

C 543400  
R 1149598  
03/10/99

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Faculdade de Medicina

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 1149598	
03 103 199	

Estudos farmacológicos do Óleo Essencial de *Mentha x villosa* e seu Principal Constituinte, Óxido de Piperitenona, em Músculos Lisos Gastrointestinais de Cobaia e Pressão Arterial de Rato

Pergentino José da Cunha Sousa

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará.

Orientador:

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

F006  
615-3287  
26922  
1999

FC-00006215-1

Fortaleza

1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
--

S698e Sousa, Pergentino José da Cunha

Estudos farmacológicos do óleo essencial de *Mentha x villosa* e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrointestinais de cobaia e pressão arterial de rato/ Pergentino José da Cunha Sousa. – Fortaleza, 1999.

204 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

1. Músculo liso gastrointestinal. 2. Óleo essencial.  
3. *Mentha x villosa*. 4. Óxido de piperitenona. 5. Espasmolítico.  
6. Hipotensor. 7. Antidiarreico. 8. Antinocicepção. 9. Toxicidade subaguda.

CDD 615.73

Tese submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade. Parte desta Tese foi publicada na revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research (1997) 30:787-791.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Pergentino José da Cunha Sousa

TESE DEFENDIDA EM 18/06/1999.

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso (Orientador)

Prof. Titular da UECE

Prof. Dr. David Neil Criddle

Prof. Adjunto da UECE

Prof. Dr. Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Prof. Adjunto da UFPE

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Prof. Adjunto da UFC

Prof. Dr. Francisco Ruy Capaz

Prof. Adjunto da UFC



Aos meus filhos, Rodrigo e Rafael, pelos mais longos  
momentos de minha ausência em suas vidas.



À Vilma, pela inestimável ajuda  
sem a qual a realização deste trabalho  
seria uma tarefa muito mais difícil.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, pela minha formação moral, cristã e ética;

Ao prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso pela orientação, ajuda, estímulo e empolgação a cada etapa vencida na realização deste trabalho;

Aos Professores David Neil Criddle, Vietla S. Rao, pelas sugestões e críticas que em muito ajudaram na escrita deste trabalho;

À Prof. Dra. Gisela C. Camarão, pelo empenho na aquisição de animais de experimentação e equipamentos na fase final deste trabalho;

À Dra. Maria Artemiza P. A. Cardoso, José Sobrinho Cavalcante, Haroldo P. Ferreira e Bento Francisco de Oliveira pela carinhosa atenção sempre que necessitei dos animais que estavam sob suas guardas;

À Dra. Andreлина Noronha Coelho-de-Souza e família, por terem me recebido em sua casa como um membro da família e, pela inestimável ajuda científica na realização deste trabalho;

Ao Laboratório Central do Hospital Universitário, em particular à Dra. Zilmar Fontenele e Silva, Dra. Gianna Mendes Lima e Dr. Nilton César Weyne da Cunha, pela colaboração na realização dos exames hematológicos e bioquímicos.

Aos colegas de curso de Pós-Graduação, Pedro Jorge C. Magalhães, Crystianne C. Lima, Henrique C. Scarparo, Paulo P. Lavor, Manoel Cláudio Patrocínio,

Aline Alice C. Albuquerque, Angelina Medeiros e Juvênia B. Fontenele pelo  
saudável convívio e amizade firmada ao longo desses anos;

Ao Prof. Dr. Sérgio Horta Matos pelo fornecimento do material botânico;

Aos Profs. Francisco José de Abreu Matos e Maria Iracema Lacerda Machado;

A bibliotecária Eliene Maria Vieira de Moura pela revisão bibliográfica;

Ao Leonardo César Oliveira e Cybele F. B. Medeiros pela ajuda em  
experimentos;

Ao Francisco Evanir G. de Lima que, mais que um técnico de laboratório,  
tornou-se um irmão;

À Nisia R. de Souza, Ana Eclésia M. Rodrigues e Maria Vilanir R. Bastos  
pelas incontáveis ajudas durante esses anos;

Ao Samuel Nystron C. de Araújo e Paulo Sérgio C. Oliveira,  
pelos momentos de descontração;

À Silvia M. A. Lima, Joana B. Moura e Marta Célia A. Freitas,  
pela inestimável ajuda nas respectivas secretarias;

À UFPa e em especial ao Departamento de Farmácia desta Universidade por  
terem permitido o meu afastamento para realização deste curso.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro

A Deus por ter me conduzido até aqui;

**A todos o meu eterno agradecimento.**

Jamais se atinge a meta que não esteja  
bem definida na mente  
*-Norman Vincent Peale*

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1- INTRODUÇÃO	25
1.1- IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS AROMÁTICAS	25
1.2- ÓLEOS ESSENCIAIS	26
1.2.1- <i>Mentha x villosa</i>	39
1.3- ANATOMIA E FISILOGIA DO MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL	34
1.4- ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO EM MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL	43
1.5- LAXATIVOS ESTIMULANTES	57
1.6- FISIOPATOLOGIA DA DOR	58
1.7- PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)	66
1.8- OBJETIVOS	68
1.8.1- GERAIS	68
1.8.2- ESPECÍFICOS	69
2- MATERIAIS E MÉTODOS	70
2.1- ISOLAMENTO E CONSTITUIÇÃO DO OEMV E OP	70
2.2- SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS	71
2.3- DROGAS	71
2.4- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	72
2.5- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	72

2.6- EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	77
2.6.1- Determinação da DL <sub>50</sub>	77
2.6.2- Toxicidade subaguda	77
2.6.3- Atividade antinociceptiva	78
2.6.3.1- Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético	78
2.6.3.2- Teste da formalina	78
2.6.3.3- Teste da placa quente	79
2.6.4- Pressão arterial média	80
2.6.4.1- Frequências cardíaca e respiratória, temperatura retal, parâmetros hematológicos e gasometria	81
2.6.5- Trânsito intestinal e diarreia	82
2.7- ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
3- RESULTADOS	84
3.1- EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	84
3.1.1- Efeito intrínseco (efeito próprio) do OEMV e de seu principal constituinte, OP	84
3.1.1.1- Efeitos do OEMV e OP sobre o tônus basal e a motilidade de músculos lisos gastrointestinais	84
3.1.1.2- Efeitos do OEMV e OP sobre o potencial transmembrana (E <sub>m</sub> )	94
3.1.2- Efeitos do OEMV e OP sobre o sistema cardiovascular e gasometria de ratos anestesiados	94
3.1.3- Estudo do mecanismo de ação do OEMV e OP	101
3.1.3.1- Participação do sistema nervoso	101
3.1.4- Efeitos antiespasmódicos do OEMV e OP e estudo do mecanismo de ação	104

3.1.4.1-	Efeitos do OEMV e OP na contração induzida por 60 mM de K <sup>+</sup> em íleo de cobaia	104
3.1.4.2-	Efeitos do OEMV e OP na contratura induzida por TEA em íleo de cobaia	104
3.1.4.3-	Efeitos do OEMV e OP sobre as respostas contráteis induzidas por ACh e HA em íleo de cobaia	109
3.1.4.4-	Efeitos do OEMV e OP sobre as contrações induzidas por ACh em meio sem cálcio e contendo EGTA	111
3.1.4.5-	Efeitos do OEMV e OP sobre as contrações induzidas por ACh em solução nutritora de Tyrode normal contendo NIF	111
3.1.4.6-	Efeito do OP sobre os vasos da circulação mesentérica de ratos contraídos com 60 mM de K <sup>+</sup>	114
3.1.4.7-	Estudo dos efeitos do OEMV e OP em aorta isolada de cobaia	116
3.1.4.7.1-	Efeitos do OEMV e OP na reversão da contratura induzida por 60 mM de K <sup>+</sup>	116
3.1.4.7.2-	Efeitos do OEMV e OP na reversão da contratura induzida pelo PDB	116
3.2-	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	120
3.2.1-	Experimentos realizados com camundongos	120
3.2.1.1-	Efeitos do OEMV e OP sobre o trânsito intestinal de camundongos	120
3.2.1.2-	Efeitos do OEMV e OP sobre a diarreia	

(peso em gramas) induzida pelo OR em camundongos	122
3.2.1.3- Estudo da atividade antinociceptiva do OEMV e OP	123
3.2.1.3.1- Efeitos do OEMV e OP sobre o estímulo nociceptivo induzido pela placa quente	123
3.2.1.3.2- Efeitos do OEMV e OP sobre o estímulo nociceptivo induzido pelo ácido acético	125
3.2.1.3.3- Efeitos do OEMV e OP sobre o estímulo nociceptivo induzido pela formalina	125
3.2.1.4- Estudos dos efeitos tóxicos do OEMV e OP em camundongos e ratos	129
3.2.1.4.1- Determinação da DL <sub>50</sub> dos animais tratados com OEMV e OP	129
3.2.1.4.2- Estudo da toxicidade sub-aguda do OEMV e OP em ratos de ambos os sexos	132
<b>4- DISCUSSÃO</b>	<b>139</b>
4.1 EFEITO DEPRESSOR DA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO	139
4.1.1 MECANISMO DE AÇÃO	139
4.1.2 ESPECIFICIDADE NA AÇÃO SOBRE O MÚSCULO LISO	145
4.1.3 ESTUDOS RELACIONADOS	148
4.2 EFEITOS SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL “IN VIVO”	149
4.3 EFEITO ANALGÉSICO	152

4.4 EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR	153
4.5 TOXICIDADE	154
4.6 RELEVÂNCIA GERAL DO ESTUDO	155
5- CONCLUSÕES	156
SUMMARY	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- *Mentha x villosa* Hudson (fotografia) 32
- Figura 2 - Estrutura química do óxido de piperitenona. 33
- Figura 3- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o tônus basal das musculaturas longitudinal e circular do íleo. 87
- Figura 4- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre o tônus basal das musculaturas longitudinal, circular e esfíncter pilórico do estômago de cobaia. 88
- Figura 5- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre a amplitude das movimentações espontâneas de diversos músculos gastrointestinais de cobaia. 90
- Figura 6- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre a frequência das movimentações de diversos músculos gastrointestinais de cobaia. 92
- Figura 7- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos anestesiados e tempo de recuperação deste efeito. 96

- Figura 8- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre as frequências cardíacas e respiratórias e sobre o pH sanguíneo e hematócrito de ratos anestesiados. 99
- Figura 9- Relaxamento do íleo isolado de cobaia induzido pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na presença de tetrodotoxina (TTX). 103
- Figura 10- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e do óxido de piperitenona (OP) sobre as contrações induzidas por 60 mM de K<sup>+</sup> em íleo isolado de cobaia. 105
- Figura 11- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e do óxido de piperitenona (OP) sobre as contraturas induzidas por 60 mM de K<sup>+</sup> em íleo isolado de cobaia. 106
- Figura 12- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e do óxido de piperitenona (OP) sobre a contratura induzida por tetraetilamônio (TEA) 3-5 mM em íleo isolado de cobaia. 108
- Figura 13- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e do óxido de piperitenona (OP) sobre as contrações induzidas pela acetilcolina (ACh) em íleo isolado de cobaia. 110

- Figura 14- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e do óxido de piperitenona (OP) sobre as contrações induzidas  
contrações induzidas pela HA em íleo isolado de cobaia. 112
- Figura 15- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa*  
(OEMV) e óxido de piperitenona (OP) nas contrações  
induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em íleo isolado de  
cobaia em meio contendo  $0Ca^{2+}$  mais EGTA 0,2 mM. 113
- Figura 16- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa*  
(OEMV) e óxido de piperitenona (OP) nas contrações  
induzidas por ACh (60  $\mu$ M) na presença de nifedipina  
(0,3  $\mu$ g/ml) em íleo isolado de cobaia. 115
- Figura 17- Efeito do óxido de piperitenona (OP)  
sobre os vasos da circulação mesentérica de ratos  
perfundidos com solução nutritora contraturante. 117
- Figura 18- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa*  
(OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na contratura  
induzida por 60 mM de  $K^+$  em aorta de cobaia. 118
- Figura 19 - Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa*  
(OEMV) e óxido de peperitenona (OP) na contração  
induzida pelo forbol dibutirato (PDB) em aorta de cobaia. 119

- Figura 20- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o trânsito intestinal (a e b) de camundongos. 121
- Figura 21- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (OR) em camundongos. 124
- Figura 22- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo térmico ( $50 \pm 5$  °C) induzido em camundongos. 126
- Figura 23- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos. 128
- Figura 24- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos. 130

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o tônus basal e sobre a amplitude e sobre a frequência dos movimentos rítmicos dos músculos lisos isolados intestinal e gástrico de cobaia. 85
- Tabela 2. Dependência do efeito (variável dependente) do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) em relação a concentração (variável independente). Método de regressão linear para efeito em função do log. da dose (efeito =  $\alpha \cdot [\log(\text{concentração})] + \beta$ ;  $\alpha$ =coeficiente angular,  $\beta$ =coeficiente linear). 93
- Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) no potencial transmembrana ( $E_m$ ) de células de íleo de cobaia. 95
- Tabela 4- Tempo de recuperação em segundos de 50% e 80% do efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na pressão arterial média (PAM) de ratos. 98
- Tabela 5. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre parâmetros sanguíneos relacionados no transporte de gases e a regulação do pH em ratos anestesiados. 100

- Tabela 6. Concentrações inibitórias para produção de 50 % de cada de cada efeito (CI<sub>50</sub>) do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) em ileo de cobaia. 107
- Tabela 7. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo térmico (50 ± 5°C) induzido em camundongos. 127
- Tabela 8. Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo induzido pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na nocicepção induzida por formalina em camundongos. 131
- Tabela 9. Ganho de peso corporal de ratos de ambos os sexos, agrupados ou separados por sexo, ao fim de 30 dias de tratamento com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP). 133
- Tabela 10. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) 55 e 110 mg/kg/dia, durante 30 dias. 135
- Tabela 11. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óxido de piperitenona (OP) 40 e 80 mg/kg/dia, durante 30 dias. 136

Tabela 12. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) 55 e 110 mg/kg/dia, durante 30 dias. 137

Tabela 13. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óxido de piperitenona (OP) 40 e 80 mg/kg/dia, durante 30 dias. 138

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
$[Ca^{2+}]_i$	Concentração intracelular de cálcio
0Ca <sup>2+</sup>	Solução de Tyrode onde não fora adicionado o CaCl <sub>2</sub>
AA	Ácido aracdônico
ACh	Acetilcolina
AEC	Acoplamento excitação-contração
AT	Atropina
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para se atingir 50% de resposta
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CI <sub>50</sub>	Concentração efetiva para bloquear 50% da resposta
CICR	Liberação de cálcio induzida por cálcio
CPA	Ácido ciclopiazônico
DAG	Diacilglicerol
DIDS	4-4'-diisotiocianato estilbeno-2-2'-ácido dissulfônico
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% dos animais tratados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Débito sistólico
EB	Excesso de base
E <sub>m</sub>	Potencial transmembrana
EGTA	Ácido etilenoglicol bis (b-aminoetil éter N,N,N',N'-tetracético)
EP	Epinefrina

<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FR</b>	Frequência respiratória
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HA</b>	Histamina
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>HEX</b>	Hexametônio
<b>IICR</b>	Liberação de cálcio induzida por IP <sub>3</sub>
<b>ILGF</b>	Fator de crescimento insulina símile
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de inositol
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>MLC</b>	Cadeia leve de miosina
<b>MLC<sub>20</sub></b>	Cadeia leve de miosina 20 kDa
<b>MLCK</b>	Quinase da cadeia leve de miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase da cadeia leve de miosina
<b>NANC</b>	Sinapses não adrenérgicas, não colinérgicas
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NIF</b>	Nifedipina
<b>OEMV</b>	Óleo essencial de <i>Mentha x villosa</i>
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>OP</b>	Óxido de piperitenona
<b>OR</b>	Óleo de rícino
<b>PAM</b>	Pressão arterial média
<b>pCO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de CO <sub>2</sub>
<b>PDB</b>	Dibutirato de forbol
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina da série E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina da série F <sub>2α</sub>
<b>PKC</b>	Proteína quinase C

<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>pO<sub>2</sub></b>	Pressão parcial de O <sub>2</sub>
<b>RS</b>	Retículo sarcoplasmático
<b>RVP</b>	Resistência vascular periférica
<b>Sat. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Saturação de HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>Sat. O<sub>2</sub></b>	Saturação de O <sub>2</sub>
<b>SITS</b>	4-acetamido-4'-isotiocianato estilbeno 2-2'-ácido dissulfônico
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNE</b>	Sistema nervoso entérico
<b>TEA</b>	Tetraetilamônio
<b>TCO<sub>2</sub></b>	CO <sub>2</sub> total
<b>TGO</b>	Transaminase glutâmico-oxalacética
<b>TGP</b>	Transaminase glutâmico-pirúvica
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TTX</b>	Tetrodotoxina
<b>T<sub>1/2</sub></b>	Tempo para se atingir 50% do relaxamento total
<b>T<sub>50</sub> e T<sub>80</sub></b>	Tempo para recuperação de 50% e 80% do efeito
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio

## RESUMO

O óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) induziu relaxamento do tônus basal do esfíncter pilórico, músculos circular e longitudinal gástricos e ileais. Óxido de piperitenona (OP), principal constituinte do OEMV relaxou o músculo longitudinal do íleo. De uma maneira geral OEMV bloqueou também a movimentação espontânea nessas preparações e nesse efeito foi menos potente do que sobre o tônus basal. O relaxamento induzido por OEMV e OP no íleo, não foi alterado por TTX, atropina ou hexametônio. Contrações induzidas por acetilcolina, HA e 60 mM de  $K^+$  ( $K_{60}$ ) foram bloqueadas por OEMV e OP. Estas substâncias aumentaram a frequência e a massa de evacuações da diarreia induzida pelo óleo de rícino na primeira hora. Contraturas induzidas por  $K_{60}$  e tetraetilamônio em íleo e  $K_{60}$  e dibutirato de forbol em aorta de cobaia também foram bloqueadas. OEMV e OP somente ligeiramente hiperpolarizaram o potencial transmembrana ( $E_m$ ) em 5 e 60 mM de  $K^+$ , uma ação improvável de ser importante funcionalmente. OEMV e OP bloquearam os componentes da resposta da acetilcolina que não são sensíveis a nifedipina ou a soluções sem cálcio. OEMV e OP diminuíram a pressão arterial média sem alterações do pH, hematócrito ou gasometria. OEMV e OP induziram analgesia. OEMV e OP apresentaram baixa toxicidade no estudo de toxicidade subaguda. Concluindo, OEMV e OP demonstraram atividade farmacológica cuja a potencia variou entre as várias preparações e que foi coerente com o uso da *Mentha x villosa* em medicina popular.

## 1 - INTRODUÇÃO:

### 1.1- IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS AROMÁTICAS.

A medicina aromática surgiu das sombras dos templos esfumados do Egito - o berço da medicina, perfumaria e farmácia - há mais de seis mil anos. Ela espalhou-se para Israel, Grécia, Roma e todo o mundo mediterrâneo e foi muito importante durante séculos. Com o advento da ciência moderna, no século XIX, houve o declínio de todas as formas de terapia vegetal em função da produção, em laboratório, de drogas como a penicilina, aspirina, etc. O uso abusivo de muitas dessas drogas fez com que surgissem efeitos indesejáveis como resistência bacteriana, dependência medicamentosa e muitos outros. Nos dias atuais, a aromaterapia está sendo novamente expandida na Europa, principalmente na França (LAVABRE, 1993).

Na Índia a aromaterapia nunca morreu. Com mais de dez mil anos de prática contínua, a medicina Ayurvédica é a mais antiga forma de prática médica. Os Vedas, o livro sagrado da Índia e um dos mais antigos que se tem notícia, menciona mais de setecentos produtos diferentes, como a canela, o espicanardo, o coentro, o gengibre, a mirra e o sândalo. Os Vedas codifica os usos dos perfumes e substâncias aromáticas para fins litúrgicos e terapêuticos (LAVABRE, 1993).

O estudo das plantas odoríferas do nordeste brasileiro resultou na descoberta de vários óleos essenciais de potencial importância econômica. Entre eles encontramos aqueles que são matérias-primas dotadas de propriedades aromatizantes, antissépticas e farmacológicas (CRAVEIRO et al., 1981).

## 1.2- ÓLEOS ESSENCIAIS

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais frequente a destilação por arraste em vapor d’água (CRAVEIRO et al., 1981).

Os óleos essenciais são encontrados em várias plantas e são abundantes especialmente nas labiadas, mirtáceas, coníferas, rutáceas, lauráceas e umbelíferas. Encontram-se na forma de pequenas gotas entre as células, onde agem como hormônios, reguladores e catalisadores. Nas plantas, os óleos essenciais tem por função protege-las de doenças e parasitas, atrair insetos polinizadores e, ajuda-las a se adaptar ao meio ambiente (LAVABRE, 1993).

Os óleos essenciais são princípios farmacologicamente ativos. Quimicamente constituem uma combinação de terpenos, sesquiterpenos, fenóis, aldeídos, álcoois, ácidos, ésteres, cetonas, nitrogênio e enxofre (MATOS & FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993). Devido à complexidade de sua composição química os óleos essenciais apresentam uma diversidade de ações farmacológicas para as quais tem crescido o interesse vislumbrando o desenvolvimento de novas drogas.

Os óleos essenciais apresentam uma grande importância econômica sendo largamente utilizados na indústria como aromatizantes (FREISE, 1935; JACOBS, 1948 e 1973; LE MOAN, 1973; CRAVEIRO et al., 1977; LE BOURHIS, 1968; 1970 e 1973; ITOKAWA et al., 1980; 1981a e b; 1985; 1987 e 1988); em

perfumaria, na composição de sabões, desinfetantes e cosméticos em geral; na preparação de alimentos como doces caseiros, licores, bebidas aromáticas e refrescantes e aguardente de cana. No ano de 1978 o Brasil importou próximo de quarenta e cinco milhões de dólares referente a 140 tipos de mercadorias relacionadas com óleos essenciais e seus derivados. Nove itens destas importações alcançaram valores acima de um milhão de dólares, ou sejam: canela, cravo da Índia e cominho entre as plantas aromáticas; óleos essenciais de menta, de pinho e de pequenos grãos, misturas odoríferas para perfumaria e alimentação. Os sucedâneos sintéticos derivados do petróleo por serem mais baratos fizeram com que houvesse uma redução significativa do uso de óleos essenciais (CRAVEIRO et al., 1981). Óleos essenciais, bem como as plantas medicinais aromáticas das quais eles são extraídos são utilizados na medicina popular, na forma de chás e infusatos, como sedativos, estomáquicos, antiespasmódicos, antidiarreicos (FREISE, 1935; ITOKAWA et al., 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994; COELHO-DE-SOUZA et al., 1997 e 1998; MAGALHÃES et al., 1998), antiparasitários, antimicrobianos, analgésicos, diuréticos e hipotensores (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), antimaláricos (KLAYMAN, 1985), anti-hemorroidários (PRUDENT et al., 1993), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989) e no tratamento de rinite alérgica (BEZERRA, 1994). Além destes usos os óleos essenciais também são importantes na ecologia e na agricultura por terem odor similar àquele de atrativos de insetos (MARCUS & LICHTENSTEIN, 1979).

O acúmulo de óleos essenciais em certas Labiadas está associada com a presença de estruturas secretórias altamente especializadas conhecidas como tricomonas glandulares que estão localizadas primariamente sobre folhas e cálices (LAWRENCE, 1992).

Óleos essenciais podem ser utilizados terapêuticamente (SHUBINA et al., 1990) e muitos dos seus componentes apresentam propriedades farmacológicas sendo utilizados como antibacterianos (BOSE et al., 1949), analgésicos, sedativos, estimulantes e estomáquicos.

No Laboratório de Eletrofisiologia da UFC vários trabalhos vem sendo publicados acerca dos efeitos farmacológicos de óleos essenciais do Estado do Ceará. Em músculo sartório de sapo o eugenol promove contrações que podem ser causadas primariamente por liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) e secundariamente por um mecanismo relacionado a presença de alguns cátions divalentes no espaço extracelular (LEAL-CARDOSO et al., 1994). Um análogo do eugenol, o benzileugenol, bloqueia as contrações induzidas pelo eugenol por uma ação específica (LEAL-CARDOSO et al., 1988).

Estudos dos efeitos do óleo essencial de *Croton zehntneri* (OECz) e de seus principais constituintes sobre músculos esqueléticos de sapo e rato sugerem que estas substâncias podem ter dois sítios de ação sobre as fibras musculares: a membrana pós-juncional, por bloqueio da transmissão neuromuscular, e o RS por aumentar o cálcio mioplasmático (ALBUQUERQUE et al., 1995).

FOGAÇA et al. (1997), ao estudarem os efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre o músculo esquelético de sapo, sugeriram que o OEMV em uma escala de 1-6 mg/ml induz contração através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS enquanto concentrações menores (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) bloqueiam as respostas induzidas por  $\text{K}^+$  e potencializam as respostas induzidas pela cafeína.

COELHO-DE-SOUZA et al., (1997) mostraram que no músculo liso de íleo de cobaia o óleo essencial de *Croton zehntneri* e seu principal constituinte, estragol, apresentam efeito antiespasmódico. Este efeito, presente no OECz, pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao estragol. Sobre a contratilidade de vários outros tipos de músculos lisos o OECz exerce efeitos modulatórios diferenciados e, sobre o músculo liso ileal o OECz parece exercer um efeito seletivo em relaxar esta preparação (COELHO-DE-SOUZA et al., 1998).

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando o óleo essencial de *Croton nepetaefolius* (OECn) e seus constituintes cineol, metileugenol e terpineol mostraram que o OECn possui propriedades antiespasmódica e relaxante intestinal (MAGALHÃES et al., 1998).

### 1.2.1- *Mentha x villosa*

A família Labiatae possui próximo de 200 gêneros e se acredita que 40 por cento deles possuem propriedades aromáticas (LAWRENCE, 1992). No Brasil existem registros da existência de 20 gêneros e 300 espécies vegetais dessa família distribuída em todo território nacional (BRITO, 1983).

A planta *Mentha x villosa* Hudson, geralmente relatada na literatura como *M.crispa* ou *M.rotundifolia*, pertence a família Labiatae e é conhecida popularmente como hortelã-rasteira, hortelã-da-folha-miúda e hortelã-de-panela (MATOS, 1991; MATOS, 1994). A identificação feita pelo Dr. R. Harley, do

Royal Botanic Garden, Kew (U. K.) mostra que a *Mentha x villosa* é um híbrido da *Mentha spicata* e *Mentha suaveolens*.

O nome do gênero *Mentha* vem do nome grego Mintha, filha de Cocylus que, segundo os poetas foi transformada nesta planta. A *Mentha longifolia* é originária da região Mediterrânea e parte da Ásia, estando atualmente distribuída em quase todo o mundo principalmente na região temperada (HARLEY, 1973).

Muitas espécies de *Mentha* são usadas na medicina popular de todo o mundo. O óleo essencial de *Mentha x piperita* (OEMp), cujo principal constituinte é o mentol, é de grande uso. O OEMp foi estudado do ponto de vista farmacológico e demonstrou um efeito espasmolítico no músculo liso intestinal cujo mecanismo de ação parece ser predominantemente devido ao bloqueio dos canais de  $Ca^{2+}$  da membrana citoplasmática (HILLS & AARONSON, 1991).

No Nordeste do Brasil a *Mentha x villosa* é amplamente usada não somente na medicina popular mas também na indústria fitoterapêutica.

*Mentha x villosa* é uma planta herbácea, rasteira, com raiz fibrosa, caule avermelhado, ereto, ramoso, com folhas aromáticas variando de 2-5 cm de tamanho e pequeno pecíolo de 2-3 mm que permitem diferencia-la de outros tipos de hortelã-rasteira (MATOS, 1994) (Fig.1).

As folhas de *Mentha x villosa* são usadas na cozinha caseira como condimento, e na medicina popular como estomáquico, ansiolítico, e para o tratamento de cólica menstrual e diarreia sanguinolenta (MATOS, 1994). Devido sua ação antiparasitária (SANTANA et al., 1992), suas folhas são também muito

utilizadas e no tratamento de amebíase, giardíase e tricomoníase (BORBA et al., 1990a e b; BORBA & MELO, 1988; BORBA et al., 1991).

O principal constituinte da *Mentha x villosa* é o óxido de piperitenona (OP) (Fig. 2). O OP, denominado anteriormente de rotundifolona (ALENCASTRO et al., 1965), é uma cetona monoterpênica de peso molecular igual a 166,219 g (BUCKINGHAM, 1994). Nas diversas espécies de *Mentha* a percentagem de OP variou de 11-81% (HARLEY & REYNOLDS, 1992).



**Fig. 1- *Mentha x villosa* Hudson (fotografia).**

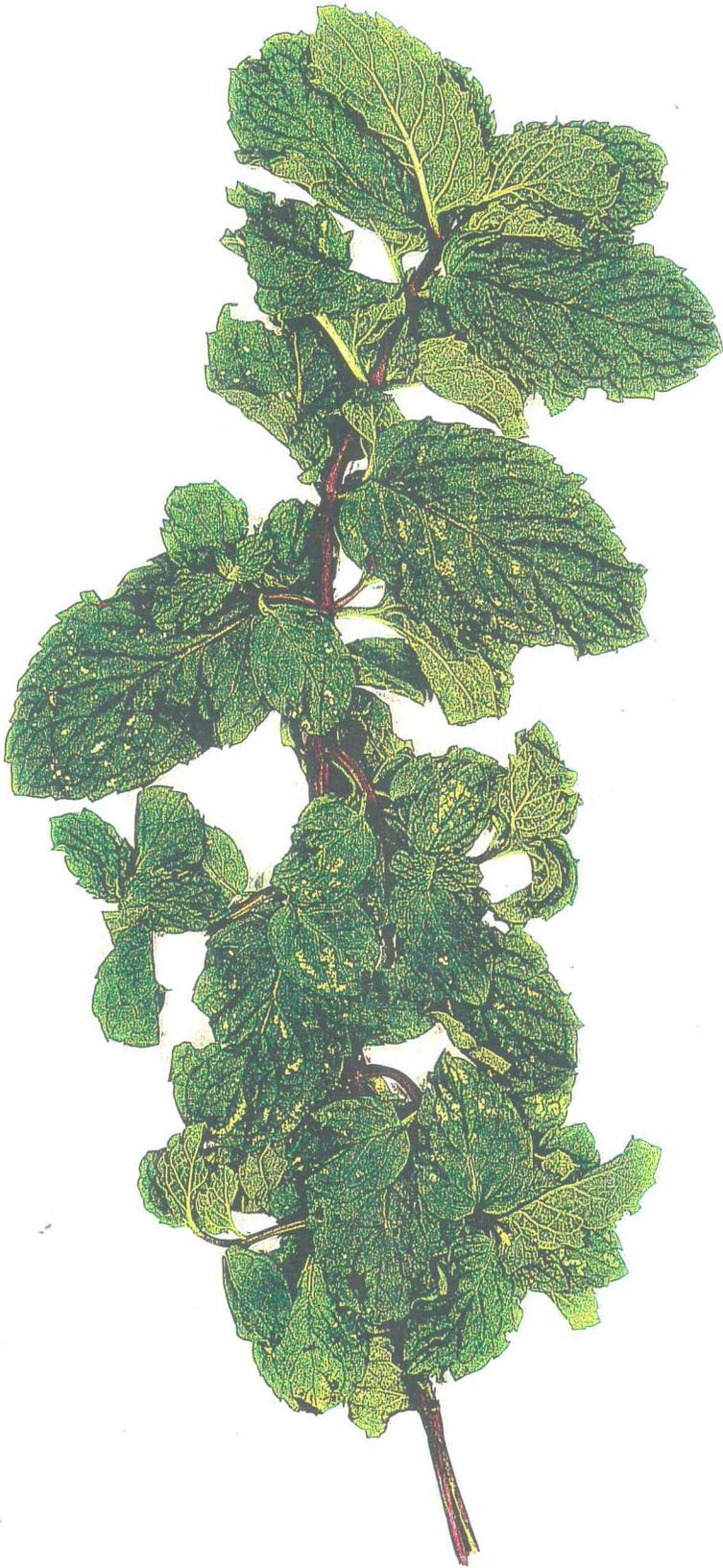
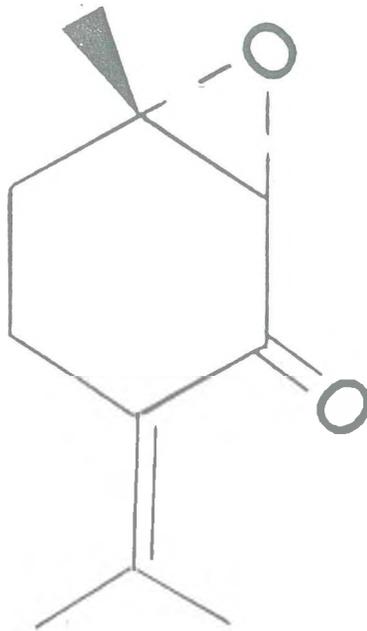


Fig. 2 - Estrutura química do óxido de piperitenona.



### 1.3- ANATOMIA E FISIOLOGIA DE MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL

O trato alimentar provê o corpo com um contínuo suprimento de água, eletrólitos e nutrientes. Para isto são necessários (1) movimento de alimento através do trato alimentar; (2) secreção de sucos digestivos e digestão do alimento; (3) absorção de produtos digestivos, água e vários eletrólitos; (4) circulação do sangue através dos órgãos gastrointestinais para carrear as substâncias absorvidas; e (5) controle de todas estas funções pelos sistemas nervoso e hormonal (GUYTON & HALL, 1996). Desta forma qualquer alteração em um dos itens acima citados pode causar sérios danos à saúde.

No trato alimentar cada parte encontra-se adaptada a uma função específica: o esôfago, para a passagem do alimento; o estômago, para receber e armazenar alimento e o intestino para a digestão e absorção (HEADING, 1980).

A parede gastrointestinal se caracteriza por apresentar, da superfície externa para a interna, as seguintes estruturas: (1) a serosa, (2) a camada muscular longitudinal, (3) a camada muscular circular, (4) a submucosa e (5) a mucosa. Além disso, uma escassa camada de fibras musculares lisas, a muscular da mucosa, situa-se nas camadas profundas da mucosa. As funções motoras do intestino são desempenhadas pelas diferentes camadas de músculo liso (GABELLA, 1979).

As células do músculo liso no trato gastrointestinal estão entre 200 e 500 micrômetros de comprimento e entre 2 e 10 micrômetros de diâmetro. São uninucleadas e, na maioria dos músculos lisos viscerais, a superfície é lisa e regular. Contrastando com as células do músculo esquelético, as células do

músculo liso apresentam-se mais amorfas e suas estruturas invaginantes, as cavéolas, não apresentam o mesmo grau de organização dos túbulos transversos (SOMLYO & HIMPENS, 1986). O músculo liso não tem o mesmo arranjo estriado dos filamentos de actina e miosina encontrado no músculo esquelético (SOMLYO, 1985) porém é evidente que as células do músculo liso apresentam uma organização intracelular regular, que é a base para seu comportamento contrátil (MOSS & HOFMANN, 1992; SPERELAKIS, 1993).

No músculo liso o RS existe em uma forma rudimentar (SOMLYO & HIMPENS, 1986) e, apesar disto pode acumular íons  $\text{Ca}^{2+}$  no sarcoplasma (SOMLYO & SOMLYO, 1981). No estado de repouso (relaxado), afirma-se que a concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) está entre 0,05 e 0,35  $\mu\text{M}$ . Este nível da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é considerado insuficiente para ativar o aparelho contrátil (RODGER, 1990).

Entre as principais proteínas do músculo liso, encontramos as contráteis (actina e miosina, que constituem respectivamente, os filamentos finos e grossos), as regulatórias (representadas, entre outras, pela cadeia leve de miosina, tropomiosina e caldesmina) e as proteínas que constituem o citoesqueleto (desmina, vimetina vinculina, além de outras) (JIANG & STEPHENS, 1994).

As fibras de músculo liso gastrointestinal, encontram-se arranjadas em feixes de alguns milhares de fibras musculares. Na camada muscular longitudinal, estes feixes estendem-se longitudinalmente para baixo, enquanto que na camada muscular circular estes estendem-se ao redor do músculo liso gastrointestinal. A conexão entre os feixes das diferentes camadas musculares é feita através de estruturas de baixa resistência elétrica, denominadas de gap junctions (junções

em fenda) ou nexus, que permitem o movimento de íons de uma célula para outra (UEHARA & BURNSTOCK, 1970; SOMLYO, 1985; MOSS & HOFMANN, 1992;). Nem todas as fibras de um mesmo feixe recebem terminações nervosas; segundo HOYLE & BURNSTOCK (1989), calcula-se que na camada circular do tubo digestivo, existam de 25 a 78 junções neuromusculares para cada 1.000 células musculares no feixe.

O trato gastrointestinal tem um sistema nervoso próprio denominado sistema nervoso entérico (SNE), que tem por função controlar os movimentos e secreções gastrointestinais. O SNE é constituído por dois plexos principais, um plexo mais externo situado entre as camadas musculares longitudinal e circular denominado plexo mioentérico ou plexo de Auerbach e um plexo mais interno, situado na submucosa, denominado plexo submucoso ou plexo de Meissner. O plexo mioentérico controla principalmente os movimentos gastrointestinais enquanto o plexo submucoso controla principalmente as secreções gastrointestinais e fluxo sanguíneo local (LUNDGREN et al., 1989). Além dos dois principais plexos existem plexos menores, o subseroso, o muscular profundo e o mucoso, sendo este último, algumas vezes, considerado uma extensão do submucoso (FANG et al., 1993).

O plexo mioentérico, pode ser dividido em três componentes que são: um primário, que consiste dos gânglios e dos feixes internodais; um secundário, representado pelos ramos mais finos que os do plexo primário e, um terciário, cujos axônios formam as varicosidades que inervam as fibras. Estas varicosidades formam junções neuro-efetoras e estão em proximidade com sítios receptores dos transmissores (LUNDGREN et al., 1989).

Devido a existência do SNE fenômenos como peristaltismo e outros padrões de comportamento motor intestinal ocorrem em segmentos isolados do tubo digestivo. Peristaltismo é um comportamento motor coordenado que impulsiona o conteúdo intestinal na direção anal e pode ser dividido em duas fases: 1) fase preparatória - quando o intestino, ao ser preenchido com o alimento, sofre um aumento na pressão intraluminal desencadeando uma contração da musculatura longitudinal e, 2) fase de esvaziamento - inicia quando o intestino radialmente distendido desencadeia contrações coordenadas da musculatura circular que se propagam da boca ao ânus expulsando o conteúdo (WATERMAN et al., 1994). Tal comportamento tende a ser contínuo se, após o esvaziamento do intestino, houver uma infusão de líquidos (WATERMAN et al., 1992). O hexametônio (HEX), um bloqueador ganglionar, é capaz de inibir a transmissão nicotínica neuro-neuronal e os reflexos peristálticos (KOSTERLITZ & LESS, 1964).

O controle neuronal das funções do trato gastrointestinal é feito não somente pelo SNE, mas também pelos sistemas parassimpático, simpático e nervos sensoriais terminais originários do epitélio luminal e parede intestinal (BEST & TAYLOR, 1990). Nas camadas do músculo liso da parede intestinal, o músculo circular tende a apresentar uma inervação adrenérgica bem mais densa que o músculo longitudinal, embora no intestino grosso alguns músculos longitudinais apresentem uma densidade de inervação adrenérgica superior aos músculos circulares como na taenia coli e reto de cobaia (GABELLA, 1979).

Quase todos os corpos celulares adrenérgicos são confinados aos gânglios simpáticos que tem seus terminais no plexo mioentérico, plexo submucoso,

mucosa, e vasos sanguíneos associados. Corpos celulares adrenérgicos são raramente vistos em plexos entéricos (HOYLE & BURNSTOCK, 1989).

Na maioria das regiões do intestino a estimulação adrenérgica ou a aplicação exógena de norepinefrina (NE) resulta em uma ação inibitória com diminuição do tônus mecânico ou da atividade espontânea, hiperpolarização da membrana do músculo liso, e inibição dos disparos de potenciais de ação (BAILEY, 1971; HOYLE & BURNSTOCK, 1989).

Os neurônios pós-ganglionares do sistema parassimpático estão localizados nos plexos mioentérico e submucoso, e a estimulação vagal causa um aumento generalizado da atividade do SNE e, conseqüentemente, da maioria das funções gastrointestinais. Alguns dos neurônios entéricos são inibitórios e, portanto inibem algumas das funções (SUPRENANT, 1994).

Além da acetilcolina (ACh) e NE, muitas outras substâncias neurotransmissoras são liberadas pelos terminais nervosos de diferentes tipos de neurônios entéricos, surgindo assim o conceito de co-transmissão e de sinapses não adrenérgicas e não colinérgicas (NANC) (HOYLE & BURNSTOCK, 1989). Entre os neurotransmissores NANC inibitórios diretos da transmissão neuromuscular do trato gastrointestinal encontramos o polipeptídeo intestinal vasoativo (LEFEBVRE et al., 1992; BACARI et al., 1994) e a neurotensina (KATSOULIS & CONLON, 1988). O óxido nítrico (ON) foi identificado como neurotransmissor inibitório NANC em diversas partes do trato gastrointestinal (BOECKXSTAENS et al., 1991; LEFEBVRE et al., 1992; KANADA et al., 1992; BACARI et al., 1994; ORIHATA & SARNA, 1994; SMITS & LEFEBVRE, 1996) enquanto em outras apresenta atividade excitatória

(BARTHO & LEFEBVRE, 1994 e 1995). Foi relatada a presença de opióides endógenos e seus receptores no SNE (LUNDGREN et al., 1989; WATERMAN et al., 1992). Fibras histaminérgicas foram encontradas no estômago, íleo e cólon de cobaia (HILL, 1990; RIZZO et al., 1995). Os neurônios adrenérgicos que suprem o intestino dividem-se, de acordo com a coexistência de NE e outras substâncias no interior das vesículas em: a) neurônios contendo NE e adenosina trifosfato (ATP) (VON KÜGELSEN & STARKE, 1991); b) neurônios contendo NE e somatostatina; c) neurônios contendo NA e neuropeptídeo Y e, d) neurônios contendo NE e peptídeos sem distinção (COSTA & FURNESS, 1984; GOYAL et al., 1980). Na camada longitudinal do intestino delgado de cobaia, a ativação de receptores adrenérgicos do tipo  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  promove efeitos inibitórios sobre os potenciais de ação em espiga e a atividade espontânea ocorre em grupos (bursts). Contudo, no íleo terminal agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos promovem efeitos excitatórios (BÜLBRING & TOMITA, 1987). A substância P atua diretamente sobre o músculo liso e também indiretamente através da liberação de ACh induzindo contração do estômago e íleo de cobaia (NIEBER et al., 1981; HALL & MORTON, 1990). Substâncias peptidérgicas como a colecistocinina induzem respostas excitatórias no intestino e estômago de cobaia (KUEMERLE et al., 1992; BOYLE et al., 1993). As prostaglandinas podem apresentar efeitos estimulantes ou inibitórios das funções gastrointestinais assim como liberar ou modificar a liberação de substâncias transmissoras dos nervos relacionados àquela função (MISHIMA & KURIYAMA, 1976; ISHIZAWA & MIYAZAKI, 1978; NITTA & ISHIZAWA, 1980; SANDERS & SZURSZEWSKI, 1981; MILENOV et al., 1983; MILENOV & RAKOVSKA, 1983; KATSOULIS & CONLON, 1988). A serotonina (5-hidroxitriptamina) (5-HT) pode contrair ou relaxar preparações gastrointestinais (AKUBUE, 1977), e estes efeitos dependem do tipo de receptor com qual esta amina irá interagir (KUEMERLE et al., 1992;

BUCHHEIT & BUHL, 1994; EBERLE-WANG et al., 1994). A motilidade antral pode ser estimulada pela gastrina (COOKE et al., 1972) e inibida pela secretina e glucagon (CHVASTA & COOKE, 1973), colecistocinina (SUGAWARA et al., 1969) e peptídeo intestinal vasoativo (STRUNZ et al., 1978).

