; LYNCH, B. J.; CHALLISS, R. A. Phosphoinositide metabolism in airway smooth muscle. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 221-245, 1994.

CHUNG, K. F. Role of inflammation in the hyperreactivity of the airways in asthma. **Thorax**, v. 41, p. 557-662, 1986.

CHUNG, K. F.; ROGERS, D. F.; BARNES, P. J.; EVANS, T. W. The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 3, p. 329-337, 1990.

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

COCKROFT, D. W. & MURDOCK, K. Y. Comparative effects of inhaled salbutamol, sodium cromoglycate and beclomethasone dipropionate on allergen-induced early asthmatic responses, late asthmatic responses and increased bronchial responsiveness to histamine. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 79, p. 734-740, 1987.

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.**, v.11, 299-304, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A. N. **Estudo dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis do músculo liso.** Tese (Doutorado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências de Saúde, Universidade Federal do Ceara, 1997.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. **Phytother. Res.** v. 12, 189-194, 1998.

- COLEMAN, R. A. & LEVY, G. P. Non-adrenergic inhibitory nervous pathway in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmac.* v. 52, p. 167-174, 1974
- COLLINS, E. M., WALSH, M. P. & MORGAN, K. G. Contraction of single vascular smooth cells by phenylephrine at constant $[Ca^{2+}]_i$. *Am. J. Physiol.*, v. 262, H754-762, 1992.
- COMROE, J. H. **Fisiologia da Respiração**. Guanabara Koogan, 2. ed., 1977.
- CORREA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, p. 483-486, 1926.
- CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura- IBDF, v. 3-4, 1978.
- COSTA, L. A. M. A. & MORAIS, S. M.; . Flavonoides com atividade anti-hipertensiva de *Alpinia speciosa* Schum. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1996, Florianópolis, **Resumos...**, p. 181, 1996.
- COSTA, L. A. M. A.; MORAIS, S. M.; DANTAS, M. C. B. R. D; LOBO, R. A. C. M; FONTELES, M. C. Flavonoides com atividade hipotensora de *Alpinia zerumbet* (colônia). **Rev. Bras. Farm.**, v. 79, n. 3/4, p. 96-98, 1998.
- CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extraction. **J. Chem. Education**, v. 53, n. 652, p. 652, 1976.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Cienc. Cult.**, v. 29, supl., p. 445, 1977.
- CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de croton. **Cienc. Cult.**, v. 30, supl., p. 326-327, 1978.
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. Edições UFC, Fortaleza, CE, 1981.
- CRAVEIRO, A. A. & CALDAS, D. Q. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**. v. 16, p. 224-228, 1993.

CROTEAU, R.; ALONSO, W. R.; KOEPP, A. E.; JOHNSON, M. A. Biosynthesis of monoterpenes: partial purification, characterization and mechanism of 1,8-cineole synthase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 309, n. 1, p. 184-192, 1994.

DALE, H. H. The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 6, p. 147-190, 1914.

DALMEIER, K. & CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacol.**, v. 22, p. 113-127, 1981.

DANIEL, E. E.; KANNAN, M.; DAVIES, C.; POSEY-DANIEL, V. Ultrastructural studies on the neuromuscular control of human tracheal and bronchial muscle. **Resp. Physiol.** n. 63, p. 109-128, 1986.

DANIEL, E. E.; BOURREAU, J. P.; ABELA, A.; JURY, J. The internal calcium store in airway muscle: emptying, refilling and chloride. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 29-37, 1992.

DAWSON, C. A. Role of pulmonary vasomotion in physiology of the lung. **Physiol. Rev.**, v. 64, p. 544-616, 1984.

DE LANEROLLE, P. & STULL, J. T. Myosin phosphorylation during contraction and relaxation of tracheal smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 255, 9993-10000, 1980.

DELANY, N. S.; HURLE, M.; FACER, P.; ALNADAF, T. *et al.* Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. **Physiol. Genomics.**, v. 4, p. 165-174, 2001.

DI ROSA, M.; RADOMSKI, R.; CARNUCCIO, R.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 172, n. 2, p. 1246-1252, 1990.

DI STASI L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência.** São Paulo: Ed. UNESP, 1995. p. 120-124.

DIAMOND, L. & GILLESPIE, M. The lung nonadrenergic inhibitory nervous system. **Trends. Pharmac. Sci.** v. 3, p. 237-239, 1982.

DIAZ, P.; GONZALEZ, M. C.; GALLEGUILLOS, F. R.; ANCIC, P.; KAY, A. B. Eosinophilis and macrophages in bronchial mucus and

bronchoalveolar lavage during allergen-induced late-phase asthmatic reactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 244, 1986.

DINH, Q. T.; GRONEBERG, D. A.; MINGOMATAJ, E.; PEISER, C. *et al.* Expression of substance P and vanilloid receptor (VR₁) in trigeminal sensory neurons projecting to the mouse nasal mucosa. **Neuropeptides**. v. 37, p. 245-250, 2003.

DIXON, S. J. & SMALL, R. C. Evidence of poor conduction of muscle excitation in the longitudinal axis of guinea-pig isolated trachea. **Br. J. Pharmac.** v.79, p. 75-83, 1983.

DOIDGE, J. M. & SATCHELL, D. G. Adrenergic and non-adrenergic inhibitory nerves in mammalian airway. **J. Auto. Nerv. Syst.**, v. 5, n. 2, p. 83-99, 1982.

DUCHEN, M. R. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. **J. Physiol.**, v. 516, p. 1-17, 1999.

DOUG, H.; CHEN, S. X.; XU, H. X.; KADOTA, S.; NAMBA, T. A new antiplatelet diarylheptanoid from *Alpinia blepharocalyx*. **J. Nat. Prod.** v. 61, n. 1, p. 142-144, 1998.

DUNCAN, R. A.; KRAZANOWSKI, J. J.; DAVIS, J. S.; POLSON, J. B. Polyphoinositide metabolism in canine tracheal smooth muscle (CTSM) in response to a cholinergic stimulus. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 307-310, 1987.

EGAN, M., AFIONE, S. *et al.* Defective regulation of outwardly rectifying C₁ channels by protein kinase A coorrected by insertion of CFTR. **Nature**, p. 358, 581-584, 1992.

EXTON, J. H.; TAYLOR, S. J.; AUGERT, G.; BOCKKINO, S. B. Cell signalling through phospholipid breakdown. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 104, p. 81-86, 1991.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENÂNCIO, F.; TAVARES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from portuguese endemic species of *Thymus*. **App. Microbiol.**, v. 36, p. 35-40, 2003.

FAME, T.M.; COLASURDO, G. N.; LOADER, J. E.; GRAVES, J. P.; LARSEN, G. L. Decrease in the airway's nonadrenergic noncholinergic inhibitory system in allergen sensitized rabbits. **Pediatric Pulmonology**, v. 17, p. 296-303, 1994.

FARLEY, J. M. & MILLES, P. R. Role of depolarization in acetylcholine-induced contractins of dog trachealis muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 201, p. 199-205, 1977.

FIERRO, I. M.; BARJA-FIDALGO, C.; CANEDO, R. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An increased in nitric oxide produced by rat peritoneal neutrophils is not involved in cells apoptosis. **Mediators of inflammation**, v. 4, p. 222-228, 1995.

FISH, J. E.; ANKIN, M. G.; ADKINSON, N. J.; PETERMAN, V. I. Indomethacin modification of immediate-type immunologic airway responses in allergic asthmatic and non-asthmatic subjects. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 123, p. 609-614, 1981.

FOGAÇA, R. T. H.; CAVALCANTE, A.D.A. SERPA, A. K. L.; SOUSA, P. J. C.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. & LEAL-CARDOSO, J. H. The effects of essential oil of *Mentha x villosa* on skeletal muscle of the toad. **Phytother. Res.**, n. 11, p. 552-557. 1997.

FONTELES, M. C.; MENDONÇA, V. L. M.; ROLA, F. H.; FILHO, J. F. T. A.; CALIXTO, J. B. Efeitos hipotensores prolongados do extrato hidroalcoólico de *Alpinia nutans* no cão. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10., 1988, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1988, p. 5/9-5.

FOSTER, R. W.; SMALL, R. C.; WESTON, A. H. The spasmogenic action of potassium chloride in guinea-pig trachealis. **Br. J. Pharmac.** v. 80, p. 553-559, 1983.

FOSTER, R. W.; OKPALUGO, B. I.; SMAILL, R. C. Antagonism of Ca^{2+} and other actions of potassium chloride in guinea-pig trachealis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 80, p. 553-559, 1984.

FRANCHOME, P. & PENOEL, D. D. L'aromatherapie exactement-Encyclopedie de l'utisation therapeutique des huiles essentielles. Edition Roger Jolois, Limoges, France, 1995.

- FRANCIS, L. E. & WOOD, D. R. **Dental Pharmacol. Therap.**, Philadelphia: W. B. Saunders, p. 53, 1961.
- FREISE, F. W. Essential oil from brazilian Euforbiaceae. **Per. Essent. Oil Rec.** v. 26, p. 219-220, 1935.
- FROSSARD, N. & ADVENIER, C. Tachykinins receptors in the airway. **Life Sci.**, v. 49, p. 1941-1953, 1991.
- FURCHGOTT, R. F. & WADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.
- FURCHGOTT, R. F. Studies on relation of rabbit aorta by sodium nitrite: basis for proposal that the acid-activable component of inhibitory factor from retrator penis is inorganic nitrite and EDNR is nitric oxide. **Mechanisms of vasodilatation**. New York, Raven Press, p. 401-414, 1988.
- GABELLA G. Structural changes in smooth muscle cells during isotonic contraction. **Cell Tissue Res.** v.1 2,187-201, 1976.
- GADDUM, J. H. & PICARELLI, Z. P. Two kinds of tryptamine receptor. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 12, p. 323-328, 1957.
- GEREMIA, B. **Rassengna Internazionale di Clinica e Thetapie**. Germany: Urban and Fisher Co. 1955, v. 35, p. 577-592.
- GERTHOFFER, W. T. & POHL, J. (1994). Caldesmon and calponin phosphorylation in regulation of smooth muscle contraction. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 72, p. 1410-1414, 1994.
- GERTHOFFER, W. T. Calcium-dependence of myosin phosphorylation and airway smooth muscle contraction and relaxation. **Am. J. Physiol.**, 250 (Cell Physiol. 19) p. 597-604, 1986.
- GERTHOFFER, W. T. Dissociation of myosin phosphorylation and active tension during muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle. **Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 240, p. 8-15, 1991.
- GERTHOFFER, W. T. Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 261 (Lung Cell. Mol. Physiol. 5), L15-L28, 1991.

GEWALI, M. B.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; ALI, M. S.; SAIKI, L.; DOUG, H.; KADOTA, S. Epicalyxin F and calyxin L: two novel antiproliferative diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. **Org. Lett.** v. 1, n. 11, p. 1733-1736, 1999.

GHATEI, M. A.; SHEPPARD, M. N.; O'SHAUGHNESSY, D. J.; ADRIAN, T. E.; MCGREGOR, G. P.; POLAK, J. M.; BLOOM, S. R. Regulatory peptides in the mammalian respiratory tract. **Endocrinol.**, v. 111, p. 1248-1254, 1982.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. **Mutat. Res.** v. 416, n. (1-2), p. 129-136, 1998.

GOMÉZ-JIMENEZ, J.; SALGADO, A.; MOURELLE, M. *et al.* L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. **Crit. Care Med.** v. 23, p. 253-258, 1995.

GOODMAN & GILMAN. **The pharmacological basis of therapeutics.** 9th ed. In: HARDMAN, J. G.; GILMAN, A. AG.; LIMBIRD, L. E. (Eds.). cap. 26, p. 601-616, 1996.

GRAFE, P.; MAYER, C. J.; WOOD, D. J. Synaptic modulation of calcium-dependent potassium conductance in myenteric neurons in the guinea-pig. **J. Physiol.**, v. 305, p. 235-248, 1980.

GRAMICCIONE, E.; PAMPARANA, F.; MESSA, A.; Mucolytic agents: polycentric study of a carbocysteine-sobrerol combination. **Arch. Monaldi Mal. Torace**, v. 44, p. 791-793, 1989.

GRANDORDY, B. M.; FROSSARD, N.; RHODEN, K. J.; BARNES, P. J. Tachykinin-induced phosphoinositide breakdown in airway smooth muscle and pithelium: relationship to contraction. **Mol. Pharmacol.**, v. 33, p. 515-519, 1988.

GREENWOOD, I. A. & LARGE, W. A. Inhibition Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in smooth muscle cells by compounds structurally similar to niflumic acid. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 324P, 1997.

GREENWOOD, I. A. & LARGE, W.A. Properties of Cl^{-} current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. H1524-1532, 1998.

GRIDER, J. R.; MURTHY, K. S.; JIN, J. G.; MAKHOUF, G. M. Stimulation of nitric oxid from muscle cells by VIP-prejuncional enhancement of VIP release. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. G774-G778, 1992.

GROSS, N. J. & SKORODIN, M. S. Anticholinergic, antimuscarinic bronchodilators. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 129, p. 856-870, 1984.

GRUNDSTROM, N.; ANDERSSON, R. G. G.; WIKBERG, J. E. S. Pharmacological characterization of the autonomous innervation of the guinea pig tracheobronchial smooth muscle. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 49, p. 150-157, 1981.

GUENTHER, E. & ALTHAUSEN, D. **The essential oils**, New York: Van Nostrand, v. 2, p. 449, 1949.

GUENTHER, E. **The essential oils**, New York: R. Krieger, v. I e II, 1972.

GUNST, S. J. & TANG, D. D. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. **Eur. Respir. J.**, v. 15, p. 600-615, 2000.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S. S.; GAVIN, C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.** v. 267, p. 313-339, 1994.

GUSEV, N.; PRITCHARD, K.; HODGKINSON, J.; MARSTON, S. Filamin and gelsodim influence Ca^{2+} -sensitivity on amooth muscle thin filaments. **J. Muscle Res. Cell. Motil.**, v. 15, p. 672-681, 1994.

HAMMERSCHMIDT, F. J.; CLARK A. M.; SOLIMAN, F. M.; EL-KASHOURY, E. S.; ABD EL-KAWY M. M.; EL-FISHAWY A. M. Chemical composition and antimicrobial activy of essential oils of *Jasonia candicans* and *J. Montana*. **Planta Med.**, v. 59, n. 1, p. 68-70, 1993.

HAHN, H.L.; WILSON, A.G.; GRAFT, P.D.; FISCHER, S.P.; NADEL, J, A. Interaction between serotonin and efferent vagus nerves in dog lungs. **J Appl Physiol.** v. 44, p. 144, 1978.

HARAGUCHI, H.; KUWATA, Y.; INADA, K.; SHINGU, K.; MIYAHARA, K.; NAGAO, M.; YAGI, A. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the competition for incorporation of unsaturated fatty acids in cell growth. **Planta Med.** v. 62, n. 4, p. 308-313, 1996.

HARGREAVE, F. E.; RAMDSDALE, E. H.; KIRBY, J. G. O'BYRNE, P. M. Asthma and the role of inflammation. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 69, suppl. 147, p. 16-21, 1986.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; FINLAY-JONES, J. J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflamm. Res.**, v. 49, n. 11, p. 619-626, 2000.

HERMSMEYER, K.; STUREK, M.; RUSCH, N. J. Calcium channel modulation by dihydropyridines in vascular smooth muscle. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 522, p. 225-231, 1998.

HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1984.

HIMPENS, B.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. P. A agonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. **Pflugers. Arch.**, v. 417, n. 1, p. 21-28, 1990.

HIMPENS B.; MISSIAEN L.; CASTEELS R. Ca^{2+} homeostasis in vascular smooth muscle. **Review**. v. 32, p. 207-219, 1995.

HIMPENS, B. & SOMLYO, A. P. Free-calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle. **J. Physiol.**, v. 395, p. 507-530, 1988.

HIRANO, K., KANAIDE, H., ABE, S., NAKAMURA, M. Temporal change in the calcium-force relation during histamine-induced contractions of strips of the coronary artery of the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 27-34, 1991.

HÖGYES, A. Beiträge zur physiologischen Wirkung der Bestandteile des *Capsicum annuum*. **Arch. Exp. Path. Pharmacol.** v. 9, p. 117-130, 1878.

HOLGATE, S. T.; HARDY, C. C.; ROBINSON, C.; AGIUS, R. M.; HOWARTH, P. H. The mast cell as a primary effector cell in the pathogenesis of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 274-282, 1986.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**. v. 24, p. 739-768, 1988.

HOOPER, N. M.; KENNY, A. J.; TURNER, A. J. The metabolism of neuropeptides: neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase-24-11 but not for peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme). **FEBS Lett.**, v. 190, p. 133-136, 1985.

HOWARTH, P. H. & HOLGATE, S. T. Astemizole as a H₁ antagonist in allergic asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 75, p. 166, 1985.

HOYER, D.; CLARKE, D. E.; FOZARD, J. R. HARTIG, P. R.; MARTIN, G. R.; MYLECHARANE, E. J.; SAXENA, P. R.; HUMPHREY, P. P. A. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol. Rev.** v. 46, p. 157-203, 1994.

HSU, S. Y. Antiulcer effects of the constituents of *Alpinia speciosa* rhizome: effects of dihydro-5,6-dehydrokawain and 5,6-dehydrokawain on gastric secretion. **Kuoli Chung-Kuo I Yao Yen Chui Pao Kao**, p. 131-145, 1982.

HSU, S. Y. Effects of the constituents of *Alpinia speciosa* rhizome on experimental ulcers. **Twain I Hsueh-Hui-Tsa-Chih**, v. 86, p. 58-64, 1987.

HSU, S. Y. Protective effects of the constituents of *Alpinia speciosa* rhizomes against various gastric and duodenal lesions in rats. **Chung-Hua Ya Hsueh Tsa Chih**, v. 40, p. 41-48, 1988.

HUA, X. Y.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; BRODIN, E.; LUNDBERG, J. M.; HOKFELT, T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neurokinin B and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. **Regul. Pept.**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 1985.

HUTSON, P. A. **Investigations into the mechanisms of late phase responses in guinea pig airways.** 1989, 282f. Thesis (Doctor of Philosophy)—Faculty of medicine, University of Southampton, 1989.

IWANG, S. W. & OH, U. Hot channels in airways: pharmacology of the vanilloid receptor. **Current Opinion in Pharmacol.**, v. 2, p. 235-242, 2002.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. **Mechanisms of vasodilation.** New York: Raven Press, 1988a.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; BYRNS, R. E.; WOOD, K. S.; HAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide

possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 246, n. 1, p. 218-226, 1988b.