O músculo liso do trato gastrointestinal está sujeito a uma atividade elétrica lenta, quase contínua. Esta atividade tende a ter dois tipos básicos de ondas elétricas: (1) ondas lentas e (2) em espigas (spikes). As ondas lentas normalmente não causam contração muscular exceto no estômago e, excepcionalmente, nos cólons. Em vez disso elas principalmente controlam o aparecimento de potenciais em espiga e estes últimos por sua vez causam a maioria das contrações musculares (CHRISTENSEN, 1971). Alguns músculos lisos são auto-excitáveis, ou seja, potenciais de ação surgem dentro da própria fibra muscular lisa sem um estímulo extrínseco. Isto está, algumas vezes associado, com um ritmo de onda lenta básico do potencial de membrana, especialmente na parede do músculo liso intestinal. A onda lenta *per se* não é um potencial de ação. Potenciais de ação podem ocorrer superpostos sobre ondas lentas e afirma-se que a onda lenta é “permissiva” para significar que aqueles potenciais sempre ocorrem em associação com essa onda. A ocorrência de potenciais de ação e, em consequência, o tempo de contração muscular são portanto regulados pela onda lenta (HEADING, 1980). BORTOFF (1965) propôs que a onda lenta gástrica teria origem na camada muscular longitudinal desde que a separação dos músculos longitudinal e circular resultou na abolição da atividade onda lenta desta última sem afetar a primeira. Segundo SAKAMOTO & NASU (1987) a despolarização do músculo longitudinal propaga-se eletrotônicamente para o músculo circular através de uma via que pode ser as células intersticiais de Cajal mas não o sistema nervoso, uma vez que não foi afetada pelos agentes

bloqueadores da transmissão neuronal como tetrodotoxina (TTX) ou atropina (AT). Embora evidências contrárias tenham surgido favorecendo a origem dentro do músculo circular (TAYLOR et al., 1975) afirma-se que no estômago intacto ambas as camadas participam na propagação da onda lenta (HEADING, 1980).

A frequência com que as ondas lentas são geradas no estômago distal varia em diferentes locais. Experimentos em cães usando a técnica de transecção gástrica mostraram que a geração de onda lenta de frequência intrínseca mais rápida ocorreu próxima ao meio do corpo gástrico (BEDI et al., 1972).

Em relação a onda lenta do estômago, influências hormonais ou neurais podem exercer efeitos inibitórios ou facilitatórios sobre os potenciais de ação. Por exemplo, a frequência da onda lenta é aumentada pela gastrina (COOKE et al., 1972) mas diminuída pela estimulação vagal insulina-induzida (BORTOFF & DAVIS, 1968), enquanto a ocorrência de potenciais de ação é facilitada por ambos. A vagotomia truncal inicialmente causa desorganização da onda lenta com subsequente recuperação porém esta apresenta uma menor amplitude e forma alterada da onda (WILBUR & KELLY, 1973).

A atividade onda lenta está sempre presente no estômago normal e sua frequência é consideravelmente pouco afetada por doença, drogas ou influências fisiológicas (HEADING, 1980).

Os músculos lisos normalmente operam em um estado contraído (algumas vezes referido como “tônus”) a partir do qual ele pode contrair mais ou relaxar, dependendo da sua função fisiológica. Uma significativa porção deste tônus é causado por mecanismos intrínsecos ou miogênicos mas também pode ser

induzido ou modulado por estímulos mecânicos e neurohormonais inibitórios e excitatórios (KNOT et al., 1996).

A contratilidade do músculo liso é regulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (MOSS & HOFMANN, 1992; KNOT et al., 1996). Se a produção de força e encurtamento do músculo depende de um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , o relaxamento pode ser associado ao retorno do cálcio interno aos níveis de repouso (SPERELAKIS, 1993). O relaxamento é representado pelo estado de perda da força contrátil e retorno do músculo às condições basais (MEISS, 1989). Para que o relaxamento ocorra são necessários uma diminuição da concentração de cálcio nas proximidades dos miofilamentos e, a desfosforilação da cadeia leve de miosina de 20 kDa ( $\text{MLC}_{20}$ ). A diminuição dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  pode ocorrer através de: 1- Inativação das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais lentos de cálcio devido à repolarização do sarcolema. 2- Recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o RS, através da bomba de cálcio ATPase do RS. 3- Bombeamento de  $\text{Ca}^{2+}$  para o espaço intersticial, através da bomba de cálcio ATPase do sarcolema. 4- Pelo mecanismo de troca de  $\text{Na}^+$ -  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i\text{-Na}^+_o$ ) que existe no sarcolema (DANIEL et al., 1992; SPERELAKIS, 1993). A desfosforilação dessa cadeia leve de miosina é feita às custas de uma fosfatase específica chamada fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), que é inibida na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ . A MLCP é ativada quando há uma diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e dissociação do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina-quinase da cadeia leve de miosina (MOSS & HOFMANN, 1992). A diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em células endoteliais é feita através da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase localizada na membrana plasmática que promove o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; as mitocôndrias também estocam e liberam  $\text{Ca}^{2+}$  (WEISNER et al., 1996). No músculo liso gastrointestinal a contratilidade pode ser ativada através de fatores neuronais, farmacológicos e não fisiológicos como o frio, estiramento ou estimulação

elétrica direta. As contrações, de acordo com o curso temporal, podem ser divididas em dois componentes: fásico e tônico. O componente fásico é representado por uma contração inicial rápida e reversível, sem platô. O componente tônico é representado por uma contração mais lenta e duradoura, cujo platô pode durar vários minutos (contração mantida ou sustentada) (MEISS, 1989; MACARA & GIÃO-T. RICO, 1992; SAITO et al., 1994; NIXON et al., 1994). Contrações fásicas são aquelas originárias da atividade onda lenta ou de potenciais de ação simples ou em grupos (bursts) enquanto contrações tônicas são aquelas em resposta a um estímulo com alterações graduais do potencial de membrana e estão relacionadas com um trem contínuo de potenciais de ação ou com uma despolarização mantida (ENDO, 1977; KNOT et al., 1996). Contrações mantidas podem ocorrer devido a agentes farmacológicos, diminuição rápida de temperatura (ENDO, 1977) e despolarização contínua com  $K^+$  (AUSINA et al., 1996).

#### **1.4- ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO (AEC) EM MÚSCULO LISO GASTROINTESTINAL**

O termo AEC refere-se à sequência de eventos entre um estímulo da membrana citoplasmática e a modificação da concentração de  $Ca^{2+}$  livre no citoplasma sem, entretanto, incluir a contração propriamente dita (SPERELAKIS, 1993).

Em células de músculos lisos ocorrem dois tipos de AEC: o eletromecânico e o farmacomecânico. A diferença entre acoplamento eletromecânico e farmacomecânico diz respeito à regulação da força de contração. No acoplamento eletromecânico a alteração da força de contração está na dependência da

modificação no potencial de membrana ( $E_m$ ). No acoplamento farmacomecânico a regulação é feita através da estimulação por fármacos, sem necessariamente grandes alterações do  $E_m$  (REMBOLD, 1996).

O desencadeamento da contração em músculos lisos pode ocorrer por despolarização da membrana celular (acoplamento eletromecânico), através da ligação de um agonista a receptores de membrana (acoplamento farmacomecânico), ou pela combinação dos dois mecanismos (RASSMUSSEN et al., 1987; SOMLYO & SOMLYO, 1968). A despolarização da membrana citoplasmática pode ocorrer por estimulação elétrica direta ou pela ligação de neurotransmissores e/ou hormônios a receptores ligados à membrana.

Independente de como a célula é ativada para contrair-se, o mediador final da contração é um aumento da concentração de cálcio no citoplasma o qual é necessário para fosforilação das cadeias leves de miosina (MORGAN & MORGAN, 1984; REMBOLD & MURPHY, 1988; MOSS & HOFMANN, 1992). A elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  pode ser produzida por: 1- Influxo de  $Ca^{2+}$  através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (canais lentos ou canais tipo-L e canais rápidos ou canais tipo-T); 2- liberação do  $Ca^{2+}$  armazenado em estoques intracelulares (principalmente do RS), através da ativação dos canais liberadores de  $Ca^{2+}$  presentes na membrana do retículo a qual pode ser induzida por  $Ca^{2+}$  ou por trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) ou ambos; 3- Troca  $Na^+ - Ca^{2+}$  operando de maneira reversa; 4- influxo por meio de canais iônicos, operados por receptor, seletivos para  $Ca^{2+}$ ; 5- Inibição da bomba de  $Ca^{2+} - ATPase$  também levaria a um aumento na  $[Ca^{2+}]_i$ ; 6- Combinação de qualquer dos fatores acima citados (SPERELAKIS, 1993). Canais catiônicos não seletivos, assim como de  $Cl^-$ , também podem estar envolvidos na elevação da  $[Ca^{2+}]_i$  em músculos lisos vasculares (ZHANG et al.,

1991; MONOS et al., 1995) e gastrointestinais (KUEMMERLE & MAKHLOUF, 1994) A contribuição relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  ativador de cada fonte depende da natureza do estímulo aplicado, da concentração do agonista contrátil e do componente (fásico ou tônico) da resposta contrátil que está sendo considerada (BOLTON, 1979a e b; CREESE, 1983; TRIGGLE, 1983; RODGER, 1983, 1986 e 1990; GIEMBYEZ & RODGER, 1987).

A membrana plasmática de células de músculo liso contém uma variedade de canais iônicos, incluindo canais que são seletivos para cálcio, potássio e cloreto. Os canais iônicos podem responder diretamente a mudanças no  $E_m$  (dependentes de voltagem) ou, por ação de hormônios e neurotransmissores agindo diretamente (operados por ligantes) ou, indiretamente através das vias de sinalização de segundo mensageiros ativadas pela interação agonista-receptor (KNOT et al., 1996). Uma relação bidirecional entre os acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico também foi constatada. Nesta relação, não somente os segundos (e terceiros) mensageiros (ácido aracdônico (AA), cálcio) do acoplamento farmacomecânico afetam canais iônicos e, conseqüentemente o  $E_m$  e o acoplamento eletromecânico como, inversamente, o  $E_m$  também pode modular a ativação da fosfolipase C (PLC) pelos agonistas; por exemplo, a hiperpolarização pode levar a uma inibição da PLC e, como consequência, ocorrer uma redução do efeito dos agonistas na liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada via  $\text{IP}_3$  (ITOH et al., 1992; GANITKEVICH & ISENBERG, 1993).

No acoplamento eletromecânico induzido por soluções contendo alta  $[\text{K}^+]$ , além do influxo inicial rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  (componente fásico) através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes de inativação rápida, ocorre também um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais lento e mais duradouro (componente tônico) através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$

voltagem dependentes de inativação lenta. O influxo inicial rápido de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa a liberação de cálcio induzida por cálcio (CICR) enquanto o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mais lento, além de carregar o RS, ativa diretamente os filamentos contráteis (KARAKI & WEISS, 1988; AUSINA et al., 1996). Soluções contendo alta  $[\text{K}^+]$  podem também aumentar os níveis intracelulares de  $\text{IP}_3$  e promover liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS; embora sua principal maneira de atuação seja aumentar as concentrações intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos mecanismos anteriores (KARAKI & WEISS, 1988; MEISS, 1989; AUSINA et al., 1996).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes são dos tipos L, T ou N, de acordo com a sua cinética de ativação e inativação, condutância, especificidade iônica e sensibilidade a drogas e toxinas (SPEDDING & PAOLETTI, 1992). O mais importante canal de  $\text{Ca}^{2+}$  presente nas células de músculo liso é o do tipo L. Sua estrutura é muito semelhante a dos outros canais iônicos voltagem dependentes, mas se caracteriza por sua elevada seletividade para íons cálcio em relação a outros íons, exceto na ausência de cátions divalentes, onde cátions monovalentes como  $\text{Na}^+$  podem atravessar o canal (KNOT et al., 1996).

Os canais do tipo L podem adquirir três conformações ou estados funcionais: repouso, ativo (aberto) e inativo. A ativação depende do  $E_m$ , sendo desencadeada pela despolarização da membrana celular e a inativação ocorre durante uma despolarização prolongada, pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou por ambas as situações.

As drogas consideradas como bloqueadoras de canais de cálcio são muito úteis no tratamento de certas doenças cardiovasculares. Seus principais efeitos farmacológicos e terapêuticos nestas patologias, resultam da inibição seletiva dos

canais L de cálcio. Estas drogas pertencem a cinco classe de compostos: Fenilalquilaminas, dihidropiridinas, benzotiazepinas, difenilpiperazinas, e uma diarilaminopropilamina (ROBERTSON & ROBERTSON, 1996). Como exemplos de bloqueadores de canais lentos (L) podemos citar o verapamil, diltiazem e nifedipina (NIF). As dihidropiridinas apresentam alta afinidade por sítios específicos destes canais em seu estado inativo sendo o bloqueio, portanto, mais ativo em tecidos parcialmente despolarizados, onde há um maior número de canais L em estado inativo (HILLE, 1984).

Recentemente surgiu um novo grupo de drogas capazes de relaxar o músculo liso vascular de artérias e veias. São os chamados ativadores de canais de potássio cujo mecanismo básico consiste em ativar diferentes tipos de canais de  $K^+$  (dependentes de voltagem, ativados pelo  $Ca^{2+}$ , sensíveis ao ATP e retificadores retardados) e promover uma hiperpolarização da membrana plasmática quando o  $E_m$  é diferente do potencial de reversão do  $K^+$ . Além deste efeito as drogas deste grupo (por exemplo pinacidil, nicorandil, minoxidil, diazóxido e outras) também causam: a) Abolição dos movimentos rítmicos espontâneos, b) inibição da liberação ou depleção do estoque intracelular de cálcio e, c) redistribuição de cálcio dentro da célula do músculo liso; esta redistribuição pode contribuir em parte para a ação vasorelaxante independente do  $E_m$  (ERNE & HERMSMEYER, 1991; MONOS et al., 1995; KNOT et al., 1996).

De uma maneira resumida o processo contrátil das células musculares lisas é iniciado quando ocorre um aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  livre no citoplasma induzida pelo acoplamento eletromecânico e/ou farmacomecânico. O mecanismo primário de ativação da contração do músculo liso é a fosforilação da

MLC<sub>20</sub> através da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) sendo esta enzima ativada pelo complexo cálcio-calmodulina (KITAZAWA et al., 1991; MOSS & HOFMANN, 1992). A calmodulina é uma proteína que, ao formar um complexo com o Ca<sup>2+</sup> irá ativar uma proteína quinase a qual irá fosforilar a MLC<sub>20</sub>, ativando o complexo actina-miosina com atividade ATPásica, que está intimamente relacionado com o início da contração (HIRANO et al., 1991; KITAZAWA et al., 1991; GUSEV et al., 1994).

Apesar do mecanismo envolvendo a ativação da MLCK dependente dos níveis intracelulares de cálcio, ser o mais aceito para a regulação da contração em músculos lisos, diversos trabalhos sugerem que este mecanismo pode não estar completo (REMBOLD, 1992; HIMPENS et al., 1995).

Um outro aspecto importante na regulação da contração muscular lisa diz respeito à sensibilização dos elementos contráteis ao Ca<sup>2+</sup>. Através do uso de indicadores da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> foi observado que a relação força/[Ca<sup>2+</sup>] não era constante e, que era maior durante a ativação por agonistas, do que por um aumento da concentração de cálcio induzida por despolarização, sugerindo uma sensibilização dos elementos contráteis ao Ca<sup>2+</sup> induzida por agonistas (HIRANO et al., 1991; YANAGISAWA & OKADA, 1994). Esta sensibilização pode ser positiva ou negativa e influenciada por processos fisiológicos.

Alta sensibilidade ao Ca<sup>2+</sup> é observada com estímulos que ativam proteína G, aumentam IP<sub>3</sub> e liberam Ca<sup>2+</sup> de estoques intracelulares como, por exemplo, a histamina (HA), a fenilefrina, a endotelina (KITAZAWA & SOMLYO, 1990; KITAZAWA et al., 1991; GONG et al., 1992; TANG et al., 1992; DROOGMANS & MISSIAEN, 1994; HIMPENS et al., 1995). A despolarização

da membrana pelo KCl potencializa a sensibilização dos elementos contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzida pela endotelina em músculo liso arterial; esta despolarização pode estar envolvida na ativação da proteína quinase C (PKC) como um resultado da ativação da PLC, cuja atividade pode ser controlada por influência do  $E_m$  (YANAGISAWA & OKADA, 1994). Baixa sensibilidade pode ser causada por agentes que somente promovem influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , como despolarização, ATP, estiramento e inversão da troca  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  com baixa  $[\text{Na}^+]_o$  (REMBOLD, 1992). A diminuição da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser causada por um balanço alterado entre a atividade da MLCK e da MLCP, resultando em uma diminuição da relação fosforilação/desfosforilação modulada por proteínas G (COHEN, 1992; HIMPENS et al., 1995; KITAZAWA et al., 1991). Há sugestões de que a inibição da fosfatase que desfosforila a serina 19 da  $\text{MLC}_{20}$  seja talvez o principal mecanismo de sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$  acoplado a proteína G (SOMLYO & SOMLYO, 1994).

Os possíveis mensageiros de sensibilização das proteínas contráteis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , em músculos lisos vasculares (LITTEN et al., 1987; CHIU et al., 1987) e não vasculares (FERNANDEZ et al., 1993), são a PKC e o AA. A evidência que demonstra o papel da PKC e a sensibilização dessas proteínas ao  $\text{Ca}^{2+}$  pelos ésteres de forbol, é o fato de que agonistas que promovem sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ , também ativam a PKC e liberam diacilglicerol (DAG), que é o ativador natural da PKC. Ésteres de forbol são diterpenos obtidos de plantas do gênero *Croton* e de diversos membros dos gêneros *Euphorbia* e *Sapium*, que se ligam a PKC somente na presença de fosfolípídeos (principalmente fosfatidilserina) e cálcio (DRUMMOND & HUGHES, 1987). Os mecanismos de ação da PKC e AA, a nível celular, são diferentes; enquanto a PKC promove um aumento na fosforilação da serina 19 da  $\text{MLC}_{20}$  (SOMLYO & SOMLYO, 1994), o AA

R 1149593199

também aumenta a fosforilação da  $MLC_{20}$ , porém através da inibição da desfosforilação mesmo que na presença de uma concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  constante (GONG et al., 1994).

A dessensibilização induzida por cálcio seria o mecanismo através do qual ocorre uma diminuição da força produzida pela maquinaria contrátil a uma dada  $[Ca^{2+}]_i$  (HIMPENS et al., 1989; KITAZAWA & SOMLYO, 1990; STULL et al., 1990; REMBOLD, 1992). À nível molecular este mecanismo ocorreria como consequência da ativação da proteína quinase II, devido a concentração de cálcio, a qual induz a fosforilação da MLCK em um sítio regulatório chamado sítio A (STULL et al., 1990; NOMURA et al., 1992; TANSEY et al., 1992; HIMPENS et al., 1995). Nesta situação a MLCK tem uma sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  mais baixa que quando desfosforilada (ADELSTEIN et al., 1978; REMBOLD, 1992).

A redução da sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  induzida por  $Ca^{2+}$  pode proteger a célula dos efeitos adversos resultantes de um aumento prolongado na  $[Ca^{2+}]_i$ . Ela pode também explicar, pelo menos parcialmente, a resposta fásica de alguns músculos lisos (HIMPENS et al., 1989; KITAZAWA & SOMLYO, 1990).

Uma vez que os mecanismos para o AEC são básicos para a compreensão da função celular, procura-se entender como receptores localizados na superfície das células transduzem e amplificam os sinais que lhes chegam (LAMBERT, 1993).

A transdução de sinais modulada por neurotransmissores e hormônios envolve a ativação sequencial de receptores que transpõem a membrana e proteínas ligadas ao guanosina trifosfato (GTP) (proteínas G), as quais acoplam o

receptor a várias enzimas efetoras; estas atuam sobre precursores citoplasmáticos ou ligados à membrana para gerar um ou mais mensageiros regulatórios (GILMAN, 1987; BERRIDGE, 1993). Agonistas mobilizadores de  $\text{Ca}^{2+}$  interagem com receptores e promovem a hidrólise de vários fosfolipídeos da membrana principalmente fosfatidilinositol e fosfatidilcolina (EXTON et al., 1991; BERRIDGE, 1993). A hidrólise do 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol através de várias formas de PLC origina dois mensageiros, 1,4,5  $\text{IP}_3$  e DAG. Na maioria dos tipos de células musculares o aumento inicial do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático ocorre devido a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida dependente de  $\text{IP}_3$  do RS, via canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (EXTON et al., 1991; RHEE & CHOI, 1992; MURTHY et al., 1992; BERRIDGE, 1993). Esta liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de estoque interno contribui para o componente fásico inicial da contração (em meio contendo cálcio), e para a contração transitória (em meio livre de cálcio). O DAG ativa a PKC que estimula a atividade de canais lentos de  $\text{Ca}^{2+}$ . A entrada de cálcio através destes canais pode contribuir também para o recarregamento do RS (DANIEL et al., 1992). Este padrão de mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  prevalece nos músculos lisos vasculares e visceral, com exceção do músculo liso longitudinal intestinal onde o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  é independente de  $\text{IP}_3$  e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS depende desse influxo (GRIDER & MAKHLOUF, 1988). A ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , nesse tipo de músculo liso, pode ser mediada através do AA, o qual induz ativação dos canais de  $\text{Cl}^-$  resultando em despolarização da membrana e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (KUEMMERLE & MAKHLOUF, 1994). O AA é formado indiretamente a partir dos fosfolipídeos da membrana pela ativação sequencial da PLC e DAG lipase ou diretamente pela ativação da fosfolipase  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), uma enzima que preferencialmente hidrolisa o fosfolipídeo fosfatidilcolina (MURTHY et al., 1995; MAKHLOUF & MURTHY, 1997).

Nos músculos lisos, e em outros tecidos, os estoques de cálcio parecem não ser homogêneos e algumas vezes são mencionados como um componente sensível ao  $IP_3$  (IICR, liberação de cálcio induzida por  $IP_3$ ), e outro sensível ao cálcio (CICR, liberação de cálcio induzida por cálcio) (KARAKI & WEISS, 1988; BURDIGA et al., 1995). O tamanho relativo destes estoques difere entre eles sugerindo que a importância funcional é variável nos diferentes tipos de músculos lisos de um mesmo animal. Diferentes espécies animais, mesmo considerando o mesmo músculo, apresentam diferentes tipos de estoque de cálcio (BURDIGA et al., 1995).

A identificação destes estoques pode ser feita através do uso de agentes mobilizadores de  $Ca^{2+}$  (cafeína e carbacol) e agentes inibidores da função do RS como a rianodina (que atua sobre os canais CICR) e CPA (uma micotoxina que inibe diretamente a  $Ca^{2+}$ -ATPase dependente de ATP do RS) (BURDIGA et al., 1995).

Estudos sobre os efeitos da cafeína na liberação de  $Ca^{2+}$  intracelular e no influxo de  $Ca^{2+}$  sugerem que existe uma comunicação entre os diferentes “pools” de  $Ca^{2+}$  intracelular e que o influxo de  $Ca^{2+}$  independe de sua liberação dos estoques intracelulares (CHEN et al., 1996; ENDO, 1977)

Durante estimulação prolongada por agonistas, como ACh, HA, fenilefrina e carbacol, entre outros, em meio sem  $Ca^{2+}$ , o  $Ca^{2+}$  liberado do RS é lançado fora da célula ocorrendo pequena recirculação no RS. Dessa forma a resposta para uma segunda estimulação é marcadamente diminuída (DANIEL et al., 1992). Sabe-se que substâncias como o  $La^{+3}$  que bloqueiam o efluxo de  $Ca^{2+}$  na

superfície da membrana citoplasmática potencializam e prolongam o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  liberado a partir dos estoques intracelulares. Na ausência destas substâncias uma aplicação do agonista em meio sem  $\text{Ca}^{2+}$  esvazia os estoques, enquanto na presença o tecido é capaz de responder, produzindo contração, a várias aplicações do agonista (BURDYGA & MAGURA, 1986; BURDYGA et al., 1995).

Assim, na contração induzida por agonistas farmacológicos como neurotransmissores (ACh), autacóides (HA, substância P) e agentes terapêuticos (bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos) parece predominar o envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  de origem intracelular para iniciar a contração (MISSIAEN et al., 1992; ZHANG et al., 1993; ZHANG & LANG, 1994; WEISS et al., 1985).

A ativação de receptores muscarínicos pode regular diferentes mecanismos de transdução pós-sinápticos no mesmo tecido. Por exemplo, no músculo longitudinal do íleo de cobaia a estimulação de receptores muscarínicos  $M_2$  pode (1) despolarizar a membrana plasmática através de uma proteína G sensível à toxina pertussis que se liga a um canal catiônico não seletivo, (2) aumenta os níveis de  $\text{IP}_3$  e (3) aumenta os níveis de  $\text{GMPc}$  (PRESTWICH & BOLTON, 1995). No músculo circular do fundo gástrico de cobaia a ativação desses receptores promove contração através de um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  NIF-sensível e NIF-insensível e libera cálcio induzido por  $\text{IP}_3$ . Esta diversidade de efeitos pode ser consequência da presença de três tipos de receptores muscarínicos (cada um ligado a três diferentes subtipos de receptores muscarínicos) ou um único subtipo ligado a três mecanismos de transdução com diferentes afinidades (PAREKH & BRADING, 1991). A resposta contrátil ao carbacol é representada por uma contração fásica transitória seguida de uma contração tônica; ambas são

reduzidas pela NIF ou pela retirada do cálcio (solução  $0Ca^{2+}$ ) (OHTA et al., 1991; PAREKH & BRADING, 1991). Através da estimulação nervosa colinérgica ficou constatado que, em músculos lisos intestinais, a contração ocorre devido a um aumento na condutância ao  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  o que promove uma despolarização e aumento da descarga de potenciais de ação (HOYLE & BURNSTOCK, 1989). A estimulação do receptor muscarínico libera cálcio armazenado em sítios celulares não ativados por soluções com alta concentração de  $K^+$ . Os níveis intracelulares de cálcio aumentam e ocorre a contração (RANG & DALE, 1993). Preparações em solução  $0Ca^{2+}$  apresentam uma diminuição da resposta contrátil após estímulos sucessivos com agonistas colinérgicos, sugerindo a presença de um depósito de cálcio sensível à estimulação colinérgica (ELORRIAGA et al., 1996). A estimulação da preparação através de uma solução contendo alto potássio recarregará este depósito interno de  $Ca^{2+}$ , a não ser que bloqueadores desse recarregamento como NIF e  $Mn^{2+}$  estejam presentes (BOLTON, 1979).

No músculo liso dos grandes vasos sanguíneos, brônquios, e intestino, a HA produz contração através da ativação de receptores  $H_1$  (HILL, 1990). No músculo liso intestinal a HA, ao interagir com esses receptores causa aumento da frequência de potenciais de ação, em pequenas concentrações, e despolarização, em concentrações maiores. Estes efeitos ocorrem como uma consequência da abertura de canais iônicos permissíveis ao  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$ , os quais são operados por receptores  $H_1$ . A despolarização ativa canais de cálcio dependentes de voltagem (BOLTON et al., 1981). Um outro mecanismo envolveria a contração dependente da formação de  $IP_3$  em consequência da ativação da proteína G acoplada ao receptor  $H_1$ . O  $IP_3$  causa uma rápida liberação de  $Ca^{2+}$  do RS, que ativa a quinase da cadeia leve dependente da  $Ca^{2+}$ -calmodulina. Esta enzima

fosforila a  $MLC_{20}$  e promove um aumento da ligação entre as pontes transversas e consequente contração (KAMM & STULL, 1985).

Os receptores adrenérgicos, assim como outros tipos, pertencem a classe dos receptores acoplados à proteínas G intermediárias de sistemas efetores (SCHWINN, 1993). O efeito inibidor do sistema simpático sobre o trato gastrointestinal decorre da ativação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$ . Uma característica peculiar do sistema gastrointestinal é que a ativação dos receptores  $\alpha$  causa relaxamento na maior parte deste (RANG & DALE, 1993). A ativação dos receptores  $\alpha$  causa uma inibição da descarga de potenciais de ação no músculo liso intestinal sem muito efeito sobre a atividade onda lenta no intestino delgado de coelho (BOLTON, 1989). Na ténia de cobaia, modificações das propriedades elétricas da membrana plasmática parecem ser mediadas através de receptores  $\beta_2$  e o mecanismo intracelular através de receptores  $\beta_1$ . Contudo a relativa distribuição dos subtipos de receptores  $\beta$  para a produção de AMPc, e consequente relaxamento, necessita ser avaliada. O que tem sido proposto é que o AMPc primeiramente reduz a concentração de  $Ca^{2+}$  livre no citoplasma e depois atuaria diretamente sobre o sistema actina-miosina quando a concentração de  $Ca^{2+}$  está baixa (BULBRING & TOMITA, 1987). Uma outra parte do efeito relaxante decorre da estimulação de receptores  $\alpha_2$  pré-sinápticos que inibem a liberação de  $\dot{A}Ch$  de nervos intramurais (RANG & DALE, 1993). Receptores  $\alpha_{2D}$  localizados em neurônios colinérgicos controlam a contração do músculo circular em íleo de cobaia. Nas camadas circular e longitudinal receptores  $\alpha_1$  pré-sinápticos estão envolvidos no efeito relaxante de ambas as camadas (LIU & COUPAR, 1997). Existem células musculares que possuem receptores  $\alpha$  cuja estimulação determina a hiperpolarização da célula (devido o aumento da permeabilidade da membrana ao  $K^+$ ) e inibe a descarga do potencial de ação

(RANG & DALE, 1993). Nos músculos esfínterianos e no íleo terminal a estimulação nervosa adrenérgica e a aplicação exógena de NE promovem contração (HOYLE & BURNSTOCK, 1989).

No músculo liso longitudinal do íleo de cobaia o íon tetraetilamônio (TEA) origina uma contração mantida com oscilações espontâneas superpostas. O provável mecanismo pode ser consequência de seus efeitos sobre as correntes de  $K^+$  para fora (correntes de  $K^+$  retardadas e correntes de  $K^+$  dependentes de  $Ca^{2+}$ ) (OHYA et al., 1986), associado ao efeito sobre as correntes para dentro transitórias e oscilatórias. A corrente para dentro transitória está intimamente ligada ao influxo de  $Ca^{2+}$  e a corrente para dentro oscilatória está na dependência da concentração intracelular, possivelmente liberado de sítios de armazenamento (OHYA et al., 1987; ZHOLOS et al., 1991).

Nas células, os mais abundantes ânions livres são os íons cloreto ( $Cl^-$  e bicarbonato ( $HCO_3^-$ )). Os canais de  $Cl^-$  estão presentes na membrana plasmática de todos os tipos de célula assim como em cada uma das organelas subcelulares incluindo membrana celular, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossoma, endossoma e mitocondria. Além de ampla distribuição, existe um número muito grande de diferentes tipos de canais de  $Cl^-$  com propriedades biofísicas diferentes (FRIZZELL & HALM, 1990; ALVAREREZ-LEEFMANS & RUSSEL, 1991; SINGH et al., 1995).

Como em muitos tipos de células o  $Cl^-$  não está em equilíbrio eletroquímico, a modulação da condutância ao  $Cl^-$  poderá promover movimento transmembrana de  $Cl^-$  que poderá influenciar a atividade elétrica das células incluindo neurônios e células musculares (SINGH et al., 1995).

Canais de  $\text{Cl}^-$  servem a uma ampla variedade de funções celulares específicas. Em células de músculo esquelético a permeabilidade anormal ao  $\text{Cl}^-$  é uma patologia conhecida que ocorre em algumas formas de miotonia (SINGH et al., 1995). Também já está bem documentada a contribuição de canais de  $\text{Cl}^-$  na absorção e secreção de fluido e eletrólitos. Pacientes com fibrose cística demonstram as conseqüências crônicas de poucos canais de  $\text{Cl}^-$  abertos, enquanto pacientes com diarreia demonstram o efeito agudo (ALVAREREZ-LEEFMANS & RUSSEL, 1991; FRIZZELL, 1987).

#### 1.5- LAXATIVOS ESTIMULANTES

A semente da mamona (*Ricinus communis*) contém dois ingredientes nocivos bastante conhecidos: uma proteína extremamente tóxica, ricina, e um óleo composto principalmente de triglicerídeos do ácido ricinoleico (ác. 12-hidroxioléico). O sabor desagradável e as qualidades purgativas do óleo, atribuíveis ao ácido ricinoleico, foram o terror das crianças desde o Egito antigo (BRUNTON, 1996).

O efeito laxativo do ácido ricinoleico ocorre, não através de um efeito irritante ou estimulante do músculo liso intestinal isolado (STEWART et al., 1975a), mas sim por uma inibição da absorção de água e reduzida atividade do músculo circular (STEWART et al., 1975b). Em enterócitos lisados de ratos o ácido ricinoleico, o princípio ativo do óleo de rícino (OR), o deacetilbisacodil, o princípio ativo do bisacodil, e o ácido deoxicólico estimularam a atividade da PKC, embora menos eficientemente que o éster de forbol 4-beta-forbol 12-

meristato 13-acetato (PMA). Isto reflete suas potências em induzir secreção fluida intestinal e liberação de prostaglandinas. Da mesma forma a potência de três ácidos graxos C18, ácido ricinoleico, ácido esteárico e ácido oleico sobre a atividade da PKC *in vitro*, sobre a liberação de PGE<sub>2</sub> e sobre a secreção fluida líquida *in vivo* correm em paralelo. Assim, laxativos estimulantes ativam a PKC, levando a uma liberação de PGE<sub>2</sub>, resultando em secreção fluida líquida (BEUBLER & SCHIRGI-DEGEN, 1993).

Estudos utilizando técnicas de registro mioelétrico mostraram que o OR ou o ácido ricinoleico alteram o estado mioelétrico do jejuno e íleo mas não do duodeno e, que o tempo médio inicial para o desenvolvimento destas alterações ocorre em 3,5 h (MATHIAS et al., 1978).

## 1.6- FISIOPATOLOGIA DA DOR

Embora a dor seja um fenômeno universal, até o presente momento não existe um conceito, do ponto de vista clínico ou fisiológico que seja universalmente aceito. Aristóteles (320 A.C.) definiu a dor como sendo: “um estado de alma, uma experiência oposta ao prazer”. Desde essa época Aristóteles já chamava atenção para a característica psicofisiológica básica da dor, o caráter aversivo desagradável da sensação (OLIVEIRA, 1979).

Os séculos passaram, diversos novos conceitos sobre dor surgiram (BONICA, 1974; MAN, 1975; MANN, 1977) mas, conceituar dor é entretanto um problema ainda em evolução.

Do ponto de vista evolutivo, na realidade, a dor é um sinal de alarme do qual o SNC lança mão para sinalizar um processo de agressão ao organismo e que coloca em risco sua integridade. Esse alarme deflagra um conjunto de reações de adaptação de ordem psicofisiológica, autônoma e motora que visa afastar o organismo da fonte de agressão e preservar sua integridade. Essas reações se manifestam através de fuga ou luta (OLIVEIRA, 1979).

A sensação dolorosa é mediada pela estimulação de receptores específicos para dor, os nociceptores, ou seja receptores de limiar elevado que respondem especificamente ao estímulo de grande intensidade, algogênicos. Os nociceptores parecem se dividir em três classes; os mecanociceptores, os termonociceptores e os nociceptores polimodais, os primeiros sensíveis à estímulos mecânicos intensos, os segundos a estímulos térmicos ( $> 45^{\circ}\text{C}$ ), os terceiros tanto a estímulos mecânicos quanto térmicos. Esses nociceptores representam terminações de neurônios mielinizados (fibras A) mas principalmente não mielinizado (fibras C). Como características fundamentais, não apresentam acomodação, e mais que isso, quando estimulados continuamente, apresentam facilitação e aumento da sensibilidade (CHIANG et al., 1973; LIEBESKIND, 1976; NAKATANI & YAMASHITA, 1977).

De uma maneira bastante resumida pode-se dizer que o sinal doloroso proveniente da periferia, em decorrência da ativação de um dos nociceptores, é integrado a nível medular e a seguir projetado para o encéfalo pelo sistema ântero-lateral. Basicamente as fibras do sistema ântero-lateral ao atravessarem o tronco cerebral se dividem em dois sub-sistemas centrais de transmissão (MANAKA, 1972; MAN & BARAGAR, 1973; KAADA, 1976; MAYER et al., 1976). O sistema neo-espinotalâmico é oligo-sináptico, rápido e a informação

atinge o neo-córtex, o qual está envolvido na percepção e discriminação têmporo-espacial do fenômeno doloroso. O outro sistema é indireto, multissináptico e formado pelas fibras espino-reticulares, espino-cervicais e paleoespinotalâmicas; origina-se na formação reticular, atinge o sistema límbico e o hipotálamo, e dessas estruturas, diretamente ou através da formação reticular, alcança o tálamo medial e daí, através das radiações tálamo-corticais difusas, todo o neo-córtex, mas principalmente a área pré-frontal (MAYER et al., 1976; NAKATANI & YAMASHITA, 1977). Este sistema está envolvido na integração afetivo-motivacional da dor, e na expressão emocional (JENCRICK, 1973; KAADA, 1974).

A modulação da transmissão de sinal doloroso pode ser feita a nível periférico, a nível segmentar ou medular-controle do portão, e a nível central no tronco cerebral. Desta forma, substâncias antinociceptivas ou analgésicas podem atuar em um ou ambos os sítios.

Uma vez que existem trabalhos publicados relatando o efeito analgésico central do OEMV e OP (ALMEIDA et al., 1996; PÉREZ RAYA et al., 1990) decidimos confirmar estes resultados utilizando outros tipos de testes, bem como investigar se haveria um efeito analgésico a nível periférico.

O teste das contorções abdominais é feito através da injeção intraperitoneal de um agente nóxico em ratos e camundongos. Após isso, estes animais mostraram uma resposta consistindo de uma onda de constrição e alongamento passando caudalmente da parede abdominal, algumas vezes acompanhada por uma torção de tronco seguida por uma extensão dos membros posteriores (VANDER WENDE & MARGOLIN, 1956; SIEGMUND et al., 1957). Inúmeras

substâncias e veículos podem desencadear contorções sendo uma delas o ácido acético (COLLIER et al., 1968). A dor induzida pelo ácido acético é indireta e consequência de uma inflamação aguda no peritônio (NORTHOVER, 1963; GYRES & KNULL, 1975). Diversos trabalhos nos anos 50 e 60 mostraram que estas contorções eram abolidas por drogas antipiréticas (SIEGMUND et al., 1957; HENDERSHOT & FORSAITH, 1959; KOSTER et al., 1959; KEITH, 1960) e antagonistas narcóticos (TABER et al., 1964; BLUMBERG et al., 1965; PEARL & HARRIS, 1966). Foi observado haver um considerável aumento nos níveis de  $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$  no fluido peritoneal após a injeção de ácido acético (DERAEDT et al., 1976, 1980). Além das prostaglandinas foi relatado também a participação do sistema simpático nas contorções abdominais (DUARTE et al., 1988). O aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos acompanha a irritação peritoneal (NORTHOVER, 1963, 1964) e o desenvolvimento das contorções abdominais (WHITTLE, 1963, 1964 a e b).

Assim, embora este teste seja considerado um teste nociceptivo periférico o mesmo é pouco específico visto que drogas hipotensoras (PETTIBONE & MUELLER, 1989), anti-histamínicas (YEH, 1986) e depressoras do SNC (TAKAHASHI & PAZ, 1987) podem abolir as contorções induzidas pelo ácido acético.

Células não neuronais produzem uma grande variedade de mediadores químicos que atuam nos neurônios nociceptores durante a inflamação. A descarga desses neurônios é controlada pela atividade de canais iônicos da membrana. Esses mediadores podem ser classificados em dois tipos: agentes ativadores diretos e agentes hiperalgésicos ou sensibilizadores de nociceptores

(MONCADA et al., 1978). É pouco provável que a sensibilização dos nociceptores não seja um fator importante nas muitas formas de dor inflamatória.

Vários estímulos algogênicos (químicos, mecânicos ou físicos) ao atuarem sobre os fosfolípidos da membrana celular levam a formação de substâncias denominadas eicosanóides. O termo “eicosanóide” é derivado de **eicosa**, indicando que há 20 átomos de carbono, e **enoic** que significa “contendo ligações duplas” porque a principal fonte de eicosanóides é o AA (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado que contém quatro ligações duplas. O AA é encontrado esterificado nos fosfolípidos, geralmente na posição 2 e em menor extensão nos glicerídeos de todas as membranas celulares (RANG & DALE, 1993). Uma vez liberado o AA, este é metabolizado rapidamente a produtos oxigenados por diversos sistemas enzimáticos distintos incluindo ciclooxigenases ou uma das diversas lipoxigenases ou citocromo P450s (FITZPATRICK & MURPHY, 1989). Como produto das ciclooxigenases temos as prostaglandinas  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$ ,  $D_2$  e  $I_2$  as quais não ativam diretamente os nociceptores, mas baixam o limiar de excitabilidade para outros estímulos. Essa ação das prostaglandinas parece ser importante no desenvolvimento da hiperalgesia periférica (RANG et al., 1991). O leucotrieno  $D_4$  ( $LTD_4$ ), assim como outros leucotrienos formados por ação das lipoxigenases, não age diretamente sobre neurônios sensoriais mas sim através da liberação de um ácido bioativo, o dihidroxieicosatetraenóico (DIHETE), de leucócitos polimorfonucleares (LEVINE et al., 1986). Por sua vez o  $LTD_4$  produz, em tecidos inflamados, uma rápida interação na expressão de genes com a finalidade de estimular a síntese e liberação de eicosanóides em macrófagos e basófilos (SAMUELSSON et al., 1987). O  $LTD_4$  é também capaz de induzir a liberação de um neuropeptídeo abundante em nociceptores polimodais C, a substância P

(BLOOMQUIST & KREAM, 1987). A bradicinina (BK) assim como a 5-HT, tem dois papéis no desenvolvimento da dor inflamatória: ativação e sensibilização de nociceptores. Ativação de nociceptores causa uma dor patente, imediata, enquanto que a sensibilização dos nociceptores é responsável pelo desenvolvimento da hiperalgia inflamatória (FERREIRA et al., 1993). A BK exógena produz dor por ativar e/ou sensibilizar fibras aferentes nociceptivas C e A (COLLIER & LEE, 1963; FRANZ & MENSE, 1975; BESSON & CHAOUCH, 1987; SZOLCSÁNYI, 1987). A BK induz a produção de Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e IL-1 em culturas de linhas celulares de macrófagos de murinos (TIFFANY & BURCH, 1989).

O agente inflamatório carragenina induz a produção de TNF $\alpha$ , o qual ativa uma cascata de liberação de citocinas. IL-8, induzida por TNF $\alpha$ , estimula a liberação de simpatomiméticos hiperalgésicos (hiperalgia simpatomimética) enquanto que IL-1 $\beta$  e IL-6, induzidas por TNF $\alpha$ , estimulam a liberação de produtos da ciclooxigenase hiperalgésicos (Hiperalgia inflamatória) (CUNHA et al., 1992).

O teste da placa quente é um teste utilizado para o estudo de drogas analgésicas que agem a nível de medula espinhal, onde o sistema supra-espinhal tem vital importância (YASKSH & RUDY, 1977). Tal teste, assim como o da retirada da cauda e o das contorções abdominais, ocorrem através de estímulos físicos de alta intensidade e suas respostas nociceptivas são de curta duração (TJØLSEN et al., 1992; GYRES & TORMA, 1984).

O teste da formalina é um modelo de dor que possibilita avaliar o modo como um animal responde à dor contínua, moderada, gerada por um injúria

tissular (TJØLSEN et al., 1992). Devido esta conexão com a injúria tissular, pressupõe-se que o teste seja um modelo de dor clínica mais válido que os testes com estímulos físicos mecânicos ou térmicos (DUBUISSON & DENNIS, 1977; ABOIT et al., 1981, 1982; ALREJA et al., 1984). Este modelo nociceptivo apresenta duas fases distintas: uma fase transitória inicial, a qual ocorre nos primeiros cinco minutos e uma fase tônica tardia, evidente 15 a 30 minutos após a injeção. A fase inicial reflete a estimulação direta dos nociceptores, enquanto a fase tardia pode estar associada com a liberação de mediadores inflamatórios (DUBUISSON & DENNIS, 1977; HUNSKAAR et al., 1985, 1986; ROSLAND et al., 1990).

Substância P e BK participam na fase inicial enquanto HA, 5-HT, prostaglandinas e BK estão envolvidas na segunda fase (SHIBATA et al., 1989; CORRÊA & CALIXTO, 1993). Parece que além da inflamação periférica, alterações no processamento central são necessárias para a segunda fase (TJØLSEN et al., 1992). Os aminoácidos excitatórios L-glutamato e L-aspartato estão envolvidos no desenvolvimento da sensibilização central e nocicepção persistente associadas à injeção de formalina (CODERRE & MELZACK, 1992).

Drogas antiinflamatórias esteroidais e não esteroidais como a indometacina reduzem o comportamento nociceptivo durante a segunda fase enquanto a primeira fase parece não ser afetada (HUNSKAR & HOLE, 1987; ROSLAND et al., 1990). Drogas de ação central como os narcóticos inibem ambas as fases (HUNSKAR & HOLE, 1987).

Foi proposto que o ON desempenha um papel importante na sensibilização central e na persistência da nocicepção em consequência da injúria tecidual causada pela formalina (MOORE et al., 1991; SHIBUTA et al., 1996).

O ON é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por uma enzima a ON sintetase. Existem pelo menos dois tipos desta enzima. Uma é constitutiva dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, citosólica e libera ON por curtos períodos em resposta a estimulação física ou do receptor. O ON liberado por esta enzima atua como um mecanismo de transdução fundamental a diversas respostas fisiológicas. A outra é induzida após a ativação de macrófagos, de células endoteliais e de um número de outras células, por citocinas e, uma vez expressa, sintetiza ON por longos períodos. É uma enzima citosólica, independente de  $Ca^{2+}$  e requer tetrahydrobiopterina assim como outros co-fatores; sua indução é inibida pelos glicocorticóides. É provável que o ON liberado por esta enzima esteja envolvido em processos patológicos, entre os quais vasodilatação patológica e dano tissular (MONCADA et al., 1991).

Células endoteliais *in vitro* são capazes de liberar ON em resposta a uma grande variedade de substâncias como: BK (PALMER et al., 1987), HA (SAKUMA & LEVI, 1988) e 5-HT (LUSCHER et al., 1990). Macrófagos ativados por lipopolissacarídeos ou citocinas também levam a formação de ON (AMBER et al., 1991). Agentes flogísticos como carragenina e mediadores inflamatórios como o  $LTD_4$  são também indutores de síntese e liberação de ON a partir de leucócitos polimorfonucleares (RIMELE et al., 1988).

MONCADA e colaboradores (1989) propuseram que o ON desempenha um papel importante não somente sobre músculo liso vascular mas, também, sobre os sistemas nervosos central e periférico bem como sobre o sistema imune.

### 1.7- PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM)

A PAM é o produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP) e pode ser diminuída pela ação de drogas sobre um ou ambos os parâmetros (OATES, 1996). O DC é o produto do débito sistólico (DS) e da frequência cardíaca (FC). O DS é o volume de sangue bombeado em cada contração (CARVALHO & COSTA, 1979). Drogas podem reduzir o DC por inibir a contratilidade do miocárdio ou diminuir a pressão de enchimento ventricular. Redução na pressão de enchimento ventricular pode ser obtida por drogas que ajam sobre o tônus venoso ou sobre o volume sanguíneo via efeitos renais. Drogas podem reduzir a resistência periférica por agirem sobre o músculo liso e causar relaxamento dos vasos de resistência ou por interferirem com a atividade dos sistemas que produzem constrição dos vasos de resistência (p. ex. o sistema nervoso simpático) (OATES, 1996).

Os vasos em geral não possuem inervação parassimpática, a exceção dos vasos da genitália, que são inervados pelo segmento sacro do parassimpático. Assim a musculatura vascular recebe inervação simpática extensa. A inervação simpática é de dois tipos: 1) vasoconstrictora (geral): de tipo adrenérgico, extensamente distribuída a todos os vasos arteriais e venosos e, particularmente à rede arteriolar. A atividade destas fibras é de caráter tônico regulada reflexamente pelo SNC. 2) vasodilatadora (especial): de tipo colinérgico, distribuída quase

exclusivamente aos vasos da musculatura esquelética. Estas fibras estão normalmente silentes, só sendo ativadas em situações de emergência (CARVALHO & COSTA, 1979).

A porção central responsável pelo controle do sistema vasoconstritor é o centro vasomotor localizado bilateralmente principalmente na substância reticular do bulbo e no terço inferior da ponte. O centro transmite impulsos parassimpáticos através do nervo vago para o coração e transmite impulsos simpáticos através da medula e nervos simpáticos periféricos para todos ou quase todos os vasos sanguíneos do corpo (COVELL, 1990).

Embora a organização total do centro vasomotor não esteja ainda esclarecida é possível identificar certas áreas importantes como uma área vasoconstrictora que excita os neurônios vasoconstrictores do SNC, uma área vasodilatadora (área “C-1”) cujos neurônios emitem fibras que se projetam para cima da área vasoconstrictora (área “A-1”) e inibem a atividade vasoconstrictora causando vasodilatação e, uma área sensorial (área “A-2”) cujos neurônios desta área recebem sinais nervosos sensoriais principalmente dos nervos vago e glossofaríngeo. Os sinais que chegam desta área sensorial ajudam a controlar a atividade das áreas vasodiladoras e vasoconstrictoras, assim proporcionando controle ‘reflexo’ de algumas funções circulatórias (GUYTON & HALL, 1996). Os mecanismos reflexos envolvendo barorreceptores e quimiorreceptores estariam sob controle desta área.

Os barorreceptores são conhecidos como receptores de estiramento e respondem rapidamente a modificações na pressão arterial; a taxa de impulsos de

disparos aumenta durante a diástole e diminui durante a sístole (HEYMANS & NEIL, 1958).

Os quimiorreceptores podem ser divididos em dois grupos, arterial e cardiopulmonar (BISCOE, 1971). Estes tipos de receptores são os responsáveis pela regulação local do tônus da musculatura lisa dos vasos situados na intimidade do tecido ou do órgão em causa. Dentre as várias espécies moleculares que podem afetar o tônus vascular temos o  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}^+$  que provocam vasodilatação tecidual; o  $\text{O}_2$ , cujo aumento da concentração a nível do miocárdio causa vasoconstricção coronariana (CARVALHO & COSTA, 1979); metabólitos como ADP, adenosina e outros, liberados em condições de anaerobiose, possuem acentuada ação vasodilatadora (RUBIO & BERNE, 1969; CARVALHO & COSTA, 1979).

Existe ainda um número apreciável de substâncias naturais liberadas em condições fisiológicas ou patológicas que exercem influência sobre o tônus vascular. Podemos citar como exemplos o sistema renina-angiotensina envolvido na regulação hidro-salina, a HA envolvida nos processos alérgicos que provoca vasodilatação e aumento de “polipeptídeos vasoativos” ligados ao sistema caliceína-BK que são substâncias vasodilatadoras liberadas nos tecidos em certas condições (CARVALHO & COSTA, 1979; BEST & TAYLOR, 1990).

## **1.8- OBJETIVOS**

### **1.8.1- GERAIS**

- Caracterizar os efeitos farmacológicos do OEMV e seu principal constituinte, OP, em músculo liso gastrointestinal e vascular procurando elucidar o(s) provável(is) mecanismo(s) de ação com fins de sua utilização terapêutica ou como uma possível ferramenta farmacológica.
- Avaliar seus efeitos toxicológicos, atividade analgésica e antidiarreica.

### 1.8.2- ESPECÍFICOS

- Verificar a participação do sistema nervoso nos efeitos do OEMV e OP.
- Estudar os efeitos do OEMV e OP sobre a contração do íleo de cobaia que depende da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.
- Estudar os efeitos do OEMV e OP sobre as contrações induzidas por ACh, HA e potássio.
- Estudar os efeitos do OEMV e OP sobre as contrações que independem de receptores específicos, induzidas por TEA e  $\text{K}^+$ .
- Avaliar os efeitos do OEMV sobre o tônus basal e as movimentações rítmicas das musculaturas circular e longitudinal gástricas bem como sobre os mesmos parâmetros do esfíncter pilórico.
- Determinar as  $\text{DL}_{50}$  do OEMV e OP.
- Avaliar os efeitos tóxicos do OEMV e OP através do estudo da toxicidade subaguda.
- Determinar o provável mecanismo de ação envolvido na atividade analgésica.
- Determinar o provável mecanismo de ação responsável pela atividade antidiarreica.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS:

### 2.1 ISOLAMENTO E CONSTITUIÇÃO DO OEMV E OP

Utilizamos em nosso trabalho o OEMV e seu principal constituinte o OP. A excisata de *Mentha x villosa* n° 27.286 é idêntica a excisata n° 18.681 cuja determinação foi feita pelo Dr. Raymond Harley do Royal Botanic Garden, Kew (U. K.), ambas preparadas com material coletado no Horto de Plantas Mediciniais da UFC. O óleo essencial foi extraído de plantas cultivadas na fazenda experimental da UFC no município de Pentecostes, Ceará. O processo de isolamento do OEMV e do OP obedeceu ao seguinte método: as folhas frescas moídas da planta eram colocadas em um frasco de vidro, conectado em um dos terminais a um vaso de vidro contendo água em ebulição e o outro terminal a um condensador com água fria. O vapor d'água ao passar através das folhas arrastava substâncias voláteis encontradas no material formando uma mistura de vapores. Após a passagem no condensador ocorria a separação das fases hidrofóbicas e hidrofílicas, separadas por decantação (CRAVEIRO et al., 1976). Na fase hidrofóbica ficava retido o OEMV, enquanto na fase hidrofílica encontrávamos o hidrolato o qual era tratado com diclorometano, o qual foi evaporado fornecendo o OP (peso molecular 166,099) (Fig. 2) (BUCKINGHAM, 1994) que é encontrado nas amostras em uma percentagem de 91,09-100%. A ausência do diclorometano no OP foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. A composição do OP e OEMV também foi determinada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa. O OEMV mostrou conter: OP, 79,03%;  $\beta$ -cariofileno, 2,82%; limoneno, 2,38%; óxido de cariofileno 2,29%;  $\gamma$ -muuroleno 2,18%; 1, 8 - cineol, 1,58%;  $\beta$ - pineno, 1,42%; outros constituintes

com pequena participação 3,72%; constituintes não identificados, 0,86% e impurezas 3,32%.

## 2.2 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas foram de grau de pureza analítica obtidos das companhias Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), Merck Sharp Dohme (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A solução nutritiva de Tyrode tinha a seguinte composição (em mM): NaCl, 136; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 0,98; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,36; NaHCO<sub>3</sub>, 11,9; glicose, 5,5. As soluções com alto teor de K<sup>+</sup> (60 mM) foram feitas substituindo-se isotônicamente o NaCl por KCl. As soluções zero cálcio nominal foram preparadas sem a adição de CaCl<sub>2</sub> à solução nutritiva. A solução de NaCl 0,9% (solução salina) continha 154 mM de NaCl. O pH do Tyrode foi ajustado através de HCl 1 N e/ou NaOH 1 M.

## 2.3 DROGAS

As soluções de acetilcolina (ACh), atropina (AT), ácido etileno - bis (β-amino - etil - éter - N, N, N', N' - tetracético) (EGTA), hexametônio (HEX) e histamina (HA) foram preparadas em H<sub>2</sub>O destilada (solução estoque) e adicionadas diretamente na solução de Tyrode. A solução estoque de TTX foi preparada em citrato de sódio com pH entre 4 e 5. A nifedipina (NIF) foi, segundo BAUER et al., (1995), preparada em etanol e protegida da luz. O dibutirato de forbol (PDB) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) e estocado na concentração de 10<sup>-2</sup> M; desta preparava-se uma solução aquosa

$10^{-3}$  M e, adicionávamos 0,1  $\mu$ l na câmara para órgão isolado contendo 10 ml de Tyrode. As soluções do OEMV e do OP foram preparadas por adição de Tween 80 0,1% v/v seguida de agitação manual e sonicação; após a homogeneização estas eram adicionadas à solução de Tyrode. Nas soluções mais concentradas de OEMV e OP houve uma diluição do veículo de 1/50.000. Nestas concentrações o veículo não modificou o efeito. As soluções estoques eram armazenadas a 4 °C até o seu uso. As drogas utilizadas neste trabalho foram de natureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) e Merck (Darmstadt, Germany). A exceção diz respeito ao óleo de rícino e de amêndoa que pertencem ao laboratório Madrevita (Fortaleza, CE, Brasil).

## 2.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Utilizamos em nossos estudos os seguintes animais: cobaias albinos (*Cavia porcellus*) machos, pesando entre 250 - 450 g, oriundos do Biotério do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE); ratos Wistar, adultos, machos e fêmeas, pesando entre 110 - 350 g e camundongos Swiss albinos, machos pesando entre 20 - 35 g; todos provenientes do Biotério Central da UFC, situado no Campus do PICI e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC.

## 2.5 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

Foram utilizados cobaias machos pesando entre 250 e 450 g. Uma vez sacrificado o animal, por concussão cerebral, era feita uma incisão mediana que se estendia desde a região torácica até a região inguinal com o objetivo de

localização e retirada dos órgãos a serem utilizados. Foram retirados a aorta torácica, estômago e íleo distal. Após a cuidadosa remoção da aorta, esta foi rapidamente colocada em uma solução nutritiva de Tyrode, aquecida a 37 °C e feita a remoção de tecidos anexos. Uma vez limpo, a artéria foi cortada transversalmente, formando anéis de aproximadamente 5 mm de comprimento, os quais foram fixos por duas hastes de aço em forma de triângulos, presas a fios de algodão.

Para avaliarmos os efeitos do OEMV e OP no componente contrátil da ACh que não depende do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular induzimos contrações com ACh em solução  $0\text{Ca}^{2+}$  com 0,2mM de EGTA. Em seguida, mediu-se a amplitude da contração promovida por 60 mM de ACh na presença e na ausência do OEMV ou OP após a preparação ficar exposta no meio  $0\text{Ca}^{2+}$  com 0,2 mM de EGTA durante 3 minutos. Quando nesse meio as contrações subsequentes e consecutivas induzidas pela ACh se tornaram menores que a anterior, até o seu completo desaparecimento; o que sugere um esvaziamento do depósito de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizado pela ACh, nessas condições. O recarregamento desse depósito era feito através de uma contração induzida por 60 mM de  $\text{K}^+$ .

Avaliamos também os efeitos do OEMV e OP sobre as contrações produzidas pela ACh em presença de nifedipina. Nesse estudo comparamos inicialmente a contração potássica com a contração da ACh. A concentração de nifedipina (0,3  $\mu\text{g/ml}$ ) foi suficiente para bloquear a contração induzida por 60 mM de  $\text{K}^+$  em solução contendo 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Antes de repetirmos a contração da ACh a preparação era incubada durante 3 minutos com a nifedipina. Para avaliarmos o efeito do OEMV ou OP em presença de nifedipina, a preparação era incubada durante 2 minutos em um dos dois fármacos e mais 3 minutos em

nifedipina, perfazendo um total de 5 minutos de incubação em OEMV ou OP. A retirada do OEMV ou OP através de lavagens sucessivas com Tyrode normal foi suficiente para a recuperação da preparação.

Nos ensaios com estômago de cobaia foram retiradas tiras musculares longitudinais e circulares da região do corpo do estômago, de aproximadamente 2 - 3 cm de comprimento x 3 mm de largura, das quais a camada mucosa foi cuidadosamente removida. O esfíncter pilórico também foi removido, cuidadosamente dissecado e preso em hastes de aço com forma de triângulo presas a fios de algodão.

Do íleo foram retirados segmentos longitudinais de 2 cm de comprimento e tiras musculares circulares de 1 cm de comprimento x 3 mm de largura, a uma distância de 10 - 20 cm da válvula íleo-cecal. As preparações acima citadas, com exceção da aorta torácica e esfíncter pilórico, foram amarradas nas suas extremidades com fio de algodão.

Todas as preparações foram mergulhadas em câmaras para órgão isolado contendo 10 ml de Tyrode aquecido a 37 °C, pH 7,4 e oxigenadas por borbulhamento de ar. Na maioria dos experimentos, após um intervalo de 30 - 60 minutos (tempo necessário para a adaptação da preparação às novas condições), duas contrações foram evocadas através da substituição do líquido nutritivo normal por outro contendo 60 mM de K<sup>+</sup>. A maioria dos dados deste trabalho são normalizados como um percentual da média destas duas contrações iniciais.

O registro das contrações isométricas foi feito em polígrafo Grass, modelo 5D, através da fixação de uma das extremidades da preparação a uma base fixa e

a outra a um transdutor de força (Grass, modelo Ft 03, Quincy, Mass., EUA); também alguns experimentos tiveram seus efeitos registrados em quimógrafo através de alavancas isotônicas de inscrição frontal com uma amplificação de 7 vezes ou alavancas de inscrição tangencial acopladas a manômetro de condom. As tensões de repouso variaram de 0,5 gramas (aorta torácica), 1,0 grama (segmento longitudinal de íleo) e 1,5 grama (musculatura circular e longitudinal de estômago, musculatura circular de íleo e esfíncter pilórico).

Para se medir os efeitos do OEMV e OP sobre o tônus muscular espontâneo considerava-se linha basal controle a linha traçada sem modificações, durante um determinado tempo, pela preparação em estudo. Modificações para cima da linha de base foram consideradas como contrações; o oposto foi considerado como relaxamento. Para mostrar que as modificações existentes foram causadas pelas drogas, um outro fragmento do mesmo órgão era colocado em uma câmara para órgão isolado vizinha e seu traçado registrado no mesmo intervalo de tempo do fragmento tratado.

A amplitude das contrações espontâneas representa a média da amplitude das seis maiores contrações. A frequência das contrações espontâneas foi calculada considerando-se o número de contrações em um intervalo de tempo de 10 minutos e foram expressos em movimento/minuto.

No estudo da circulação mesentérica utilizamos ratos Wistar pesando entre 200 - 250 gramas. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido de uma incisão na cavidade abdominal com a finalidade de localização da artéria mesentérica principal. Em seguida, foi dissecada no ponto de inserção com a aorta abdominal e canulado neste local. Ao nível da porção colônica final

uma das ramificações finais da artéria mesentérica foi ligada e cortada. Através de uma ligeira tensão toda a circulação mesentérica foi desligada das vísceras intestinais e removida do animal. Esta preparação foi perfundida com solução nutritora de Tyrode à uma pressão constante (53 cm de H<sub>2</sub>O), pH 7,4 e temperatura de 37 °C.

A preparação foi deixada em repouso durante 30 minutos para se adaptar às novas condições. Transcorrido esse tempo, fazia-se a primeira coleta do líquido de perfusão, por gotejamento, durante um minuto e media-se o volume. Um minuto após, fazia-se uma nova coleta e medida. Quando o volume tornou-se estável, após três medidas consecutivas tomou-se a média desses valores como o fluxo controle. Em seguida, a preparação era perfundida com uma solução de Tyrode contendo 60 mM de K<sup>+</sup>, e cinco minutos depois media-se o fluxo mesentérico em períodos intercalados de 1 minuto, até se conseguir estabilidade das medidas de fluxo para a solução com alta [K<sup>+</sup>].

Para se avaliar os efeitos vasodilatadores do OP nos vasos da circulação mesentérica, utilizaram-se concentrações crescentes do OP na presença de 60 mM de K<sup>+</sup>. A cada mudança na concentração do OP, esperava-se 5 minutos antes de ser feita a primeira coleta e medida. Transcorrido esse tempo o procedimento era igual ao já descrito anteriormente.

Para as medidas eletrofisiológicas, usou-se a técnica do microeletrodo intracelular. Os potenciais transmembranas foram medidos através de micropipetas (resistência de 50 - 100 MΩ) preenchidas com 3 M de KCl e conectadas, através de fio de prata, a um eletrômetro (modelo M4-A, New

Haven, CT) e monitorados em um osciloscópio (Tektronix, model 5111A, Beaverton, OR, USA).

## 2.6 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 2.6.1 Determinação da $DL_{50}$ (dose letal para 50% dos animais tratados):

Para a determinação da  $DL_{50}$  por via oral utilizamos grupos constituídos de 10 camundongos pesando entre 20 - 30 g. Cada grupo recebia por via oral através de uma cânula oro-gástrica, diferentes doses do OEMV ou OP. Em seguida os animais eram colocados em gaiolas com ração e água *ad libitum* e observados durante 48 h. A determinação da  $DL_{50}$  foi feita através da interpolação semilogarítmica, onde foram plotados no eixo das ordenadas os valores dos probitos correspondentes ao percentual de mortes e, no eixo das abcissas as doses de OEMV e OP usadas.

### 2.6.2 Toxicidade sub-aguda:

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 110 - 150 g. Cada grupo foi constituído por 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) e separados em gaiolas de acordo com o sexo. Os grupos foram tratados diariamente por via oral com as doses de 40 ou 80 mg/kg do OP e 55 ou 110 mg/kg do OEMV (10 ou 20% da  $DL_{50}$ ), durante 30 dias. O grupo controle recebeu um volume correspondente de água destilada e tween 80 0,1% v/v. Os animais foram anestesiados com éter etílico e, através de um tubo de microhematócrito, foi feita a punção do sangue no plexo venoso orbital. Este procedimento foi feito no início e no fim do tratamento para a análise de

parâmetros bioquímicos e hematológicos, os quais foram realizados através do laboratório de análises clínicas do HUWC. Os animais eram pesados semanalmente e, diariamente os animais eram observados para evidenciação de alterações comportamentais ou de natureza tóxica.

### **2.6.3 Atividade antinociceptiva:**

#### **2.6.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético**

A metodologia utilizada neste ensaio seguiu o modelo proposto por VANDER WENDE & MARGOLIN (1956) para ratos, e modificado por KOSTER e cols. (1959) para camundongos. Utilizamos camundongos Swiss, machos, pesando 20 - 30 g. Cada grupo experimental foi constituído de 10 a 20 animais. Os animais eram deixados em jejum de 8 - 12 h à noite prévia. A via de administração do ácido acético a 0,6% (v/v) foi a intraperitoneal (i.p) e injetado um volume de 0,1 ml/10 g de peso. Em seguida era feita a contagem do número de contorções abdominais durante 20 minutos sendo iniciada a contagem 10 min. após a injeção do ácido. Uma hora antes da avaliação os animais dos grupos controle e tratados receberam por via oral (v.o), água destilada mais tween 0,1% e, 10, 100 e 200 mg/kg de OEMV e OP, respectivamente.

#### **2.6.3.2 Teste da formalina**

Segundo HUNSKAAR e cols. (1985) o teste da formalina consiste na injeção intraplantar de formalina (20 µl de uma solução a 1% v/v) na pata direita

traseira do camundongo e registrado o tempo, transcorrido em segundos, que o animal passa lambendo a pata durante as fases inicial (0 - 5 min.) e tardia (20 - 25 min.) (TJØLSEN et al., 1992). Nesses animais o teste deve ser realizado à temperatura ambiente de 22 - 23 °C ou 26 - 28 °C e na ausência de fatores experimentais que possam afetar o fluxo sanguíneo periférico, devido a grande sensibilidade das resposta na segunda fase (tardia).

Neste teste utilizamos camundongos Swiss (20 - 30 g), machos, em jejum de 12 h. As doses de 50, 100 e 250 mg/kg de OEMV e OP foram administradas por via oral, através de uma cânula oro-gástrica, 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina. Os animais do grupo controle receberam, por via oral, uma solução de água destilada contendo tween 0,1% num volume de 0,1 ml/10 g de peso, uma hora antes da injeção de formalina.

A naloxona (2 mg/kg), um antagonista opióide, foi administrada por via subcutânea (s.c) 15 min. antes do tratamento com OEMV e OP ou morfina (4 mg/kg, s.c), administrada 30 min. antes da injeção de formalina.

### **2.6.3.3 Teste da placa quente**

É um teste utilizado quando se pesquisa substâncias que agem a nível do SNC. Este teste, proposto por WOLFF & MCDONALD em 1944 e modificado por outros pesquisadores (CARLINI, 1973), consiste em colocar camundongos sobre uma placa quente ( $50 \pm 5^\circ\text{C}$ ) e observar quantos segundos os animais levam para manifestar uma reação (lamber as patas posteriores ou saltar sobre a placa) ao estímulo térmico. Os camundongos que apresentaram uma dessas

reações em um intervalo de tempo de até 20 segundos foram selecionados para o teste. Cada grupo tratado foi constituído por 10 animais pesando entre 20 e 30 g. O grupo controle (n=19) recebeu, por v.o., salina 0,9% e os grupos tratados receberam as doses de 100 e 200 mg/kg de OEMV e OP, 1 hora antes, pela mesma via. A morfina (10 mg/kg) foi administrada por via s.c. e, imediatamente após, os animais foram colocados na placa quente.

#### **2.6.4 Pressão arterial média**

Para analisar os efeitos do OEMV e OP sobre a PAM foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos, pesando 180 - 350 g. Os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg) por via i.p. e, uma vez verificado que o animal apresentava um estado de anestesia cirúrgica, este foi fixado com fio de algodão através dos dentes incisivos superiores e das patas posteriores, em decúbito dorsal à uma placa de cortiça. Uma lâmpada incandescente foi colocada próxima ao corpo do animal na tentativa de regular a temperatura corporal entre 36 - 37 °C . A cirurgia consistia inicialmente em localizar e isolar a veia ilíaca externa em uma das patas e introduzir um tubo de polietileno (nº 60) com uma ponta de agulha (30 x 8) preenchido com solução salina heparinizada. Em seguida, foi feita uma incisão longitudinal da pele, na face ventral do pescoço e afastava-se as glândulas salivares parotidianas. Uma vez localizados, os músculos esterno-cleido-mastóideo e hióideo, com uma pinça afastava-se as fibras musculares do músculo hióideu até encontrar-se o feixe carótida-nervo vago. A carótida foi isolada do nervo vago, tendo-se o cuidado para não lesarmos este último; dava-se um nó com uma linha localizada mais cefalicamente, enquanto que outra linha era colocada à frente da pinça bulldog com a finalidade de fixar a

cânula acoplada ao manômetro de condon à carótida. Esta cânula foi também previamente heparinizada. Após 10 min. de estabilização da PAM, o OP e OEMV foram injetados na forma de *bolus*, nas doses de 0,3; 1; 3; 5 e 10 mg/kg e 0,3; 1; 3; 5; 10 e 20 mg/kg, respectivamente. As injeções endovenosas foram feitas em um intervalo de tempo de 15 - 30 segundos e não ultrapassaram o volume total de 0,3 ml, com o objetivo de se evitar alterações hemodinâmicas nas respostas das preparações. O registro das alterações pressóricas foi feito em quimógrafo e expresso como variação da pressão arterial em relação à pressão arterial controle.

#### **2.6.4.1 Frequências cardíaca e respiratória, parâmetros hematológicos e gasometria.**

Nos animais usados para estudo das variações de pressão induzidas pelo OEMV e OP, também foram analisados se estas substâncias promoviam alterações das frequências cardíaca e respiratória, dos parâmetros hematológicos e de gasometria. Os eletrodos eletrocardiográficos foram implantados nas axilas direita e esquerda e região inguinal direita e esquerda. A monitorização da frequência respiratória foi feita através da contagem dos movimentos respiratórios a cada minuto, com o auxílio de um cronômetro. Após a administração da última dose de cada uma das drogas em estudo, o sangue arterial era colhido através da cânula implantada na artéria carótida através de uma seringa descartável de 3 ml. As análises de pH e gasometria foram feitas através de um gasômetro modelo COMPACT 1 Blood Gas Analyzer (AVL), do Laboratório Central do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC). O hematócrito foi feito também no Laboratório Central do HUWC.

### 2.6.5 Trânsito intestinal e diarreia

A metodologia adotada foi a descrita por JOSHI e cols. (1987).

Utilizamos camundongos pesando entre 20 - 30 g. Os animais foram deixados em jejum durante 24 h recebendo somente água *ad libitum*. Nos experimentos desenvolvidos para avaliar os efeitos do OEMV (200, 250 e 300 mg/kg) e OP (10, 100 e 200 mg/kg) sobre o trânsito intestinal normal, estas drogas foram administradas por via oral 30 minutos antes da solução aquosa de carvão 10% em 5% de goma arábica (0,4 ml/animal). Vinte minutos após a administração da solução de carvão, os animais eram sacrificados através de inalação de éter e os intestinos removidos. A distância percorrida pelo marcador foi medida e expressa como o percentual do comprimento total do intestino, do piloro ao ceco.

No estudo da diarreia induzida pelo óleo de rícino os animais foram deixados em jejum durante 12 h recebendo água *ad libitum*. Os animais foram mantidos individualmente, em recipientes plásticos onde foram colocados 6 papéis previamente pesados, sendo cada papel analisado ao longo de cada hora durante 6 h. A análise consistia em pesar os papéis e contar o número de evacuações a cada hora. O grupo controle recebeu óleo de amêndoa (0,1 ml/10 g) por animal. Os animais do grupo tratado receberam as doses de 1, 10, 100 e 200 mg/kg de OEMV e OP, solubilizadas em óleo de amêndoa, na proporção de 0,1 ml/10g. Tanto os animais do grupo controle quanto os animais tratados

receberam, 30 minutos após, OR (0,5 ml/animal). A administração das drogas foi feita através de sonda gástrica.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros bioquímicos e hematológicos da toxicidade sub-aguda foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (D.P.M.) e comparados através do cálculo do intervalo de confiança de 95% (n=46) obtido do grupo controle. Foram considerados significativos os valores que ficaram fora deste intervalo. Os demais resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M), onde n representa o n<sup>o</sup> de experimentos. São considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5 % ( $p < 0,05$ ). Para comparação de mais de dois grupos experimentais foram utilizados ANOVA e testes paramétricos e não paramétricos. As  $CE_{50}$  e  $CI_{50}$  foram calculadas por interpolação semilogarítmica e são consideradas neste trabalho como a concentração da substância capaz de produzir 50% do seu efeito correspondente.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

##### 3.1.1 EFEITO INTRÍNSECO DO OEMV E DE SEU PRINCIPAL CONSTITUINTE, O OP

Foram estudados os efeitos do OEMV e OP, sobre a contratilidade de músculos lisos gastrointestinais de cobaia, sobre alguns parâmetros cardiovasculares de ratos e sobre o trânsito intestinal de camundongos. Os estudos sobre o tônus foram feitos considerando-se o nível basal de contração sem a interferência de substância exógena.

##### 3.1.1.1 Efeitos do OEMV e OP sobre o tônus basal e a motilidade de músculos lisos gastrointestinais:

Para se estudar os efeitos do OEMV e OP sobre o tônus basal (1,0 g para o músculo longitudinal ileal e 1,5 g para os músculos circular do íleo e estômago, longitudinal do estômago e esfíncter pilórico) e sobre os movimentos rítmicos gastrointestinais utilizaram-se diversas preparações musculares. O OEMV foi utilizado em concentrações entre 0,1 e 800  $\mu\text{g/ml}$  enquanto o OP foi utilizado em concentrações entre 1 e 740  $\mu\text{g/ml}$  (6 e 4562  $\mu\text{M}$ ). Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o tônus basal e sobre a frequência dos movimentos rítmicos dos músculos lisos isolados intestinal e gástrico de cobaia.**

PREPARAÇÃO	<i>Mentha x villosa</i>			Óxido de piperitenona	
	<sup>a</sup> CE <sub>50</sub>	Efeito máximo <sup>c</sup> (E.M)		<sup>a</sup> CE <sub>50</sub>	Efeito máximo <sup>c</sup>
	Tônus basal (T.B)	Amplitude das mov. rítmicas (A.M.R)	Relaxamento	Tônus basal	Relaxamento
Esfincter do piloro	1,4 ± 0,48 <sup>e</sup> (19) <sup>b</sup>	23,2 ± 6,32 <sup>d,f</sup> (13)	45,1 ± 11,78* (19)	—	—
Músc. circ. gástrico	<sup>d</sup> 20,1 ± 7,92 <sup>e</sup> (15)	37,0 ± 18,57 (6)	18,5 ± 11,85 <sup>g</sup> (15)	—	—
Músc. long. gástrico	<sup>d</sup> 163,3 ± 37,00 (22)	63,5 ± 12,18 (10)	79,6 ± 17,70* (7)	—	—
Músc. circ. ileal	<sup>d</sup> 19,7 ± 9,00 <sup>e</sup> (12)	—	22,4 ± 7,62* (12)	—	—
Músc. long. ileal	<sup>d</sup> 36,1 ± 10,26 <sup>e</sup> (11)	—	17,3 ± 4,24* (11)	79,7 ± 17,40 (14)	13,5 ± 3,04* (14)

<sup>a</sup>, valores de CE<sub>50</sub> em µg/ml.

<sup>b</sup>, valores expressos como média ± EPM (número de observações).

<sup>c</sup>, efeito máximo em porcentagem da contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>.

<sup>d</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Dunn's method) da CE<sub>50</sub> do OEMV sobre o T.B do esfíncter pilórico em relação as CE<sub>50</sub> sobre o T.B dos diversos musc. gastrointestinais.

<sup>e</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Dunn's method) da CE<sub>50</sub> do OEMV sobre o T.B do musc. gástrico em relação as CE<sub>50</sub> sobre o T.B dos diversos musc. gastrointestinais.

<sup>f</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Dunn's method) da CE<sub>50</sub> do OEMV sobre A.M.R do musc. long. gástrico em relação a CE<sub>50</sub> sobre A.M.R do esfíncter pilórico.

<sup>g</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Dunn's method) da CE<sub>50</sub> do OEMV sobre o E.M do músc. circ. gástrico em relação a CE<sub>50</sub> sobre o E.M do músc. long. gástrico.

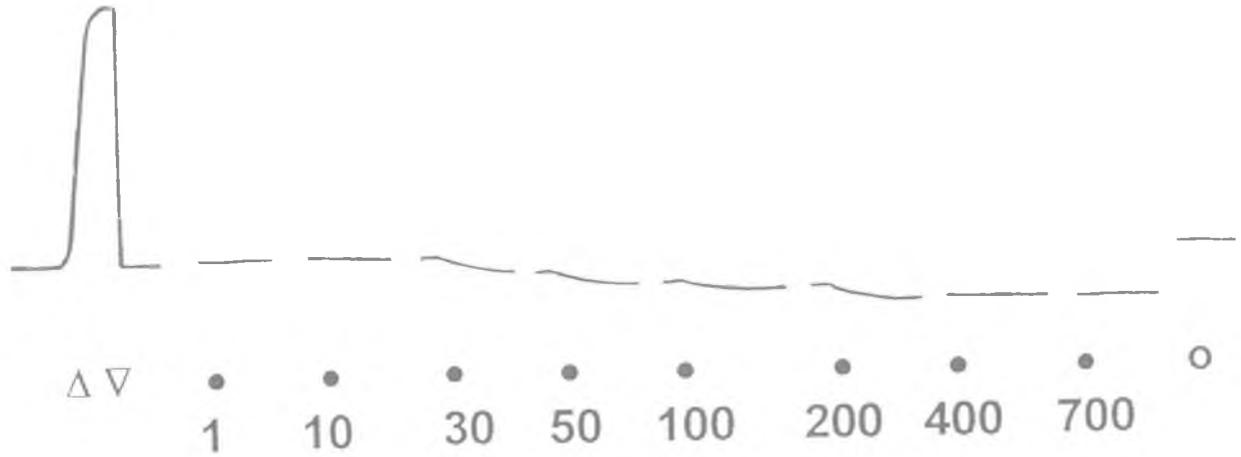
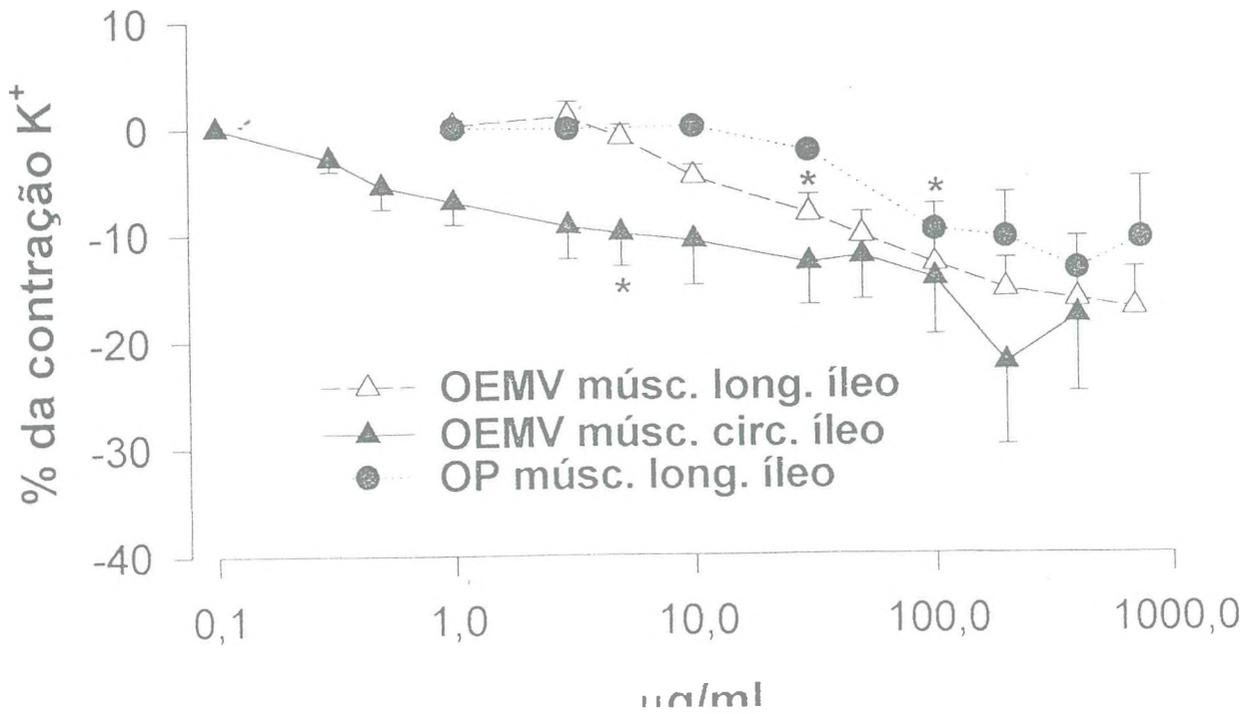
\*, diferente (p<0,05; Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test). do controle (tônus basal na ausência do OEMV ou OP)

Em músculos lisos longitudinal e circular de íleo de cobaia (Fig. 3a) o OEMV e o OP promoveram uma diminuição do tônus basal. Na musculatura longitudinal, OEMV e OP, nas concentrações de 3 – 700  $\mu\text{g/ml}$  (n=11) e 30 – 740  $\mu\text{g/ml}$  (n=14), promoveram, respectivamente, um relaxamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Student-Newman-Keuls test) dose-dependente (vide tabela 2) e estatisticamente significantes. Na musculatura circular o OEMV nas concentrações de 0,3 – 400  $\mu\text{g/ml}$  (n=12) também promoveu um relaxamento dose-dependente e estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's Method). As  $CE_{50}$  e a amplitude máxima do relaxamento para o OEMV e OP em cada um dos músculos lisos encontram-se sumarizados na tabela 1. O OEMV apresentou uma  $CE_{50}$  significativamente menor ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's Method) e um relaxamento máximo maior, apesar de não significativo quando comparado ao OP.

No músculo liso circular gástrico de cobaia (Fig. 4) o OEMV não promoveu alteração significativa sobre o tônus basal. O músculo longitudinal gástrico apresentou em todos os experimentos, um relaxamento dose-dependente (vide tabela 2) ao OEMV cujo efeito relaxante máximo foi obtida na concentração de 800  $\mu\text{g/ml}$  e foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's Method).

**Fig. 3-** Efeito miorrelaxante do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o tônus basal das musculaturas longitudinal e circular do íleo de cobaia.

Em **a**, traçado registrado em quimógrafo, iniciado com uma contração de 60 mM de  $K^+$ , seguido do efeito próprio do OEMV sobre a musculatura longitudinal do íleo. Os triângulos com os vértices para cima e para baixo representam, respectivamente, o momento da aplicação e lavagem de 60 mM de  $K^+$ . Os números abaixo da figura representam concentrações expressas em  $\mu\text{g/ml}$  e os círculos cheios ( $\bullet$ ) o momento da aplicação. O círculo vazio ( $\circ$ ) representa a remoção do OEMV através de lavagens sucessivas da preparação com Tyrode normal durante 60 min. Transcorrido esse tempo houve recuperação da linha de base (traçado horizontal, à direita) e da responsividade do músculo ao estímulo potássico de maneira semelhante ao estímulo inicial (dado não mostrado). Observe o relaxamento dose-dependente. As interrupções ao longo do registro representam o tempo em que o quimógrafo permaneceu parado. Calibração: horizontal, 10 min.; vertical, 1,7 cm. Em **b**, gráfico das alterações médias do tônus basal das musculaturas longitudinal e circular do íleo induzidas por OEMV e OP. \*, concentrações do OEMV ou OP a partir das quais o relaxamento é estatisticamente significativo em relação ao controle (tônus basal na ausência de OEMV e OP) ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**a****b****c**

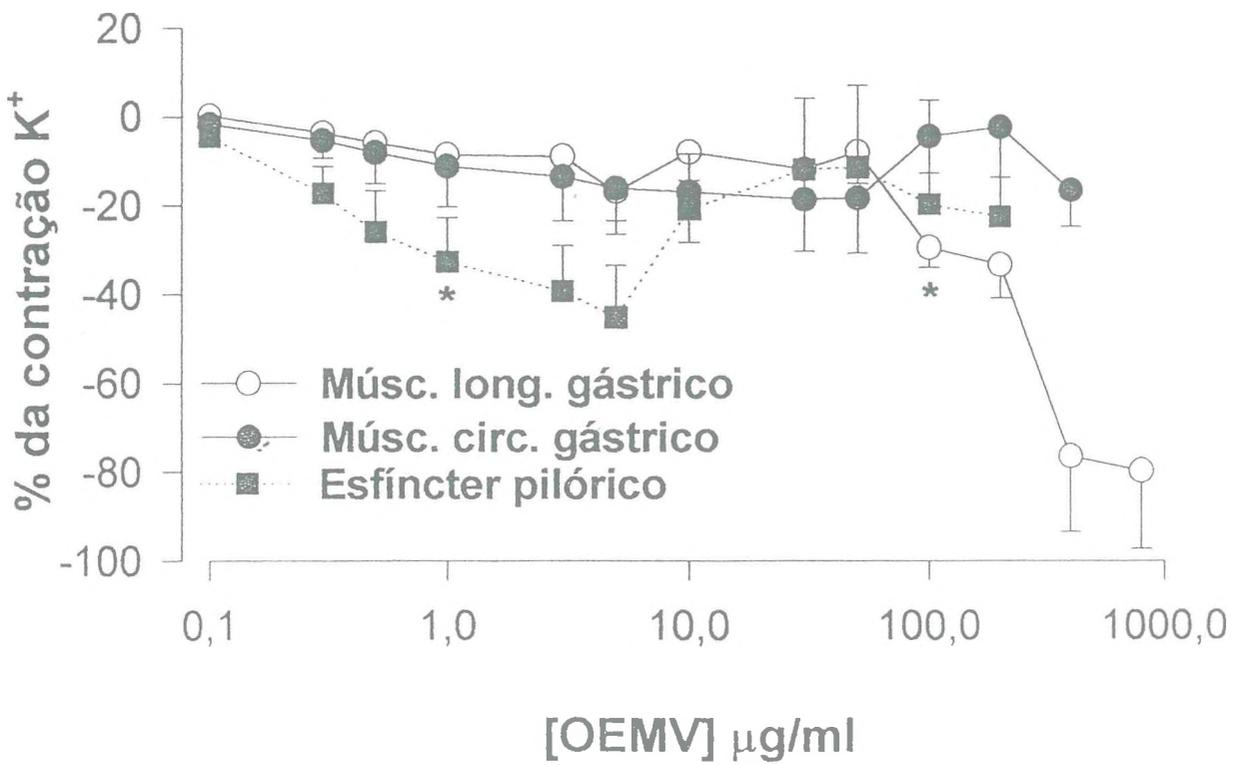
**Fig. 4- Efeito miorrelaxante do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre o tônus basal das musculaturas longitudinal, circular e esfíncter pilórico do estômago de cobaia.**

Em **a**, traçado poligráfico de uma dose única de OEMV (200 µg/ml) sobre o tônus basal da musculatura longitudinal do estômago de cobaia. Observe o relaxamento e, após a lavagem, o retorno à linha de base do controle. À esquerda, os triângulos com os vértices voltados para cima e para baixo representam, respectivamente, o momento da aplicação do OEMV (200 µg/ml) e a lavagem da preparação com Tyrode normal. As interrupções ao longo do traçado representam o tempo em que o quimógrafo permaneceu parado. Calibrações: horizontal, 2 min.; vertical, 0,23 g de força. As setas para cima e para baixo, à direita, representam, o momento da aplicação e remoção, respectivamente, à preparação, de Tyrode com 60 mM de K<sup>+</sup>. Em **b**, gráfico das alterações médias do tônus basal das musculaturas longitudinal e circular do estômago e do esfíncter pilórico induzidas pelo OEMV (0,1 – 800 µg/ml). \*, concentração do OEMV a partir da qual o relaxamento é estatisticamente significativo em relação ao controle (tônus basal na ausência de OEMV) (p<0,05; ANOVA, Dunn's method).

a



b



O OEMV, sobre o tônus basal do esfíncter pilórico, induziu um padrão de relaxamento semelhante ao produzido sobre o músculo circular gástrico. Em pequenas concentrações o OEMV (0,1 – 5 µg/ml) induziu um relaxamento cuja amplitude máxima foi de  $-45,1 \pm 11,78$  percentuais da contração induzida por 60 mM de  $K^+$ , em relação ao controle. Nas concentrações de 10 – 200 µg/ml, o OEMV promoveu relaxamentos médios menores, voltando ao nível do controle.