IKEBE, M.; HARTSHORNE, D. J.; ELZINGA, M. Phosphorylation of the 20.000-dalton light chain of smooth muscle myosin by the calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase: Phosphorylation sites and effects of phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 20, p. 9569-9573, 1987.

ITOKAWA, H.; WATANABLE, K.; MIHASHI, S.; IITAKA, Y. Isolation of agarofuran-type sesquiterpenes from *Alpinia japonica* (Thunb) Miq. **Chem. Pharm. Bull.**, v.28, n.2, p. 681-682, 1980.

ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Two new diarylheptanoids from *Alpinia officinarum* Hance. **Chem. Pharm. Bull**, v.29, n. 8, p. 2383-2385, 1981a.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; WATANABLE, K.; TOKASE, A.; IITAKA, Y Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochem.**, v.20, n.11, p. 2503-2506, 1981b.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; KOBAYASH, T.; WATANABLE, Z.; IITOKA, Y. Novel sesquiterpenes from *Alpinia intermedia* Gagnep. **Chem. Pharm. Bull**, v. 35, n. 7, p 2860-2868, 1987a.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; OSAWA, K.; WATANABLE, Z.; IITOKA, Y. Novel guiane-and secoguaine-type sesquiterpenes from *Alpinia japonica* (thunb) Miq. **Chem. Phrarm. Bull**, v. 35, n.7, p. 2849-2859, 1987b.

ITOKAWA, H.; MORITA, H.; SUMITOMO, T.; TOTSUKA,N.;TOKEYA,K. Antitumour principles from *Alpinia galanga*. **Planta Med.**, v. 53, n.1, p. 32-33, 1987c.

ITOKAWA, H.; YOSHIMOTO, S.; MORITA, H. Diderpenos from the rhizomes of *Alpinia formosa*. **Phytochemistry**. v.27, n.2, p. 435-438, 1988.

JACOBS, M. B. Root beer flavor components. **Amer. Perf. Essent. Oil. Rer.**, v. 51, p. 55-57, 1948.

JANCSÓ, N. Role of the nerve terminals in mechanisms of inflammatory reactions. **Bull. Millard Fillmore Hos. Buffalo**, v. 7, p. 53-77, 1960.

JANCSÓ, N. Desensitization with capsaicin and related acylamides as a tool for studying the function of pain receptors. **In Pharmacology of Pain.** (Edited by Lin K., Armstrong D. and Pardo E. G.), Pergamon Press, Oxford. v. 9, p. 33–35, 1968.

JANCSÓ-GÁBOR, A.; SZOLCSÁNYI, J.; JANCSÓ, N. Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. **J. Physiol.**, v. 208, p. 449–459, 1970.

JACOBS, M.B Les aromatisants; problèmes toxicologiques posés par leur emploi. **Aliment. et Vie.** v. 61, p. 121-160, 1973.

JANSSEN, A. M. & SCHEFFER, J. J. C. Acetoxychavicol acetate, an antifungal component of *Alpinia galanga*. **Planta Med.**, v. 6, p. 507-11, 1985.

JANSSEN, L. J. & SIMS, S. M. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig trachea myocytes. **J. Physiol.**, n. 453, p. 197-218, 1992.

JANSSEN, L. J. & SIMS, S. M. Emptying and refilling of Ca^{2+} store in trachea myocytes as indicated by ACh-evoked currents and contraction. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, n. 265, p. C877-C886, 1993a.

JANSSEN, L. J. & SIMS, S. M. Histamine activates Cl^{-} and K^{+} currents in guinea-pig trachea myocytes: convergence with muscarinic signalling pathway. **J. Physiol.**, n. 465, p. 661-677, 1993b.

JANSSEN, L. J. & SIMS, S. M. Substance P activates Cl^{-} and K^{+} conductances in guinea-pig trachea smooth muscle cell. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, n. 72, p. 705-710, 1994.

JANSSEN, L. J. Acetylcholine and caffeine activate Cl^{-} and suppress K^{+} conductances in human bronchial smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 270, p. 772-781, 1996.

JANSSEN, L. J. Ionic mechanisms and Ca^{2+} regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma? **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, n. 282, p. L1161-L1178, 2002.

JANSSEN, L. J.; TAZZEO, T.; ZUO, J. Enhanced myosin phosphatase and Ca^{2+} -uptake mediate adrenergic relaxation of airway smooth muscle. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 2003. (As supplied by publisher).

JEDLICKOVÁ, Z.; MOTT, O.; SERY, V. Antibacterial properties of the *Vietnamese cajeput* oil and oil in combination with antibacterial agents. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, v. 36, p. 303-309, 1992.

JENTSCH, T. J. Chloride channels: a molecular perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 6, p. 303-310, 1996.

JENTSCH, T. J. & GUNTHER, W. Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays.*, v. 19, n. 2, p. 117-126, 1997.

JIRTLE, R. L.; HAAG, J. D.; ARIAZI, E. A.; GOULD, M. N. Increased mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor and transformin growth factor beta 1 levels during monoterpene-induced regression of mammary tumors. *Cancer Res.*, v. 53, p. 3849-3852, 1993.

JOHNSON, A. R.; ASHTON, J.; SCHULZ, W. W.; ERDOS, E. G. Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 132, p. 564-568, 1985.

JOLY, A.B. **Botânica:** Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: EDUSP, 1966. v. 4, p. 578-583. (Série Ciências Pura, 3).

JONES, T. R.; KANNAN, M. S.; DANIEL, E. E. Ultrastructural study of guinea-pig tracheal smooth muscle and its innervation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v. 58, p. 974-983, 1980.

JOOS, G. F. & PAUWELS, R. A. Mechanisms involved in neurokinin-induced bronchoconstriction. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, v. 330, p. 132-146, 1990.

JOOS, G. F. & PAUWELS, R. A. The *in vivo* effect of tachykinins on airway mast cells of the rat. *Am. Rev. Respir. Dis.*, v. 148, n. 4, p. 922-926, 1993.

JOOS, G. F.; GERMONPRE, P. R.; PAUWELS, R. A. Neural mechanisms in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, v. 30, n. 1, p. 60-65, 2000.

JOSEPH, M.; TONNEL, A. B. CAPRON, A.; DESSAINT, J. P. the interaction of IgE-antibody with human alveolar macrophages and its participation in the inflammatory processes of the lung allergy. *Agents Actions*, v. 11, p. 619-622, 1981.

JOSEPH, M.; AURIAULT, C.; CAPRON, A.; VORNG, H.; VIERS, H.; VIERS, P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. **Nature**, v. 303, p. 310-312, 1983.

JOSEPH, R.; JOSEPH, T.; JOSEPH, J. Volatile essential oil constituents of *Alpinia smithiae* (Zingiberaceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 49, n. 2, p. 509-512, 2001.

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

JUERGENS, U. R.; STOBER, M.; VETTER H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes *in vitro*. **Eur. J. Med. Res.**, v. 3, n. 11, p. 508-510, 1998b.

KADOWITZ, P.J.; KNIGHT, D.S.; HIBBS, R.G.; ELLISON, J.P.; JOINER, P.D.; BRODY, M.J.; HYMAN, A.L. Influence of 5- and 6-hydroxydopamine on adrenergic transmission and nerve terminal morphology in the canine pulmonary vascular bed. **Circ. Res.** v. 39, p. 191, 1976.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 3, p. 288-291, 2002.

KAMM, K. E. & STULL, J. T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 593-620, 1985.

KAMM, K. E.; HSU, L. C.; KUBOTA, Y.; STULL, J. T. Phosphorylation of smooth muscle myosin heavy and light chains: effects of phorbol dibutyrate and agonists. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 21223-21229, 1989.

KANASHIRO, C. A.; KHALIL, R. A. Isoform-specific protein kinase C activity at variable Ca^{2+} entry during coronary artery contraction by vasoactive eicosanoids. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 76, n. 12, p. 1110-1119, 1998.

KANNAN, M. S.; JAGER, L. P.; DANIEL, E. E.; GARFIELD, R. E. Effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium chloride on the

- electrical activity and cable properties of canine tracheal smooth muscle. **J. Pharmac. Exp. Ther.** v. 227, p. 706-715, 1983.
- KANNAN, M. S. & JOHNSON, D. E. Nitric oxide mediates the neural nonadrenergic noncholinergic relaxation of pig tracheal smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. L511-L514, 1992.
- KARLSSON, J. A. *In vivo* and *in vitro* studies of the non-adrenergic non-colinergic nervous system of the guinea-pig airway. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 280, n. 2, p. 191-207, 1986.
- KEEF, K. D. & ROSS, G. Rhythmic coronary arterial contractions: changes with time and membrane potential. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. H524-529, 1986.
- KIM, K. J.; KIM, Y. H.; YU, H. H.; JEONG, S. I.; CHA, J. D.; KIL, B. S.; YOU, Y. O. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Chrysanthemum boreale*. **Planta Med.** v. 69, n. 3, p. 274-277, 2003.
- KIMURA, Y.; TAKIDO, M.; NAKANO, K.; TAKISHITA, M. **J. Pharm. Soc. Japan.**, v. 86, p. 1184, 1966.
- KITAZAWA, T. & SOMLYO, A. P. Desensitization and muscarinic resensitization of force and myosin light chain phosphorylation to cytoplasmic Ca^{2+} in smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res.**, v. 172, p. 1291-1297, 1990.
- KIUCHI, F.; IWAKAMI, S.; SHIBUYA, M.; HANAOKA, F.; SANKAWA, U. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. **Chem. Pharm. Bull.**, v.40, n. 2, p.387-391, 1992.
- KLAYMAN, D. L. Qinghoosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science.** v. 228, p. 1049-1055, 1985.
- KNOT, H.; BRAYDEN, J.; NELSON, M. Calcium channels and potassium channels, In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction.** New York: Academic Press, 1996. p. 203-219.
- KOHOOGI, H.; YAMAGUCHI, T.; KAWANO, O.; HONDA, I.; ANDO, M.; ARAKI, S. inhibition of neutral endopeptidase potentiates bronchial contraction induced by immune response in guinea pigs *in vitro*. **Am. Ver. Respir. Dis.**, v. 144, p. 636-641, 1991.