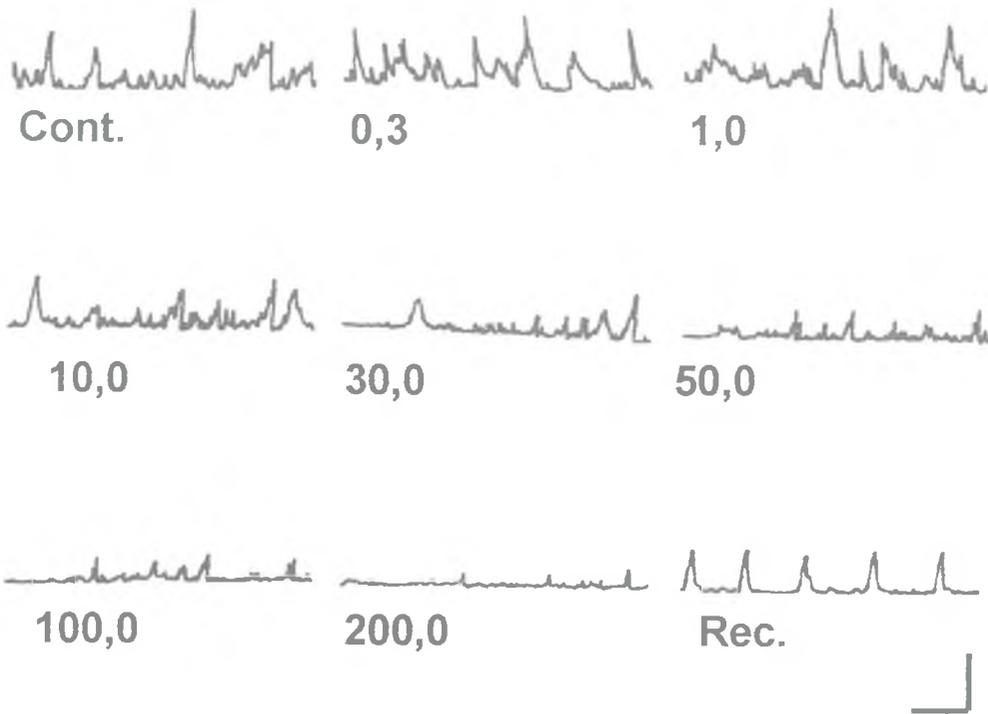
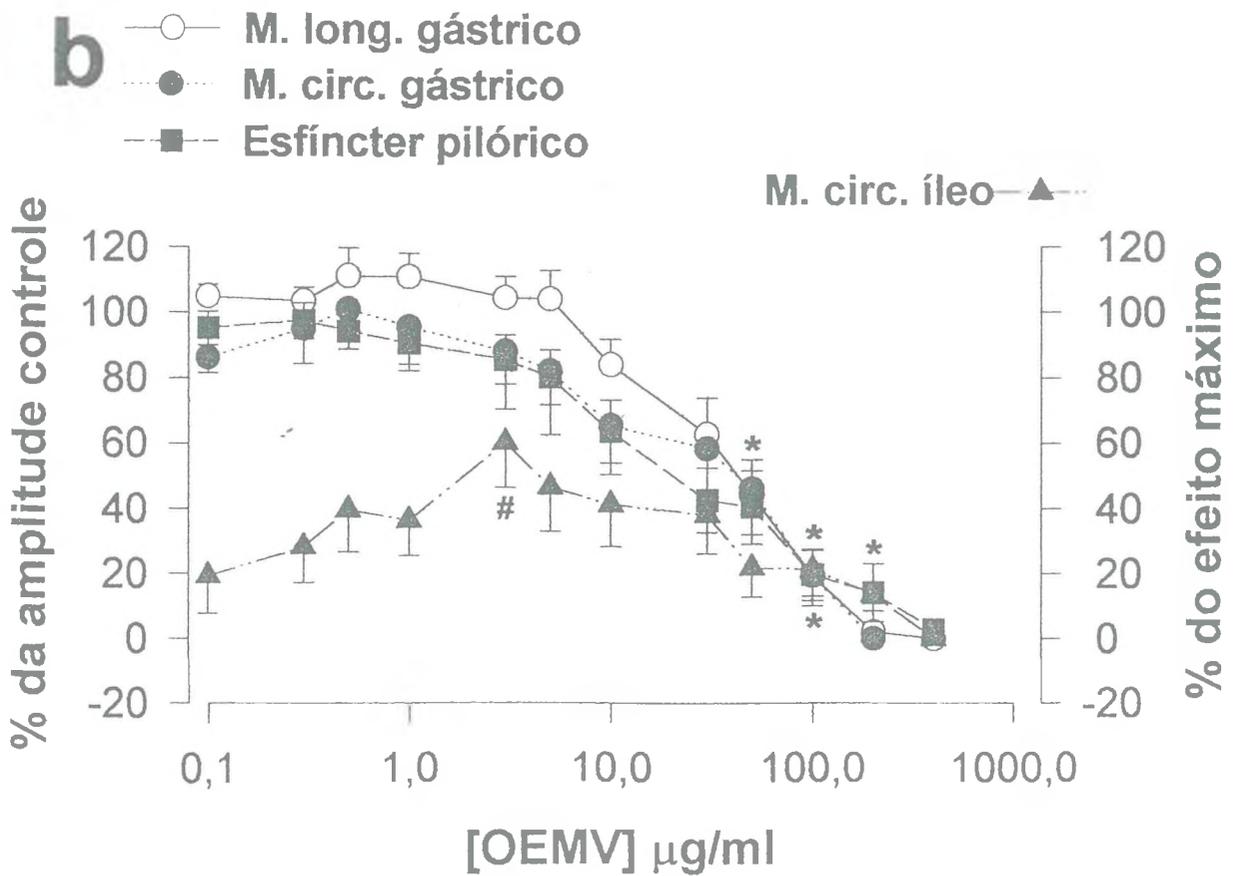
Em todos os experimentos onde se avaliou o efeito do OEMV sobre o tônus basal, tanto nas preparações onde foi observado relaxamento ou contração no final do experimento, estes efeitos foram reversíveis pela remoção do óleo.

Na atividade rítmica espontânea do músculo circular do íleo de cobaia (Fig. 5) o OEMV, em concentrações entre 0,3 – 3,0 µg/ml, induziu aumento da amplitude das movimentações rítmicas em seis de nove preparações, cuja média máxima da amplitude foi  $60,33 \pm 13,81\%$  (n=6) em relação ao percentual da amplitude de controle ( $0,19 \pm 0,06$  g; n=9). A amplitude máxima não foi significativa em relação ao controle. A dependência do efeito em relação a dose teve, um comportamento bifásico, sendo a amplitude máxima obtida com a concentração de 3 µg/ml, seguida de um decaimento, que evoluiu para bloqueio total desta atividade rítmica com a dose de 200 µg/ml. Essa amplitude máxima, foi significativamente diferente do efeito inibitório máximo induzido por concentrações de OEMV superiores a 100 µg/ml ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's test). Para dose dependência vide tabela 2.

Em relação à atividade contrátil rítmica dos músculos circular ( $0,39 \pm 0,10$  g; n=6) e longitudinal ( $0,31 \pm 0,04$  g; n=10) gástricos e do esfíncter pilórico

**Fig. 5- Alteração da amplitude das movimentações espontâneas de diversos músculos gastrointestinais de cobaia induzida pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV).**

Em **a**, traçado poligráfico mostrando o efeito de concentrações crescentes ( $\mu\text{g/ml}$ ; mostrado logo abaixo de cada traçado) do OEMV sobre amplitude das movimentações espontâneas do esfíncter pilórico de cobaia. Calibrações: horizontal, 2 min.; vertical, 0,5 g de força. Em **b**, gráfico das médias das alterações de amplitude das movimentações espontâneas das musculaturas longitudinal e circular gástricas, musculatura circular ileal e esfíncter do piloro de cobaia induzidas pelo OEMV. Abscissa, concentrações do OEMV (0,1 – 200  $\mu\text{g/ml}$ ) expressas em  $\mu\text{g/ml}$ ; ordenada à esquerda, percentual da amplitude controle ( $0,31 \pm 0,04$  g de força, musculatura longitudinal gástrica;  $0,39 \pm 0,10$  g de força, musculatura circular gástrica;  $0,56 \pm 0,10$  g de força, esfíncter pilórico); ordenada à direita, percentual do efeito máximo da amplitude controle ( $0,19 \pm 0,06$  g de força, musculatura circular ileal). \*, concentração do OEMV a partir da qual há uma diminuição da amplitude estatisticamente significativa em relação à amplitude controle (amplitude inicial na ausência de OEMV) ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method). #, estatisticamente significativa da diminuição máxima da amplitude do músculo circular do íleo ( $p < 0,05$ ; Teste t pareado).

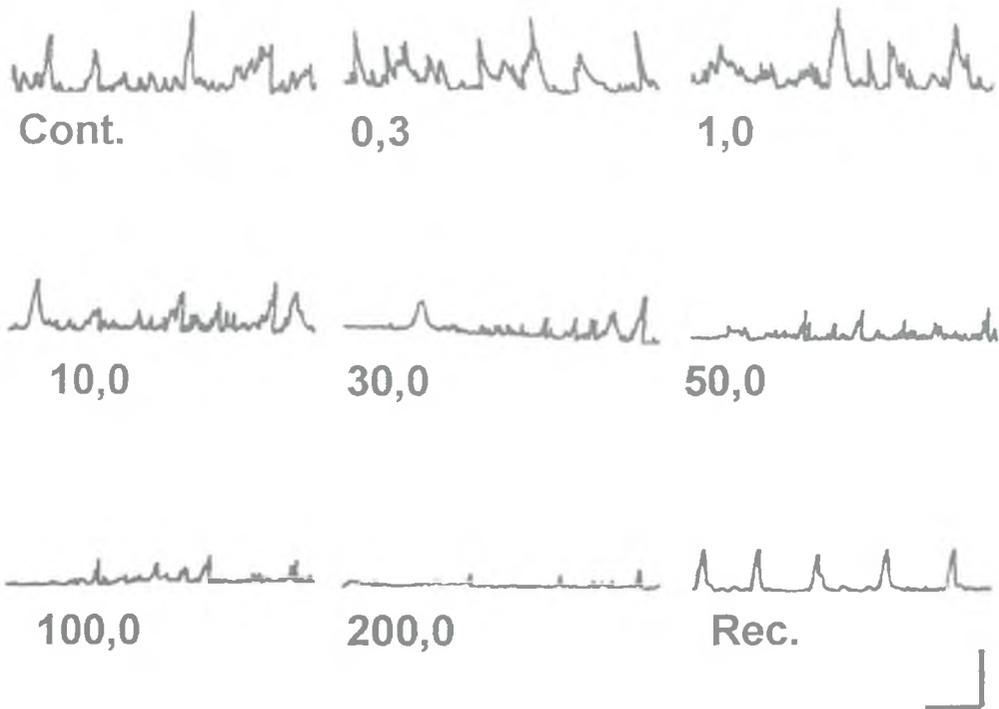
**a****b**

( $0,56 \pm 0,10$  g;  $n=13$ ) de cobaia o OEMV induziu, de maneira concentração-dependente, uma diminuição da amplitude dessas contrações; com exceção do músculo longitudinal gástrico no qual as concentrações de OEMV entre  $0,1 - 5$   $\mu\text{g/ml}$  induziram um aumento não significativo dessa amplitude (Fig. 5). As  $CE_{50}$  do OEMV e os efeitos máximos sobre as atividades rítmicas em cada uma das preparações encontram-se sumarizados na tabela 1. Sobre a amplitude média das movimentações rítmicas o OEMV, na concentração de  $400$   $\mu\text{g/ml}$ , anulou totalmente o valor deste parâmetro nos músculos circular, longitudinal e esfíncter pilórico.

Em relação a frequência das movimentações rítmicas do músculo circular do íleo houve também um aumento, em seis de nove preparações, apesar de não significativo, com doses crescentes de OEMV até  $30$   $\mu\text{g/ml}$ , cuja média máxima foi  $67,0 \pm 13,81\%$  ( $n=6$ ) em relação ao percentual da frequência controle ( $0,9 \pm 0,3$  mov./min.,  $n=9$ ). Com a concentração acima de  $30$   $\mu\text{g/ml}$ , houve uma diminuição do número de contrações rítmicas, cujo mínimo foi obtido com  $200$   $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 6). Sobre a frequência das movimentações rítmicas dos músculos circular (controle:  $3,6 \pm 0,2$  mov./min.,  $n=11$ ) e longitudinal ( $2,8 \pm 0,2$  mov./min.,  $n=17$ ) gástricos, o OEMV, nas concentrações entre  $0,1 - 50$   $\mu\text{g/ml}$  pouco afetou este parâmetro, contudo na concentração de  $100$   $\mu\text{g/ml}$  (a qual o que restou de amplitude ainda permitiu resolução na medida da frequência) a redução se tornou mais evidente,  $65,3 \pm 9,65\%$  para a musculatura circular e  $62,8 \pm 11,71\%$  para a musculatura longitudinal, sendo significativamente diferente (Teste *t* pareado) das respectivas frequências controle. Sobre a frequência das movimentações rítmicas do esfíncter pilórico o OEMV na concentração de  $100$   $\mu\text{g/ml}$  reduziu a frequência das movimentações rítmicas para  $73,7 \pm 13,90\%$  da frequência controle

**Fig. 6-** Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) sobre a frequência das movimentações espontâneas de diversos músculos gastrointestinais de cobaia.

Em a, traçado poligráfico mostrando o efeito de concentrações crescentes ( $\mu\text{g/ml}$ ; mostrado logo abaixo de cada traçado) do OEMV sobre o esfíncter pilórico de cobaia. Calibrações: horizontal, 2 min.; vertical, 0,5 g de força. Em b, gráfico da média das alterações de frequência das movimentações espontâneas das musculaturas longitudinal e circular gástricas, musculatura circular ileal e esfíncter do piloro de cobaia induzidas pelo OEMV (0,1 – 200  $\mu\text{g/ml}$ ). Abscissa, concentrações do OEMV expressas em  $\mu\text{g/ml}$ ; ordenada à esquerda, percentual de frequência controle ( $3,6 \pm 0,2$  mov./min., para a musculatura circular gástrica;  $2,9 \pm 0,2$  mov./min., para a musculatura longitudinal gástrica;  $3,1 \pm 0,2$  mov./min., para o esfíncter pilórico); ordenada à direita, percentual do efeito máximo da frequência controle ( $0,9 \pm 0,29$  mov./min., musculatura circular ileal). \*, concentração do OEMV a partir do qual há uma diminuição da frequência, estatisticamente significante em relação à frequência controle (frequência inicial na ausência de OEMV) ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**a**

**b** ● M. circ. gástrico  
 ○ M. long. gástrico  
 ■ Esfíncter pilórico

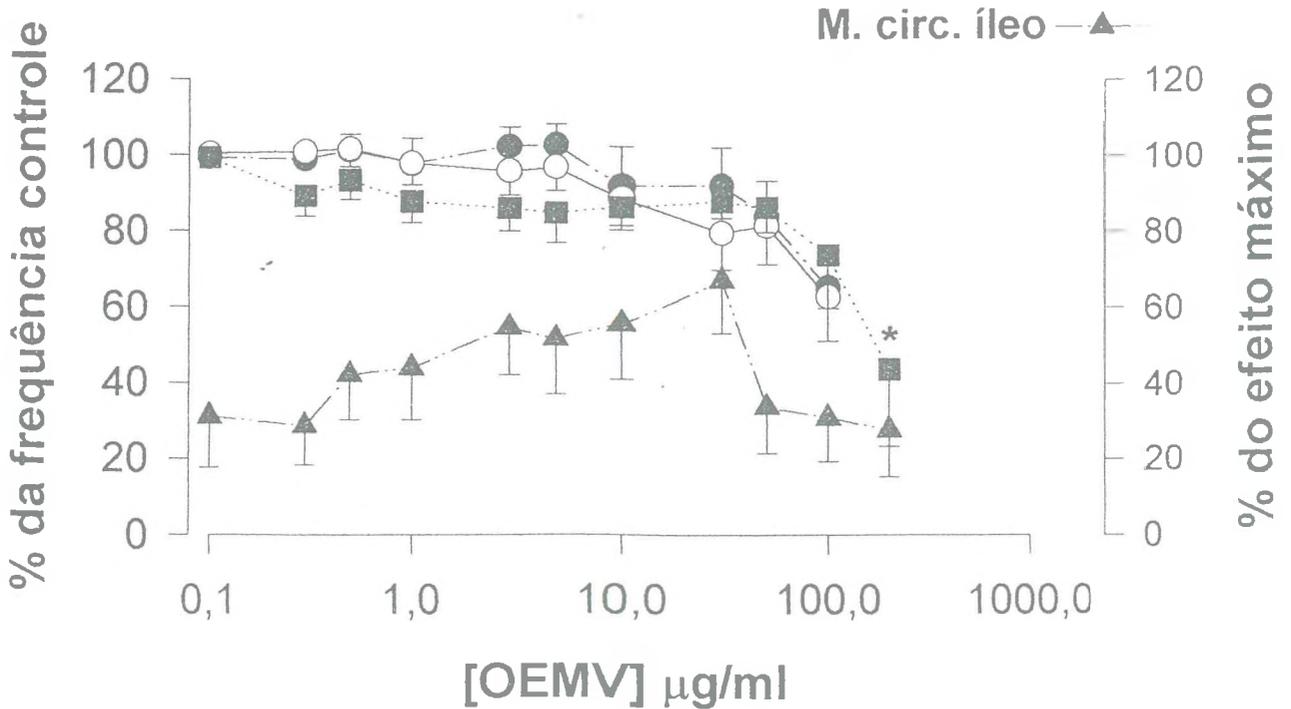


Tabela 2. Dependência do efeito (variável dependente) do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) em relação a concentração (variável independente). Método de regressão linear para efeito em função do log. da dose (efeito =  $\alpha \cdot [\log(\text{concentração})] + \beta$ ;  $\alpha$ =coeficiente angular,  $\beta$ =coeficiente linear).

Estrutura	Parâmetro			Fármaco	Coeficiente Angular		Coeficiente linear	R	Vide Figura
	T. basal	Amplitude das mov. espontâneas	Faixa de Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )		Valor	P <sup>a</sup>			
Mús. Long. íleo	SIM	—	5 — 700	OEMV	-7,86	< 0,0001	3,60	0,57	3
	SIM	—	10 — 400	OP	-9,07	< 0,0001	9,82	0,44	3
Músc. circ. íleo	SIM	—	0,5 — 200	OEMV	-4,98	0,003	-6,36	0,28	3
	—	ascendente descendente	0,1 — 3,0	OEMV	+26,4	0,0166	43,7	0,35	5
	—		5 — 200	OEMV	-21,1	0,0064	62,8	0,37	5
Músc. long. Estômago	SIM	—	50 — 400	OEMV	-58,9	< 0,0001	92,7	0,50	4
	—	SIM	5 — 100	OEMV	-0,189	< 0,0001	0,452	0,663	5
Músc. circ. Estômago	SIM	—	0,3 — 50	OEMV	-5,76	0,1948	-10,1	0,119	4
	—	SIM	1 — 30	OEMV	-27,3	0,0611	97,9	0,346	5
Esfíncter pilórico	SIM	—	0,3 — 5	OEMV	-24,9	0,0300	-31	0,26	4
	—	SIM	1 — 200	OEMV	-36,7	< 0,0001	98,6	0,68	5

<sup>a</sup>P, probabilidade de  $\alpha=0$ , calculado através da variável t, em que  $t=\text{coeficiente de regressão}/\text{erro padrão do coeficiente de regressão}$  (HARSHBARGER, 1971).

( $3,1 \pm 0,2$  mov./min.,  $n= 14$ ). A concentração de  $400 \mu\text{g/ml}$  reduziu a frequência das movimentações rítmicas para  $11,1 \pm 11,11\%$  da frequência controle.

### **3.1.1.2 Efeitos do OEMV e OP sobre o potencial transmembrana**

Em íleo de cobaia mantido em solução nutritora com 5 ou 60 mM de  $\text{K}^+$  mediu-se o  $E_m$  na ausência ou presença de  $50 \mu\text{g/ml}$  de OEMV e na ausência ou presença de  $100 \mu\text{g/ml}$  de OP (resultados mostrados na tabela 3). Neste estudo utilizamos seis tecidos de íleo para o OEMV e OP. Conforme pode ser constatado o OEMV não promoveu nenhuma alteração significativa nas duas condições. O OP, apesar de não alterar o  $E_m$  na solução nutritora contendo 5 mM de  $\text{K}^+$ , o fez quando na presença de 60 mM de  $\text{K}^+$ .

### **3.1.2 EFEITO DO OEMV E OP SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR E GASOMETRIA DE RATOS ANESTESIADOS**

Estudaram-se os efeitos do OEMV e OP sobre o sistema cardiovascular de ratos anestesiados com uretana dando ênfase aos efeitos sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR), pH, hematócrito e gasometria ( $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ , sat.  $\text{O}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{TCO}_2$ , EB, sat.  $\text{HCO}_3^-$ ).

A figura 7 mostra os efeitos hipotensores do OEMV e OP sobre a PAM e o tempo de recuperação de 50% e 80% ( $T_{50}$  e  $T_{80}$ ).

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) no potencial transmembrana ( $E_m$ ) de células de íleo de cobaia.

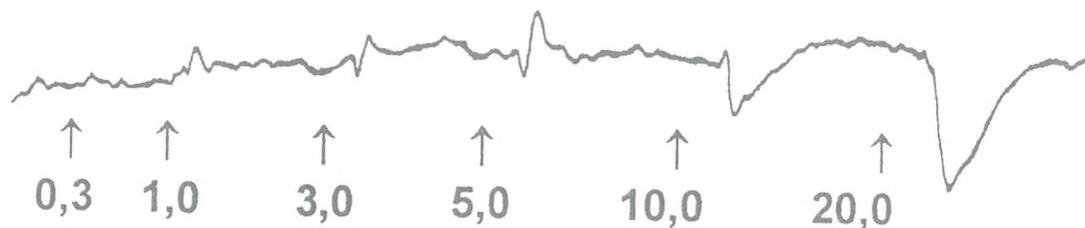
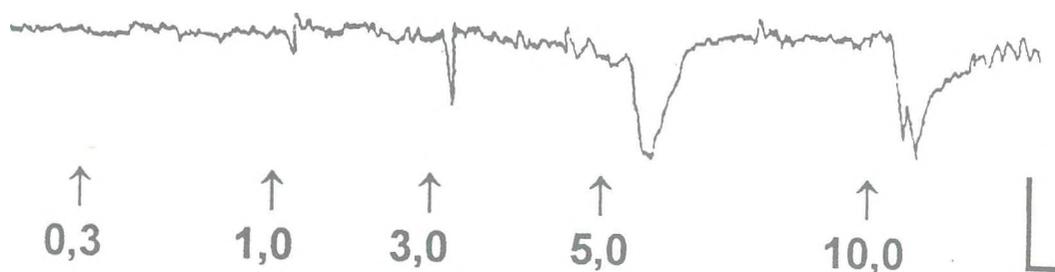
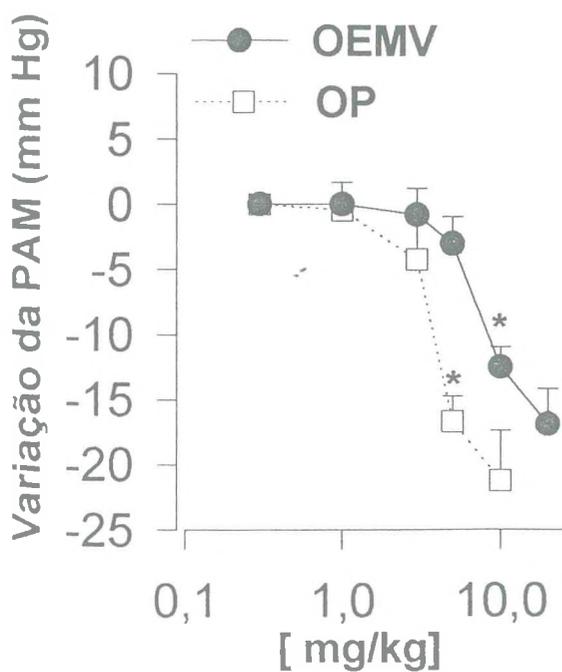
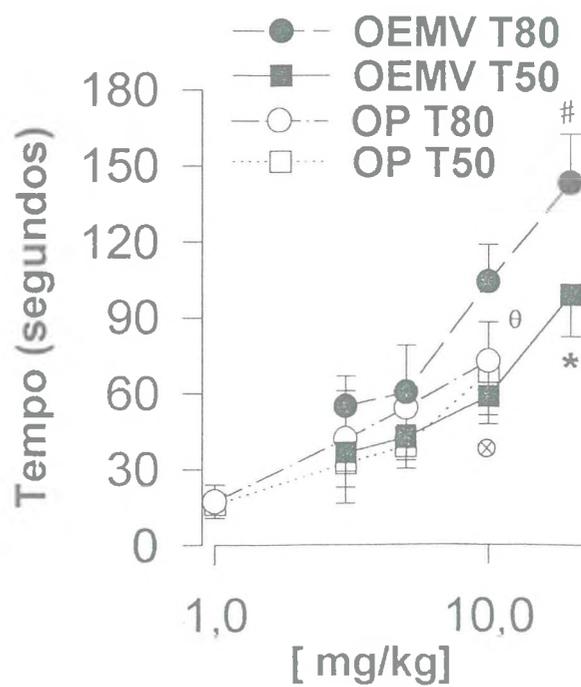
CONDIÇÃO	$E_m$ (5 mM K <sup>+</sup> )	$E_m$ (60 mM K <sup>+</sup> )
Controle	<sup>a</sup> -54,3 ± 0,49 mV (49)	-24,0 ± 0,41 mV (37)
Em presença de OEMV (50 µg/ml)	-53,3 ± 0,41 mV (46)	-23,5 ± 0,36 mV (39)
Controle	-56,4 ± 1,01 mV (17)	-21,0 ± 0,48 mV (24)
Em presença de OP (100 µg/ml)	-50,7 ± 0,87 mV (23)	-25,1 ± 0,76 mV* (25)

<sup>a</sup>, os valores expressam média ± erro padrão da média do  $E_m$  expresso em mV(número de observações).

\* diferente (p<0,05; Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test) do controle.

**Fig. 7- Efeitos hipotensores do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre a pressão arterial média (PAM) em ratos anestesiados e tempo de recuperação deste efeito.**

Em **a**, traçado registrado em quimógrafo de um experimento típico mostrando a diminuição da PAM após administração intravenosa de OEMV (**a**) e OP (**b**) em doses crescentes (mg/kg de peso do rato). A seta e o numeral logo abaixo indicam o momento da administração e a dose do óleo, respectivamente. Os animais controle não apresentaram modificação da PAM, mesmo recebendo igual volume do veículo (salina contendo tween 80 a 0,1%) aplicado a uma velocidade entre 15-30 seg. A PAM basal neste experimento foi de 90 mmHg. Calibrações: horizontal, 60 seg.; vertical, 13 mmHg. Em **c**, gráfico da variação da pressão arterial expresso em mmHg induzida pela administração intravenosa (bolus) de OEMV e OP. \*, estatisticamente diferente de 0,3 mg/kg ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method). Em **d**, gráfico do tempo de recuperação, expresso em segundos, necessário para recuperar 50% ( $T_{50}$ ) e 80% ( $T_{80}$ ) da queda da pressão arterial promovida pelo OEMV e OP. #, estatisticamente diferente de 3,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Bonferroni's method). \*, estatisticamente diferente de 3,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).  $\theta$ , estatisticamente diferente de 1,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).  $\otimes$ , estatisticamente diferente de 1,0 mg/kg ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**a****b****c****d**

A PAM basal do grupo controle foi de  $71,90 \pm 5,33$  mmHg (n=7). Para os animais tratados com OEMV e OP, a PAM basal foi de  $64,90 \pm 2,91$  mmHg (n=8) e  $62,40 \pm 3,11$  mmHg (n=8), respectivamente.

OEMV e OP foram administrados intravenosamente em bolus com doses entre 0,3 – 20 e 0,3 – 10 mg/kg, respectivamente. A injeção do veículo correspondente àquele usado para a injeção da dose de 20 mg/kg de peso corporal, em condições idênticas de velocidade e de volume, não promoveram alteração detectável da PAM. Ambas as substâncias reduziram a PAM de forma significativa e dose-dependente, embora este efeito tenha sido de curta duração. Os tempos de recuperação de 50% ( $T_{50}$ ) e 80% ( $T_{80}$ ) encontram-se na tabela 4. O OEMV na dose de 20 mg/kg de peso causou uma queda da PAM que foi de  $16,8 \pm 2,7$  mmHg da PAM basal; por sua vez o OP (10 mg/kg de peso) promoveu uma queda de  $21,2 \pm 3,8$  mmHg da PAM basal (Fig. 7c).

A FC basal foi de  $400 \pm 14$  b.p.m (n=9),  $378 \pm 17$  b.p.m (n=9),  $381 \pm 16$  b.p.m (n=9), para o grupo controle, OEMV e OP, respectivamente. A FR basal foi de  $82,1 \pm 4,70$  m.p.m (n=9),  $75,33 \pm 3,11$  m.p.m (n=9),  $76,0 \pm 2,90$  m.p.m (n=9), para o grupo controle, OEMV e OP, respectivamente. O pH inicial foi de  $7,4 \pm 0,02$  (n=7),  $7,3 \pm 0,02$  (n=8),  $7,3 \pm 0,02$ (n=8), para o grupo controle, OEMV e OP respectivamente. O hematócrito de  $51,1 \pm 0,37$  % (n=7),  $49,00 \pm 1,43$  % (n=8),  $51,00 \pm 1,20$  % (n=8), para o grupo controle, OEMV e OP, respectivamente (Fig. 8). Os valores da gasometria encontram-se na tabela 5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais do grupo controle e os animais injetados com o OEMV e OP na FR, no pH e no hematócrito; entretanto, a FC foi alterada significativamente pelas doses de 5 e 10 mg/kg de OP e 20 mg/kg de OEMV.

Tabela 4. Tempo de recuperação em segundos de 50% e 80% do efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na pressão arterial média de ratos.

OEMV (mg/kg) (n=10)	T <sub>50</sub> (seg.)	T <sub>80</sub> (seg.)	OP (mg/kg) (n=8)	T <sub>50</sub> (seg.)	T <sub>80</sub> (seg.)
0,3	—	—	0,3	—	—
1	—	—	1	16,1 ± 2,7 <sup>d</sup>	17,3 ± 6,6 <sup>c</sup>
3	<sup>a</sup> 36,6 ± 7,36 <sup>b</sup>	52,2 ± 11,86 <sup>c</sup>	3	32,4 ± 15,97	42,0 ± 19,23
5	42,6 ± 12,35	60,5 ± 18,74	5	39,1 ± 5,58	54,4 ± 6,91
10	58,7 ± 10,94	104,4 ± 14,84	10	68,6 ± 17,23	72,8 ± 15,55
20	99,3 ± 16,69	143,6 ± 19,28	—	—	—

<sup>a</sup>, os valores representam média ± E.P.M dos T<sub>50</sub> e T<sub>80</sub> expressos em segundos.

<sup>b</sup>, diferente de 20 mg/kg do OEMV (p<0,05; ANOVA, Dunn's method).

<sup>c</sup>, diferente de 20 mg/kg do OEMV (p<0,05; ANOVA, Bonferroni's method).

<sup>d</sup>, diferente de 10 mg/kg do OP (p<0,05; ANOVA, Dunn's method).

<sup>e</sup>, diferente de 10 mg/kg do OP (p<0,05; ANOVA, Dunn's method).

**Fig. 8- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre as frequências cardíacas e respiratórias e sobre o pH sanguíneo e hematócrito de ratos anestesiados.**

**a e b** mostram a diminuição da frequência cardíaca, monitorada através de eletrocardiograma, induzida pelo OEMV e OP (mg/kg de peso corporal) respectivamente. \*, estatisticamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method). **c e d** mostram que o OEMV (39,3 mg/kg) e o OP (19,3 mg/kg), respectivamente, não afetam a frequência respiratória. **e e f** mostram o efeito do OEMV e OP, respectivamente, sobre o pH sanguíneo e o hematócrito onde, como pode ser observado, não houve modificação desses parâmetros fisiológicos obtidos de amostras ao final de cada experimento.

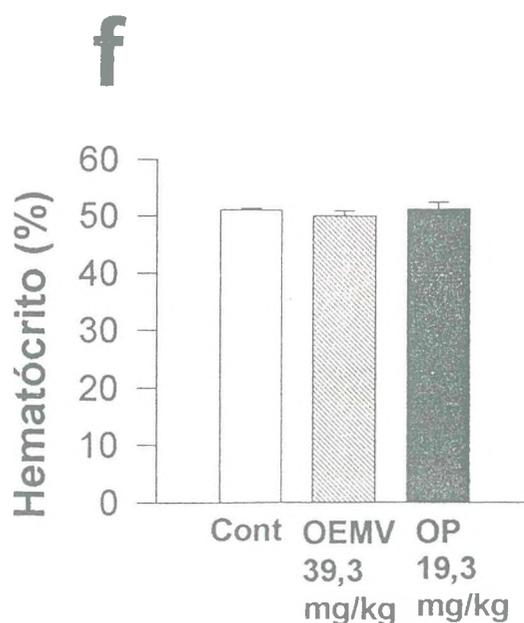
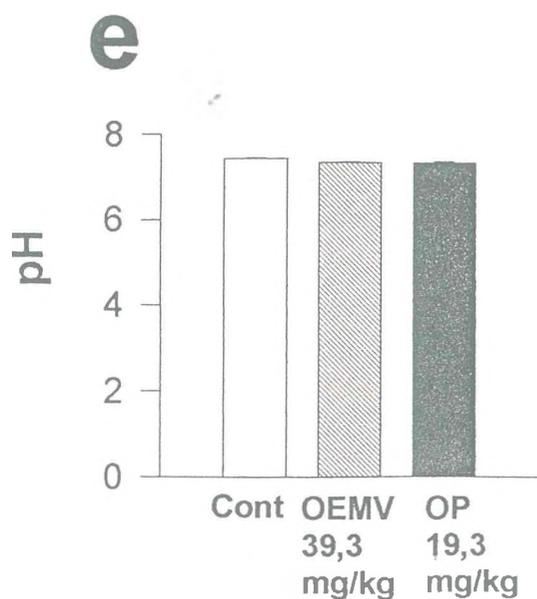
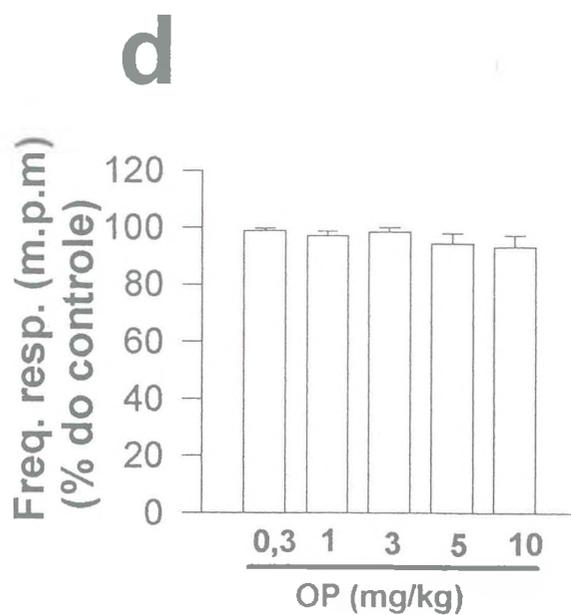
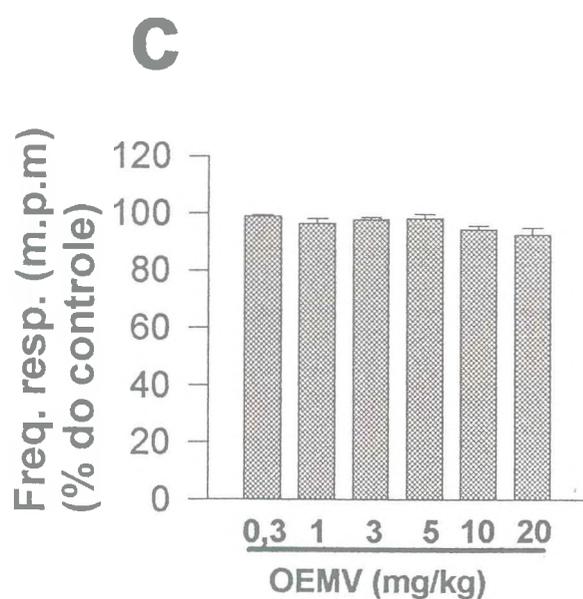
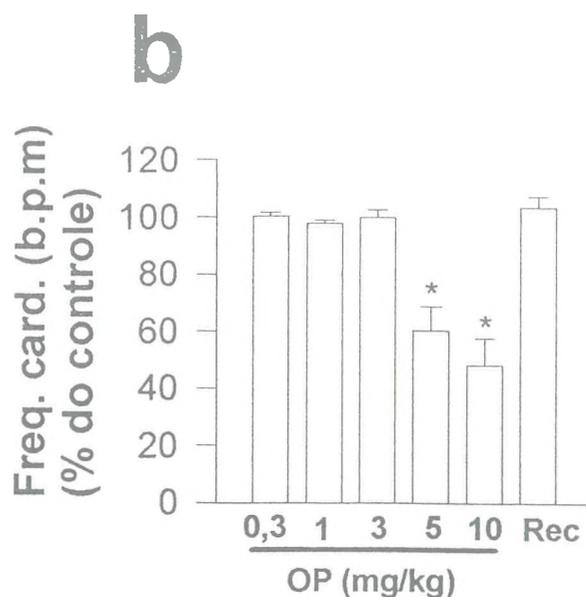
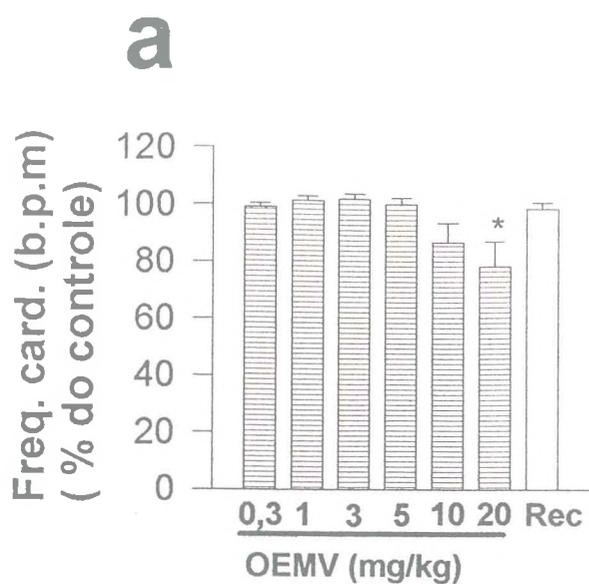


Tabela 5. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre parâmetros sanguíneos relacionados no transporte de gases e a regulação do pH em ratos anestesiados.

	pCO <sub>2</sub> (mmHg) <sup>b</sup>	pO <sub>2</sub> (mmHg)	sat. O <sub>2</sub> (%)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l)	TCO <sub>2</sub> (mmol/l)	EB (mmol/l)	sat. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/l)
Controle (7) <sup>a</sup>	31,37 ± 3,84 <sup>c</sup>	108,64 ± 4,80	98,01 ± 0,37	18,90 ± 1,34	19,84 ± 1,46	-3,94 ± 0,76	20,67 ± 0,64
OEMV (8)	38,52 ± 4,04	90,79 ± 5,53	95,61 ± 1,08	19,89 ± 1,43	21,05 ± 1,55	-4,94 ± 1,05	20,21 ± 0,90
OP (7)	35,71 ± 3,41	103,19 ± 7,55	96,51 ± 1,26	18,40 ± 0,72	19,47 ± 0,77	-6,19 ± 0,98	19,21 ± 0,69

<sup>a</sup>, número de animais utilizados.

<sup>b</sup>, mmHg, milímetros de mercúrio; conteúdo de O<sub>2</sub>, em percentuais do valor máximo carreável pelo sangue; mmol/l, milimoles por litro.

<sup>c</sup>, os valores expressam média ± erro padrão da média. Nenhum valor foi significativamente diferente dos outros de uma dada coluna.

### 3.1.3 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO OEMV E OP

O OEMV e seu principal constituinte o OP induziram relaxamento, de uma maneira concentração-dependente, na maioria das preparações de músculos lisos gastrointestinais. No entanto, deve ser ressaltado que, sobre a musculatura circular e sobre o esfíncter pilórico do estômago de cobaia, o OEMV, em pequenas concentrações (0,1 – 50  $\mu\text{g/ml}$  e 0,1 – 5  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) induziu relaxamento em 73% e 94% das preparações, respectivamente; concentrações maiores que as citadas promoveram contração em 26% e 29% das preparações, respectivamente. Em consequência desses resultados estudos mais detalhados se fizeram necessários para elucidar o mecanismo de ação do principal efeito do OEMV e OP, o relaxamento.

#### 3.1.3.1 Participação do sistema nervoso

A avaliação da participação do sistema nervoso no efeito relaxante do OEMV e OP foi feita através da prévia incubação de preparações de íleo de cobaia, durante 10 minutos, com 1  $\mu\text{M}$  de AT mais 500  $\mu\text{M}$  de HEX (bloqueadores de receptores muscarínicos e nicotínicos, respectivamente, segundo KOSTERLITZ & LEES, 1964) ou com 500  $\mu\text{M}$  de TTX (agente bloqueador dos canais rápidos de  $\text{Na}^+$  e, conseqüentemente, da condução do impulso nervoso, NARAHASHI et al., 1964).

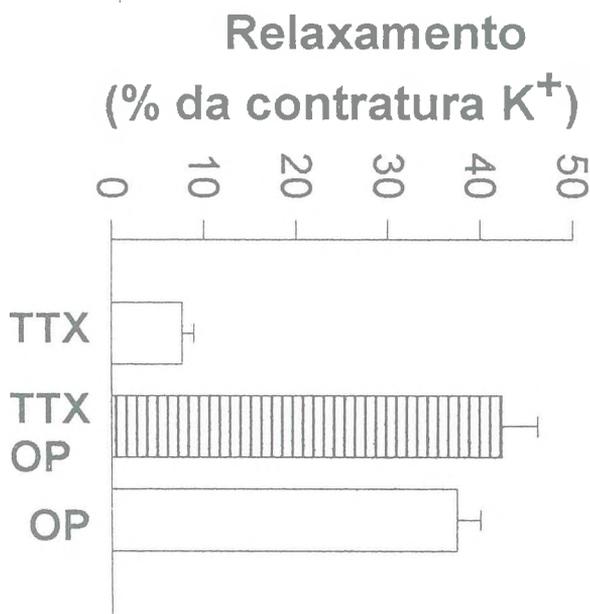
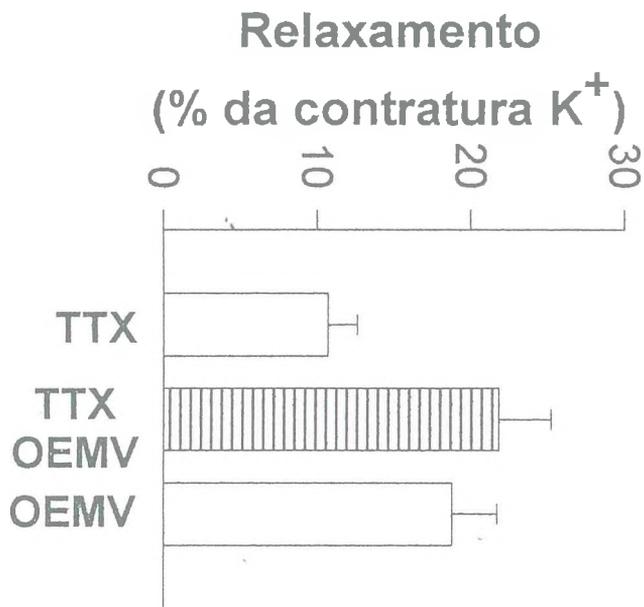
A adição da TTX ocasionou uma diminuição do tônus intestinal que correspondeu a  $10,7 \pm 1,91\%$  da contração induzida por 60 mM de  $\text{K}^+$  (contração controle). A adição do OEMV (50  $\mu\text{g/ml}$ ) à preparação em presença

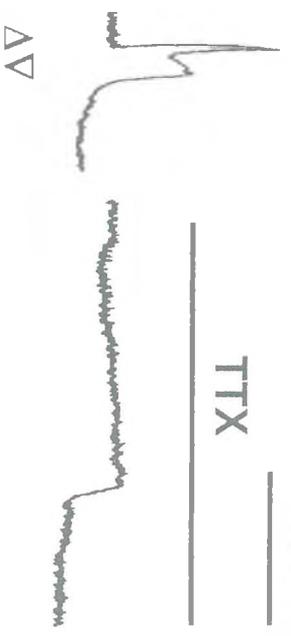
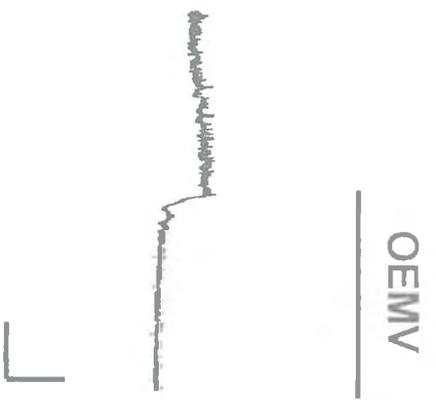
de TTX causou um relaxamento intestinal total,  $21,9 \pm 3,37\%$  da contração controle. Este último relaxamento não foi significativamente diferente do relaxamento produzido pelo OEMV sozinho ( $18,8 \pm 2,89\%$  da contração controle;  $n=5$ ). Em relação ao efeito do OP ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) observamos que, quando comparado ao relaxamento induzido pelo TTX ( $7,7 \pm 1,22\%$  ( $n=5$ ) da contração induzida por  $60 \text{ mM}$  de  $\text{K}^+$ ), o OP, na presença de TTX causou um relaxamento total de  $42,4 \pm 3,83\%$  ( $n=5$ ) que não foi significativamente diferente daquele produzido pelo OP sozinho ( $37,6 \pm 2,51\%$  da contração controle) (Teste t pareado) (Fig. 9 a-c).