KROEGER, E. A. & STEPHENS, N. L. Effect of tetraethylammonium on tonic airway smooth muscle: initiation of phasic electrical activity. **Am. J. Physiol.**, v. 228, n. 2, p. 633-636, 1975.

KUBO, M.; MATSUDA, H.; TOMOHIRO, N.; YOSHIKAWA, M. Studies on *Alismatis rhizoma*. I Anti-allergic effects of methanol extract and six terpene components from *Alismatis rhizoma* (dried rhizome of *Alisma orientale*). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 20, p. 511-516, 1997.

KUEMMERLE, J. F.; MURTY, K. S.; MAKHLOUF, G. M. Agonist-activated, ryanodine-sensitive, IP₃-insensitive Ca²⁺ release channels in longitudinal muscle of intestine. **Am. J. Physiol.** v. 226, n. 5, pt. 1421-1431, 1994.

KUSTER, R. M.; MPALATINOS, M. A.; LIMA, M. C. H. P.; BRAND, E. M. T.; PARENTE, J. P. "GC-MS determination of kava-pyrone in *Alpinia zerumbet* leaves". **J. High Resol. Chromat.** v.22, n. 2, p. 129-130, 1999.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; MAGALHÃES, P. J. 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 Med.**, v. 65, p. 553-557, 1999.

LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. & MAGALHÃES, P. J. Essential oil of *Croton nepetaefolius* decreases blood pressure through an action upon vascular smooth muscle: studies in DOCA-salt hypertensive rats. **Planta Med.**, v. 66, p. 138-143. 2000.

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

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

LAHLOU, S.; FIGUEREDO, A. F.; MAGALHÃES, P.J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide

present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, n. 12, p. 1125-1131, 2002b.

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; PINTO, D. G. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.** n.7, p. 323-330, 2003.

LAITINEN, L. A. & LAITINEN, A. Innervation of airway of smooth muscle. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 131, p. 599-606, 1987.

LAMB, F. S.; VOLK, J. A.; SHIBATA, E. F. Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. **Circ. Res.**, 75, 742-750, 1994.

LAMBERT, I. H. & HOFFMANN, E. K. Regulation of taurine transport in Ehrlich ascites tumor cells. **J. Membr. Biol.**, v. 131, n. 1, p. 67-79, 1993.

LAMMERS, J. W. J.; BARNES, P. J. & CHUNG, K. F. Noradrenergic noncholinergic airway inhibitor nerves. **Eur. Resp. J.**, v. 5, p. 239-246, 1992.

LARANJA, S. M.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 86, n. 2, p. 237-240, 1991.

LARANJA, S. M.; BERGAMASCHI, C. M.; SCHOR, N. Evaluation of three plants with potential diuretic effect. **Rer. Assoc. Bras.**, v. 38, n. 1, p. 13-16, 1992.

LATTANZIO, F. A.; SCHLATTERER, R. G.; NICAR, M.; CAMPBELL, K. P.; SUTKO, J. L. The effects of ryonidine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 2711-2718, 1987.

K. P.; SUTKO, J. L. The effects of ryonidine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 2711-2718, 1987.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais.** 2. ed. Rio de Janeiro: Record, 1993.

LEAL-CARDOSO, J. H.; LAHLOU, S.; COELHO-DESOUZA, A. N.; CRIDDLE, D. N.; DUARTE, G. I.B.; SANTOS, M. A. V.;

- MAGALHÃES, P. J. C. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 901-906, 2002.
- LEE, C. Y.; CHIOU, J. W.; CHANG, W. H. Studies on the antioxidative activities spices grow in Taiwan. **Chuug-kuo Nung Yeh Huo Hsueh Hui Chih.** v. 20, p. 61-66, 1982.
- HIMPENS, B.; KITAZAWZ, T.; SOMLYO, A. P. A gonist-dependent modulation of Ca^{2+} sensitivity in rabbit pulmonary artery smooth muscle. **Pflugers. Arch.**, v. 417, n. 1, p. 21-28, 1990.
- LEE, E.; PARK, K. K.; LEE, J. M.; CHUN, K. S.; KANG, J. Y.; LEE, S. S.; SURH, Y. J. Suppression of mouse skin tumor promotion and induction of apoptosis in HL-60 cells by *Alpinia oxiphylla* Miquel (Zingiberaceae). **Carcinogenesis.** v. 19, n. 8, p. 1377-1381, 1998.
- LEFF, A. R.; HAMANN, K. J.; WEGNER, C. D. Inflammation and cell-cell interactions in airway hyperresponsiveness. **Am. J. Physiol.**, v. 260, p. L189-206, 1991.
- LEMOAN, G. Les aromatisants: problemes toxicologiques posés por levr emploi. **Aliment. et. Vie.**, v. 61, p. 121-160, 1973.
- LEUNG, P. C.; TAYLOR, W. A.; WANG, J. H.; TIPTON, C. L. Ophiobolin A: a natural product inhibitor of calmodulin. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 2742-2747, 1984.
- LIAO, M. C.; ARAKAKI, H.; LI, Y.; TAKAMIYAGI, A.; TAWAKA, S.; ANIYA, S.; SAKURAI, H.; NONAKA, S.; Inhibitory effects of *Alpinia apesciosa* Schum on the porphyrin photooxidative reaction. v. 27, n. 5. p. 312-317, 2000.
- LI, Y. ZHUANGS, S. *et al.* The major myosin-binding site of caldesmon resides near is N-terminal extreme. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 10989-10994, 2000.
- LILLY, C. M.; DRAZEN, J. M.; SHORE, S. A. Peptidase modulation of airway effects of neuropeptides (43616). **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 203, n. 4, p. 388-404, 1993.
- LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT. A. M.; PAULO. M Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses.** v. 36, p. 333-336, 1993.

LOUGHRIN, J. H. & KASPERBAUER, M. J. Aroma content of fresh basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves is affected by light reflected from colored mulches. **A. Agric. Food Chem.** v. 51, n. 8, p. 2272-2276, 2003.

LUNDBERG, J. M.; BRODIN, E.; HUA, X.; SARIA, A. Vascular permeability changes and smooth muscle contraction in relation to capsaicin-sensitive substance P afferents in the guinea-pig. **Acta. Physio. Scand.**, v. 120, p. 217-227, 1984.

LUNDBERG, J. M. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxid. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, n. 1, p. 114-140, 1996.

LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L. Essential oils of some Amazonian Zingiberaceae, 3 genera *Alpinia* and *Rengalmia*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 5, p. 907-908, 1984.

MACCHIONI, F.; CIONI, P. L.; FLAMINI G.; MORELLI, I.; PERRUCCI, S.; FRANCESCHI, A.; MACCHIONI, G.; CECCARINI, L. Acaricidal activity of pine essential oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored food mite. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, n. 16, p. 4586-4588, 2002.

MAGALHÃES, P. J. C. **Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaio.** 1997. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MAGALHÃES, P. J. C. CRIDDLE, D. N.; TAVARES, R. A.; MELO, E. M.; MOTA, T. L & LEAL-CARDOSO. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituent cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytother. Res.** v. 12, p. 172-177, 1998.

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

MAGGI, C. A.; SANTIOCIOLI, P. GEPPETTI, P.; PARLANI, M.; ASTOLFI, M.; PRADELLES, P.; PATACCHINI, R.; MELI, A. The

antagonism induced by ruthenium red of actions of capsaicin on the peripheral terminais of sensory neurons: further studies. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 154, n. 1, p.1-10, 1988.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; QUARTARA, L.; ROVERO, P.; SANTICIOLI, P. Tachykinins receptor in the guinea-pig isolated bronchi. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 197, p. 167-174, 1991a.

MAGGI, C. A.; PATACCHINI, R.; ROVERO, P.; SANTICIOLI, P. Tachykinins receptors and noncholinergic bronchoconstriction in the guinea-pig isolated bronchi. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 144, p. 363-367, 1991b.

MANN, S. P. The innervation of mammalian bronchial smooth muscle: the localisation of catecholamines and cholinesterases. **Histochem. J.** v. 3, p. 319-331, 1971.

MARCUS, C. & LICHTENSTEIN, P. Biologically active components of anise: toxicity and interactions with insecticides in insects. **J. Agric. Food Chem.**, v. 27. p. 1217-1223, 1979.

MARGRET, W. **Die Wichtigsten Arzneipflanzen von A-Z in Phytotherapie.** Germany: 1999, Urban & Fisher, p. 89-218.

MARSTON, S. B. & REDWOOD, C. S. The molecular anatomy of caldesmon. **Biochem.** v. 279, p. 1-6, 1993.

MARTINS, A. P.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; DA CUNHA, A. P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S.; MAZZONI, V.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tome e Prince. **Planta Med.**, v. 67, n. 6, p. 580-584, 2001.