Foi avaliado também o efeito dos bloqueadores ganglionares muscarínicos (AT,  $1 \mu\text{M}$ ) e nicotínico (HEX,  $500 \mu\text{M}$ ) sobre o relaxamento induzido pelo OEMV ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) e OP ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). Em íleo de cobaia a AT associada ao HEX causou um relaxamento ( $0,6 \pm 0,26\%$  da contração induzida por  $60 \text{ mM}$   $\text{K}^+$  (contração controle)) que foi significativamente menor ( $p<0,05$ ; teste t pareado) que o causado pela adição de OEMV ( $20,1 \pm 4,50\%$  da contração controle) ao meio contendo os dois bloqueadores ganglionares. Quando comparado este relaxamento com o relaxamento induzido pelo OEMV ( $20,6 \pm 3,12\%$  da contração controle;  $n=5$ ) sozinho, constatou-se não haver diferença estatisticamente significativa. Estudo semelhante foi feito utilizando-se desta vez o OP e observou-se que, na presença de AT mais HEX, o OP induz relaxamento ( $30,0 \pm 6,13\%$  da contração controle) que não é significativamente diferente do relaxamento induzido pelo OP ( $22,4 \pm 4,15\%$  da contração controle;  $n=6$ ) sozinho.

**Fig. 9- Relaxamento do músculo longitudinal de íleo de cobaia induzido pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na presença de tetrodotoxina (TTX).**

Em a, registro poligráfico do relaxamento induzido por OEMV (50 µg/ml; n=5) após o bloqueio da atividade nervosa promovido por 500 µM de TTX. Observe que a TTX diminuiu o tônus intestinal e após a subsequente administração de OEMV, houve um relaxamento acentuado da preparação o qual foi reversível após sucessivas lavagens da preparação. Observe ainda que não houve diferença entre o relaxamento induzido pelo OEMV na presença de TTX e o relaxamento induzido pelo OEMV sozinho. As barras horizontais acima do traçado indicam o tempo em que a preparação foi exposta às substâncias, respectivamente. O tempo de exposição do OEMV ao músculo foi de 5 min. Calibrações: horizontal, 3,0 min.; vertical, 0,7 g. Em b e c gráficos representativos dos relaxamentos induzidos por OEMV (50 µg/ml) e OP (200 µg/ml) na presença de TTX ou quando administrados isoladamente. \*, Relaxamento induzido por TTX, estatisticamente significativo em relação aos relaxamentos induzidos pelas associações TTX-OEMV ou TTX-OP, ou ainda em relação aos relaxamentos induzidos pelo OEMV ou OP sozinhos.



**a****b****c**

### 3.1.4 EFEITOS ANTIESPASMÓDICOS DO OEMV E OP E ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

#### 3.1.4.1 Efeitos do OEMV e OP na contração induzida por 60 mM de K<sup>+</sup> em íleo de cobaia

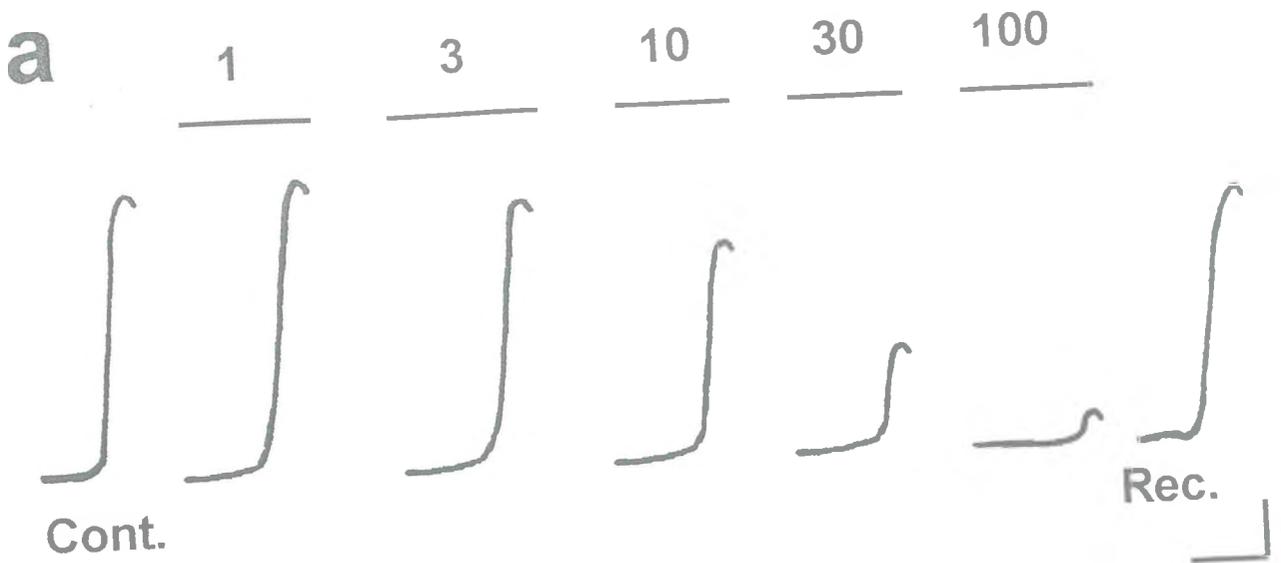
O OEMV e OP apresentaram um efeito inibitório dependente de concentração em duas condições experimentais nas quais foram utilizadas 60 mM de K<sup>+</sup>. Em uma das condições OEMV ou OP eram adicionados previamente ao banho durante 5 minutos, seguidos da administração de 60 mM de K<sup>+</sup>. OEMV e OP foram capazes de prevenir as contrações induzidas por 60 mM de K<sup>+</sup>. As CI<sub>50</sub> do OEMV e OP 27,3 ± 3,28 µg/ml (n=10) e 61,7 ± 13,80 µg/ml (n=5), respectivamente, foram estatisticamente diferentes (Fig. 10 a e b). Na outra condição estabelecia-se uma contratura com 60 mM de K<sup>+</sup> e, uma vez atingido o seu estado estacionário (platô), eram administradas concentrações crescentes de OEMV e OP. Ambas as substâncias foram capazes de reverter a contratura potássica (Fig. 11 a e b). As CI<sub>50</sub> foram 27,5 ± 4,38 µg/ml (n=10) para o OEMV e 150,8 ± 16,30 µg/ml (n=8) para o OP. Estes valores encontram-se sumarizados na tabela 6.

#### 3.1.4.2 Efeitos do OEMV e OP na contratura induzida por TEA em íleo de cobaia.

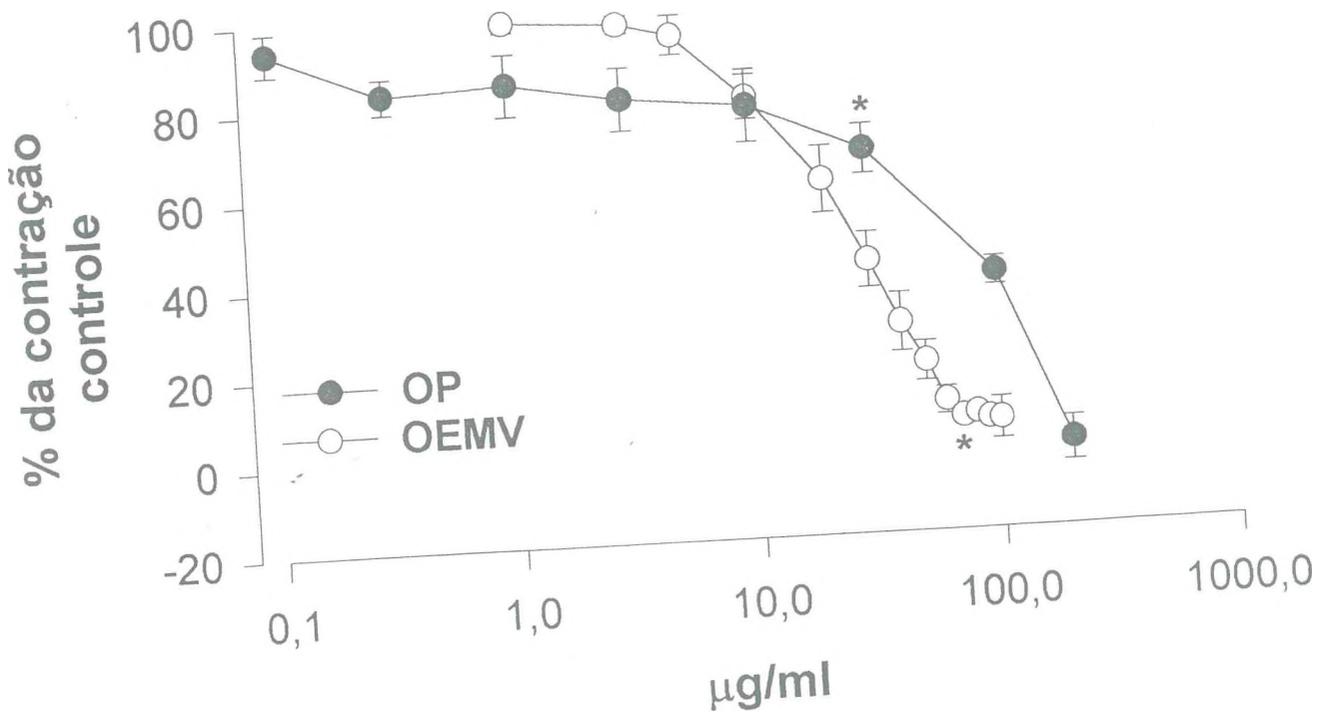
Induzia-se uma contratura com TEA (5 mM) e uma vez atingido o seu estado estacionário o procedimento era semelhante ao anterior. Neste estudo OEMV e OP foram capazes de reverter a contratura induzida pelo TEA (Fig. 12

**Fig. 10-** Bloqueio das contrações induzidas por 60 mM de  $K^+$  pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP) em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.

Em **a**, registro quimográfico de um experimento típico mostrando que o OEMV, quando adicionado previamente à solução nutritora por 5 minutos, é capaz de bloquear as contrações sucessivas de 60 mM de  $K^+$ , de maneira dependente de concentração. Os traçados acima das contrações de 60 mM de  $K^+$ , representam as concentrações de OP em  $\mu\text{g/ml}$ . O intervalo de tempo entre uma contração e outra foi de 5 min. A lavagem da preparação com Tyrode normal é suficiente para a recuperação da mesma. A interrupção do traçado representa o momento em que o quimógrafo permaneceu parado. O OP foi capaz de bloquear a contração potássica porém sua  $CI_{50}$  foi significativamente maior (ver tabela 5). Calibrações: horizontal, 1,5 min.; vertical, 1,1 cm. Em **b**, gráfico mostrando o bloqueio da contração potássica induzido pelo OEMV e OP. Notar a maior potência do OEMV. \*, concentração apartir da qual o bloqueio das contrações pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significante em relação à contração controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).



**b**



**Fig. 11- Reversão da contratura induzida por 60 mM de K<sup>+</sup> pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP) em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.**

Em **a**, registro quimográfico onde o OEMV (1 – 100 µg/ml; valor de cada concentração utilizada, e momento da aplicação mostrados pelos números e círculo cheio, respectivamente, logo abaixo do registro), adicionado no platô de uma contratura potássica é capaz de induzir relaxamento de uma maneira dependente de concentração. Triângulos com o vértice para cima ou para baixo representam o momento da aplicação e remoção de 60 mM de K<sup>+</sup>. Os números representam as concentrações em µg/ml e os círculos cheios o momento da aplicação. A quebra do traçado representa uma parada do quimógrafo. Calibrações: horizontal, 5 min.; vertical, 2,85 cm. O OP também foi capaz de reverter a contratura potássica porém a sua CI<sub>50</sub> foi significativamente maior. Em **b**, gráfico mostrando a reversão da contratura potássica induzida pelo OEMV e OP de maneira dependente de concentração. Em ordenada, percentagem do valor de estado estacionário da contração controle induzida por 60 mM de K<sup>+</sup>. Em abscissa, concentrações, em µg/ml, do OEMV e OP. Observar a maior potência do OEMV. \*, concentração apartir da qual a reversão das contraturas pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significante em relação à contratura controle (p<0,05; ANOVA, Dunn's method).

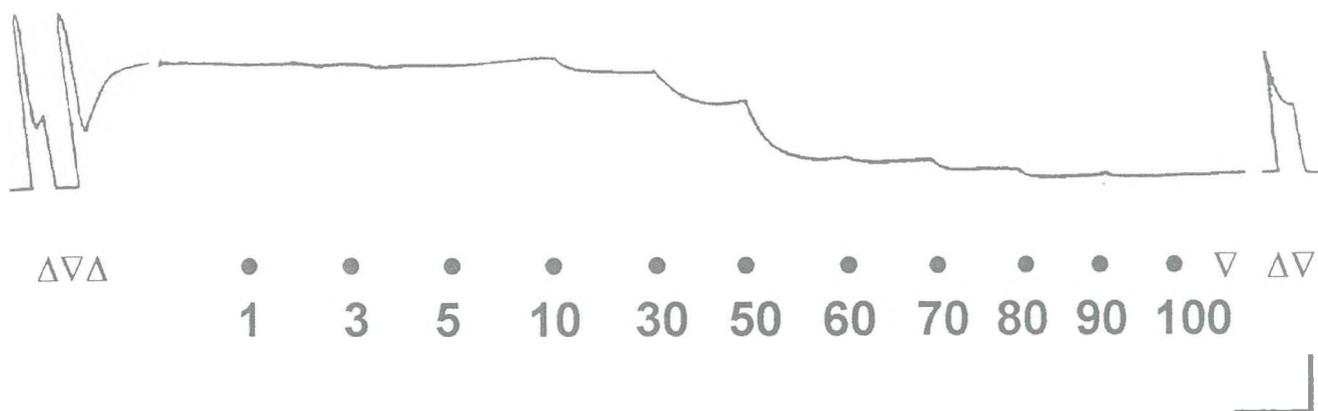
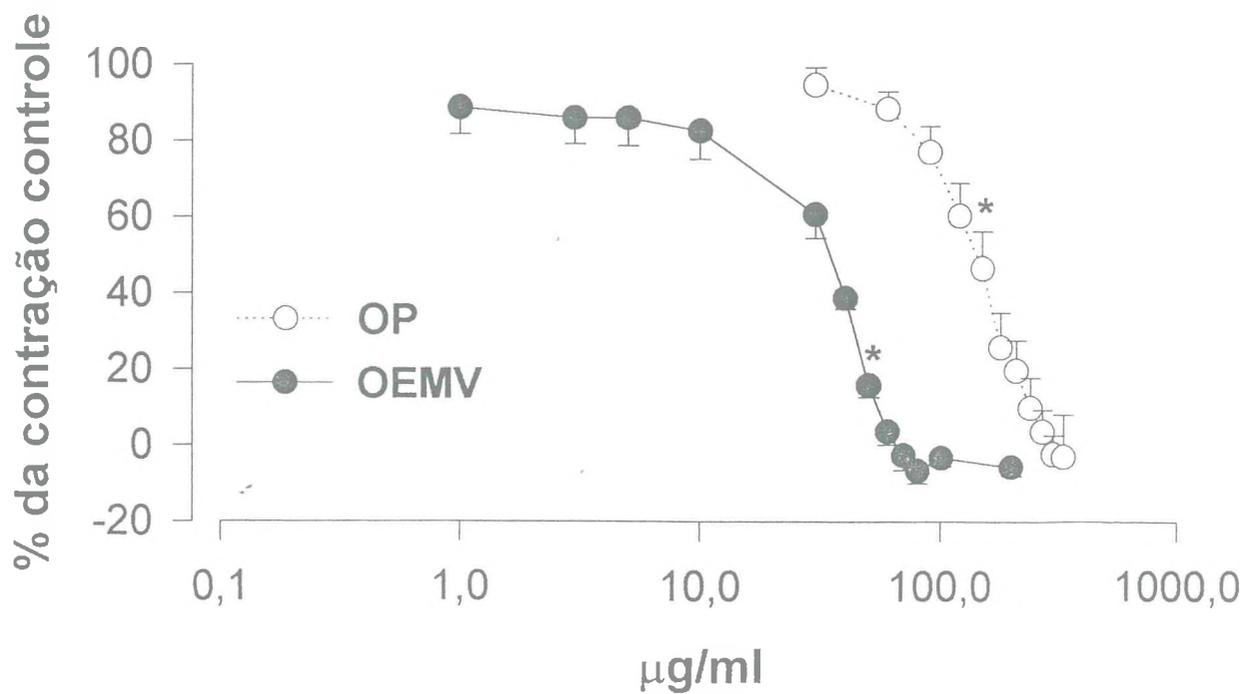
**a****b**

Tabela 6. Concentrações inibitórias para produção de 50% de cada efeito (CI<sub>50</sub>) do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) em íleo de cobaia.

Efeito	OEMV	OP
Bloqueio K <sup>+</sup>	<sup>a</sup> 27,3 ± 3,28 <sup>c</sup> (10) <sup>b</sup>	61,7 ± 13,80 <sup>d,*</sup> (6)
Reversão K <sup>+</sup>	27,5 ± 4,38 <sup>c</sup> (10)	150,8 ± 16,30 <sup>d,*</sup> (8)
Reversão TEA	51,9 ± 8,16 (8)	200,8 ± 21,50* (10)
Bloqueio ACh	22,1 ± 5,03 <sup>c</sup> (9)	97,9 ± 14,40 <sup>d,*</sup> (9)
Bloqueio HA	15,1 ± 3,63 <sup>c</sup> (8)	64,0 ± 10,05 <sup>d,*</sup> (8)

<sup>a</sup>, os valores expressam concentração média (µg/ml) ± erro padrão da média.

<sup>b</sup>, número de experimentos.

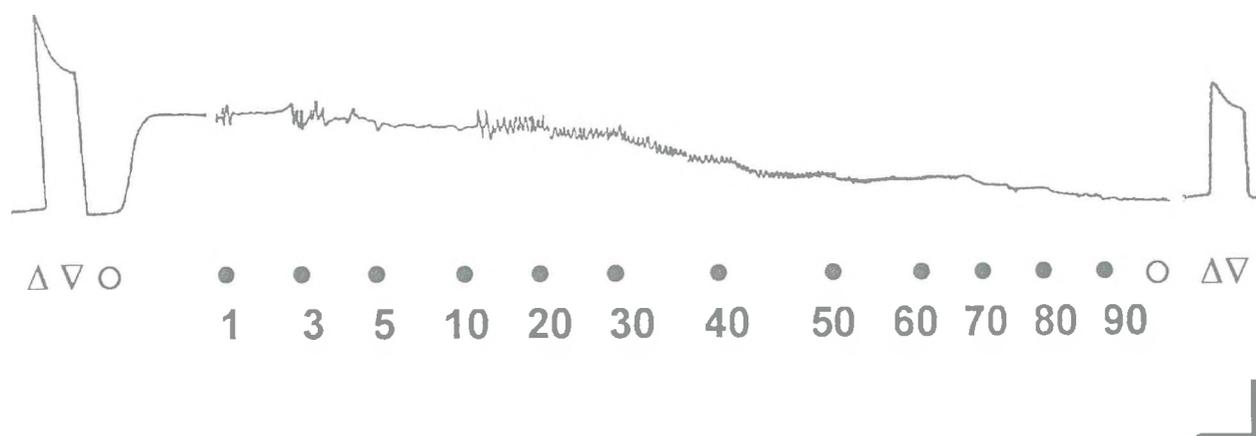
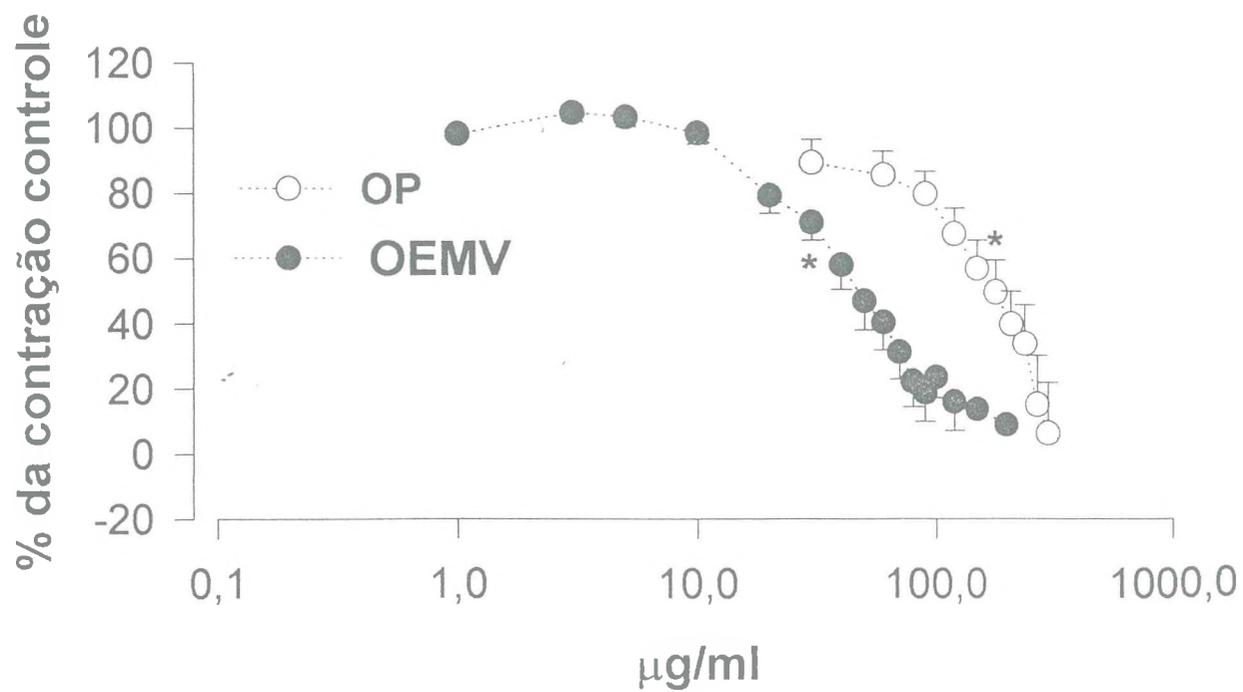
<sup>c</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Student-Newman-Keuls method) da CI<sub>50</sub> do OEMV para a reversão da contratura induzida pelo TEA.

<sup>d</sup>, diferente (p<0,05; ANOVA, Student-Newman-Keuls method) da CI<sub>50</sub> do OP para a reversão da contratura induzida pelo TEA.

\*, diferente (p≤0,05; Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test) do valor correspondente da CI<sub>50</sub> para o OEMV.

**Fig. 12- Reversão da contratura induzida por tetraetilamônio (TEA), 5 mM, pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP) em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.**

Em **a**, registro quimográfico de um experimento típico mostrando a reversão, pelo OEMV, da contratura induzida por 5 mM de TEA. Triângulos com o vértice para cima ou para baixo representam o momento da aplicação e retirada de 60 mM de  $K^+$ . O círculo vazio representa o momento da administração de 5 mM de TEA. Os números representam as concentrações em  $\mu\text{g/ml}$  e os círculos cheios o momento da aplicação. Protocolo semelhante foi adotado para o OP. A quebra do traçado representa uma parada do quimógrafo. Calibrações: horizontal, 5 min.; vertical, 1,6 cm. Em **b**, gráfico mostrando a reversão da contratura do TEA induzida por OEMV e OP, de maneira dependente de concentração. Em ordenada, percentagem do valor de estado estacionário da contração controle induzida por 5 mM de TEA. Em abscissa, concentrações, em  $\mu\text{g/ml}$ , do OEMV e OP. Notar a maior potência do OEMV em comparação ao OP. \*, concentração apartir da qual a reversão das contraturas pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significante em relação à contratura controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**a****b**

a e b) com  $CI_{50}$  de  $51,9 \pm 8,16 \mu\text{g/ml}$  ( $n = 8$ ) e  $200,8 \pm 21,50 \mu\text{g/ml}$  ( $n=10$ ), respectivamente (ver tabela 6).

### 3.1.4.3 Efeitos do OEMV e OP sobre as respostas contráteis induzidas por ACh e HA em íleo de cobaia.

Neste estudo foram usadas concentrações de ACh e HA (0,1 – 3,0 e 0,15 – 3,0  $\mu\text{M}$ ) que produziram aproximadamente 70% da amplitude da resposta máxima de contração em cada experimento (concentrações submaximais). Em seguida OEMV e OP foram administrados em concentrações crescentes, isoladas, obedecendo um intervalo de 5 minutos entre cada concentração.

O OEMV nas concentrações entre 0,1 – 1,0  $\mu\text{g/ml}$  não causou aumento significativo da amplitude das contrações induzidas pela ACh. Por sua vez o OP, nas concentrações entre 0,1 – 10  $\mu\text{g/ml}$  causou um aumento significativo ( $p<0,05$ ; teste de Fischer) das contrações submaximais de ACh enquanto que nas concentrações entre 30 – 40  $\mu\text{g/ml}$  houve um bloqueio dependente de concentração e reversível dessas contrações (Fig. 13 a e b). O bloqueio dessas contrações alcançou 100 % para o OEMV (200  $\mu\text{g/ml}$ ) e para o OP (400  $\mu\text{g/ml}$ ). As  $CI_{50}$  para o OEMV e OP foram  $22,1 \pm 5,03 \mu\text{g/ml}$  ( $n=9$ ) e  $97,9 \pm 14,40 \mu\text{g/ml}$  ( $n=9$ ), respectivamente (ver tabela 6).

Em relação às contrações submaximais induzidas por HA na presença de OEMV e OP observou-se que, em ambos os casos, nas concentrações entre 0,1– 1,0  $\mu\text{g/ml}$  ( $n=8$ ) para o OEMV e 0,1 – 10 $\mu\text{g/ml}$  ( $n=8$ ) para o OP houve um

**Fig. 13- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP) sobre as contrações induzidas pela acetilcolina (ACh) em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.**

Em a, experimento típico registrado em quimógrafo, do bloqueio das contrações submaximais (aproximadamente 70% da resposta máxima do agente contrátil) de ACh pelo OP quando administrados 5 minutos prévios a administração do agente contrátil. Os traçados acima das contrações de ACh representam as concentrações do OP. O intervalo de tempo entre uma contração e outra foi de 5 min. As contrações antes e após os numerais representam controle e recuperação, respectivamente. A quebra do traçado representa uma parada do quimógrafo. Calibrações: horizontal, 5 min.; vertical, 1,4 cm. Em b, gráfico representativo do bloqueio das contrações submaximais da ACh, de maneira dependente de concentração, por OEMV e OP. Em ordenada, percentagem da contração controle induzida pela ACh. Em abscissa, concentrações, em  $\mu\text{g/ml}$ , do OEMV e OP. Notar a maior potência do OEMV em comparação ao OP. \*, concentração a partir da qual o bloqueio das contrações pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significativo em relação à contração controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).



aumento significativo (teste de Fischer) das contrações enquanto que entre 3 – 50  $\mu\text{g/ml}$  e 30 – 200  $\mu\text{g/ml}$  houve uma diminuição, dependente de concentração e reversível, das contrações (Fig. 14). As  $\text{CI}_{50}$  para OEMV e OP em relação às contrações induzidas por HA foram  $15,1 \pm 3,60 \mu\text{g/ml}$  e  $64,0 \pm 10,05 \mu\text{g/ml}$ , respectivamente (tabela 6).

#### **3.1.4.4 Efeitos do OEMV e OP sobre as contrações induzidas por ACh em meio sem cálcio e contendo EGTA**

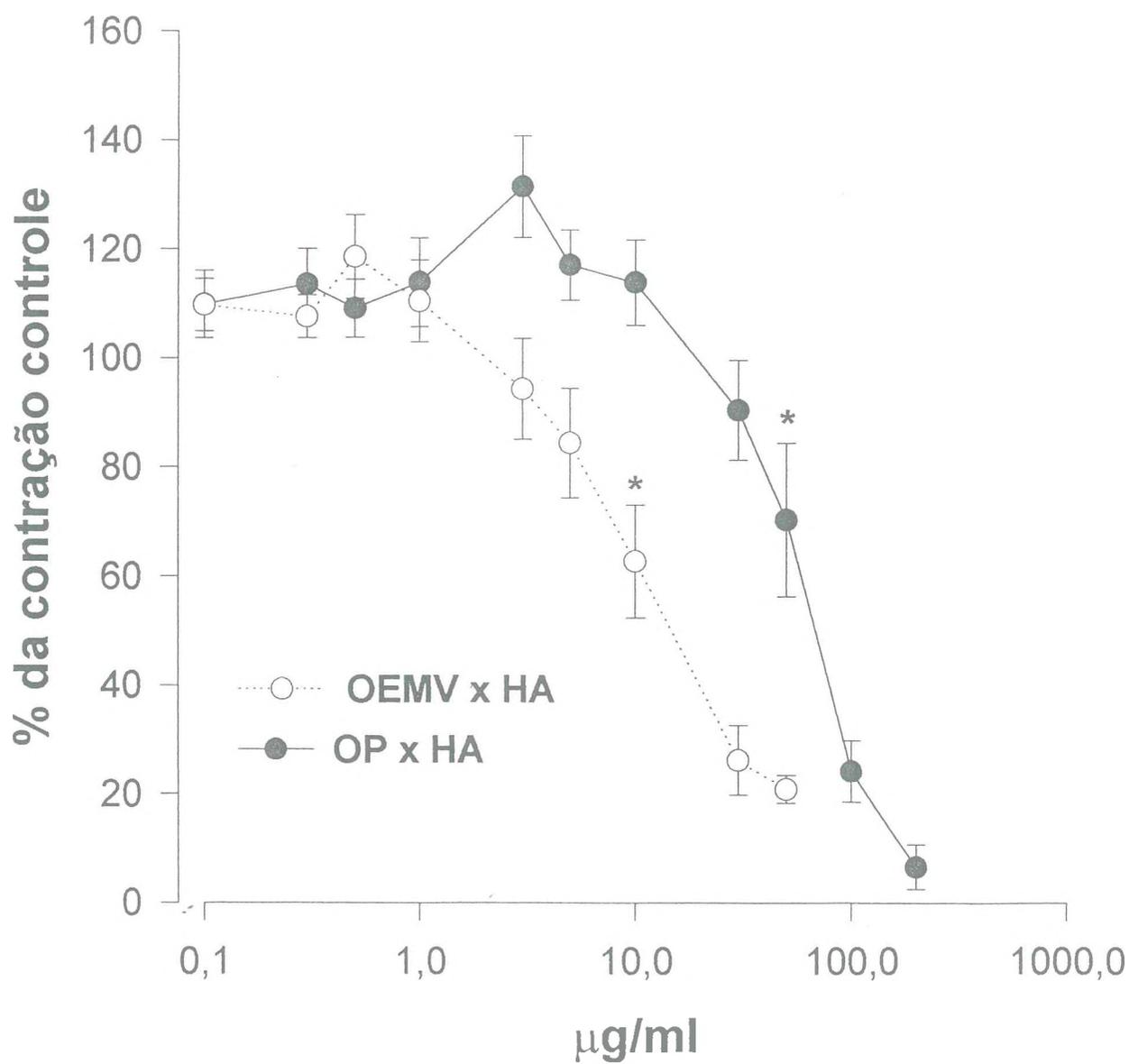
A contração física da ACh (60  $\mu\text{M}$ ) quando em meio sem cálcio e contendo EGTA, correspondem a  $34,2 \pm 4,05\%$  da contração controle da ACh ( $2,32 \pm 0,29 \text{ g}$ ;  $n=10$ ); a adição do OEMV a este meio diminui a contração para  $11,8 \pm 2,09 \%$  ( $n=10$ ) da contração controle. Em relação ao OP observou-se que a contração física da ACh (60  $\mu\text{M}$ ), quando em meio sem cálcio e contendo EGTA, correspondeu a  $33,3 \pm 11,9\%$  da contração controle da ACh ( $1,87 \pm 0,13 \text{ g}$ ;  $n=7$ ); a adição do OP a este meio diminui a contração para  $13,3 \pm 3,95\%$  ( $n=7$ ) da contração controle (Fig. 15 a-c).

#### **3.1.4.5 Efeitos do OEMV e OP sobre as contrações induzidas por ACh em solução nutritora de Tyrode normal contendo nifedipina.**

Neste estudo investigamos os efeitos do OEMV e OP no componente da contração da ACh que não é bloqueado pela NIF (componente tônico). Utilizamos a concentração de 1  $\mu\text{M}$  de NIF uma vez que esta concentração mostrou ser eficaz em bloquear as contrações induzidas por 60 mM de  $\text{K}^+$ ,

**Fig. 14- Efeito do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP) sobre as contrações induzidas pela histamina (HA) em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.**

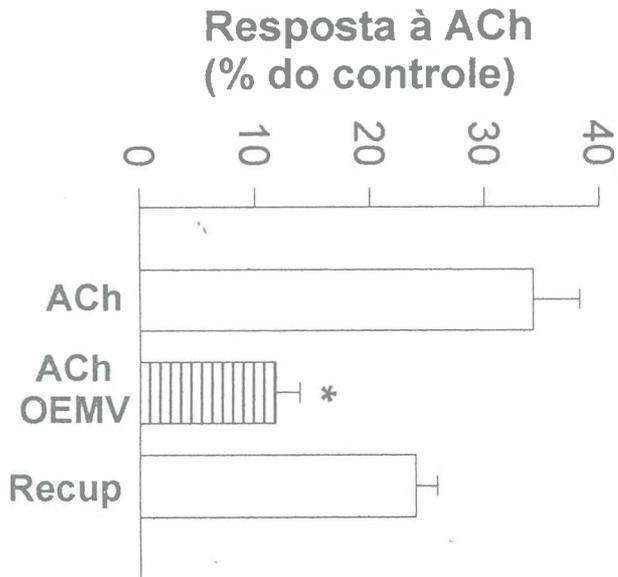
Gráfico representativo do bloqueio, por OEMV e OP, das contrações submaximais da HA, de maneira dependente de concentração. Em abscissa, concentrações, em  $\mu\text{g/ml}$ , do OEMV e OP; ordenada, percentagem da contração controle induzida pela HA. Observe que em ambos os gráficos OEMV é mais potente que o OP. \*, concentração apartir da qual o bloqueio das contrações pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significativo em relação à contração controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).



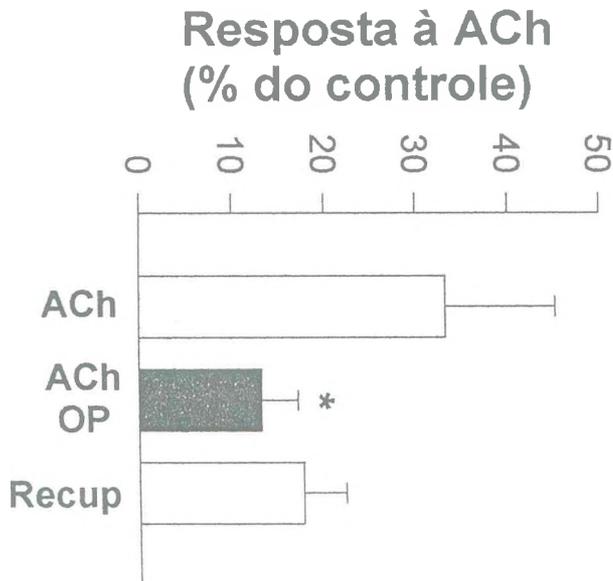
**Fig. 15-** Depressão das contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em meio contendo 0Ca<sup>2+</sup> mais EGTA 0,2 mM, pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP), em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia.

Em **a**, registro poligráfico mostrando as contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em solução de Tyrode sem Ca<sup>2+</sup> mais EGTA 0,2 mM (0Ca) em comparação com a contração controle induzida por ACh na presença de Tyrode normal (2 mM de Ca<sup>2+</sup>). Notar que ocorre um bloqueio ainda maior da contração fásica induzida por 60  $\mu$ M de ACh em meio sem Ca<sup>2+</sup> mais EGTA, quando na presença de OEMV (50  $\mu$ g/ml). As contrações potássicas presentes no experimento são necessárias para o recarregamento dos estoques intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. As barras horizontais acima do traçado indicam o tempo em que a preparação foi exposta às substâncias, respectivamente. O tempo de exposição do OEMV ao músculo foi de 5 min. Em **b** e **c**, gráfico mostrando as diminuições, pelo OEMV (50  $\mu$ g/ml) e OP (200  $\mu$ g/ml), das contrações induzidas por 60  $\mu$ M de ACh em meio sem Ca<sup>2+</sup> mais EGTA, e a recuperação (RECUP) parcial das contrações após 60 min. de lavagem da preparação. Calibrações: 3 min.; vertical, 1,1 g de força. \*, estatisticamente significante da contração controle ( $p < 0,05$ ; Teste t pareado).

**b**



**c**



a

$K^+$     ACh    EGTA     $K^+$     EGTA     $K^+$     EGTA  
 —    —    —    —    —    —    —

OEMV  
 —

ACh  
 —

ACh  
 —

ACh  
 —



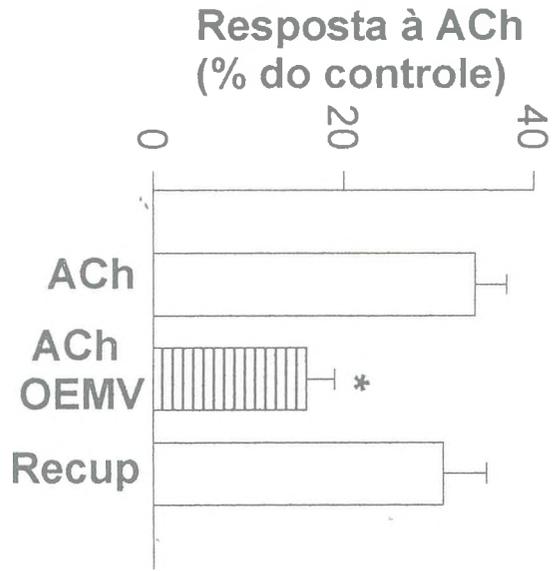
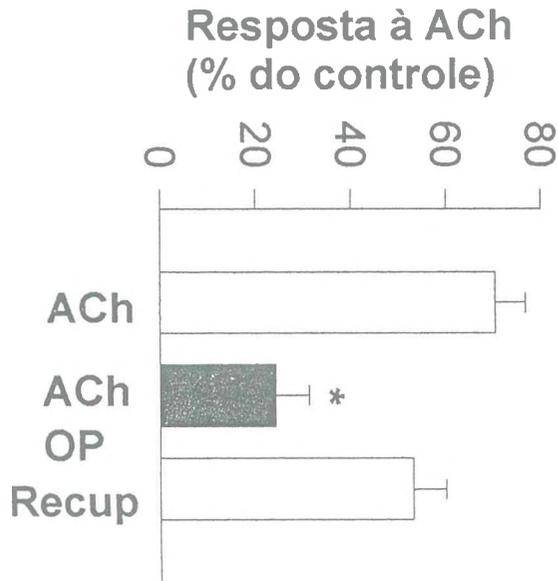
contrações estas que são dependentes do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais dependentes de voltagem (KNOT et al., 1996). O componente tônico da contração da ACh, no íleo, independe da atividade desses canais. OEMV (50  $\mu\text{g/ml}$ ) e OP (200  $\mu\text{g/ml}$ ) foram capazes de reduzir a resposta contrátil a ACh em presença de NIF de  $0,55 \pm 0,06$  g (n=9) e  $0,85 \pm 0,16$  g (n=10), respectivamente, para  $16,1 \pm 2,89\%$  (n=9) e  $24,3 \pm 6,98\%$  (n=10) das respectivas contrações controles da ACh ( $1,71 \pm 0,18$  g; n=9) e ( $1,41 \pm 0,16$  g; n=10), em presença de NIF (Fig. 16 a-c).

#### **3.1.4.6 Efeito do OP sobre os vasos da circulação mesentérica de ratos contraídos com 60 mM de $\text{K}^+$ .**

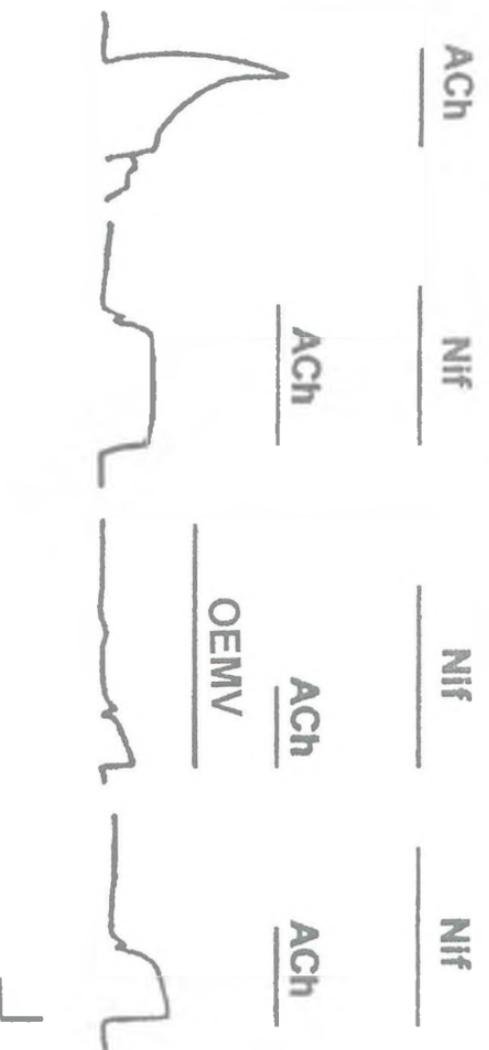
A circulação mesentérica isolada de ratos apresentou, em Tyrode normal, um fluxo de  $8,8 \pm 0,91$  ml/min. (n=8). Em solução de Tyrode contendo 60 mM de  $\text{K}^+$  o fluxo diminuiu para  $2,4 \pm 0,31$  ml/min. (27,2% do fluxo mesentérico controle) que foi significativamente diferente do fluxo inicial ( $P < 0,05$ , Student-Newman-Keuls Method). A administração de doses crescentes de OP nos vasos da circulação mesentérica contraídos com 60 mM de  $\text{K}^+$ , durante um intervalo de 5 minutos para cada concentração, reverteu o efeito contraturante induzido por 60 mM de  $\text{K}^+$ . O efeito máximo foi obtido com a concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  do OP, na qual o fluxo reverteu de 2,4 para  $6,7 \pm 0,70$  ml/min., alteração essa estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ , Student-Newman-Keuls Method). A  $\text{CI}_{50}$  foi de  $50,5 \pm 8,6$   $\mu\text{g/ml}$  (n=8). A perfusão da preparação com solução de Tyrode normal foi mantida constante durante todo o experimento. A retirada do OP através da lavagem da preparação com solução de Tyrode normal, ao final de

**Fig. 16- Depressão das contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) na presença de nifedipina (1  $\mu$ M), através do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP), em músculo longitudinal de íleo isolado de cobaia**

Em **a**, registro poligráfico mostrando as contrações induzidas por ACh (60  $\mu$ M) em solução de Tyrode normal ou com adição de 1  $\mu$ M de nifedipina (concentração suficiente para bloquear a contração induzida por 60 mM de  $K^+$ ) isoladamente ou conjuntamente com OEMV. Observe que a adição de OEMV (50  $\mu$ g/ml) nesta última condição diminui acentuadamente a amplitude da contração em relação àquela induzida pela ACh em presença de nifedipina. As barras horizontais acima do traçado indicam o tempo em que a preparação foi exposta às substâncias, respectivamente. O tempo de exposição do OEMV ao músculo foi de 5 min. Calibração: horizontal, 1 minuto; vertical, 0,50 g de força. Em **b** e **c**, gráfico mostrando a diminuição, pelo OEMV (50  $\mu$ g/ml) e OP (200  $\mu$ g/ml), das contrações induzidas por 60  $\mu$ M de ACh em Tyrode normal contendo nifedipina. RECUP, recuperação da resposta após 60 min. de lavagem da preparação. \*, estatisticamente diferente do controle ( $p < 0,05$ ; Teste t pareado).