MARTLING, C. R. Sensory nerves containing tachykinins and CGRP in the lower airway: functional implications for bronchoconstriction, vasodilation and protein extravation. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, v. 563, p. 1-57, 1987.

MASTON, S. B. & REDWOOD, C. S. The molecular anatomy of caldesmon. **Biochem. J.**, v.279, p. 1-16, 1991.

MATOS, M. J. A. & FERNANDES, A. **Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste.** Convênio BNB-CNPq-UFC, 1975-1978.

- MATOS, F. J. A. **Formulário fitoterápico do Prof. Dias da Rocha**. 5. ed. (coleção ESAM, ano 20, v. 18, s.1). 1987, 205p.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 82, Fortaleza: Edições-UFC, 1994.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 2. ed. rev. e atual. Fortaleza: Edições-UFC, 1996, 179p.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária-UFC, 2000, 344 p.
- MATSAS, R.; FULCHER, I. S.; KENNY, A. J.; TURNER, A. J. Substance P and [leu]enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, n. 10, p. 3111-3115, 1983.
- MAYER, A. M.; GLASER, K. B.; JACOBS, R. S. Regulation of eicosanoids biosynthesis in vitro and in vivo by the marine natural product monoalide: a potent inactivator of venom. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, p. 871-878, 1988.
- McCAIG, D. J. & SOUHRADA, J. F. Alteration of electrophysiological properties of airway smooth muscle from sensitised guinea-pigs. **Resp. Physiol.** v. 41, p. 49-60, 1980.
- McCAIG, D. J. & RODGER, I. W. Electrophysiological effects of leukotriene D₄ in Guinea-pig trachealis airway smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.** v. 88, p. 399, 1986.
- McCAIG, D. J. & RODGER, I. W. Effects of leukotriene D₄ on the mechanical and electrical properties of guinea-pig isolated trachealis. **Br. J. Pharmacol.** v. 94, n.3, p. 729-36, 1988.
- McDANIEL, N. L.; CHEN, X. L.; SINGER, H. A.; MURPHY, R. A.; REMBOLD, C. M. Nitrovasodilators relax arterial smooth muscle by decreasing [Ca²⁺] and uncoupling stress from phosphorylation. **Am. J. Physiol.**, v. 263, p. C461-467, 1992.
- McPHERSON, G. A. & ANGUS, J. A. Evidence that acetylcholine-mediated hyperpolarization of the rat mesenteric artery does not involve the K⁺ channels opened by cromakalin. **Br. J. Pharmacol.** v. 103, p. 1184-1190, 1991.

MEISS, R. A. Mechanical properties of gastrointestinal smooth muscle. In: SCHULTZ, S. G.; WOOD, J. D. *et al.* (Ed). **Handbook of physiology**. Baltimore: American Physiological Society, 1989. p. 273-329.

MENDONÇA, V. L. M.; SANTOS, T. J. T.; OLIVEIRA, J. V. BANDEIRA, M. A.; RAO, V. S.; FONTENLES, M. C. Avaliação dos efeitos hipotensores e da diurese da *Alpinia nutans* no rato. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10., 1988, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1988a.

MENDONÇA, V. L. M.; SANTOS, T. J. T.; OLIVEIRA, J. V.; FONTENLES, M. C. Screening farmacológico geral da *Alpinia nutans*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10., 1988, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1988b.

MENDONÇA, V. L. M. **Estudo Farmacológico e Toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum.** 1989. 152 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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

MENEZES, A. M. S.; ALMEIDA, F. R. C.; RAO, V. S.; MATOS, M. E. O. Antiinflammatory activity of the essential oil of *Vanillosperma arborea*. **Fitoterapia LXI** v. 3, p. 252-254, 1990.

METZGER, W. J.; ZAVALA, D.; RICHERSON, H. B.; MOSELEY, P.; IWAMOTA, P.; MONICK, M.; SJOERDSMA, K.; HUNNINGHATE, G. W. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs: description of the model and local airway inflammation. **Am. Ver. Respir. Dis.**, v. 135, p. 433-440, 1987.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; MIHAJLOVIC, B.; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Med.**, v. 69, n, 5, p. 413-419, 2003.

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

MITSUI, S.; KOBAYASHI, S.; NAGAHORI, H.; OGISO, A. Constituents from seeds of *Alpinia galanga* Wild. and their anti-ulcer activities. **Chem. Pharm. Bul**, v.24, n.10, p. 2377-2382, 1976.

MIYAZAWA, M.; KAMEOKA, H.; MORINAGA, K.; NEGORO, K.; MURA, N. Hydroxycineole: four new metabolites of 1,8-cineole in rabbits. **J. Agric. Food Chem.** v. 37, p. 222-226, 1989.

MIYAZAWA, M.; NAKAOKA, H.; HYAKUMACHI, M.; KAMEOKA, H. Biotransformation of 1,8-cineole to (+)-endo-hydroxy-1,8-cineole by *Gromollera cingulata*. **Chemistry. Express.** v. 6, p. 667-670, 1992.

MIYAZAWA, M.; NAKAMURA, Y.; ISHIKAWA, Insecticidal sesquiterpene from *Alpinia oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*. **J. Agric. Food Chem.** v. 48, n. 8, p. 3639-3641, 2000.

MIYAZAWA, M.; SHINDO, M.; SHIMADA, T. Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from *Eucalyptus polybractea*, by cytochrome P450 3A enzymes in rat human liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition.** v. 29, n. 2, p. 200-205, 2001a.

MIYAZAWA, M.; SHINDO, M.; SHIMADA, T. Role of cytochrome P450 3A enzymes in the 2-hydroxylation of 1,4-cineole, a monoterpene cyclic ether, in rat and human liver microsomes. **Xenobiotica.** v. 31, n. 10, p. 713-723, 2001b.

MIYAZAWA, M. & SHINDO, M. T. Biotransformation of 1,8-cineole by human liver microsomes. **Nat. Prod. Lett.**, v. 15, n. 1, p. 49-53, 2001.

MORLEY, J. K. Channel openers and suppression of airway hyperreactivity. **Trends Pharmacol. Sci.**, 15, 463-468, 1994.

MOODY, C.; LEHMAN, W.; CRAIG, R. Caldesmon and the structure of smooth muscle thin filaments: electron microscopy of isolated thin filaments. **J. Muscle Res. Cell. Motil.** v. 11, n. 2, p. 176-185, 1990.

MOORE, P. K.; SWAYELH, O. A.; CHONG, N. W. S.; EVANS, R. A L-N^G nitroarginine (NOARG) inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit aorta and perfused rat mesentery. **Br. J. Pharmacol.** v. 176, p. 219-223, 1989.

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

MOTEKI, H.; HIBASAMI, H.; YAMADA, Y.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; KOMIYA, T. Specific induction of apoptosis by 1,8-cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. **Oncol. Rep.**, v. 9, n. 4, p. 757-760, 2002.

MPALANTINOS, M. A.; MOURA, R. S.; PARENTE, J. P. & KUSTER, R. M. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. **Phytother. Res.** v.12, p. 442-444, 1998.

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

MURTHY, K. S., GRIDER, J. R., MAKHLOUF, G. M. Receptor-coupled G proteins mediate contraction and Ca^{2+} mobilization in isolated intestinal muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 260, p. 90-97, 1992.

NAKAJIMA, T.; HAZAMA, H.; HAMADA, E.; OMATA, M.; KURACHI, Y. Ionic basis of neurokinin-A-induced depolarization in single smooth muscle cells isolated from the guinea-pig trachea. **Pflugers Arch.**, v. 430, 552-562, 1995.

NASCIMENTO, N. R. F. *Efeitos cardiovasculares do 4-terpineol*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FeSBE), 12., Caxambu, Minas Gerais. **Resumos...**, p. 280-283, 1997.

NASCIMENTO, N. R. F. **Efeitos do terpinen-4-ol no sistema cardiovascular e músculo liso intestinal**. 1998. 127 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

NASCIMENTO, N. R. F.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Effects of terpinen-4-ol on the cardiovascular system. *do*. In: **XIIIth International Pharmacology Union**, Munich, Germany, 1998.

NEILD, T. O. & KOTTECHA, N. Relation between membrane potential and contractile force in smooth muscle of the rat tail artery during stimulation by norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and potassium. **Cir. Rev.**, v. 60, p. 791-795, 1987.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; BRAYDEN, J. E.; WORLEY, J. F. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 382-385, 1988.

- NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, v. 308, 693-698, 1984.
- NIXON, G. F.; MIGNERY, G. A.; SOMLYO, A. V. Immunogold localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, v. 15, p. 6682-70020, 1994.
- NORO, T.; SEKIYA, M.; ODA, Y.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S. Inhibitors of xanthine oxidase from *Alpinia galanga*. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 36, n.1, p. 244-248, 1988.
- NOMURA, M.; STULL, J. T.; KAMM, K. E.; MUMBY, M. C. Site specific dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein phosphatases 1 and 2A. *Biochemis.*, v. 314, p. 11915-11920, 1992.
- O'BYRNE, P. M. & MANNING, P. J. Clinical relevance of lipid mediators in asthma. *J. Asthma*. v. 29, n. 3, p. 153-163, 1992.
- O'DONNELL, S. R.; SAAR, N.; WOOD, L. J. The density of adrenergic nerves at various levels in the guinea pig lung. *Chin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v. 5, p.325-32, 1978.
- OATES, J. A. & WOOD, A. J. J. Drug therapy: a new approach to the treatment of asthma. *The New England J. Med.* v. 22, n. 321, p. 1517-1527, 1989.
- OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; SAITO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of "Paico" a medicinal peruvian plant. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 41, n. 7, p. 1309-13011, 1993.
- OLIVEIRA, C. L. A. **Contribuição ao estudo químico de plantas do Nordeste *Alpinia speciosa* (Zingiberaceae) e *Physsa angulata* (Solonaceae).** 1994. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- OLSEN, C. R.; COLEBATCH, H. J. H.; MEBEL, P. E.; NADEL, J. A.; STAUB, N. C. Motor control of pulmonary airways studied by nerve stimulation. *J. appl. Physiol.*, v. 20, p. 202-208, 1965.