**b****c**

a



cada experimento, estabeleceu um fluxo mesentérico final ( $6,5 \pm 0,73$  ml/min.) que não foi significativamente diferente em relação ao controle (Fig. 17).

### **3.1.4.7 Estudo dos efeitos do OEMV e OP em aorta isolada de cobaia.**

#### **3.1.4.7.1 Efeitos do OEMV e OP na reversão da contratatura induzida por 60 mM de $K^+$ .**

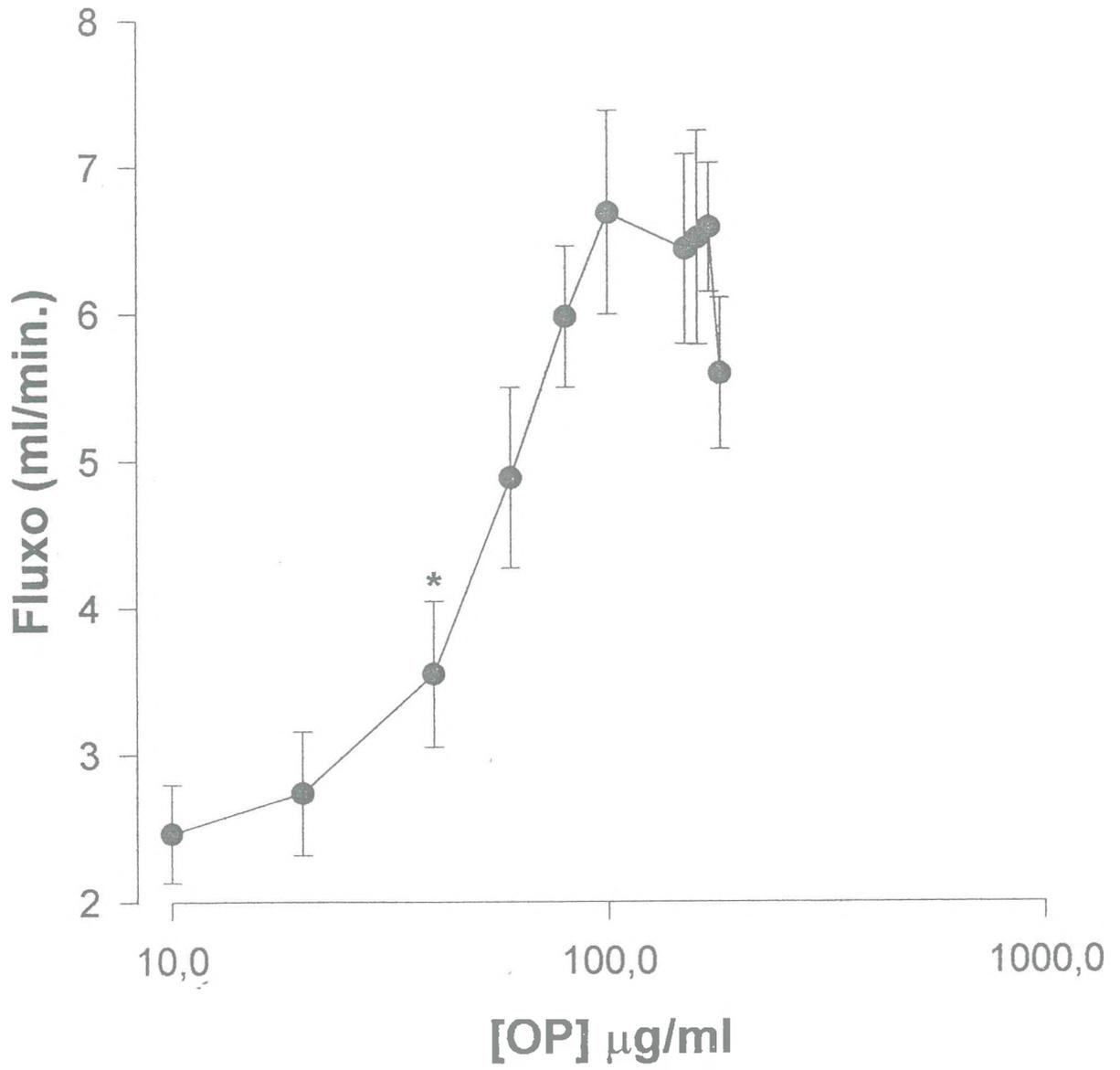
A administração de 60 mM de  $K^+$  em aorta isolada de cobaia induz uma contratatura de dezenas de minutos de duração (Fig. 18a). OEMV e OP quando adicionados no platô da contração induzida por 60 mM de  $K^+$  em aorta de cobaia, promoveu um relaxamento de maneira dependente de concentração (Fig. 18b) com  $CI_{50}$  de  $43,2 \pm 6,36$  (n=6) e  $61,2 \pm 6,96$   $\mu$ g/ml (n=7), respectivamente (Fig. 18c). Esses valores não foram estatisticamente significantes (teste t não pareado). A reversão máxima da contratatura foi obtido com concentrações de 1600 e 2000  $\mu$ g/ml para o OEMV e OP, respectivamente.

#### **3.1.4.7.2 Efeitos do OEMV e OP na reversão da contratatura induzida pelo PDB.**

De maneira semelhante ao 60 mM de  $K^+$  o PDB, quando administrado em meio sem  $Ca^{2+}$  com EGTA (2 mM) na aorta de cobaia, induz uma contratatura que, cujo platô demora alguns minutos mais para ser alcançado e dura um tempo geralmente superior a 50 min. (Fig. 19a). OEMV e OP quando adicionados no platô da contração induzida pelo PDB em aorta de cobaia promoveram um

**Fig. 17- Efeito antiespasmódico do óxido de piperitenona (OP) sobre os vasos da circulação mesentérica de ratos.**

Gráfico mostrando a reversão, promovida por OP, de maneira concentração-dependente, da contratura dos vasos da circulação mesentérica isolada de ratos induzida por perfusão desses vasos com Tyrode contendo 60 mM de  $K^+$ . Cada leitura era feita 5 minutos após a perfusão da preparação contendo OP em presença de 60 mM de  $K^+$ . Abscissa, concentrações do OP expressa em  $\mu\text{g/ml}$ ; ordenada, fluxo em ml/min. \*, concentração do OP a partir da qual o fluxo foi estatisticamente significativo em relação ao fluxo controle ( $2,4 \pm 0,31$  ml/min.) ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Student-Newman-Keuls method).



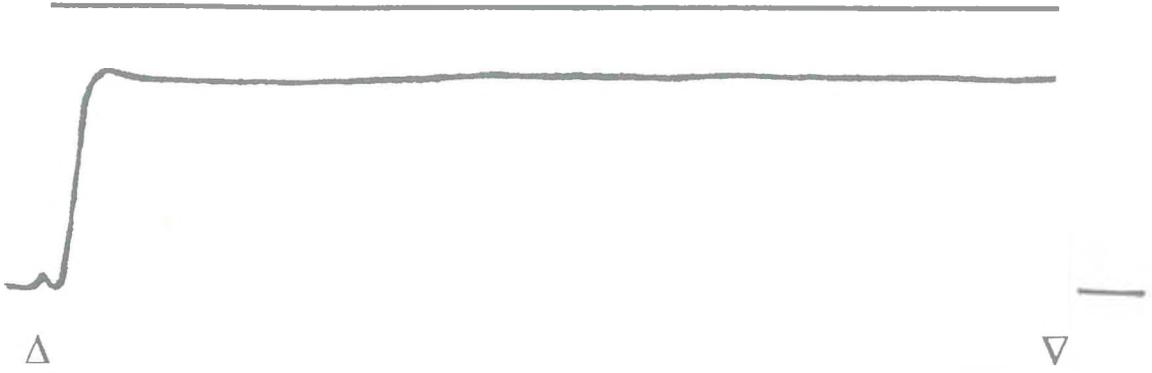
**Fig. 18-** Reversão da contratura induzida por 60 mM de  $K^+$ , pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP), em aorta de cobaia.

**a e b** – traçado original em polígrafo mostrando experimento controle da contratura induzida por 60 mM de  $K^+$ , sem adição do OEMV ou OP (**a**) e efeito relaxante induzido pelo OEMV de maneira dependente de concentração, sobre a contração induzida por 60 mM de  $K^+$  (**b**). As concentrações do OEMV, expressa em  $\mu\text{g/ml}$ , necessárias para a reversão da contratura potássica foram 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, respectivamente. O momento das aplicações, são representadas sob os traçados pelo símbolo ( $\bullet$ ). Triângulos com vértice para cima e para baixo, representam o momento da aplicação e retirada respectivamente, de 60 mM de  $K^+$ . Calibrações: vertical, 0,4 g de força; horizontal, 10 minutos.

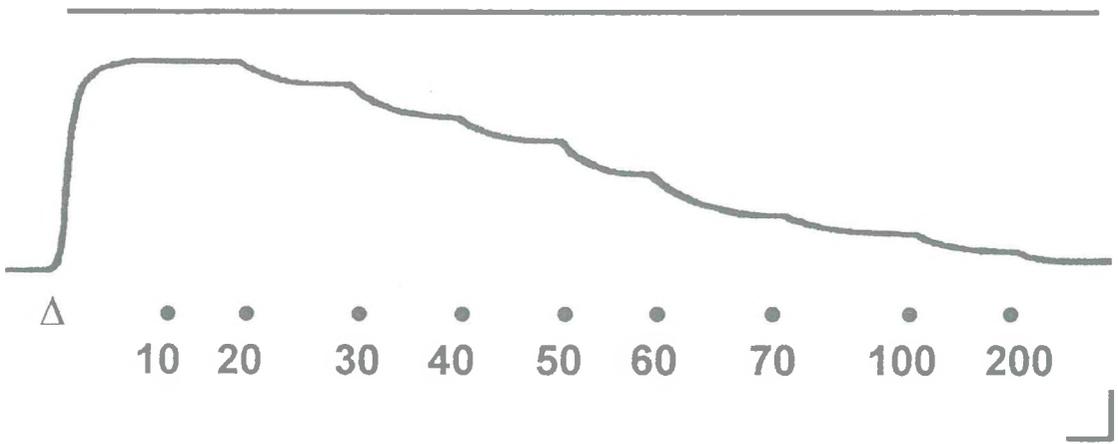
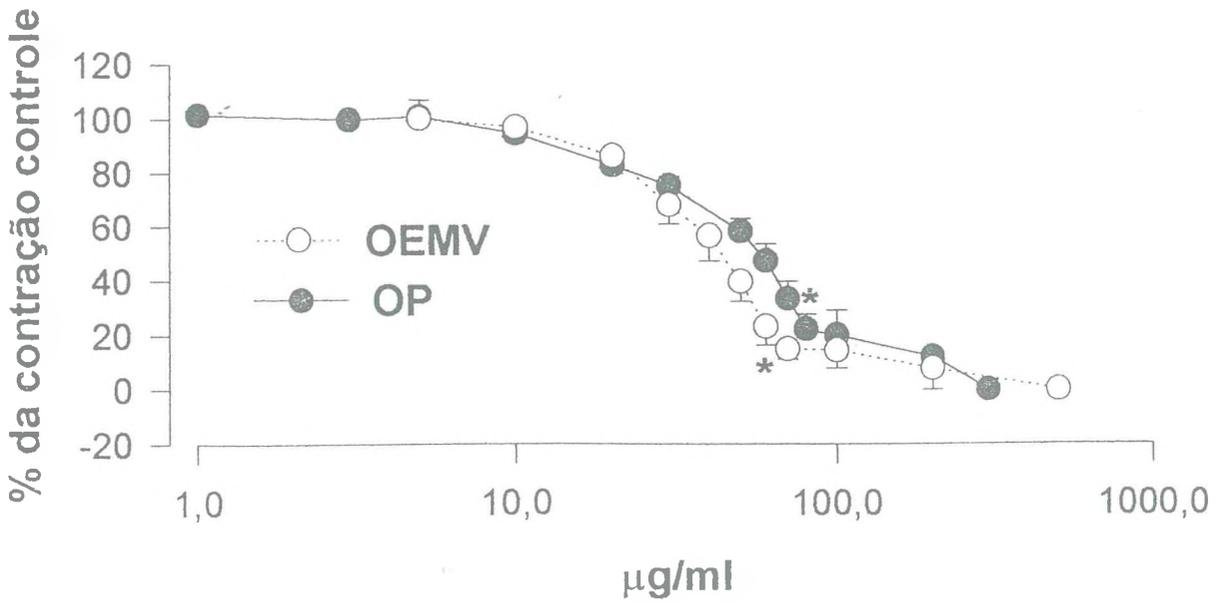
**c** – gráfico mostrando as curvas concentração efeito do OEMV ( $\circ$ ) e OP ( $\bullet$ ) à contrações induzidas por 60 mM de  $K^+$ . \*, concentração apartir da qual a reversão das contraturas pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significante em relação à contratura controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**a**

K60

**b**

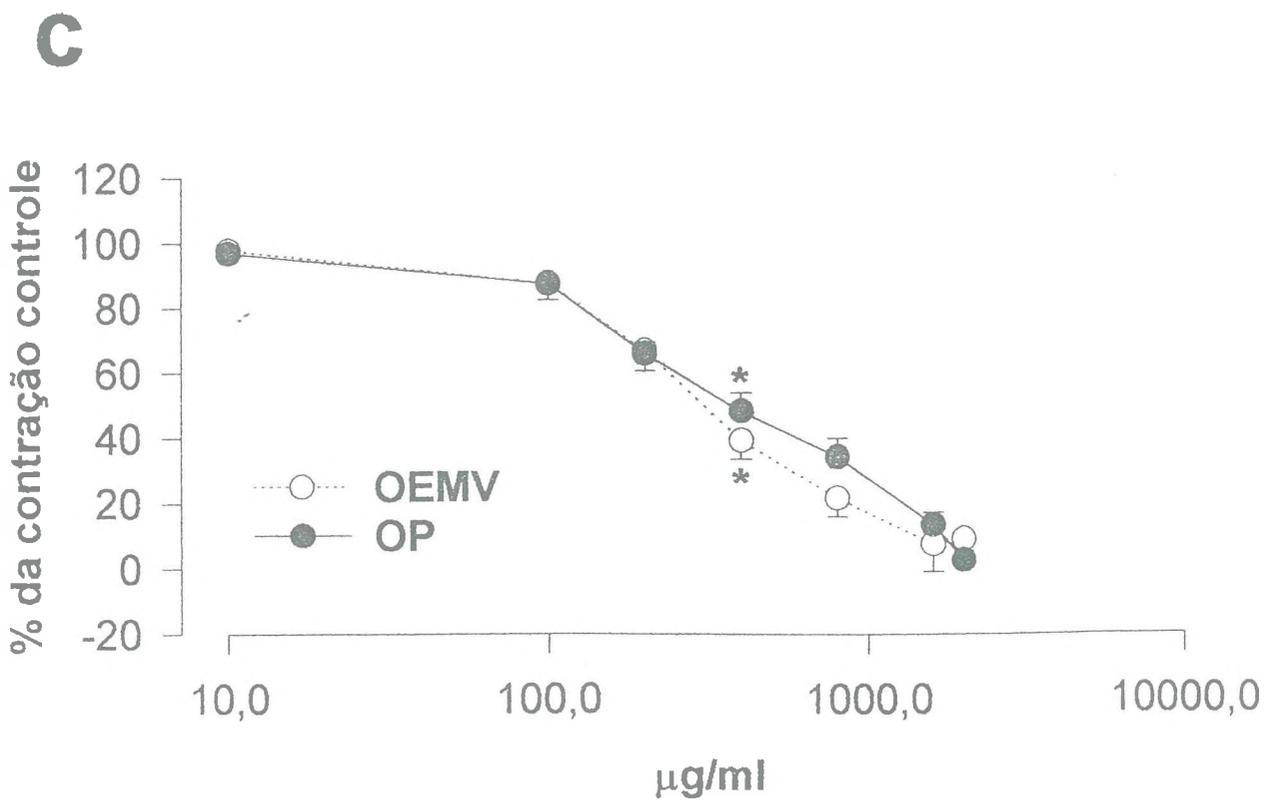
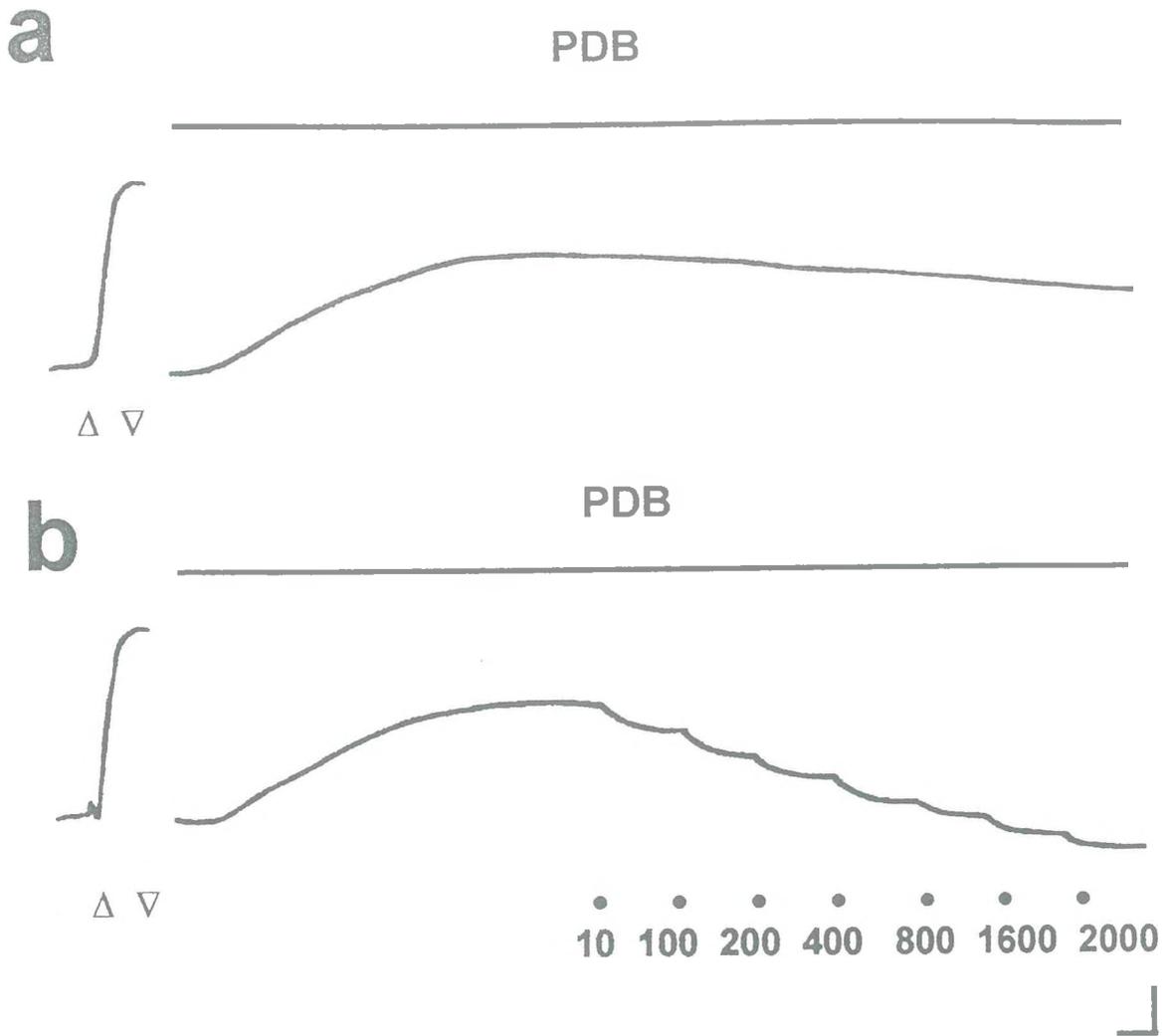
K60

**c**

**Fig. 19-** Reversão da contratura induzida por 1  $\mu$ M de dibutirato de forbol (PDB), pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) ou óxido de piperitenona (OP), em aorta de cobaia.

**a e b** – traçado original de polígrafo mostrando experimento controle da contratura induzida pelo PDB, onde não houve adição do OEMV (**a**) e efeito relaxante promovido pelo OEMV, de maneira dependente de concentração, sobre as contrações induzidas pelo PDB (1 $\mu$ M). (**b**). As concentrações do OEMV, em  $\mu$ g/ml, para a reversão da contratura induzida pelo PDB foram 10, 100, 200, 400, 800, 1600 e 2000, respectivamente. O momento das aplicações, são representadas sob o traçado pelo símbolo ( $\bullet$ ). Triângulos com vértice para cima e para baixo, à esquerda, representam o momento da aplicação e retirada respectivamente, de 60 mM de  $K^+$ . Calibrações: vertical, 0,19 g de força; horizontal, 10 minutos.

**c** – gráfico mostrando as curvas concentração efeito do OEMV (o) e OP ( $\bullet$ ) à contração induzida pelo PDB (1 $\mu$ M). \*, concentração apartir da qual a reversão das contraturas pelo OEMV ou OP foi estatisticamente significante em relação à contratura controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).



relaxamento de maneira dependente de concentração (Figs. 19b-c) com  $CI_{50}$  de  $344,4 \pm 55,87$  (9) e  $440,1 \pm 81,70$   $\mu\text{g/ml}$  (9), respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente significantes (teste t não pareado). A reversão máxima da contratura foi obtido com concentrações de 1600 e 2000  $\mu\text{g/ml}$  para o OEMV e OP, respectivamente.

## 3.2 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

### 3.2.1 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM CAMUNDONGOS

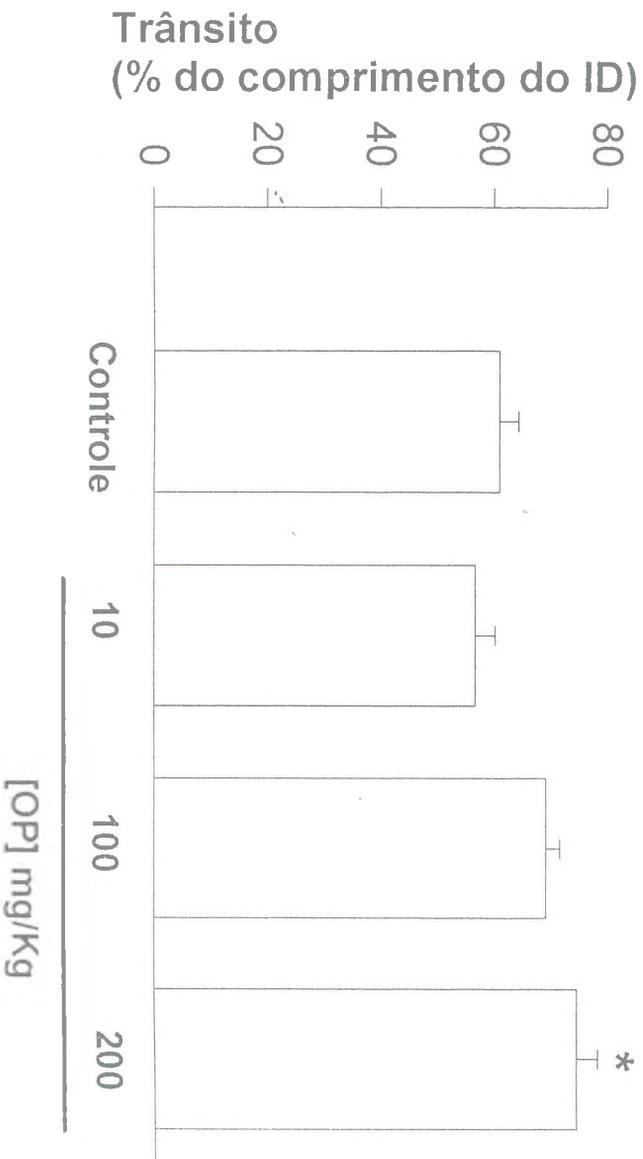
#### 3.2.1.1 Efeitos do OEMV e OP sobre o trânsito intestinal de camundongos.

Estudou-se os efeitos do OEMV e OP sobre o trânsito intestinal de camundongos através da administração intragástrica de uma suspensão contendo 10% de carvão e 5% de goma arábica em um volume correspondente a 0,1 ml/10 g de peso. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo (água destilada). OEMV na dose de 200 mg/kg (n=8) não alterou significativamente o trânsito intestinal controle ( $61,7 \pm 2,78\%$  do comprimento do intestino delgado) enquanto que as doses de 250 e 300 mg/kg alteraram de forma significativa a distância percorrida para  $84,1 \pm 3,18\%$  (n=10) e  $80,2 \pm 2,61\%$  (n=9), respectivamente, ( $p < 0,05$ ; ANOVA, método de Bonferroni). Em relação ao OP, o grupo controle apresentou um valor de  $61,0 \pm 3,42\%$  (n=10) do comprimento do intestino delgado enquanto que os grupos tratados com as doses de 10 mg/kg (n=10) e 100 mg/kg (n=10) não apresentaram distâncias estatisticamente significantes em relação ao controle. Entretanto a dose de 200 mg/kg apresentou uma distância estatisticamente significativa ( $74,6 \pm 3,70\%$ ; n=9) ( $p < 0,05$ ; ANOVA, método de Bonferroni) (Fig. 20 a-b).

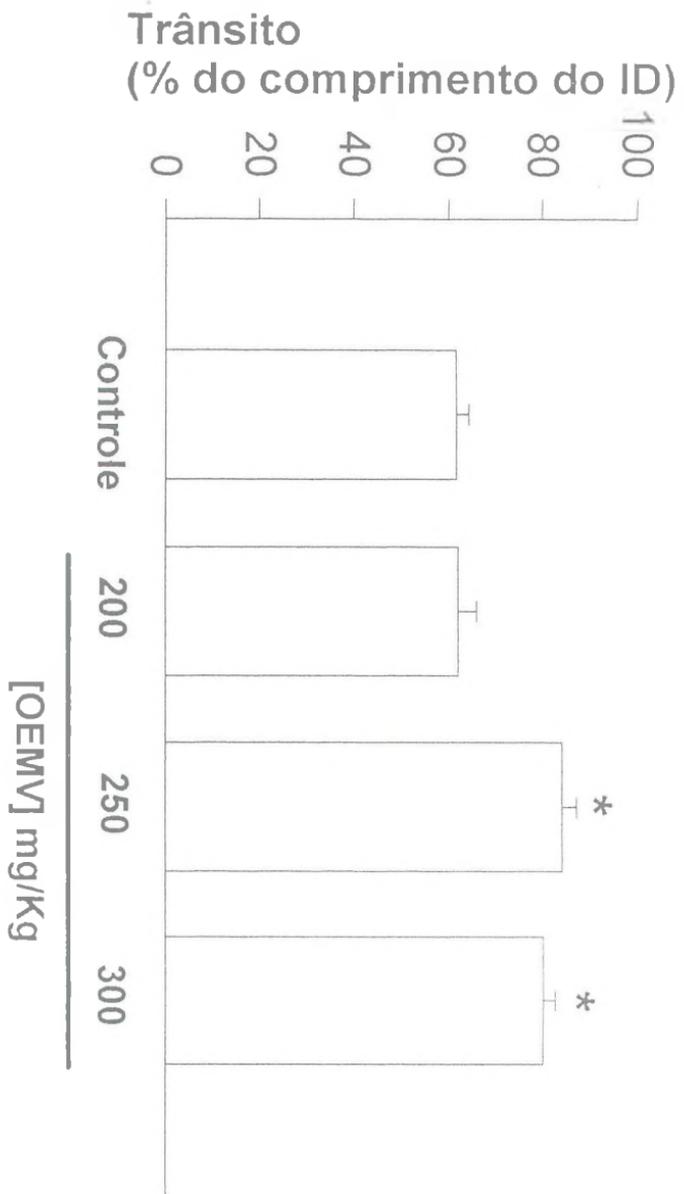
**Fig. 20-** Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o trânsito intestinal de camundongos.

Em **a** e **b**. Abscissas, doses do OEMV e OP, respectivamente, expressas em mg/kg; ordenadas, trânsito (distância percorrida pelo marcador calculada em termos de porcentagem do comprimento total do intestino delgado). Notar que OEMV 250 e 300 mg/kg e OP 200 mg/kg promoveram um aumento significativo do trânsito intestinal em camundongos. \*, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Bonferroni's method).

**b**



a



### 3.2.1.2 Efeitos do OEMV e OP sobre a diarreia (peso em gramas) induzida pelo OR em camundongos.

A diarreia induzida pelo OR na ausência do OEMV mostrou um padrão de baixa frequência de excreção das fezes ( $0,6 \pm 0,25$  evacuações) na primeira hora, seguida por um aumento, o qual foi significativo ( $1,8 \pm 0,21$  evacuações,  $n=20$ ;  $p<0,05$ ; Teste t, Teste t, Mann-Whitney Rank Sum test) na terceira hora e, posteriormente, uma queda progressiva até a sexta hora ( $0,7 \pm 0,18$  evacuações).

OEMV nas doses de 10 e 200 mg/kg (mas não 1 mg/kg) alterou significativamente ( $p<0,05$ ; Teste t, Mann-Whitney Rank Sum test) esse padrão de resposta. Nessas doses o OEMV deslocou o pico das frequências das evacuações (número médio de eliminações fecais/hora) para as duas primeiras horas, para em seguida essas frequências declinarem monotonicamente até o final do período de observação (Fig. 21a). O número médio de evacuações totais durante as seis horas no controle e com 1,0, 10 e 200 mg/kg de peso do OEMV foi  $6,6 \pm 0,43$  ( $n=20$ ),  $5,5 \pm 0,56$  ( $n=10$ ),  $6,9 \pm 0,72$  ( $n=17$ ) e  $5,0 \pm 0,49$  ( $n=18$ ), respectivamente; nenhuma diferença significativa foi encontrada (Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test).

Sobre este mesmo parâmetro o OP 1 mg/kg e o controle apresentaram um padrão semelhante de atuação, sendo atingido o efeito máximo ( $2,0 \pm 0,42$ ; e  $2,1 \pm 0,36$  evacuações,  $n=10$ , respectivamente) na quarta hora para em seguida declinar até 73% do efeito máximo do controle. Na dose de 200 mg/kg o OP, na primeira hora causou um aumento significativo da frequência das evacuações ( $1,5 \pm 0,5$  evacuações) quando comparada ao controle ( $0,1 \pm 0,11$  evacuações) (Fig. 21b). O número de evacuações durante as seis horas, por animal, no controle e

com as doses de 1 e 200 mg/kg de OP foi,  $7,3 \pm 0,55$  (n=20),  $6,9 \pm 0,67$  (n=10) e  $5,0 \pm 0,552$  (n=10), respectivamente, não sendo observado diferença significativa do número de evacuações entre os grupos (ANOVA, um fator).

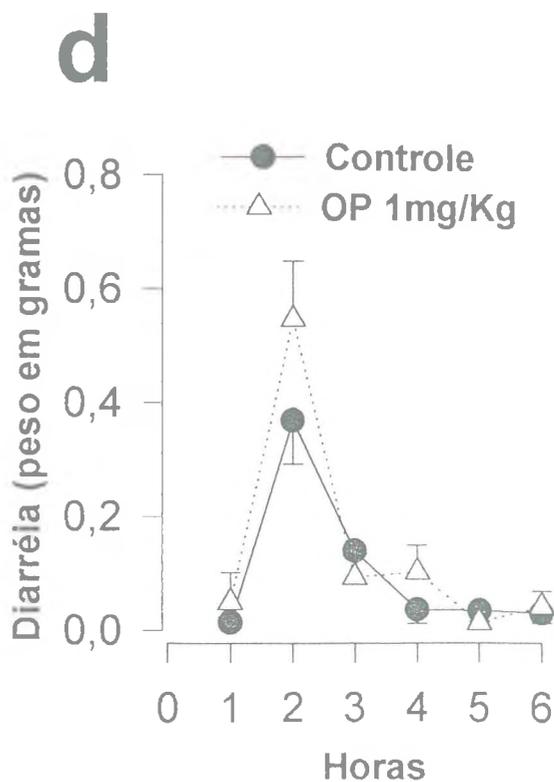
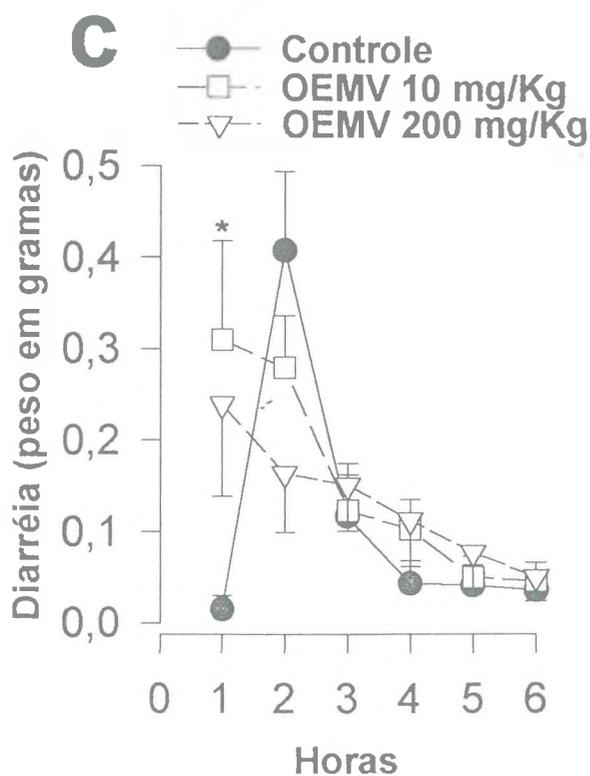
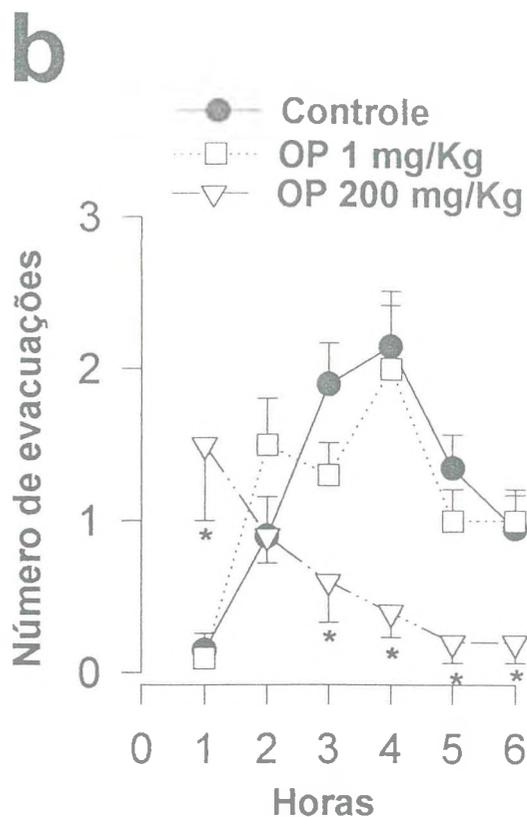
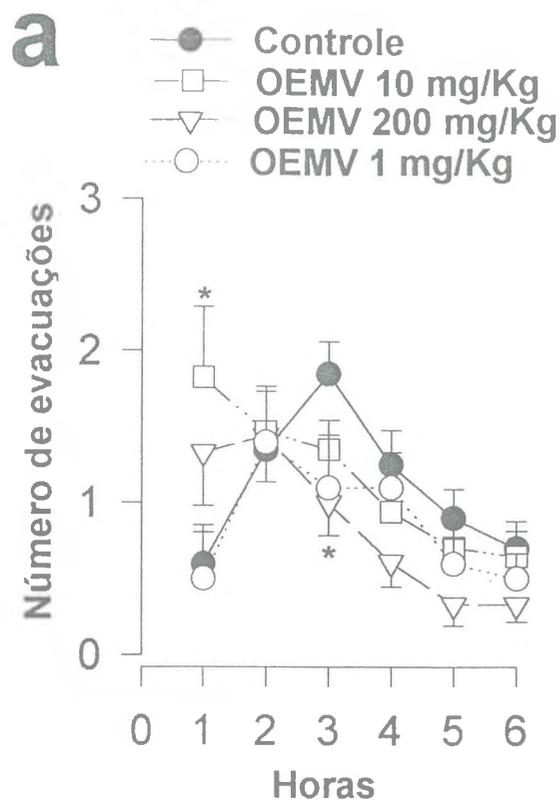
A diarreia induzida pelo OR na ausência do OEMV mostrou um padrão de baixo peso de excreção das fezes ( $0,015 \pm 0,015$  g) na primeira hora, seguida por um aumento significativo ( $0,40 \pm 0,09$  g; n=10) na segunda hora e uma queda progressiva para os níveis próximos à primeira hora no final do período de observação (Fig. 21c). Este padrão de diarreia não foi alterado por 1 mg/kg de peso do OEMV. Com 200 mg/kg de peso corporal de OEMV houve um aumento significativo da média peso/hora das fezes eliminadas durante a primeira hora, que foi  $0,31 \pm 0,11$  g (n=7), um valor máximo, após o qual essa média declinou monotonicamente até o final do período de observação. O peso total das fezes evacuadas durante as seis horas/animal no grupo controle e com 10 e 200 mg/kg de peso do OEMV foi  $0,65 \pm 0,069$  g (n=10),  $0,90 \pm 0,082$  g (n=17) e  $0,79 \pm 0,15$  g (n=10), respectivamente. Conforme observado, neste último caso, não houve diferença significativa (Teste t, Mann-Whitney Rank Sum test). Em relação ao OP observou-se que a dose de 1 mg/kg (n=10) não apresentou diferença significativa quando comparada ao controle ao longo das seis horas de observação (Fig. 21d).

### **3.2.1.3 Estudo da atividade antinociceptiva do OEMV e OP.**

#### **3.2.1.3.1 Efeitos do OEMV e OP sobre o estímulo nociceptivo induzido pela placa quente.**

**Fig. 21- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino (OR) em camundongos.**

a e b, efeitos do OEMV e OP sobre a diarreia induzida pelo OR, expressa como média da relação frequência/hora das evacuações durante seis horas de observação. c e d, efeitos do OEMV e OP sobre a diarreia induzida pelo OR expressa como médias da relação peso/hora das fezes durante seis horas de observação. Notar que o OEMV nas doses de 10 e 200 mg/kg promoveu, de forma significativa, um aumento e diminuição do número de evacuações na primeira e terceira hora, respectivamente. Sobre este mesmo parâmetro, o OP, na dose de 200 mg/kg, promoveu um aumento significativo na primeira hora para, a partir da terceira hora, promover uma diminuição significativa do número destas. Em relação ao peso em gramas de fezes eliminadas pelos camundongos, somente o OEMV (10 mg/kg), na primeira hora, foi capaz de apresentar um efeito significativo. \*, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test).



**Fig. 22-** Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo térmico ( $50 \pm 5$  °C) induzido em camundongos.

Abscissa, tempo em minutos, nos quais o estímulo térmico foi aplicado; ordenada, latência (tempo que o animal demora para manifestar uma reação dolorosa) em segundos. Notar que somente a morfina (10 mg/kg) apresentou um efeito significativo na elevação do tempo para a manifestação de uma reação dolorosa a partir de 30 min. \*, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

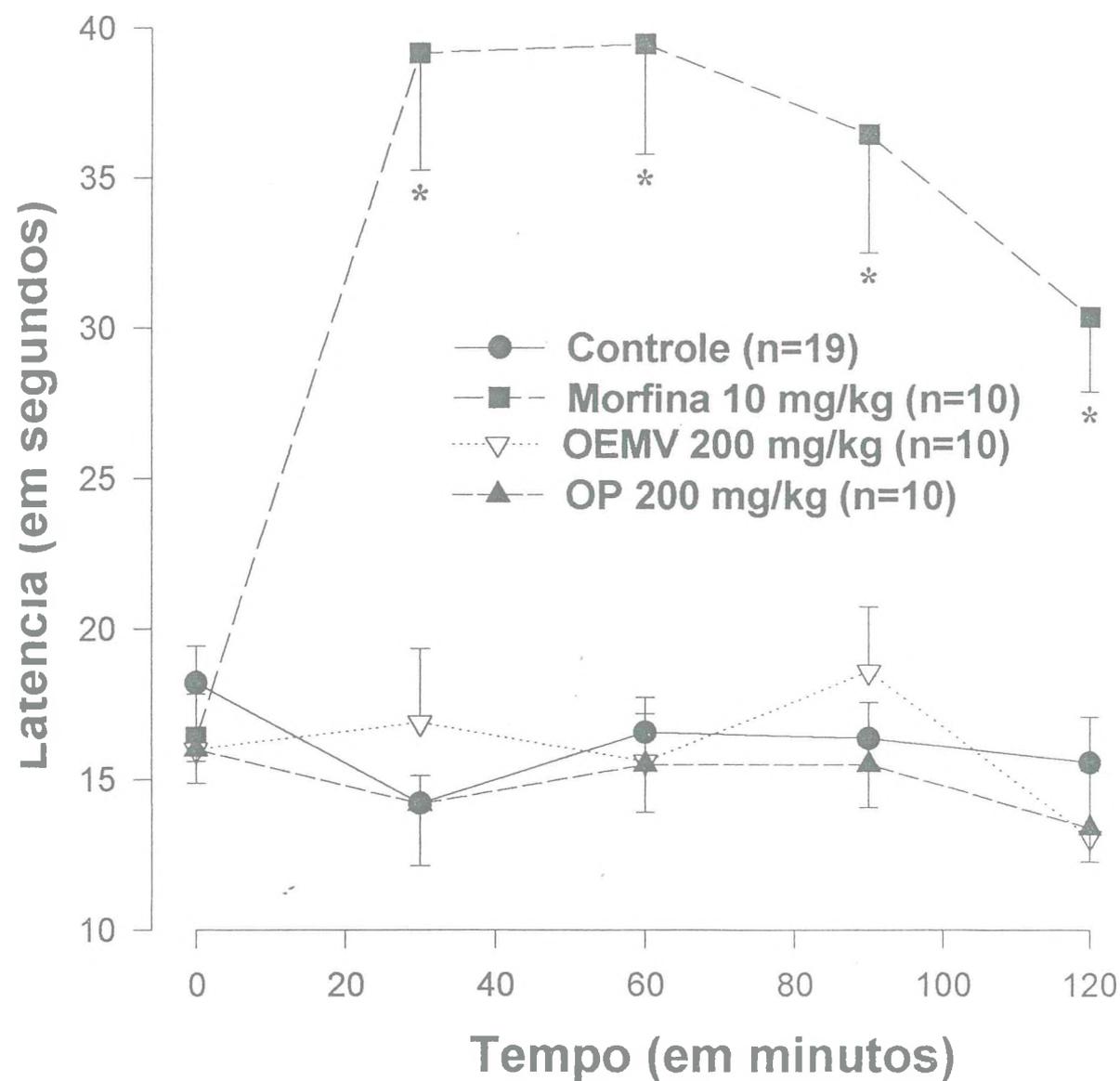


Tabela 7. Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo térmico ( $50 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) induzido em camundongos.