- OZAKI, H.; OHYAMA, T.; SATO, K.; KARAKI, H. Ca^{2+} -dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. **J. Pharmacol.**, v. 52, p. 509-512, 1990.
- PAIVA, L. F. A.; RAO, V. S.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffi* oleo-resin on experimental gastric ulcer in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 73-78, 1998.
- PALMER, J. B. & BARNES, P. J. Neuropeptides and airway smooth muscle function. **Am. Rev. Resp. Dis.**, v. 136, p. S50-S54, 1987.
- PALMER, J. B. & SAMPSON, A. P. Cholinergic and non-adrenergic inhibitory responses in bovine airway: distribution and functional association. **Am. Rev. Respi. Dis.**, v. 131, p. A282, 1985.
- PARK, K. M.; MAX, M. B.; ROBINOVITZ, E.; GRACELY, R. H.; BENNETT, G. J. Effects of intravenous ketamine, alfentanil or placebo on pain, pinprick hyperalgesia and allodynia produced by intradermal capsaicin in human subjects. **Pain**, v. 63, p. 163-172, 1995.
- PENDRY, I. D. Neuronal control of airways smooth muscle **Pharmac. Ther.** v. 57, p. 171-202, 1993.
- PEPYS, J. & HUTCHCROFT, B. J. Bronchial provocation test in etiology and analysis of asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 112, p. 829-859, 1975.
- PERNOW, B. Substance P. **Pharmacol. Rev.**, v. 35, n. 2, p. 85-141, 1983.
- PEROUTKA, S. J.; SNYDER, S. H. multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol. **Mol. Pharmacol.**, v. 16, p. 687-699, 1979.
- PERRY, N. S.; HOUGHTON, P. J.; THEOBALD A. E.; JENNER, P.; PERRY, E. K. *In-vitro* inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 52, n. 7, p. 895-902, 2000.
- PERRY, N. S.; HOUGHTON, P. J.; SAMPSON, J.; THEOBALD A. E.; HART, S.; LIS-BALCHIN, M.; HOULT, J. R.; EVANS, P.; JENNER, P.; MILLIGANS, S.; PERRY, E. K. *In-vitro* activity of *S. lavandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, n. 10, p. 1347-1356, 2001.

PIETRI, S.; MAURELLI, E.; DRIEU, K.; CULCASI, M. Cardioprotective and anti-oxidante effects of the terpenoid constituents of *Gingko biloba* extract (EGb 761). **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 29, n. 2, p. 733-742, 1997.

PINHO, F. V. S. A. **Efeito antinociceptivo do óleo essencial de *Alpinia zerumbet***. 2002. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas). Centro de Ciências da Saúde. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 11, p. 3294-3301, 2003.

POLAK, J. A. & BLOOM, S. R. Regulatory peptides and neuron-specific enolase in the respiratory tract of man and other mammals. **Exp. Lung Res.**, v. 3, p. 313-328, 1982.

POLOSA, R.; RENAUD, L.; CACCIOLA, R.; PROSPERINI, G.; CRIMI, N.; DJUKANOVIC, R. Sputum eosinophilia is more closely associated with airway responsiveness to bradykinin than methacholine in asthma. **Eur. Respir. J.**, v. 12, p. 551-556, 1998.

POOTER, H. L.; OMAR, M. N.; COOLSAET, B. A.; SCHAMP, N. M. The essential oil of greater galanga (*Alpinia galanga*) from Malaysia. **Phytochem.** v. 24, p. 93-96, 1985.

POZZI, E. Soberol and chronic bronchitis. **Arch. Monaldi Mal. Torace**, v. 44, p. 4-6, 1989.

PRASAIN, J. K.; TEZUKA, Y.; HASE, K.; BASNET, P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Inhibitory effect of diarylheptanoids on nitric oxide production in activated murine macrophages. **Biol. Pharm. Bull.** v. 21, n. 2, p. 371-374, 1998a.

PRASAIN, J. K.; LI, J. X.; TEZUKA, Y.; TANAKA, K.; BASNET, P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Calyxin H, epicalyxin H and blepharocalyxins A and B, novel diarylheptanoids from the seeds of *Alpinia blepharocalyx*. **J. Nat. Prod.** v. 61, n. 2, p. 212-216, 1998b.

PRITCHARD, K. & MARSTON, S. B. The Ca²⁺ sensitizing component of smooth muscle thin filaments: properties of regulatory factors that interact

- with caldesmon. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, p. 668-673, 1993.
- PRUDENTE, D.; PERINEAU, F.; BESSIERE, J. M.; MICHEL, G.; BRAVO, R. Chemical analysis, bacteriostatic and fungistatic properties of the essential oil of the atouman from Martinique (*Alpinia speciosa* K. Schum). **J. of Essent. Oil Res.**, v.5, n. 3, p. 255-264, 1993.
- QIAN, Y. & BOURREAU, J. P. Two distinct pathways for refilling Ca^{2+} store in permeabilized bovine trachealis muscle. **Life Sci.**, N. 64, p. 2049-2059, 1999.
- QUAST, U. Do the K^+ channel openers relax smooth muscle by opening K^+ channel? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 141, p. 332-337, 1993.
- RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase vascular endothelial cells. **Proc. Natl. Acad., USA.** v. 87, n. 24, p. 10043-10047, 1990.
- RAFFERTY, P.; LEWIS, P.; WHEELLEY, M. St. G.; HOLGATE, S. T. Terfenadine as a potent and specific H-1 histamine receptor antagonist on asthmatic airway. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 77, p. 155, 1986.
- RAMAN, A.; WEIR, U.; BLOOMFIELD, S. F. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermids* and *Propionibacterium acnes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 21, p. 242-245, 1995.
- RAND, T. H.; CRUIKSHANK, W.W.; CENTER, D. M.; WELLER, P. F. Human eosinophilis share with other CD^+ leukocytes responsiveness to lymphocyte chemoattractant factor. **FASEB. J.**; v. 4, p. A1699, 1990.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Sistema respiratório. In: _____ **Farmacologia.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997a. cap. 17, p. 280-291.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Transmissão colinérgica. In: _____. **Farmacologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997b. cap. 6, p. 91-114.
- RASMUSSEN, H.; TAKUWA, Y.; PARK, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. **FASEB J** v.1, p. 177-185, 1987.

- REEVER, C. M.; FERRARI-DILEO, G.; FLYNN, D. D. The M₅ (m₅) receptor subtype: fact or fiction? **Life Sci.**, v. 60, n. 13/14, p. 1105-1112, 1997.
- REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.
- REMBOLD, C. M. Eletromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BARANY, M. (ed). **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York: Academic Press. 1996, p. 227-239.
- RICHARDSON, J. B. & FERGUSON, C. C. Neuromuscular structure and function in the airways. **Fed. Proc.** v. 38, p. 202-208, 1979.
- RICHARDSON, J. B. Nerve supply to the lungs. **Am. Rev. Respir. Dis.** v. 119, n. 5, p. 785-802, 1979.
- ROLE, L.W. & BERG, D. K. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. **Neuron**, v. 16, p. 1077-1085, 1996.
- ROSS, H.M.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. Sistema respiratório. In: _____. **Histologia: texto e atlas**. 2. ed. São Paulo: Panamericana, 1993. cap. 18, p. 501-525.
- RUSSIN, W. A.; HOESLY, J. D.; ELSON, C. E.; TANNER, M. A.; GOULD, M. N. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 11, p. 2161-2164, 1989.
- SAID, S. I. & MUTT, V. A. Apeptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. **Scand. J. Lab. Invest. Suppl.** v. 107, p. 51-56, 1969.
- SAID, S. I. Effector actions: influence of neuropeptides on airway smooth muscle. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, n. 6, p. S52-S58, 1987.
- SAITO, M.; WEIN, J.; LEVIN, R. M. Biphasic response of the rabbit detrusor muscle to changing the extracellular concentrations of potassium and calcium. **Gen. Pharmac.**, v. 25, n. 6, p. 1101-1107, 1994.
- SANDERS, K. M. Eletrophysiology of dissociate gastrointestinal muscle cells. In: **Handbook of Physiology - Section 6. The Gastrointestinal System**. Waverly Press: Baltimore, MD. v. 6, 1989, p. 166-185.

McCAIG, D. J. & RODGER, I. W. Effects of leukotriene D₄ on the mechanical and electrical properties of guinea-pig isolated trachealis. **Br. J Pharmacol.** v. 94, n.3, p. 729-36, 1988.

SANDERS, K. M. & NORTHRUP, T. E. Prostaglandin synthesis by microsomes of circular and longitudinal gastrointestinal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 244, n.4, p. G442-448, 1983.