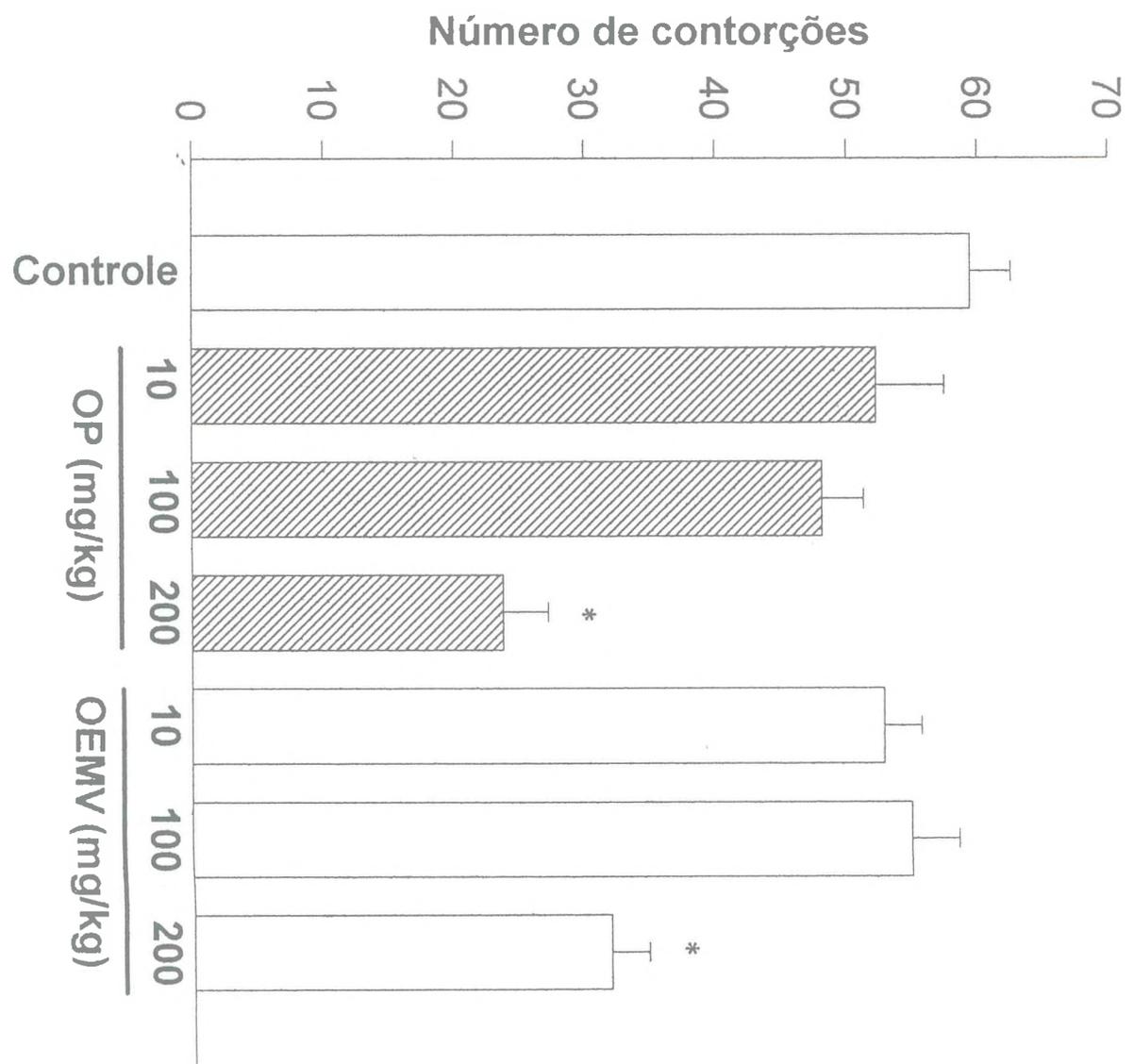
GRUPO	Dose/via de Administração (n)	Latência (em segundos)				
		0 min.	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Controle (veículo)	v.o (19)	$18,21 \pm 1,23$	$14,21 \pm 0,93$	$16,58 \pm 1,16$	$16,37 \pm 1,21$	$15,58 \pm 1,52$
Morfina	10 mg/kg, i.p. (10)	$16,40 \pm 0,79$	$39,20 \pm 3,91^*$	$39,50 \pm 3,69^*$	$36,50 \pm 3,95^*$	$30,40 \pm 2,47^*$
OEMV	100 mg/kg, v.o (10)	$21,40 \pm 1,88$	$18,70 \pm 1,44$	$15,40 \pm 1,14$	$17,40 \pm 1,39$	$16,00 \pm 1,50$
	200 mg/kg, v.o (10)	$16,00 \pm 1,84$	$16,90 \pm 2,46$	$15,60 \pm 1,59$	$18,60 \pm 2,15$	$13,10 \pm 2,20$
OP	100 mg/kg, v.o (10)	$18,70 \pm 1,94$	$16,30 \pm 2,19$	$17,20 \pm 2,52$	$16,20 \pm 2,89$	$15,40 \pm 1,12$
	200 mg/kg, v.o (10)	$16,00 \pm 1,11$	$14,20 \pm 2,05$	$15,50 \pm 1,58$	$15,50 \pm 1,42$	$13,40 \pm 1,13$

<sup>a</sup>, os valores representam média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) do tempo expresso em segundos nos períodos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos em que os animais foram submetidos ao estímulo térmico. v.o e i.p, representam via oral e intraperitoneal, respectivamente.

\* $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method.

**Fig. 23- Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos.**

Abscissa, doses do OP e OEMV expressas em mg/kg; ordenada, número de contorções apresentadas durante os 20 minutos. Notar que OEMV e OP nas doses de 200 mg/kg, foram capazes de diminuir, de forma significativa, o número de contorções induzidas pelo ácido acético. \*, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Student-Newman-Keuls test).



intraplantar de formalina 1%. OEMV e OP nas doses de 100 e 200 mg/kg, mas não na dose de 50 mg/kg, reduziram de maneira significativa o tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata na segunda fase ( $5,3 \pm 2,18$  e  $2,8 \pm 1,17$  seg. para o OEMV;  $8,3 \pm 2,72$  e  $3,0 \pm 1,16$  seg. para o OP) (Fig. 24a). No intuito de se avaliar o envolvimento do sistema opióide na atividade analgésica induzida por OEMV e OP, utilizamos a naloxona, um antagonista opióide, 15 minutos antes do tratamento com as doses de OEMV e OP ou morfina, sendo esta última administrada 30 min. antes da formalina. Observamos ainda que a naloxona foi capaz de reverter ( $76,7 \pm 4,19$  e  $21,7 \pm 4,09$  seg.) a atividade analgésica induzida pela morfina na primeira e segunda fase ( $16,8 \pm 6,83$  e  $2,6 \pm 1,39$  seg.) quando comparada ao controle ( $60,5 \pm 3,97$  e  $20,6 \pm 2,14$  seg.). O OEMV e OP (200 mg/kg) mesmo na presença de naloxona, mostraram-se capazes de diminuir o tempo que os animais ficavam lambendo as patas ( $7,2 \pm 3,18$  e  $6,3 \pm 2,60$  seg.; respectivamente) na segunda fase (componente inflamatório) do teste (Fig. 24b) (Tabela 8).

### **3.2.1.4 Estudo dos efeitos tóxicos do OEMV e OP em camundongos e ratos.**

#### **3.2.1.4.1 Determinação da $DL_{50}$ dos animais tratados com OEMV e OP.**

Neste estudo observamos que as doses de 1000, 600, 550, 500 e 355 mg/kg do OEMV, quando administradas por via oral, induziram percentuais de morte de 100, 70, 50, 40 e 0, respectivamente. As doses de 1000, 500, 450, 400, 355 e 300 mg/kg do OP, induziram percentuais de morte de 100, 90, 70, 50, 30 e 0, respectivamente. Através da interpolação semilogarítmica determinou-se as

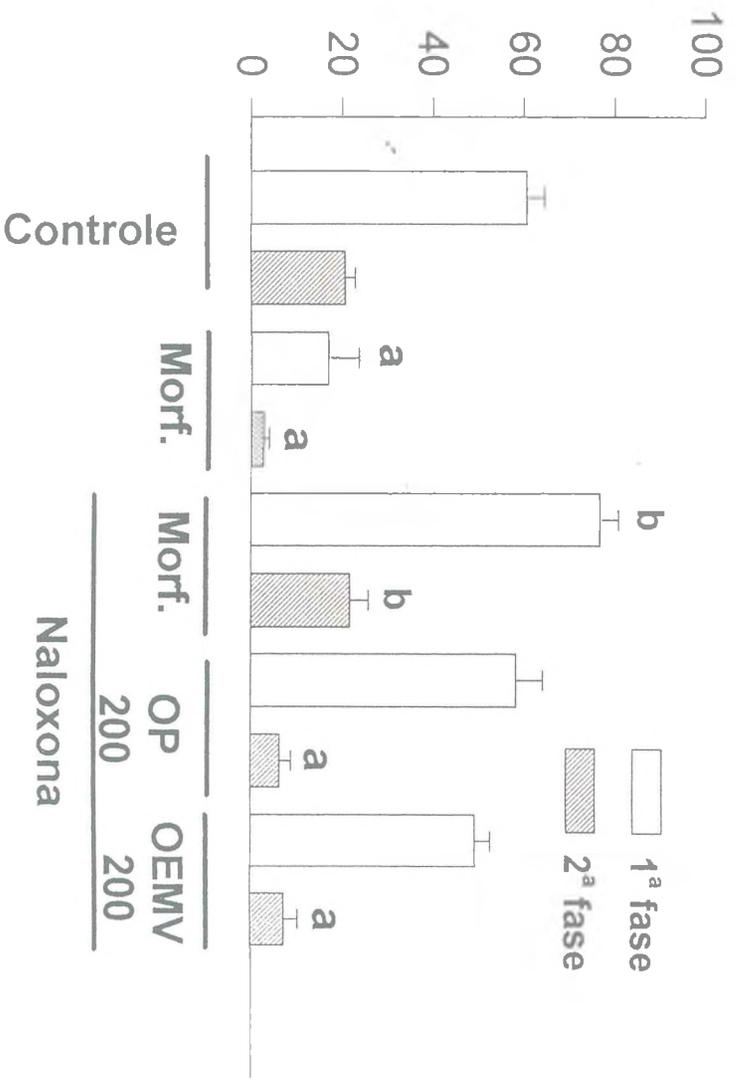
**Fig. 24-** Efeitos do óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos.

**a**, efeitos do OEMV e OP, dependentes de concentração, sobre as fases do estímulo nociceptivo induzido pela formalina 1%. Abscissa, concentrações do OEMV e OP expressas em mg/kg; ordenada, tempo gasto, em segundos, lambendo a pata. \*, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; ANOVA, Dunn's method).

**b**, efeitos do OEMV e OP sobre as fases do estímulo nociceptivo induzido pela formalina, na presença do antagonista opiáceo naloxona (2 mg/kg, s.c). Observe que não houve reversão dos efeitos analgésicos do OEMV e OP na presença de naloxona; ao contrário da morfina (4 mg/kg, s.c), que teve seu efeito analgésico revertido. Abscissa, efeito da morfina e da naloxona sobre as concentrações do OEMV e OP (200 mg/kg) e morfina; ordenada, tempo gasto, em segundos, lambendo a pata. **a** e **b**, estatisticamente significante do controle ( $p < 0,05$ ; Teste **t** não pareado, Mann-Whitney Rank Sum test).

**b**

Tempo gasto lambendo a pata (s)



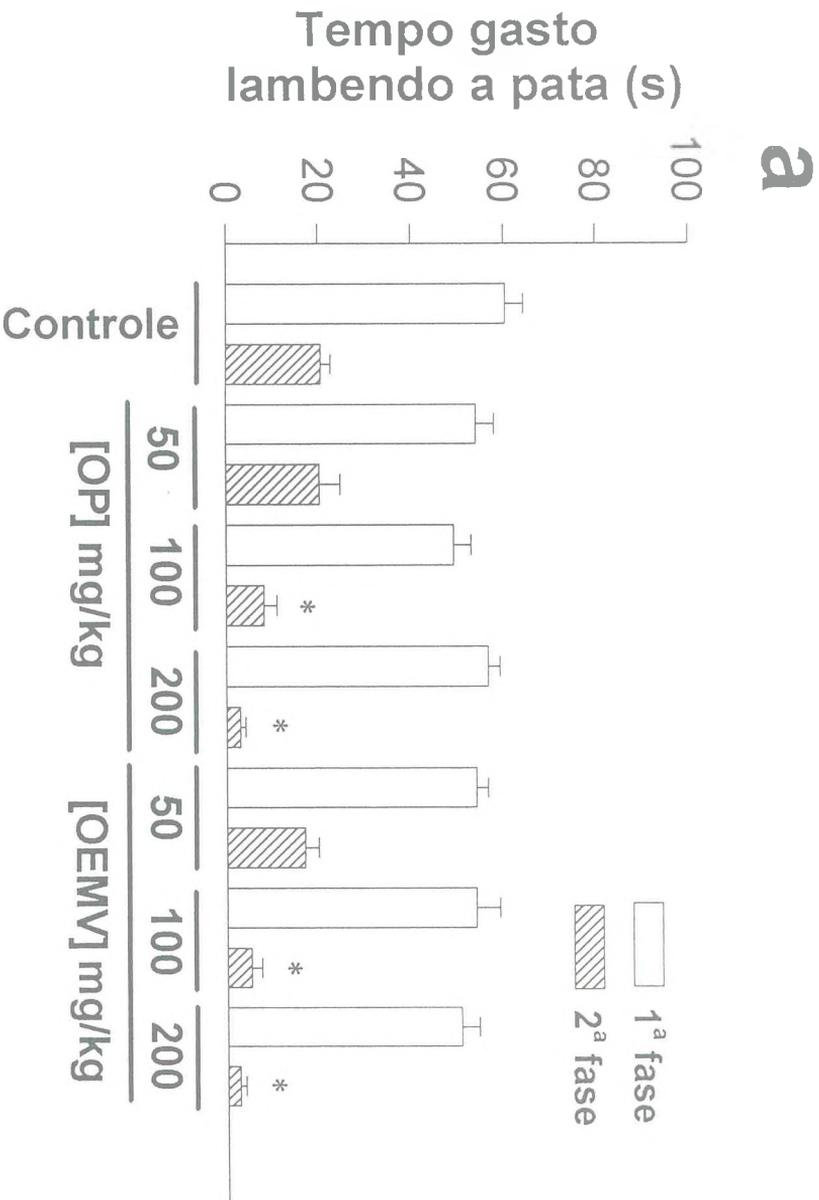


Tabela 8. Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo induzido pelo óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP) na nociceção induzida por formalina em camundongos.

GRUPO	Dose/Via de Administração (n)	Tempo (s)		% de inibição	
		1ª Fase	2ª Fase	1ª Fase	2ª Fase
Controle (veículo)	v.o (13)	60,5 ± 3,97	20,6 ± 2,14	—	—
	50 mg/kg (v.o.) (10)	54,0 ± 5,52	17,0 ± 2,97	—	—
OEMV	100 mg/kg (v.o.) (12)	54,0 ± 5,11	5,3 ± 2,18*	—	74,2 *
	200 mg/kg (v.o.) (10)	50,6 ± 3,90	2,8 ± 1,16*	—	86,4 *
	50 mg/kg (v.o.) (10)	54,3 ± 3,97	20,3 ± 4,59	—	—
OP	100 mg/kg (v.o.) (14)	49,3 ± 3,80	8,3 ± 2,72*	—	59,7*
	200 mg/kg (v.o.) (12)	56,6 ± 2,60	3,0 ± 1,16*	—	85,4*
MORFINA	10 mg/kg (s.c.) (17)	16,8 ± 6,83*	2,6 ± 1,39*	72,2*	87,4*
OEMV + naloxona	200 mg/kg (v.o.) + 2 mg/kg (s.c.) (12)	49,2 ± 3,38	7,2 ± 3,18*	—	65,0*
OP + naloxona	200 mg/kg (v.o.) + 2 mg/kg (s.c.) (12)	58,2 ± 5,92	6,3 ± 2,60*	—	69,4*
Morfina + naloxona	10 mg/kg (s.c.) + 2 mg/kg (s.c.) (11)	76,7 ± 4,15	21,7 ± 4,09	—	—

Os resultados representam média ± E.P.M, do tempo (em segundos) gasto pelo animal lambendo a pata, registrado no período de 0-5min. (1ª fase) e 20-25 min. (2ª fase), após a injeção de formalina.

\*p<0,05; Teste t não pareado, Mann-Whitney Rank Sum Test e ANOVA, Dunn's method.

v.o e s.c, representam via oral e subcutânea, respectivamente.

DL<sub>50</sub>, cujos valores foram  $550 \pm 49,05$  e  $400 \pm 31,64$  mg/kg, para o OEMV e OP, respectivamente.

Foi observado que, a partir da dose de 200 mg/kg do OP e 250 mg/kg do OEMV, os animais apresentaram incoordenação motora, sonolência, salivação abundante, aumento da excreção de fezes, dificuldade respiratória, ptose palpebral e morte de alguns.

A administração do OEMV (400 mg/kg) ou OP (355 mg/kg) através da veia caudal do camundongo induziu morte em 50% dos camundongos nas primeiras 24 horas.

#### **3.2.1.4.2 Estudo da toxicidade sub-aguda do OEMV e OP em ratos de ambos os sexos.**

Este estudo consistiu em observar os efeitos da administração diária, por via oral, de 55 e 110 mg/kg de OEMV e 40 e 80 mg/kg de OP, durante 30 dias. Estas doses correspondem a 10 e 20% das DL<sub>50</sub> aguda em camundongos. Durante os 30 dias de tratamento com o OEMV e OP não houve alteração do comportamento nem morte dos animais. Nos grupos tratados houve um aumento progressivo no peso dos animais que não foi estatisticamente diferente do grupo controle. Porém, quando os animais foram separados em grupos pelo sexo, os machos apresentaram um significativo ganho de peso nas doses de 80 mg/kg e 110 mg/kg de OP e OEMV, respectivamente (Tab. 9).

Tabela 9. Ganho de peso corporal de ratos de ambos os sexos, agrupados ou separados por sexo, ao fim de 30 dias de tratamento com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) e óxido de piperitenona (OP).

GRUPO	Dose/número de animais (n)	Ganho ponderal (gramas)
Controle (M + F) <sup>b</sup>	— (10)	40,3 ± 5,61 <sup>a</sup>
OEMV	55 mg/kg (9)	52,9 ± 9,14
	110 mg/kg (9)	60,4 ± 9,01
OP	40 mg/kg (10)	52,3 ± 4,73
	80 mg/kg (8)	54,2 ± 10,31
Controle (M)	— (5)	47,0 ± 10,74
OEMV	55 mg/kg (5)	72,0 ± 9,46
	110 mg/kg (5)	82,0 ± 4,51*
OP	40 mg/kg (6)	57,7 ± 10,74
	80 mg/kg (4)	81,0 ± 8,34*
Controle (F)	— (5)	33,6 ± 2,01
OEMV	55 mg/kg (4)	29,0 ± 3,08
	110 mg/kg (4)	33,5 ± 4,17
OP	40 mg/kg (4)	44,3 ± 3,73
	80 mg/kg (4)	27,5 ± 4,57

<sup>a</sup>, os valores representam média ± erro padrão da média.

<sup>b</sup>, as letras M e F, representam machos e fêmeas, respectivamente.

\*, p<0,05; ANOVA, Student-Newman-Keuls-test.

Os parâmetros hematológicos ligados à concentração de hemoglobina e contagem de células no sangue (hemácias, plaquetas, leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos, monócitos e linfócitos)) não foram significativamente alterados (Tabelas 10 e 11). Dos parâmetros bioquímicos do sangue (concentração de glicose, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, transaminase glutâmica oxalacética, transaminase glutâmica pirúvica, colesterol total e triglicerídios) apenas a glicose foi significativamente alterada pelo tratamento com OP 40 e 80 mg/kg (tabelas 12 e 13).

Tabela 10. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados por via oral com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) 55 e 110 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	GRUPOS			
	Controle <sup>a</sup> inicial	Controle final	OEMV 55 mg/kg	OEMV 110 mg/kg
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μl) <sup>b</sup>	6,93 ± 0,68 <sup>c</sup> (5,59 — 7,67)	7,62 ± 0,61	7,46 ± 0,51	7,37 ± 0,48
Hemoglobina (g/dl)	13,59 ± 1,10 (11,43 — 15,76)	14,45 ± 0,89	14,50 ± 0,78	14,70 ± 0,38
Hematócrito (%)	44,47 ± 2,55 (39,47 — 49,47)	42,28 ± 3,11	47,71 ± 2,76	46,91 ± 2,80
VCM (fl)	63,87 ± 1,72 (60,49 — 67,23)	63,45 ± 2,35	64,21 ± 6,72	63,61 ± 1,06
HCM (pg)	19,48 ± 0,66 (18,18 — 20,77)	19,01 ± 0,93	19,43 ± 0,51	19,97 ± 1,29
CHCM (g/dl)	30,51 ± 0,85 (28,82 — 32,19)	29,95 ± 0,72	30,48 ± 2,54	31,41 ± 1,81
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl)	521,11 ± 70,78 (382,37 — 659,85)	539,10 ± 78,21	607,33 ± 122,21	608,88 ± 109,49
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μl)	8,68 ± 2,36 (4,05 — 13,31)	9,98 ± 2,36	11,37 ± 2,99	12,44 ± 1,56
Neutrófilo (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,59 ± 0,11 (0,37 — 0,82)	0,65 ± 0,21	0,57 ± 0,12	0,72 ± 0,21
Linfócito (x10 <sup>3</sup> /μl)	7,25 ± 1,83 (3,65 — 10,84)	8,06 ± 2,10	9,07 ± 2,48	10,30 ± 1,27
Monócito (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,68 ± 0,23 (0,22 — 1,15)	0,84 ± 0,53	0,98 ± 0,41	0,98 ± 0,33
Eosinófilo (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,042 ± 0,016 (0,011 — 0,074)	0,045 ± 0,024	0,057 ± 0,031	0,053 ± 0,037
Basófilo (x10 <sup>3</sup> /μl)	0,046 ± 0,014 (0,018 — 0,074)	0,048 ± 0,029	0,044 ± 0,024	0,057 ± 0,016

<sup>a</sup>, Controle inicial, medidas iniciais, efetuadas nos 47 ratos utilizados neste estudo, no primeiro dia da sequência temporal antes dos inícios dos tratamentos. A partir desse dia, os animais foram divididos em 5 grupos. Um grupo não recebeu tratamento (Controle = 10 animais), dois o receberam com OEMV 55 mg/Kg e 110 mg/Kg, 09 animais para cada grupo e os outros dois com óxido de piperitena 40 mg/Kg = 10 animais e 80 mg/Kg = 09 animais. No 30<sup>o</sup> dia as medidas foram repetidas em todos os grupos, inclusive no não tratado (controle final).

<sup>b</sup>, Número de células x 10<sup>6</sup>/μl de sangue.

<sup>c</sup>, Os valores representam média ± D.P.M. O intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 11. Parâmetros hematológicos de ratos Wistar tratados por via oral com óxido de piperitenona (OP) 40 e 80 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	GRUPOS			
	Controle <sup>a</sup> inicial	Controle final	OP 40 mg/kg	OP 80 mg/kg
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ) <sup>b</sup>	6,93 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup> (5,59 — 7,67)	7,62 $\pm$ 0,61	7,34 $\pm$ 0,45	7,37 $\pm$ 0,51
Hemoglobina (g/dl)	13,59 $\pm$ 1,10 (11,43 — 15,76)	14,45 $\pm$ 0,89	14,09 $\pm$ 0,65	14,23 $\pm$ 1,06
Hematócrito (%)	44,47 $\pm$ 2,55 (39,47 — 49,47)	42,28 $\pm$ 3,11	46,57 $\pm$ 2,71	47,41 $\pm$ 3,47
VCM (fl)	63,87 $\pm$ 1,72 (60,49 — 67,23)	63,45 $\pm$ 2,35	63,46 $\pm$ 1,17	64,26 $\pm$ 1,93
HCM (pg)	19,48 $\pm$ 0,66 (18,18 — 20,77)	19,01 $\pm$ 0,93	19,23 $\pm$ 0,51	19,28 $\pm$ 0,52
CHCM (g/dl)	30,51 $\pm$ 0,85 (28,82 — 32,19)	29,95 $\pm$ 0,72	30,29 $\pm$ 0,59	30,03 $\pm$ 0,81
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	521,11 $\pm$ 70,78 (382,37 — 659,85)	539,10 $\pm$ 78,21	586,00 $\pm$ 72,35	569,87 $\pm$ 103,06
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8,68 $\pm$ 2,36 (4,05 — 13,31)	9,98 $\pm$ 2,36	11,07 $\pm$ 2,26	11,92 $\pm$ 1,60
Neutrófilo ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,59 $\pm$ 0,11 (0,37 — 0,82)	0,65 $\pm$ 0,21	0,80 $\pm$ 0,28	0,64 $\pm$ 0,10
Linfócito ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	7,25 $\pm$ 1,83 (3,65 — 10,84)	8,06 $\pm$ 2,10	8,75 $\pm$ 2,08	8,69 $\pm$ 1,63
Monócito ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,68 $\pm$ 0,23 (0,22 — 1,15)	0,84 $\pm$ 0,53	0,95 $\pm$ 0,46	1,09 $\pm$ 0,54
Eosinófilo ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,042 $\pm$ 0,016 (0,011 — 0,074)	0,045 $\pm$ 0,024	0,073 $\pm$ 0,066	0,061 $\pm$ 0,055
Basófilo ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,046 $\pm$ 0,014 (0,018 — 0,074)	0,048 $\pm$ 0,029	0,048 $\pm$ 0,024	0,042 $\pm$ 0,011

<sup>a</sup>, Controle inicial, medidas iniciais, efetuadas nos 47 ratos utilizados neste estudo, no primeiro dia da sequência temporal antes dos inícios dos tratamentos. A partir desse dia, os animais foram divididos em 5 grupos. Um grupo não recebeu tratamento (Controle = 10 animais), dois o receberam com OEMV 55 mg/Kg e 110 mg/Kg, 09 animais para cada grupo e os outros dois com óxido de piperitenona 40 mg/Kg = 10 animais e 80 mg/Kg = 09 animais. No 30º dia as medidas foram repetidas em todos os grupos, inclusive no não tratado (controle final).

<sup>b</sup>, Número de células  $\times 10^6/\mu\text{l}$  de sangue.

<sup>c</sup>, Os valores representam média  $\pm$  D.P.M. O intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle  $\times 1,96$  é dado em parênteses.

Tabela 12. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óleo essencial de *Mentha x villosa* (OEMV) 55 e 110 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	GRUPOS			
	Controle <sup>a</sup> inicial	Controle final	OEMV 55 mg/kg	OEMV 110 mg/kg
Glicose (mg/dl)	95,75 ± 24,27 <sup>b</sup> (48,17 — 143,33)	64,33 ± 21,44	55,77 ± 16,19	73,00 ± 14,54
Uréia (mg/dl)	68,68 ± 8,70 (51,62 — 85,74)	73,20 ± 22,14	60,44 ± 22,14	53,22 ± 7,49
Creatinina (mg/dl)	0,56 ± 0,17 (0,21 — 0,91)	0,71 ± 0,11	0,60 ± 0,15	0,65 ± 0,31
Fosfatase alcalina (U/l)	385,87 ± 118,20 (154,19 — 617,55)	324,30 ± 100,11	291,66 ± 100,14	347,22 ± 121,66
TGO (U/ml)	248,67 ± 59,29 (132,46 — 364,88)	301,10 ± 62,02	337,33 ± 52,37	305,66 ± 51,71
TGP (U/ml)	55,33 ± 9,23 (20,59 — 87,31)	78,90 ± 11,67	58,44 ± 10,89	67,11 ± 29,20
Colesterol (mg/dl)	57,84 ± 8,48 (41,21 — 74,48)	54,10 ± 12,96	61,22 ± 6,28	56,88 ± 7,52
Triglicerídeos (mg/dl)	47,62 ± 17,12 (14,05 — 80,62)	43,30 ± 14,23	65,88 ± 16,47	58,55 ± 14,37

<sup>a</sup>, Controle inicial, medidas iniciais, efetuadas nos 47 ratos utilizados neste estudo, no primeiro dia da sequência temporal antes dos inícios dos tratamentos. A partir desse dia, os animais foram divididos em 5 grupos. Um grupo não recebeu tratamento (Controle = 10 animais), dois o receberam com OEMV 55 mg/Kg e 110 mg/Kg, 09 animais para cada grupo e os outros dois com óxido de piperitenona 40 mg/Kg = 10 animais e 80 mg/Kg = 09 animais. No 30º dia as medidas foram repetidas em todos os grupos, inclusive no não tratado (controle final).

<sup>b</sup>, Os valores representam média ± D.P.M. O intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

Tabela 13. Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar (machos e fêmeas) tratados por via oral com óxido de piperitenona (OP) 40 e 80 mg/kg/dia, durante 30 dias.

Parâmetros	GRUPOS			
	Controle <sup>a</sup> inicial	Controle final	OP 40 mg/kg	OP 80 mg/kg
Glicose (mg/dl)	95,75 ± 24,27 <sup>b</sup> (48,17 — 143,33)	64,33 ± 21,44	46,60 ± 14,50*	42,12 ± 26,82*
Uréia (mg/dl)	68,68 ± 8,70 (51,62 — 85,74)	73,20 ± 22,14	62,40 ± 5,79	61,25 ± 19,47
Creatinina (mg/dl)	0,56 ± 0,17 (0,21 — 0,91)	0,71 ± 0,11	0,65 ± 0,07	0,77 ± 0,27
Fosfatase alcalina (U/l)	385,87 ± 118,20 (154,19 — 617,55)	324,30 ± 100,11	394,40 ± 169,37	436,87 ± 206,16
TGO (U/ml)	248,67 ± 59,29 (132,46 — 364,88)	301,10 ± 62,02	331,70 ± 53,20	358,62 ± 65,20
TGP (U/ml)	55,33 ± 9,23 (20,59 — 87,31)	78,90 ± 11,67	85,88 ± 13,73	86,50 ± 15,10
Colesterol (mg/dl)	57,84 ± 8,48 (41,21 — 74,48)	54,10 ± 12,96	56,40 ± 6,61	56,87 ± 10,14
Triglicerídeos (mg/dl)	47,62 ± 17,12 (14,05 — 80,62)	43,30 ± 14,23	56,00 ± 15,72	54,87 ± 11,28

<sup>a</sup>, Controle inicial, medidas iniciais, efetuadas nos 47 ratos utilizados neste estudo, no primeiro dia da sequência temporal antes dos inícios dos tratamentos. A partir desse dia, os animais foram divididos em 5 grupos. Um grupo não recebeu tratamento (Controle = 10 animais), dois o receberam com OEMV 55 mg/Kg e 110 mg/Kg, 09 animais para cada grupo e os outros dois com óxido de piperitenona 40 mg/Kg = 10 animais e 80 mg/Kg = 09 animais. No 30º dia as medidas foram repetidas em todos os grupos, inclusive no não tratado (controle final).

<sup>b</sup>, Os valores representam média ± D.P.M. O intervalo de confiança calculado a partir do D.P.M. do controle x 1,96 é dado em parênteses.

\*Significativamente diferente dos controles iniciais.

## 4 - DISCUSSÃO

Este estudo demonstra que o OEMV apresenta atividade farmacológica em várias preparações relacionadas a tecidos excitáveis de mamíferos. Esses efeitos foram demonstrados em preparações *in vitro* e *in vivo*, e incluem ações que se relacionam com o uso da *Mentha x villosa* em medicina popular, bem como outras não relacionadas ao uso da planta pelo povo. Logo abaixo, discutiremos inicialmente os efeitos *in vitro*.

### 4.1 EFEITO DEPRESSOR DA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO

Sobre o músculo liso vascular e intestinal *in vitro* o OEMV foi potente e eficaz em instalar uma ação predominantemente depressora da motilidade. Essa atividade apresentou características de especificidade e de mecanismo de ação que ensejam uma potencialidade de utilização do OEMV.

#### 4.1.1 MECANISMO DE AÇÃO

Em relação ao mecanismo de ação do efeito relaxante e antiespasmódico do OEMV e OP, eles promoveram no íleo relaxamento do tônus basal e do tônus artificialmente aumentado com uma alta  $[K^+]$  com  $CI_{50}$  que foram semelhantes àquelas do bloqueio da ACh e HA neste tipo de preparação. Isto sugere que os efeitos miorelaxantes e antiespasmódico sobre o músculo liso intestinal tem mecanismo(s) comum(ns). Tal(is) mecanismo(s) é (são) provavelmente independentes de receptores de membrana, para neurotransmissores e autacóides.

O efeito relaxante do OEMV e do OP no músculo liso intestinal não foi alterado pelo HEX e pela AT, bloqueadores das transmissões ganglionares e dos receptores muscarínicos, respectivamente. As sinapses dos gânglios do SNE são na sua maioria nicotínicas e ACh é o principal neurotransmissor que modula a atividade contrátil do músculo liso intestinal estimulando-a na maioria dos segmentos intestinais (DAVISON, 1996; MIOLAN & NEIL, 1996). Esses dados, portanto, mostram que o efeito miorelaxante do OEMV e OP não se deve a alterações da transmissão colinérgica e torna pouco provável que o efeito miorelaxante do OEMV e OP seja devido primariamente a uma ação nos plexos nervosos da parede intestinal. Acredita-se que um dos principais mediadores de efeitos depressores da motilidade intestinal sejam as catecolaminas NE e EP, atuando em receptores  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (KELLOW, 1996; MIOLAN & NEIL, 1996; SZURSZEWSKY & KING, 1989). Enquanto nossos dados mostraram que OEMV e OP relaxaram completamente as preparações pré-contraídas pela exposição a 60 mM de  $K^+$  na solução nutritora, MAGALHÃES (1997) demonstrou que o relaxamento máximo induzido por EP em íleo de cobaia nessa condição não ultrapassa 17% do valor de estado estacionário dessa contração. Assim, é pouco provável que o relaxamento, induzido por OEMV e OP, dessas preparações previamente contraídas por 60 mM de  $K^+$ , seja mediada por liberação de catecolaminas ou por estimulação de receptores adrenérgicos. A transmissão sináptica no SNE pode ser efetuada e/ou modulada por outros mediadores, designados conjuntamente “NANC”, incluindo-se aqui, a transmissão peptidérgica (DAVISON, 1996). Demonstrada a pouca probabilidade da participação de mediadores adrenérgicos e colinérgicos, restava investigar a participação do SNE através de outros sistemas de mediadores. Os experimentos deste estudo que demonstraram que a presença de TTX ou de 60 mM de  $K^+$  na solução nutritora não alteraram o efeito miorelaxante e

antiespasmódico do OEMV e OP, tornam muito improvável a participação do SNE nesses efeitos. Essa conclusão decorre de a TTX, por efeito farmacológico (NARAHASHI et al., 1964), e 60 mM de  $K^+$ , por despolarizar a membrana citoplasmática (GRAFE, 1980), inativarem os canais de  $Na^+$  responsáveis pelo potencial de ação nervoso, e assim bloquearem qualquer participação neuronal que envolva a transmissão sináptica e, “a fortiori”, liberação de neurotransmissores e neuromoduladores.

O relaxamento, induzido por OEMV e OP, de preparações pré-contraídas por 60 mM de  $K^+$  na solução nutritora, leva a outras conclusões além daquela acima mencionada. Em presença de 60 mM de  $K^+$ , é muito improvável que um relaxamento venha se dever a uma repolarização da membrana sarcoplasmática para valores de  $E_m$  próximos ao potencial de repouso. Isso porque com 60 mM de  $K^+$  no meio extracelular o  $E_k \cong -20$  mV, a condutância da membrana ao  $K^+$  é alta e é  $K^+$  o principal responsável pelo  $E_m$  (GRAFE, 1980). Por essas mesmas razões é também muito improvável que o relaxamento da preparação se deva a ativação de canais de  $K^+$ , promovendo repolarização. Assim, o relaxamento induzido por OEMV e OP do íleo contraído por 60 mM de  $K^+$  não é razoavelmente explicável por alteração do  $E_m$ . Essa conclusão se torna muito mais inquestionável à luz dos resultados das medidas do  $E_m$  em presença e ausência de OEMV e OP, sobre as quais esses fármacos não induziram alteração funcionalmente significante em concentrações fisiológicas de  $K^+$  na solução nutritora (5 mM) ou em concentrações altas (60 mM). Tal conclusão é provavelmente aplicável aos outros efeitos depressores da contratilidade do íleo, como o relaxamento do tônus basal, bloqueio da contração induzida pelos agonistas ACh e HA, pois as  $CI_{50}$  de OEMV são similares entre si (o mesmo argumento se aplica para os efeitos miodepressores do OP). Essas conclusões se aplicam também nos anéis de aorta

para o relaxamento das preparações pré-contraídas com 60 mM de  $K^+$ , mas não para o relaxamento da contração induzida pelo éster do forbol, pois nesse último caso a  $CI_{50}$  muito mais alta sugere a possibilidade de mecanismo de ação diferente.

O bloqueio pelo OEMV e OP das contrações induzidas pela ACh, HA e  $K^+$ , com  $CI_{50}$  semelhantes, sugerindo portanto mecanismos de ação comuns, chegou a abolir totalmente essas contrações. As contrações induzidas pela ACh e HA são causadas em parte pela liberação de  $Ca^{2+}$  de seus estoques intracelulares (REMBOLD, 1992) e o efeito relaxante e antiespasmódico do OEMV e OP, promovendo bloqueio total da contração desses agonistas não são facilmente explicáveis por ação deflagradas na membrana sarcoplasmática. Assim, os dados discutidos até aqui são sugestivos de que o OEMV e OP estejam atuando através de mecanismos intracelulares que envolveriam desde o processo de transdução de sinais após a ativação de receptores até a etapa mecânica contrátil propriamente dita (interação das proteínas contráteis). No intuito de avaliar a veracidade desta hipótese, estudamos os efeitos do OEMV e OP nas contrações de ACh que estão na dependência do cálcio intracelular (por ocorrerem na presença de solução nutritora sem adição de  $Ca^{2+}$ ).

A contração do músculo longitudinal do íleo de cobaia promovida pela ACh se traduz em uma resposta constituída de dois componentes: um componente inicial rápido e reversível (contração fásica) e um componente que se desenvolve mais lentamente e de longa duração (contração tônica) (MACARA & GIÃO-T. RICO, 1992). A contração fásica é consequência da liberação dos estoques intracelulares de cálcio (KOBAYASHI et al., 1989; BOURREAU, 1991) de maneira dependente de  $IP_3$  (MACARA & GIÃO-T. RICO, 1992)

enquanto que a contração tônica é consequência de um aumento  $[Ca^{2+}]_i$  devido o influxo deste íon proveniente do meio externo (HOYLE & BURNSTOCK, 1989) e parece estar relacionado com a ativação da enzima PKC pelo DAG. Situações nas quais a concentração de  $Ca^{2+}$  do meio extracelular encontra-se baixa (0Ca-EGTA) a contração induzida pela ACh é dependente da liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques interno (BOLTON, 1979; BORREAU, 1991; ELORRIAGA et al., 1996). Quando na presença de bloqueadores de canais de  $Ca^{2+}$  como o metoxiverapamil (D600) ou NIF, em concentrações capazes de bloquear as contrações induzidas por 60 mM de  $K^+$ , permanece ainda um componente contrátil lento, porém de menor amplitude, como resposta do músculo longitudinal do íleo à presença da ACh na solução nutritora. OEMV (50  $\mu$ g/ml) e OP (200  $\mu$ g/ml) reduziram significativamente contrações induzidas pela ACh em presença de NIF (Fig. 16). O bloqueio pelo OEMV e OP, do componente da contração induzida pela ACh resistente a NIF e independente do  $Ca^{2+}$  externo, sugere que o bloqueio dos canais de cálcio da membrana sarcoplasmática é uma hipótese improvável para explicar totalmente o efeito antiespasmódico dessas duas substâncias. Isto porque a concentração de NIF usada foi suficiente para bloquear totalmente a contração induzida por 60 mM de  $K^+$ , e supostamente para bloquear totalmente os canais de cálcio dependentes de voltagem da membrana citoplasmática. Portanto, OEMV e OP bloquearam o componente da contração induzido pela ACh que supostamente não depende do influxo de cálcio do meio extracelular através do canal dependente de voltagem. O OEMV e OP bloquearam também o remanescente da contração induzida pela ACh em soluções 0Ca-EGTA. Nessas soluções a concentração de  $Ca^{2+}$  cai para valores da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M, e se desfaz (ou se inverte) o gradiente de potencial eletroquímico que promoveria, em presença de condições apropriadas de permeabilidade ao  $Ca^{2+}$ , um influxo passivo desse íon independente do tipo de

transporte por ele utilizado. Esses experimentos em soluções em 0Ca-EGTA, portanto, apoiam as conclusões obtidas dos experimentos usando o remanescente da contração da ACh em presença de NIF. Isto sugere uma hipótese de um sítio intracelular para a ação do OEMV e OP. Este efeito do OEMV está em consonância com resultados obtidos no laboratório de eletrofisiologia da UFC (FOGAÇA et al., 1997) onde foi demonstrado a atividade intracelular deste óleo (sobre o RS) em músculo estriado de sapo.

Os resultados acima discutidos sugerem que OEMV e OP promovem efeitos miorelaxantes e antiespasmódicos através de uma ação desencadeada a nível intracelular. A reversão pelo OEMV e OP da contração de anéis de aorta em meio sem adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e com 2 mM de EGTA, induzida por PDB, reforça a conclusão anterior de que esses fármacos são capazes de relaxar contrações que independem do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (nesse meio com 2 mM de EGTA sem  $\text{Ca}^{2+}$  a  $[\text{Ca}^{2+}] \cong 10^{-9}$  M (ARMSTRONG et al., 1972)). Contudo não podemos descartar a possibilidade de um efeito não específico.

Está documentado que a contração induzida por PDB em meio sem adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e com EGTA se deve a aumento da sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $\text{Ca}^{2+}$  (sensibilização ao  $\text{Ca}^{2+}$ ) devido a ativação da proteína quinase dependente de fosfolipídeos, ativada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (PKC) (DRUMOND & HUGHES, 1987; JIANG & MORGAN, 1987; LITTEN et al., 1987; HIRANO et al., 1991; YANAGISAWA & OKADA, 1994; SOMLYO & SOMLYO, 1994). Os efeitos dos PDBs podem ser mediados através de um outro mecanismo tal como ativação da  $\text{PLA}_2$  e liberação de AA. O AA é um agente  $\text{Ca}^{2+}$  sensibilizante porque aumenta a fosforilação da  $\text{MLC}_{20}$  e causa contração do

músculo liso a um nível de  $\text{Ca}^{2+}$  constante, por inibir a defosforilação de  $\text{MLC}_{20}$  (SOMLYO & SOMLYO, 1994).

É razoável levantar-se a hipótese de que o OEMV e OP atuem em uma certa etapa da cadeia de eventos celulares que levam à contração. A contração induzida por agente contraturante que atue em etapas dessa cadeia posteriores à etapa de atuação do OEMV e OP não deve sofrer influência desses fármacos. Assim, o bloqueio pelo OEMV e OP da contração induzida por PDB provavelmente se deve a uma atuação na etapa que envolve a PKC ou etapa anterior (em relação a sequência de eventos), o que está em acordo com a hipótese de ação intracelular. Essa conclusão, contudo, não se pode generalizar a todo efeito miorelaxante promovido pelo OEMV e OP. Isso porque, em anéis de aorta determinou-se nesse estudo que o OEMV e OP relaxam esses anéis pré-contraídas por 60 mM de  $\text{K}^+$ , com  $\text{CI}_{50}$  que foram (43,27 e 61,24  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) diferentes das  $\text{CI}_{50}$  para relaxamento da contração induzida pelo PDB (344,39 e 440,10  $\mu\text{g/ml}$ ). Esse fato sugere que OEMV e OP talvez atuem em aorta através de mais de um mecanismo de ação.

#### 4.1.2 ESPECIFICIDADE NA AÇÃO SOBRE O MÚSCULO LISO

As diferenças na potência e na eficácia da atuação do OEMV sobre os músculos lisos dos diferentes segmentos intestinais estudados são em alguns casos conspícuas e provavelmente funcionalmente importantes.

Quanto ao tônus basal observamos que o OEMV apresenta potência variável em induzir relaxamento, verificando-se a maior potência no esfíncter

pilórico e a menor na musculatura circular do estômago. Nós não pesquisamos explicação para esse fenômeno. Talvez o OEMV atue em sítios ou receptores que influenciam o tônus basal e que estejam relativamente mais presentes nos músculos onde esse óleo essencial é mais potente. Poder-se-ia sugerir que essas diferenças estejam relacionadas com as distintas vias de sinalização envolvidas nas contrações das células da musculatura gastrointestinal. Nas células da musculatura circular o componente fásico da contração se deve a mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$  do RS que é precedida pela hidrólise de  $\text{PIP}_2$  devido à ação de  $\text{PLC-}\beta_1$  e formação de  $\text{IP}_3$ .  $\text{IP}_3$  liga-se ao complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /receptor de  $\text{IP}_3$  e libera  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques sarcoplasmáticos. Nas células da musculatura longitudinal esse componente da contração se deve à ativação da  $\text{PLA}_2$  dependente de proteína G, que leva à formação de AA, e este por sua vez, ativa canais de  $\text{Cl}^-$  resultando em despolarização e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais sensíveis a voltagem. O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  deflagra a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques sarcoplasmáticos e induzem contração (GRIDER & MAKHLOUF, 1988; MURTHY et al., 1995; MAKHLOUF & MURTHY, 1997). Admitindo-se que os mesmos mecanismos que geram o componente fásico da contração também participam da geração do tônus basal, é possível que uma maior potência de atuação do OEMV em um desses mecanismos promovam maior potência de relaxamento do tônus basal. Julgamos, contudo, que essa hipótese é pouco provável por: i) ela pressupor que o mesmo mecanismo do componente fásico da contração contribuiria para a manutenção do tônus basal, enquanto seria mais lógico supor-se que essa contribuição viria dos mecanismos que promovem o componente tônico; ii) o efeito relaxante do OEMV, presente sobre os músculos longitudinais do estômago e do íleo, deveria estar ausente nos músculos circulares, e isso não ocorreu com o músculo circular do íleo.