SANDERS, K. M. & PUBLICOVER, N. G. Excitation-contraction coupling in gastric muscles. **Dig. Dis. Sci.**, v. 39, v. 12, suppl. P. 69S-72S, 1994.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. Antiinflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guyanensis*. **Fitoterapia LXVIII** (1): 65-68, 1997a.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S.; SILVEIRA, E. R. The leaf essential oil of *Psidium guyanensis* offers protection against pentylentetrazole-induced seizures. **Planta med.**, v. 63, p. 133-135, 1997b.

SANTOS, F. A. & RAO, V. S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide presente in many plant essential oils. **Phytother Res.** v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000.

SANTOS, F. A. & RAO, V. S. 1,8-Cineol, a food flavoring agent, prevents ethanol-induced gastric injury in rats. **Dig. Dis. Sci** v. 46, n. 2, p. 331-337, 2001.

SANTOS, F. A.; SILVA, R. M.; TOME, A. R.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M.; TEIXEIRA, M. J.; DE FREITAS, L. A.; DE SOUZA, V. L. 1,8-Cineole protects against failure an *in vivo* murine model of endotoxemic shock. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, n. 4, p. 505-511, 2001.

SARIA, A. & LUNDBERG, J. M. Capsaicin pretreatment inhibits heat-induced oedema in the rat skin. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 323, n. 4, p. 341-342, 1983.

SARIA, A.; GAMSE, R.; PETERMANN, J.; FISCHER, J. A.; HEODORSSON-NORHEIM, E., LUNDBERG, J. M. Simultaneous release of several tachykinins and calcitronic gene-related peptide from rat spinal cord slices. **Neurosci. Lett.**, v. 63, p.310-314, 1986.

SARIA, A. & LUNDBERG, J. M. Capsaicin pretreatment inhibits heat-induced edema in the rat skin. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 323, n. 4, p. 341-342, 1983.

SARIA, A.; MARTLING, C. R.; YAN, Z.; THEODORSSON-NORHEIM, E.; GAMSE, R.; LUNDBERG, J. M. Release of multiple tachykinins from capsaicin-sensitive sensory nerves in the lung by bradykinin, histamine, dimethylphenyl piperazinium and vagal nerve stimulation muscle. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 137, n. 6, p. 1330-1335, 1988.

SCHIWINN, D. A. Adrenoceptors as models for G protein-coupled receptors: structure, function and regulation. **Br. J. Anaesth.**, v. 71, p. 77-85, 1993.

SEIDLER, N. W.; JONA, I.; VEHG, M.; MARTONOSI, A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 17816-17823, 1989.

SEIGLER, D. S. Terpenes and plant phylogeny. Apud DI STASI, L. C.: **Plantas Mediciniais: arte e ciência.** São Paulo: Ed. UNESP, 1995. p. 120-126.

SEKIZAWA, K.; TAMAOKI, J.; GRAF, P. D.; BASBAUM, C. B.; BORSON, D. B.; NADEL, J. A. Enkephalinase inhibitor potentiates mammalian tachykinin-induced in ferret trachea. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 237, p. 782-786, 1986.

SHARKEY, N. A.; HENNINGS, H.; YUSPA, S. H.; BLUMBERG, P. M. Comparison of octahydromerzein as protein kinase activators and as mouse skin tumor promoters. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 10, p. 1937-1941, 1989.

SHEPARD, E. G.; MALAN, L.; MACFARLANE, C. M.; MOUTON, W.; JOUBERT, J. R. Lung function and plasma levels of thromboxane B_2 , 6-ketoprostaglandins F_{1a} and b-thromboglobulin in antigen-induced asthma before and after indomethacin pretreatment. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 29, p. 459-470, 1985.

SHIMA, H. & BAUSTEIN M. P. Modulation of evoked contractions in rat arteries by ryanodine, thapsigargin and cyclopiazonic acid. **Circulation Res.** v. 70, p. 968-977, 1992.

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

SHOJI, N.; AUMEYAMA, A.; ASAKAWA, Y.; TAKEMOTO, T.; NOMOTO, K.; OHIZUZUMI, Y. Structural determination of nootkatol, a new sesquiterpene isolated from *Alpinia Oxyphylla* Miquel possessing calcium-antagonistic activity. **J. Pharmaceu. Scien.**, v. 73, n. 6, p. 843-844, 1984.

SILVERTHORN, D. U. Respiratory Physiology. In: _____ **Human Physiology: an integrated approach**. Austin, Prentice Hall, 1998, cap. 15, p. 474-513.

SIMÕES, R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, Ed. Univ do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2000.

SIMONE, D. A. & OCHOA, J. Early and late effects of prolonged topical capsaicin on cutaneous sensibility and neurogenic vasodilatation in humans. **Pain**. v. 47, p. 285-294, 1991.

SINGH, A. K.; VENGLARIK, C. J.; BRIDGES, R. J. Development of chloride channel modulators. **Kidney Int.**, v. 48, p. 985-993, 1995.

SITSAPERSAN, R.; McGARRY, S. J.; WILLIAMS A. J. Cyclic ADP-ribose competes with ATP for the adenine nucleotide binding site on the cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} -release channel. **Circ. Res.**, n. 75, p. 596-600, 1994.

SMALL, R. C. & FOSTER, R. W. Electrophysiology of the airway smooth muscle. In: **Asthma: basic mechanisms and clinical management**. Academic Press-London. 1990.

SMALL, R. C. & FOSTER, R. W. Airways smooth muscle: an overview of morphology, eletrophysiology and aspects of the pharmacology of contracion and relaxion. In **Asthma: clinical pharmacology and therapeutic progress**. ed. Kay, A. B. p. 101-113. London: Blackwell Scientific. 1986.

SMALL, R. C. Electrical slow waves and tone of guinea-pig isolated trachealis muscle: effects of drugs and temperature changes. **Br. J. Pharmacol.** v. 77, p. 45-54, 1982.

- SOBUE, K.; MURAMOTO, Y.; FUJITA, M.; KARIUCHI, S. Purification of a calmodulin-binding protein from chicken gizzard that interacts with F-actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 78, p. 5652-5655, 1981.
- SOLLEY, G. O.; GLEICH, G. J.; JORDAN, R. E.; SCHROETER, A. L. Late phase of immediate wheal and flare skin reaction—its dependence upon ige antibodies. *J. Clin. Invest.*, v. 58, n. 2, p. 408-420, 1976.
- SOLWAY, J. & LEFF, A. R. Sensory neuropeptides and airway function. *J. Appl. Physiol.*, v. 71, p. 2077-2087, 1991.
- SOMLYO, A. V. & SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 159, p. 129-145, 1968.
- SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ. Res.*, v. 57, p. 479-507, 1985.
- SOMLYO, A. P. & HIMPENS, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB. J.*, v. 3, 2266-2276, 1986.
- SOMLYO, A. P. & SOMLYO, A. V. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* v. 52, p. 857-874, 1990.
- SOMLYO, A. V.; HORIUTI K, D. R.; KITAZAWA T, SOMLYO A. P. Kinetics of Ca^{2+} -release and contraction induced by photolysis of caged D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate in smooth muscle. The effects of heparin, procaine and adenine nucleotides. *J. Biol Chem.*, v. 267, p. 22316-22322, 1992.
- SOMLYO, A. P. & SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, v. 372, p. 231-236, 1994.
- SOMLYO, A. P.; WU, X.; WALKER, L. A.; SOMLYO, A. V. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatase. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, v. 134, p. 201-234, 1999.
- STEPHENS, N. M. Airway smooth muscle. *Lung*. v. 179, p. 333-373, 2002.

SOUHRADA, M.; KLEIN, J. J.; BEREND, N.; SOUHRADA, J. F. Topographical differences in the physiological responses of canine airway smooth muscle. **Resp. Physiol.**, v. 52, p. 245-248, 1983.

SOUSA, P. J. C. **Estudos Farmacológicos do óleo essencial de *Mentha villosa* e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrointestinais de cobaia e pressão arterial de rato.** 1999. 204 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SOUSA, P. J. C.; MAGALHÃES, P. J. C.; LIMA, C. C.; OLIVEIRA, V. S. LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 787-791, 1997.

SPEDDING, M. & PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, p. 363-372, 1992.

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: SPERELAKIS, N., BANKS, R. O. **Physiol.**, Boston: Little-Brown, 1993. c. 15, p. 223-241.

SPINA, D. & PAGE, C. P. Pharmacology of airway irritability. **Current Opinion in Pharmacol.**, v. 2, p. 264-272, 2002.

STENNHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F.W. **Registry of mass spectral data.** J. Willey & Sons, New York, 1974.

STEPHENS, N. L. & SEOW, C. Y. Mechanical properties of smooth muscle. **Pro. Clin. Biol. Res.** v. 104, p. 331-336, 1990.

STEPHENS, N. L. Structure of airway smooth muscle. In: **Asthma: basic mechanisms and clinical management.** Academic Press, 1988

STHELE, H. & STHELE, M. **Flore agronomique des Antilles Françaises: Le Chevalier.** Basse-Terre. v. IX, p. 124-125, v. X, p. 50-51, 1958.

STICHER, F. D. & SMITH, R. M. Eugenol: some pharmacological observations. **J. Dental. Res.**, v. 50, p. 1531-1535, 1971.

STICHER, F. D. & SMITH, R. M. Eugenol: some pharmacological observations. **J. Dental. Res.**, v. 50, p. 1531-1535, 1971.

- STICHER, O. Quality of Ginkgo of preparations. **Planta Med.**, v. 59, n. 1, p. 2-11, 1993.
- STULL J. T.; HSU, L. C.; TANSEY, M. G.; DAMM, K. E. Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. **J. Biol. Chem.** V. 265, p. 16683-16690, 1990
- SUZUKY, H.; MORITA, K.; KURIYAMA, H. Innervation and properties of the smooth muscle of the dog trachea. **Jpn. J. Physiol.** v. 319, p. 379-392, 1976.
- SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. **Gen. Pharmacol.** v. 25, n. 2, p. 223-243, 1994.
- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptor and mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 51, n. 2, p. 159-211, 1999.
- TAKAHASHI, K.; HIWADA, K.; KOKUBU, T. Isolation and characterization of a 34.000-dalton calmodulin- and F-actin-binding protein from chicken gizzard smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 141, p. 20-26, 1986.
- TAKIZWA, T. & THURLBECK, W. M. Muscle and mucous gland size in the major bronchi of patients with chronic bronchitis, asma and asthmatic bronchitis. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 104, p. 331-336, 1971.
- TAMAOKI, J.; SEKIZAWA, K.; GRAF, P. D.; NADEL, J. A. Cholinergic neuromodulation by prostaglandin D₂ in a canine airway smooth muscle. **J. Appl. Physiol.**, v. 63, p. 1396-1400, 1987.
- TANAKA, C. & NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17, p. 551-564, 1994.
- TANG, D. C.; STULL, J. T.; KUBOTA, Y.; KAMM, K. E. Regulation of the calcium dependence of smooth muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, c. 267, p. 11839-11845, 1992.
- TANSERY, M. G.; WORD, R. A.; HIDAKA, H. *et al.* Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, 12511-12516, 1992.
- TAWAKA, S.; TAIRA, S.; KOBAMOTO, N.; ISHIHARA, M.; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5-

6dehydrokawain derivatives. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 60, n. 10, p. 1643-1645, 1996.

TENG, C. M.; HSU, S. Y.; LIN, C. H.; YU, S.M.; WANG, K.J.; LIN, M. H.; CHEN, C. F. Antiplatelet action of dehydrokawain derivatives isolated from *Alpinia speciosa* rhizoma. **Chin. J. Physiol.**, v. 33, p. 41-48, 1990.

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

TRABOULSI, A. F.; TAOUBI, K.; EL-HAJ, S.; BESSIERE J. M.; RAMMAL, S. Insecticidal properties of essential plant oil against the mosquito *Culex pipiens* molestus (Diptera: Culicidae). **Pest Manag Sci.** v. 58, n. 5, p. 491-495, 2002.

TRIGGLE, D. J. & SWAMY, V. C. Calcium antagonists. some chemical-pharmacologic aspsects. **Circ. Res.**, v. 52, 117-128, 1983.

TYRODE, M.V. The mode of action of some purgative salts. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v. 20, n. 205, 1910.

TZAKOU, O.; PITAROKILI, D.; CHINOU, I. B.; HARVALA, C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. **Planta Med.**, v. 67, n. 1, p. 81-83, 2001.

ULLMER, C.; BODDEKE, H.G.; SCHMUCK, K.; LUBBERT, H. 5-HT receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary endothelial cells, **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, n. 6, p. 1081-1088, 1996.

UNDEM, B. J. & KOLLARIK, M. Characterization of vanilloid receptor 1 antagonist iodo-resiniferatoxin on the afferent and efferent function of vagal sensory C-fibers. **Pharmacol. Rev.**, v. 303, n. 2, p. 716-722, 2002.

VAN DER VELDEN, V. H. & HULSMANN, A. R. Autonomic innervation of human airways: struture, function and pathophysiology in asthma. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, n. 3, p. 145-159, 1999.

VAN NIEUWSTADT, R. A.; HAJER, R.; BREUKINK, H. J. Autonomic innervation of the airways. **Vet. Q.**, v. 16, n. 2, p. 110-114, 1994.

VANDERLINDE, F. A. Ação hipotensora e outras atividades farmacológicas do extrato aquoso de *Alpinia speciosa* Schum (colônia).

1990. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Departamento de Farmacologia. Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

VANDERLINDE, F. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Atividade farmacológica de extrato de *Alpinia speciosa* Schum. In: 9º SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1986. Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: 1986. p. 36.

VANDERLINDE, F. A.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Efeitos cardiovasculares do extrato aquoso de *Alpinia speciosa* Schum. In: 10º SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1988. São Paulo. **Resumos...** São Paulo: 1988. p. 20.

VERONESI, B.; CARTER, J. D.; DEVLIN, R. B.; SIMON, S. A.; OORTGIESEN, M. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. **Neuropeptides**. v. 33, n. 4, p. 447-456, 1999.

VERONESI, B.; OORTGIESEN, M.; ROLY, J.; CARTER, J. D.; GAVETT, S. H.; SIMON, S. A. Vanilloid (capsaicin) receptors influence inflammatory sensitivity in response to particulate matter. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 15, n. 169, p. 66-76, 2000.

VIBERT, P.; CRAIG, R.; LEHMAN, W. Three-dimensional reconstruction of caldesmon-containing smooth muscle thin filaments. **J. Cell. Biol.** v. 123, p. 313-321, 1993.

VILA, R.; VALENZUELA, L.; BELLO, H.; CANIGUERAL, S.; MONTES, M.; ADZET, T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Med.**, v. 65, n. 2, p. 178-179, 1999.

WATTS, S.W., COX, D.A. *et al.* Contractile serotonin-2a receptor signal transduction in guinea-pig trachea: importance of protein kinase C and extracellular calcium but not phosphoinositide hydrolysis. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 271, n.2, p. 832-844. 1994.

WEBER, A. & HERZ, R. The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. **J. General Physiol.**, v. 52, p. 750-759, 1968.

WEISS, G. B.; PANG, I. H.; GOODMAN, F. R. Relationship between Ca^{2+} movements, different calcium components and responses to

acetylcholine and potassium in tracheal smooth muscle. **J. Pharmac. Exp. Ther.** v. 233, p. 389-394, 1985.-

WEISSBERG, P. L.; LITTLE, P. J.; BOBIK, A. Spontaneous oscillations in cytoplasmic calcium concentration in vascular smooth muscle. **Am. J. Physiol.** v. 256, n. 25, p. 951-954, 1989.

WIDDICOMBE, J.G. Regulation of tracheobronchial smooth muscle. **Physiol. Rev.** v. 43, 1963.

WILLIAMS, D. A. & FAY, F. S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin 2. **Am. J. Physiol.**, 250 (5 Pt1), C779-791, 1986.

WRIGHT, C. D.; MULSCH, A.; BUSSE, R.; OSSWALD, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 160, n. 2, p. 813-819, 1989.

YAMAHARA, J.; YAMADA, T.; KIMURA, H.; SAWADA, T.; FUJIMURA, H. Biologically active principles of crude drugs. II antiallergic principles. **J. Pharmacobiodyn.**, v. 5, p. 921-929, 1982.

YAMAKAGE, M.; LINDEMAN, K. S.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Intracellular pH regulates voltage-dependent Ca^{2+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **Am. J. Physiol.** v. 268, p.642-646, 1995 .

YANG, X. & EILERMAN, R. G. Pungent principal of *Alpinia galanga* L. Swartz and its applications. **J. Agric. Food Chem.** v. 47, n. 4, p. 1657-1662, 1999.

YANG, Y.; KINOSHITA, K.; KOYAMA, K.; TAKAHASHI, K.; TAI, T.; NUNOURA, Y.; WATANABE, K. Two novel anti-emetic principles of *Alpinia katsumadai*. **J. Nat. Prod.** v. 62, n. 12, p. 1672-1674, 1999.

YANAGISAWA, T. & OKADA, Y. KCl depolarization increases Ca^{2+} sensitivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. **A. J. Physiol.** v. 267, p .614-621, 1994.

YU, D. Y. C.; GALANT, S. P.; GOLD, W. M. Inhibition of antigen-induced bronchoconstriction by atropine in asthmatic patients. **J. Appl. Physiol.**, v. 32, p. 832 -843, 1972.

YUAN, L.; BURCHER, E.; NAIL, B. Tachykinin receptors and non-cholinergic bronchoconstriction in the anaesthetized guinea-pig. **Clin. Exp. Physiol.**, v. 23, n. 2, p. 119-124, 1996.

ZAAGSMA, J.; VAN AMSTERDAM, R. G.; BROUWER, F.; VAN DER HEIJDEN, P. J.; VAN DER SCHARR, M. W.; VERWEY, W. M.; VEENSTRA, A. Adrenergic control of airway function. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 136, p.45-5, 1987.

ZEGARRA-MORAN, O.; SACCO, O.; ROMANO, L.; ROSSI, G. A.; GALIETTA, L. J. V. Cl^- currents activated by extracellular nucleotides in human bronchial cells. **J. Membr. Biol.**, v. 156, n. p. 297-305, 1997.

ZENG, X-P. & BURCHER, E. Use of selective antagonists for further characterization of tachykinins NK-2, NK-1 and possible "septide-selective" receptors in guinea pig bronchus. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 270, n. 3, p. 1295-1300, 1994.

ZIN, W. A. & ROCCO, P. R. M. Organização morfofuncional do sistema respiratório. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Juanabara Koogan, 1999. p. 499-502.

ZYGMUNT, P. M.; LARSSON, B.; STERNER, O.; VINGE, E.; HOGESTATT, E. D. Calcium antagonistic properties of the sesquiterpene T-canadinol and related substances: structure activity studies. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 73, n. 1, p. 3-9, 1993.