A literatura registra sensibilidade diferente, quando comparada à aquela de outros músculos lisos intestinais, do músculo liso circular pilórico a vários agentes como o TEA,  $Ba^{++}$  e  $Sr^{++}$  (PAPASOVA, 1989). Registra também uma resposta contrátil à estimulação elétrica que é totalmente diferente do músculo circular das regiões vizinhas do duodeno e do antro pilórico (PAPASOVA, 1989). O músculo do piloro do gato e do gambá desenvolvem uma tensão da linha basal muito alta que é mais provável em relaxar sob estímulo nervoso que os músculos do antro pilórico e duodeno (SCHULZE-DELRIEU & SHIRAZI, 1983). Neste estudo estamos demonstrando que OEMV foi, em seu efeito miorrelaxante, mais potente no esfíncter pilórico do que em outros músculos aumentando assim a lista de agentes aos quais o esfíncter pilórico apresenta uma resposta diferente das apresentadas pelos outros músculos lisos intestinais. Esse efeito do OEMV, depressor da contratilidade, tem a característica de apresentar uma maior potência sobre o tônus basal do que sobre a frequência da movimentação espontânea do esfíncter pilórico. Tem ainda a característica de, sobre tônus basal ser efetuado com maior potência no esfíncter pilórico do que em outros músculos lisos intestinais. Essas duas características de atuação são provavelmente muito importantes para explicar o padrão de atuação do OEMV *in vivo*, que, apesar de ser um agente antiespasmódico acelera o trânsito intestinal.

Dessa maneira em todas as preparações intestinais *in vitro* estudadas, embora com potências diferentes, o OEMV exerceu, exceto no músculo circular do estômago, um efeito depressor sobre o tônus basal. Sobre as movimentações rítmicas o OEMV deprimiu monotonicamente a amplitude e a frequência dos músculos circular e longitudinal do estômago e do esfíncter pilórico. Em relação ao músculo circular do íleo, embora sua ação talvez haja sido parcialmente uma exceção a este padrão geral depressivo, pois em baixas concentrações houve uma

tendência a um aumento na amplitude e frequência, em concentrações mais altas o aumento foi abolido. Esta predominante ação miorreloxante do OEMV está em concordância com o uso da *Mentha x villosa* na medicina popular para tratar cólicas intestinais e sugere a possibilidade da utilidade do OEMV como um agente terapêutico antiespasmódico.

Embora a ação do OEMV haja sido, de uma maneira geral depressora do músculo liso intestinal, algumas características do perfil da ação do OEMV sobre esse músculo liso mereceram atenção. A primeira é sua maior potência, em deprimir o tônus basal em relação à movimentação rítmica espontânea. A segunda é a diferença na potência em um dado parâmetro, por exemplo, tônus basal, entre diferentes preparações. A terceira é a diferença qualitativa do efeito entre preparações pois, no músculo circular do íleo, diferentemente de outras preparações, não se observou (na faixa de concentrações estudadas) efeito significativo sobre o tônus basal e observou-se uma tendência a uma curva concentração-resposta bifásica. O perfil destas características sugere que o OEMV, mais que um depressor geral inespecífico do músculo liso intestinal, é um agente que atua com especificidade através de mecanismos ou receptores os quais não estão igualmente distribuídos pelos vários segmentos do intestino.

#### 4.1.3 ESTUDOS RELACIONADOS

Outras plantas aromáticas do nordeste do Brasil, também usadas como carminativo, estomáquico e como antiespasmódico em tratamento de distúrbios intestinais, tem óleos essenciais com atividade antiespasmódica. É o caso de *Croton zehntneri* (COELHO-DE SOUZA, 1997; COELHO-DE SOUZA et al.,

1997 e 1998) e do *Croton nepetaefolius* (MAGALHÃES, 1997; MAGALHÃES et al., 1998). O OEMV, contudo, apresenta diferenças em relação às características de efeito e de mecanismo de ação desses óleos. OEMV se diferencia do óleo essencial de *Croton zehntneri* por esse último não relaxar apreciavelmente o tônus basal e induzir oscilações contráteis no íleo e não relaxar a contração do PDB (COELHO-DE-SOUZA, 1997). O OEMV se assemelha ao óleo essencial de *Croton nepetaefolius* por várias razões: ambos induzem relaxamento do tônus basal, de amplitude e padrão de especificidade similares em relação aos vários segmentos intestinais. O OEMV se diferencia do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* por esse último não potencializar, em concentrações pequenas, a contração induzida pela ACh e HA (MAGALHÃES, 1997; MAGALHÃES et al., 1998).

Muitas espécies de *Mentha* são usadas na medicina popular e na indústria de todo o mundo. O óleo essencial de *Mentha x piperita* (OEMp), cujo principal constituinte químico é o mentol, é de grande uso na medicina popular e é usado também na medicina científica. O OEMp foi estudado do ponto de vista farmacológico (HILLS & AARONSON, 1991; BRUNETON, 1995) e demonstrou possuir efeitos espasmolíticos sobre o músculo liso intestinal, tendo efeitos semelhantes ao OEMV e OP. O mecanismo de ação contudo parece ser diferente desde que se documentou que o OEMp age predominantemente bloqueando os canais de cálcio dependentes de voltagem da membrana citoplasmática (HILLS & AARONSON, 1991), e é possível que esse seja o caso do OEMV e OP.

#### **4.2 EFEITOS SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL “IN VIVO”**

OEMV e OP foram eficazes em alterar o trânsito intestinal de camundongos em preparações *in vivo*, aumentando a distância percorrida pelo marcador, em um dado tempo ao longo do intestino delgado. O método que elegemos para quantificar alterações do trânsito intestinal inclui a deposição do marcador no estômago (JOSHI et al., 1987). Assim, a velocidade de esvaziamento gástrico influencia também a medida. Assim, é provável que este efeito seja pelo menos em parte uma consequência da maior potência do OEMV em relaxar o tônus basal do esfíncter pilórico do que em relaxar o tônus e a movimentação do músculo circular e longitudinal do estômago. Assim, é promovido uma diminuição da resistência a passagem do marcador sem alteração da força propulsora, e se acelera o trânsito (SARNA, 1991).

Sobre a diarreia induzida pelo óleo de rícino, OEMV aumentou a quantidade da massa e a frequência de evacuações na primeira hora. O OP apresentou efeito semelhante em relação a frequência de evacuações, porém com uma dose bem maior; quanto ao seu efeito sobre a quantidade de massa eliminada a dose de 1 mg/kg não causou nenhuma alteração. A capacidade do OEMV, e consequentemente OP, em aumentar a quantidade de massa e a frequência de evacuações na primeira hora após a administração do OR parece ser contraditório aos efeitos depressivos do OEMV sobre a motilidade intestinal. Uma análise mais criteriosa entretanto mostra que os efeitos *in vivo* e *in vitro* são consistentes, uma vez que uma diminuição do tônus basal sem uma diminuição dos movimentos rítmicos espontâneos deve diminuir a resistência luminal ao fluxo do quimo ou bolo fecal com um direcionamento propulsivo inalterado, e portanto, com uma propulsão aumentada. Enquanto o peso médio das fezes durante a primeira hora foi significativamente diferente do controle com 10 mg/kg de peso corporal, não o

foi com 200 mg/kg de peso corporal de OEMV. Isto é também consistente com os efeitos mostrados *in vitro*, desde que uma baixa concentração do OEMV deprime predominantemente o tônus basal enquanto doses mais altas deprimem também a motilidade rítmica. Analisando a frequência de evacuações pode ser visto que, a partir da terceira hora (quando a frequência de evacuações foi maior que o controle), a frequência de evacuações com 200 mg/kg de peso corporal estava consistentemente diminuída quando comparada ao controle. Isto sugere que estas maiores doses de OEMV, mais provavelmente deprimem amplamente o tônus basal bem como os movimentos rítmicos, tendo assim um efeito consistente na inibição da diarreia. Esses dados confirmam o que já está registrado na literatura (BEST & TAYLOR, 1990): substâncias antiespasmódicas ou miorelaxantes em efeito moderado podem apresentar efeito pró diarreico desde que promovam uma diminuição da resistência ao fluxo luminal relativamente maior do que a diminuição da movimentação propulsiva.

O padrão de atuação do OEMV e OP sobre o trânsito intestinal, um antiespasmódico com capacidade de acelerar o trânsito intestinal, poderá revelar-se, com estudos posteriores, de relevância terapêutica especial. Sabe-se hoje que muitas diarreias têm um componente motor predominante e, portanto, os antiespasmódicos podem ser úteis no seu tratamento. Por outro lado, os agentes antiespasmódicos e depressores da motilidade intestinal que retardam o trânsito intestinal podem favorecer a instação de infecções intestinais (SARNA, 1991). A *Mentha x villosa* é usada pelo povo, mas com validação científica, para tratar diarreias sanguinolentas e amebíase e giardíase. Assim, é possível que o OEMV associe propriedades de agente antimicrobiano com as de antiespasmódico sem a desvantagem de retardar o trânsito intestinal. Essa hipótese, contudo, necessita de estudos adicionais, inclusive em humanos, para sua confirmação.

### 4.3 EFEITO ANALGÉSICO

Desde que a *Mentha x villosa* é utilizada em casos de cólicas intestinais decidimos estudar uma possível atividade analgésica do OEMV e OP. No teste em que foi avaliado a participação central na atividade analgésica através do estímulo nociceptivo térmico (placa quente) OEMV e OP não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao controle. No teste de contorções abdominais, um teste cujo estímulo nociceptivo é consequência de uma inflamação aguda na área peritoneal (NORTHOVER, 1963; GYRES & KNOLL, 1975) OEMV e OP mostraram-se eficazes em reduzir o número de contorções, o que sugere uma atividade analgésica de natureza antiinflamatória. O estímulo doloroso induzido pela formalina é caracterizada por uma resposta comportamental bifásica. A primeira fase, caracterizada como uma dor neurogênica, representa provavelmente um efeito irritante direto da formalina sobre as fibras C sensoriais, enquanto a segunda fase, decorrente do desenvolvimento de um processo inflamatório, envolve o recrutamento de células inflamatórias pelos neurônios primários adjacentes (HUNSKAAR et al., 1985; McCARSON & GOLDSTEIN, 1990). Neste teste OEMV e OP apresentaram uma acentuada atividade analgésica na segunda fase sem interferência sobre a primeira fase, confirmando assim que a atividade analgésica do OEMV e OP é consequência de um efeito antiinflamatório. Em roedores o OEMV e o OP apresentam atividade depressora do sistema nervoso central (SNC) e analgésica provavelmente envolvendo mecanismos centrais (PÉREZ RAYA et al., 1990; LIMA, 1994). O OP mostrou significativa atividade analgésica nas contorções induzidas por ácido acético e nos métodos de retirada da cauda e imersão da

cauda. Nos testes de imersão da cauda o efeito analgésico do OP foi bloqueado pelo pré-tratamento com a naloxona, indicando que o mecanismo de ação pode envolver um mecanismo opióide (ALMEIDA et al., 1996). Uma análise do trabalho de PÉREZ RAYA e colaboradores (1990) mostra que, a amostra com a qual trabalhou, o principal constituinte era o piperitol (57,6%) e não o OP (10,4% do peso do óleo. As nossas conclusões tornaram-se diferentes das de PÉREZ RAYA et al. (1996) e ALMEIDA et al. (1996), porque além das constituições químicas dos OEMVs serem diferentes, foram utilizadas técnicas diferentes.

#### 4.4 EFEITOS SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os resultados do OEMV e OP sobre o sistema cardiovascular mostram que estas substâncias causam uma diminuição da PAM em ratos anestesiados. Esta queda da PAM, provavelmente é parcialmente consequência de seus efeitos relaxantes sobre o músculo liso dos vasos circulatórios, incluindo os de resistência, pois, em anéis de aorta e em leito mesentérico de ratos, contraída com 60 mM de  $K^+$ , o OP reverteu esse efeito espasmódico de maneira dependente de concentração. Um outro dado que provavelmente contribui para a queda da PAM é a queda da frequência cardíaca que foi diminuída e assim talvez tenha promovido diminuição do débito cardíaco e se sabe que a PAM é determinada pela resistência e pelo débito cardíaco (BEST & TAYLOR, 1990). Permaneceram inalterados a frequência respiratória, pH, hematócrito e gasometria, sugerindo que o OEMV e o OP, nas doses utilizadas, não apresentou efeito depressor respiratório. Quando comparadas as  $T_{50}$  e  $T_{80}$  para o OEMV e o OP verificou-se não haver diferença estatística entre elas. Os valores de  $T_{50}$  e  $T_{80}$

foram pequenos, mas há que se considerar que a administração de OEMV e OP foi realizada em forma de “bolus”.

Um aspecto importante a ser considerado nos efeitos do OEMV e OP sobre a PAM é que, na promoção desses o OP foi mais potente do que OEMV, e essa relação é o inverso da observada para os efeitos gastrointestinais, onde a potência do OEMV foi maior. É bem verdade que nos experimentos *in vivo* cardiovasculares a via de administração foi endovenosa e nos experimentos gastrointestinais foi oral. Contudo, os experimentos em íleo *in vitro* também mostraram uma maior potência farmacológica para o OEMV. Assim, é possível que o OP seja mais potente na indução de efeitos cardiovasculares do que de efeitos gastrointestinais. Essa hipótese e, no caso da sua veracidade, as possíveis implicações terapêuticas, espera, para sua elucidação, por investigações adicionais.

#### 4.5 TOXICIDADE

Em relação ao estudo da toxicidade subaguda observamos que houve uma diminuição dos níveis de glicose somente com o OP (machos e fêmeas) 80 mg/kg. Em relação a todos os outros parâmetros bioquímicos e hematológicos o OEMV (55 e 110 mg/kg) e o OP (40 e 80 mg/kg) não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle. Foi observado também não haver mudança de comportamento entre animais tratados e o controle. Um aspecto interessante é que em relação ao ganho de peso, machos e fêmeas do grupo tratado com o OEMV, apresentaram um desenvolvimento ponderal superior aos outros grupos. Mais interessante ainda foi o fato de os machos

(OEMV 110 mg/kg e OP 80 mg/kg) terem apresentado um significativo ganho de peso quando comparado com as fêmeas desses grupos.

Órgãos acessórios sexuais de camundongos machos sexualmente maduros possuem receptores para os Fatores de Crescimento Insulina símile (ILGF) (LIU et al., 1992) e insulina, os quais ao serem ativados aumentam a capacidade esteroidogênica (BERNIER et al., 1986) e de seus efeitos antilipolíticos (ELSAIR et al., 1984). Assim, é possível que o OEMV e OP, nas doses utilizadas, estejam ativando receptores para ILGF.

#### 4.6 RELEVÂNCIA GERAL DO ESTUDO

A *Mentha x villosa* é amplamente usada no nordeste do Brasil, não somente na medicina popular mas, devido suas ações na amebíase e giardíase, na indústria fitoterapêutica. Poucos estudos sobre as ações farmacológicas dos extratos desta planta são disponíveis na literatura. O presente estudo contribui para demonstrar que o OEMV e OP são eficazes sobre o músculo liso intestinal, com efeitos coerentes com o uso popular da planta. Isto, junto com a documentação da potência farmacológica (suficientemente alta para apresentar atividade intestinal mesmo quando ingerido em pequenas concentrações) do OEMV, sugere a participação deste óleo como princípio ativo. Estudos adicionais, contudo, serão necessários para melhor caracterizar as ações farmacológicas da *Mentha x villosa* e a participação do OEMV nos efeitos da *Mentha x villosa*.

## 5 - CONCLUSÕES

OEMV promove efeitos miorelaxantes em todas as preparações gastrointestinais estudadas. A potência farmacológica na produção desse efeito variou muito entre preparações.

OEMV e OP exerceram efeitos relaxantes que independem de bloqueio da transmissão do impulso nervoso, de receptores nicotínicos ou muscarínicos, de alteração do  $E_m$  e de influxo de  $Ca^{2+}$  para o meio intracelular, embora não possa ser excluído possíveis efeitos sobre canais de cálcio dependentes de voltagem.

As contrações induzidas por agentes contráteis ACh, HA e 60 mM de  $K^+$  foram bloqueadas pelo OEMV e OP em músculo liso intestinal, com  $CI_{50}$  similares, sugerindo que esse bloqueio é independente em termos de receptores para neurotransmissores e autacóides.

OEMV e OP reduziram a PAM de ratos anestesiados com uretana. Em tecidos vasculares isolados promoveram efeitos miorelaxantes e, no coração efeito cronotrópico negativo, efeitos esses aos quais foi atribuída a redução da PAM.

Os estudos utilizando como modelo a diarreia induzida pelo OR e a medida do trânsito através de marcador, mostram que esses fármacos podem acelerar o trânsito ou a diarreia, sugerindo que eles são agentes antiespasmódicos com características especiais.

O OEMV e OP apresentaram atividade analgésica restrita apenas a testes que sugerem que essa atividade antinociceptiva é indireta, via efeito antiinflamatório.

E, finalmente, os estudos de toxicidade subaguda mostraram que OEMV e OP possuem toxicidade baixa, vez que neste estudo não foram observadas alterações dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, sugestivos de toxicidade.

## SUMMARY

The essential oil of *Mentha x villosa* (OEMV) induced relaxation of the basal tonus of the pyloric sphincter, circular and longitudinal muscle of the stomach and ileum. Piperitonone oxide (OP), the principal constituent of OEMV relaxed the longitudinal muscle of the ileum. In general, OEMV also blocked the spontaneous movement of these preparations with a lesser potency than on basal tonus. The relaxation induced by OEMV and OP on the ileum was not altered by TTX, atropine or hexamethonium. Contractions induced by acetylcholine, histamine and 60 mM K<sup>+</sup> were blocked by OEMV and OP. These substances increased the frequency and the mass of evacuations of diarrhea induced by castor oil in the first hour after administration. Contractions induced by K<sub>60</sub> and tetraethylammonium in ileum and K<sub>60</sub> and phorbol dibutyrate in guinea-pig aorta were also blocked. OEMV and OP only slightly hyperpolarized the transmembrane potential (Em) in 5 and 60 mM K<sup>+</sup>, an action unlikely to be functionally important. OEMV and OP blocked the components of the response to acetylcholine that were insensitive to nifedipine or to calcium-free solution. OEMV and OP decreased mean arterial pressure without alteration of pH, haematocrit or gasometry. OEMV and OP induced analgesia. OEMV and OP showed low toxicity in a study of sub-acute toxicity. In conclusion, OEMV and OP demonstrated pharmacological activity whose potency varied between preparations and which was consistent with the use of *Mentha x villosa* in popular medicine.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B., LUDWICK, R. J., MELZACK, R. Apparent lack of tolerance in the formalin test suggests different mechanisms for morphine analgesia in different types of pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 15, p. 631-640, 1981.
- ABBOTT, F. V., MELZACK, R., SAMUEL, C. Morphine analgesia in tail-flick and formalin pain tests is mediated by different neural systems. **Exp. Neurol.**, v. 75, p. 644-651, 1982.
- ADELSTEIN, R. S., CONTI, M. A., HATHAWAY, D. R. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 8347-8350, 1978.
- AKUBUE, P. I. The effect of tetrodotoxin on the 5-hydroxytryptamine-induced response of the guinea-pig isolated gastrointestinal preparations. **West. Afr. J. Pharmacol. Drug. Res.**, v. 4, n. 1, p. 25-31, 1977.
- 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. Pharmacol.**, v. 49, p. 41-49, 1995.
- ALENCASTRO, F. M. M. R., SCATONE, Z., PRISCO, J. T., LABORIAU, L. F.G. Óleos essenciais. **Assoc. Bras. Pesq. Plantas Arom.**, p. 354, 1965.

- ALMEIDA, R. N., HIRUMA, C. A., BARBOSA-FILHO, J. M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 334-338, 1996.
- ALREJA, M., MUTALIK, P., NAYAR, U., MANCHANDA, S. K. The formalin test: a tonic pain model in the primate. **Pain**, v. 20, p. 97-105, 1984.
- ALVAREREZ-LEEFMANS, F. J., RUSSEL, J. M. Chloride channels and carriers in nerve, muscle and glial cells. **Kidney Int.**, v. 40, suppl. 33, 1991.
- AMBER, I. J., HIBBS, J. B., PARKER, C. J., JOHNSON, B. B., TAINTOR, R. R., VAVRIN, Z. Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and L-arginine dependent effector mechanism. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, p. 610-620, 1991.
- ARMSTRONG, C. M., BEZANILA, F., HOROWICZ, P. Twitches in the presence of ethylene glycol-bis ( $\beta$ )-N,N'-tetraacetic acid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 267, p. 605-608, 1972.
- AUSINA, P., SAVINEAU, J. P., PINTO, F. M., MARTIN, J. D., CANDENAS, L.  $Ca^{2+}$ -independent contraction induced by hyperosmolar  $K^{+}$ -rich solutions in rat uterus. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 312, p. 309-318, 1996.
- BACCARI, M. C., CALAMAI, F., STADERINI, G. Modulation of cholinergic transmission by nitric oxide, VIP and ATP in the gastric muscle. **Neuroreport**, v. 5, n. 8, p. 905-908, 1994.

- BAILEY, D. M. Inhibitory and excitatory effects of sympathomimetic amines on muscle strips from the stomach of the guinea-pig. **Br. J. Pharmac.**, v. 41, p. 227-238, 1971.
- BARTHÓ, L., LEFEBVRE, R. A. Nitric oxide causes contraction in the rat isolated small intestine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 259, n. 1, p. 101-104, 1994.
- BARTHÓ, L., LEFEBVRE, R. A. Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 329, n. 1, p. 53-66, 1995.
- BAUER, V., REKALOV, V. V., JURÁNEK, I., et al. Effect of illuminated nifedipine, a potent antioxidant, on intestinal and vascular smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, v. 115, p. 871-874, 1995.
- BEDI, B. S., KELLY, K. A., HOLLEY, K. E. Pathways of propagation of the canine gastric pacesetter potential. **Gastroenterology**, v. 63, p. 288-296, 1972.
- BERNIER, M., CHATELAIN, P., MATHER, J. P., SAEZ, J. M. Effects of insulin and somatomedin C on the function of cultured Leydig cells. **C. R. Acad. Sci. III**, v. 303, n. 4, p. 119-122, 1986.
- BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate, and calcium signalling. **Nature**, v. 361, p. 315-325, 1993.

- BESSION, J. M., CHAOUCH, A. Perpheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, n. 67, p. 67-186, 1987.
- BEST, C., TAYLOR, N. **Physiological basis of medical practice**. 12. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990.
- BEUBLER, E., SCHIRGI-DEGEN, A. Stimulation of enterocyte protein kinase C by laxatives in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 1, p. 59-62, 1993.
- BEZERRA, M. A. C. *Alpinia speciosa* Schum: Estudo das frações fixas e do óleo essencial. Fortaleza, 1994. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1994.
- BIANCANI, P., ZABINSKI, M. P., KERSTEIN, M. D., BEHAR, J. Mechanical characteristics of the gat pylorus. **Gastroenterology**, v. 78, n. 2, p. 301-309, 1980.
- BISCOE, T. J. Carotide body: structure and function. **Physiol. Rev.**, n. 51, p. 437-495, 1971.
- BLOMQUIST, E. I., KREAM, R. M. Leukotriene D<sub>4</sub> acts in part to contract guinea pig ileum smooth muscle by releasing substance P. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 240, p. 523-528, 1987.

- BLUMBERG, H., WOLF, P. S., DAYTON, H. B. Use of writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 118, p. 763-766, 1965.
- BOECKXSTAENS, G. E., PELCKMANS, P. A., RUYTJENS, I. F., BULT, H., DE-MAN, J. G., HERMAN, A. G., VAN-MAERCKE, Y. M. Biossay of nitric oxide released upon stimulation of non-adrenergic non-cholinergic nerves in the canine ileocolonic junction. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103, n. 1, p. 1085-1091, 1991.
- BOLTON, T. B. Cholinergic mechanisms in smooth muscle. **Br. Med. Bull.**, v. 35, n. 3, p. 275-283, 1979a.
- \_\_\_\_\_. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol. Rev.**, v. 59, p. 606-718, 1979b.
- \_\_\_\_\_. Electrophysiology of the intestinal musculature. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D. et al. (Eds). **Handbook of physiology**. Baltimore : American Physiological Society, 1989. cap. 6, p. 217-250.
- BOLTON, T. B., TOMITA, T., VASSORT, G. Voltage clamp and the measurement of ionic conductances in smooth muscle. In: BÜLBRING, E., BRADING, A. F., JONES, A. W., TOMITA, T. **Smooth muscle: an assessment of current knowledge**. London: Arnold, 1981. p. 47-63.
- BONICA, J. Advances in neurology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PAIN, 4., 1974.

- BORBA, M. O. P., MELO, J. F. A. Uso da *Mentha crispera* no tratamento de helmintos e protozoários intestinais. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 24., 1988, Manaus.
- BORBA, M. O. P., KOBAYASHI, S., ACA, I. S., DERINO, E., MEDEIROS, F. P. Frações ativas da *Mentha crispera* sobre cultura de *Entamoeba histolytica* cepa SAW 1627. Parte II. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11., 1990a, João Pessoa.
- BORBA, M. O. P., SILVA, J. S., MONTENEGRO, L., JUGMANN, P., CAVALCANTE, M. M., ALBUQUERQUE, P. M. S. Frações ativas da *Mentha crispera* sobre camundongos albinos infectados com *Schistosoma mansoni* cepa São Lourenço da Mata. Parte I. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11., 1990b, João Pessoa.
- BORBA, M. O. P., BARBOSA-FILHO, J. M., PADOVAN, I. O. Ultra structural study of the active fractions of *Mentha aff. crispera* against the *Schistosoma mansoni* "in vivo". In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SCHISTOSSOMÍASIS - NATIONAL MEETING ON SCISTOSSOMÍASIS, 1991, Rio de Janeiro.
- BORTOF, A. Electrical transmissiom of slow waves from longitudinal to circular intestinal muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 209, p. 1254-1260, 1965.

- BORTOF, A., DAVIS, R. S. Myogenic transmission of antral slow waves across the gastroduodenal junction in situ. **Am. J. Physiol.**, v. 215, p. 889-897, 1968.
- BOSE, S. M., BHIMA RHAO, C. N., SUBRAHMANYAN, V. Relationship between the chemical constitution of the constituents of certain essential oils and their bactericidal properties. **J. Sci. Ind. Res.**, v. 8, n. 9, p. 160-162, 1949.
- BOURREAU, J. P., ABELA, A. P., KWAN, C. Y., DANIEL, E. E. Refilling of ACh-sensitive internal  $Ca^{++}$ -store directly involves a dihydropyridine sensitive Ca channel in dog trachea. **Cell.Physiol.**, v. 30, p. C497- C505, 1991.
- BOYLE, S. J., TANG, K. W., WOODRUFF, G. N., MCKNIGHT. A. T. Characterization of CCK receptors in a novel smooth muscle preparation from the guinea-pig stomach by use of the selective antagonists CI 988, L 365 and devazepide. **Br. J. Pharmacol.**, v. 109, n. 4, p. 913-917, 1993.
- BRITO, N. R. S. **Quimiosistemática da família Labiatae**. Rio de Janeiro, 1983. Dissertação (Mestrado em Química) - Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1983.
- BRUNETON, J. **Pharmacology, phytochemistry, medicinal plants**. Paris: Lavoisier, 1995.

- BRUNTON, L. L. Agents affecting gastrointestinal water flux and motility; emesis and antiemetics; bile acids and pancreatic enzymes. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, L.E. **GOODMAN & GILMAN'S The pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. U.S.A: McGraw-Hill, 1996. c. 38, p. 924.
- BUCHHEIT, K. H., BUHL, T. Stimulant effects of 5-hydroxytryptamine on guinea pig stomach preparations in vitro. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 262, n. 1/2, p. 91-97, 1994.
- BUCKINGHAM, J. **Dictionary of natural products**. London: Chapman and Hall, 1994. v. 2, p. 2169.
- BÜLBRING, E., TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacol. Rev.**, v. 39, n.1, p. 49-96, 1987.
- BURDYGA, T. H., MAGURA, I. S. Effects of caffeine on the electrical and mechanical activity of guinea-pig ureter smooth muscle. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 5, p. 581-591, 1986.
- BURDYGA, T. H., TAGGART, M. J., WRAY, S. Major difference between rat and guinea-pig ureter in the ability of agonists and caffeine to release  $Ca^{2+}$  and influence force. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 489, n. 2, p. 327-335, 1995.
- CARLINI, E. L. A. **Farmacologia prática sem aparelhagem**. São Paulo: Sarvier, 1973. p. 192.

- CARVALHO, A. P., COSTA, A. F. **Circulação e respiração: fundamentos de biofísica e fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Cultura médica, 1979.
- CHEN, T. H., LEE, B., YANG, C., HSU, W. H. Effects of caffeine on intracellular calcium release and calcium influx in a clonal  $\beta$ - Cell line RINm5F. **Life Sci.**, v. 58, p. 983- 990, 1996.
- CHIANG, C. Y., CHANG, C. T., CHU, H. L., YANG, L. F. Peripheral afferent pathway for acupuncture analgesia. **Sci. Sin.**, v. 16, p. 210-217, 1973.
- CHIU, A. T., BOZARTH, J. M., FORSYTHE, M. S., TIMMERMANS, P. B. M. W. M.  $Ca^{2+}$  utilization in the constriction of rat aorta to stimulation of protein kinase C by phorbol dibutyrate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.242, n. 30, p. 934-939, 1987.
- CHRISTENSEN, J. The controls of gastrointestinal movements: some old and new views. **N. Engl. J. Med.**, v. 285, p. 85-98, 1971.
- CHVASTA, T. E., COOKE, A. R. Secretin-gastric emptying after vagotomy and motor activity: natural versus synthetic secretion. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 142, p. 137-142, 1973.
- CODERRE, T. J., MELZACK, R. The contribution of excitatory aminoacids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 3665-3670, 1992.

COELHO-DE-SOUZA, A. N. **Estudos dos efeitos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, sobre parâmetros contráteis de músculo liso.** Fortaleza, 1997. 213 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1997.

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, p. 299-304, 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, p. 189-194, 1998.

COHEN, P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. **Trends Biochem. Sci.**, v. 171, p. 408-413, 1992.

COLLIER, H. O. J., DINNEEN, L. C., JOHNSON, C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COLLIER, H. O. J., LEE, I. R. Algesic actions of bradykinin. **Br. J. Pharmacol.**, v. 21, p. 151-158, 1963.

- COOKE, A. R., CHVASTA, T. E., WEISBRODT, N. W. Effect of pentagastrin on emptying and electrical and motor activity of the dog stomach. **Am. J. Physiol.**, v. 223, p. 934-938, 1972.
- CORRÊA, C. R., CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.
- COSTA, M., FURNESS, J. B. Somatostatin is present in a subpopulation of noradrenergic nerve fibres supplying the intestine. **Neuroscience**, v. 13, p. 911-919, 1984.
- COVELL, J. W. Neurohumoral control of the circulation. In: BEST and TAYLOR. **Physiological basis of medical practice**. 12. Ed., 1990. c. 16, p. 276-290.
- 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., RODRIGUES, A. S., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W., MACHADO, M. I. L. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de *Croton*. **Cienc. Cult.**, v. 30, supl., p. 326-327, 1976.
- \_\_\_\_\_. Volatile constituents of brazilian euphorbiaceae. Genus *Croton*. **J. Nat. Prod.**, v. 44, n. 5, p. 602-608, 1981.

- CREESE, B. R. Calcium ions, drug actions and airways obstruction. **Pharmac. Ther.**, v. 20, p. 357-375, 1983.
- CUNHA, F. Q., POOLE, S., LORENZETTI, B. B., FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor  $\alpha$  in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660-664, 1992.
- 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.
- DAVISON, J. S. The enteric nervous system. In: GREGER, R., WINDHORST, U. (Eds.). **Comprehensive human physiology: from cellular mechanisms to integration**. New York: Springer, 1996. p. 1415-1423.
- DERAEDT, R., JOUQUEY, S., BENZONI, J., PETERFALVI, M. Inhibition of prostaglandin biosynthesis by non-narcotic analgesic drugs. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 224, p. 30-42, 1976.
- DERAEDT, R., JOUQUEY, S., DELEVALLÉE, F. FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 61, p. 17-24, 1980.
- DROOGMANS, G., MISSIAEN, I. Electromechanical and Pharmacomechanical in vascular smooth muscle. In: SPERELAKIS, N. (Ed.). **Physiology and physiopatology kluwer**. 1994. p. 867-879.

- DRUMMOND, A. H., HUGHES, P. J. The interaction of natural products with cellular signaling mechanisms. **Phytother. Res.**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 1987.
- DUARTE, I. D. G., NAKAMURA, M., FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Br. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 341-343, 1988.
- DUBUISSON, D., DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.
- EBERLE-WANG, K., BRAUN, B. T., SIMANSKY, K. J. Serotonin contracts the isolated rat pylorus via a 5-HT<sub>2</sub>-like receptor. **Am. J. Physiol.**, v. 266, v. 1, pt. 2, p. 284-291, 1994.
- ELORRIAGA, M., ANSELMINI, E., HERNANDEZ, J., D'OCÓN, P., IVORRA, D. The sources of Ca<sup>2+</sup> for muscarinic receptor-induced contraction in the rat ileum. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 48, p. 817-819, 1996.
- ELSAIR, J., TABET-AOUL, M., KHELFA, K., TABET-AOUL, F.S., IKHLEF, F., GHOUINI, A., DUFOUR, P., GOUGAM, S., MARQUIE, G., DAHMANI, Y. et al. Effects of insulin, somatomedin-a multiplication stimulating activity (MSA)--and transferrin, on the lipolysis of rat adipocytes in vitro. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil.**, v. 178, n. 1, p. 56-62, 1984.

- ENDO, M. Calcium release from sarcoplasmic reticulum. **Physiol. Rev.**, v. 57, n. 1, p. 71-106, 1977.
- ERNE, P., HERMSMEYER, K. Modulation of intracellular calcium by potassium channels openers in vascular muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 344, p. 706-715, 1991.
- EXTON, J. H., TAYLOR, S. J., AUGERT, G., BOCCCKINO, S. B. Cell signalling through phospholipid breakdown. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 104, p. 81-86, 1991.
- FANG, S., WU, R., CHRISTENSEN, J. Intramucosal nerve cells in human small intestine. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 44, p. 129-136, 1993.
- FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B., POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.
- FERNANDEZ, A. I., CANTABRANA, B., HIDALGO, A. Effects of phorbol 12,13-dibutyrate and H-7 in extravascular smooth muscle contraction. **Pharmacol.** v. 47, p. 152-157, 1993.
- 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.**, v.11, n.8. p.552-557, 1997.

- FRANZ, M., MENSE, S. Muscle receptors with group IV afferent fibres responding to application of bradykinin. **Brain Res.**, v. 92, p. 369-383, 1975.
- FREISE, F. W. Essential oils from Brazilian Euphorbiaceae. **Perfum. Essent. Oil Rec.**, v. 26, p. 219-220, 1935.
- FITZPATRICK, F. A., MURPHY, R. C. Cytochrome P-450 metabolism of arachidonic acid: formation and biological actions of "epoxygenase"-derived eicosanoids. **Pharmacol. Rev.**, v.40, p.229-241, 1989.
- FRIZZELL, R. A. Cystic fibrosis: a disease or ions channels? **TIPS**, v. 10, p. 190-193, 1987.
- FRIZZELL, R. A., HALM, D. R. Chloride channels in epithelial cells. In: BRONNER, F., HELMAN, S. I., VAN DRIESSCHE, W. **Channels and noise in epithelial tissues**. New York: Academic Press, 1990. v. 37, c. 8, p. 215-242.
- GABELLA, G. Innervation of the gastrointestinal tract. **Int. Rev. Cytol.**, v. 59, p. 129-193, 1979.
- GANITKEVICH, V. Y., ISEMBERG, G.  $\text{Ca}^{2+}$  entry through  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange can trigger  $\text{Ca}^{2+}$  release from  $\text{Ca}^{2+}$  stores in  $\text{Na}^+$ -loaded guinea-pig coronary myocytes. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 468, p. 225-243, 1993.

- GIEMBYEZ, M. A., RODGER, I. W. Electrophysiological and other aspects of excitation-contraction coupling and uncoupling in mammalian airway smooth muscle. **Life Sci.**, v. 41, p. 111-132, 1987.
- GILMAN, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 56, p. 615-649, 1987.
- GONG, M. C., COHEN, P., KITAZAWA, T., IKEBE, M., MASUO, M., SOMLYO, A., SOMLYO, A. Myosin light chain phosphatase activities and the effects of phosphatase inhibitors in tonic and phasic smooth muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 25, p. 14662-14668, 1992.
- GONG, M. C., SOMLYO, A. V., SOMLYO, A. P. **Biophys. J.**, v. 66, p. A409, 1994.
- GOYAL, R. K., RATTAM, S., SAID S. I. VIP as possible neurotransmitter of non-cholinergic, non-adrenergic inhibitory neurones. **Nature**, v. 228, p. 378-380, 1980.
- GRAFE, P., MAYER, C. J., WOOD, D. J. Synaptic modulation of calcium-dependent potassium conductance in myenteric neurons in the guinea-pig. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 305, p. 235-248, 1980.
- GRIDER, J. R., MAKHLOUF, G. M. Contraction mediated by  $Ca^{++}$  release in circular and  $Ca^{++}$  influx in longitudinal intestinal muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, n. 2, p. 432-437, 1988.

- GUSEV, N., PRITCHARD, K., HODGKINSON, J., MARSTON, S. Filamin and gelsodin influence  $Ca^{2+}$ -sensitivity on smooth muscle thin filaments. **J. Muscle Res. Cell. Motil.**, v. 15, p. 672-681, 1994.
- GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. Philadelphia : W. B. Saunders, 1996. cap. 62, p. 793-799.
- GYRES, K., KNOLL, J. Inflammation and writhing syndrome inducing effect of  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  and the inhibition of these actions. **Pol. J. Pharmacol. Pharm.**, v. 27, p. 257-264, 1975.
- GYRES, K., TORMA, Z. The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. **Arch. Int. Pharnacodyn.**, v. 267, p. 131-140, 1984.
- HALL, J. M., MORTON, I. K. Mechanism of action of substance P in guinea-pig ileum longitudinal smooth muscle: a re-evaluation. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 431, p. 529-541, 1990.
- HARLEY, R. M. Mints. In: GREEN, P. S. **Plants wild and cultivated**. Botanic Gardens : Kew Royal, 1973. p. 126-128.
- HARLEY, R. M., REYNOLDS, T. Advances in labiate science. Royal Botanic Garden Kew, Richmond, Surrey, UK, 1992, p. 420.
- HARSHBARGER, T. R. **Introductory statistics: a decision map**. New York: The Macmillan, 1971.

- HEADING, R. C. Gastric motility. **Front. Gastrointest. Res.**, v. 6, p. 35-56, 1980.
- HENDERSHOT, L. C., FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and non-analgesics. **J. Pharmac. Exp. Ther.**, v. 125, p. 237-240, 1959.
- HEYMANS, C., NEIL, E. Reflexogenic areas of the cardiovascular System. London: Churchill, 1958 (*apud* BEST & TAILOR, 1170 p.).
- HILL, J. H. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. **Pharmacol. Rev.**, v. 42, n. 1, p. 45-83, 1990.
- HILLE, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1984.
- HILLS, J. M., AARONSON, P. I. The mechanism of action of peppermint oil on gastrointestinal smooth muscle. **Gastroenterology**, v. 101, p. 55-65, 1991.
- HIMPENS, B., MATTHIJS, G., SOMLYO A. P. Desensitization to cytoplasmic  $Ca^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  sensitivities of guinea-pig ileum and rabbit pulmonary artery smooth muscle. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 413, p. 489-503, 1989.

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

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.

HOYLE, C. H. V., BURNSTOCK, G. Neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D. et al. (Ed). **Handbook of physiology**. Baltimore : American Physiological Society, 1989. v. 13, p. 435-463.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S., BERGE, O. G., HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

ISHIZAWA, M., MIYAZAKI, E. Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha (PGF<sub>2</sub> alpha)-induced contraction and calcium movement in longitudinal muscle of guinea-pig isolated stomach. **Prostaglandins**, v. 16, n. 4, p. 591-597, 1978.

ITOH, T., SEKI, N., SUZUKI, S., ITO, S., KAJIKURI, J., KURIYAMA, H.  
Membrane hyperpolarization inhibits agonist-induced synthesis of inositol  
1,4,5-trisphosphate in rabbit mesenteric artery. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 451,  
p. 307-328, 1992.

ITOKAWA, H., AIYAMA, R., IKUTA, A. A pungent diarylheptanoid from  
*Alpinia oxyphylla*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 4, p. 769-771, 1981a.

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

ITOKAWA, H., MORITA, H., OSAWA, K., KOBAYASHI, T., KUBOTA,  
H., WATANABLE, K., IITAKA, Y. Structural relationships of  
sesquiterpenes obtained from *Alpinia japonica*. **Tennen Yuki Kogobutsu  
Toronkai Koen Yoshishu**, v. 27, p. 458-465, 1985.

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

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

- ITOKAWA, H., YOSHIMOTO, S., MORITA, H. Diterpenes from the rhizomes of *Alpinia formosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 435-438, 1988.
- ITOKAWA, H., WATANABLE, K., MIHASHI, S., ITAKA, Y. Isolation of agarofuran-type sesquiterpenes from *Alpinia japonica* (Thunb) Miq. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 2, p. 681-682, 1980.
- JACOBS, M. B. Les aromatisants; problèmes toxicologiques posés par leur emploi. **Aliment. et vie.**, v. 61, p. 121-160, 1973.
- \_\_\_\_\_. Root beer flavor components. **Amer. Perf. Essent. oil Rev.**, v. 51, p. 55 - 57, 1948.
- JENCRICK, H. Proceedings of N. I. H. In: **Acupuncture Research Conference**, v. 74, p. 65, 1973.
- JIANG, M. J., MORGAN, K. G. Intracellular calcium levels in phorbol ester-induced contractions of vascular muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 253, n. 22, p. H1365-H1371, 1987.
- JIANG, H., STEPHENS, N. L. Calcium and smooth muscle contraction. **Moll. Cell. Biochem.**, v. 135, p. 1-9, 1994.
- JOSHI, D. J. DIKSHIT, R. K., MANSURI, S. M. Gastrointestinal actions of garlic oil. **Phytother. Res.**, v. 1, n. 3, p. 140-141, 1987.

KAADA, B. Acupuncture analgesia. **T. Norske Laegeforen**, v. 94, p. 419-437, 1974.

\_\_\_\_\_. Effectiveness and time course of acupuncture analgesia. **Advances in pain research and therapy**. Nova York: Raven Press, 1976. v.1, p. 733-741.

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.

KANADA, A., HATA, F., SUTHAMNATPONG, N., MAEHARA, T., ISHII, T., TAKEUCHI, T., YAGASAKI, O. Key roles of nitric oxide and cyclic GMP in noradrenergic and noncholinergic inhibition in rat ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 216, n. 2, p. 287-292, 1992.

KARAKI, H., WEISS, G. B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci.**, v. 42, p. 11-122, 1988.

KATSOULIS, S., CONLON, J. M. Neurotensin and prostaglandin interactions in smooth muscle of the guinea pig stomach. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 158, n. 3, p. 251-256, 1988.

KEITH, E. F. Evaluation of analgesic substances. **Am. J. Pharm.**, v. 132, p. 202-230, 1960.

KELLOW, J. E. Gastrointestinal motility and defecation. In: GREGER, R., WINDHORST, U. (Eds.). **Comprehensive human physiology: from**

cellular mechanisms to integration. New York: Springer, 1996. p. 1289-1308.

KITAZAWA, T., GAYLINN, B. D., DENNEY, G. H., SOMLYO, A. P. G-protein-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1708-1715, 1991.

KITAZAWA, T., MASUO, M., SOMLYO, A. G-Protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, n. 20, p. 9307-9310, 1991.

KITAZAWA, T., SOMLYO, A. P. Desensitization and muscarinic re-sensitization of force and myosin light chain phosphorylation to cytoplasmic  $\text{Ca}^{++}$  in smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 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. Qinghaosu (artemisinin) an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049-1055, 1985.

KLEMM, M. F. Neuromuscular junctions made by nerve fibres supplying the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 55, p. 155-164, 1995.

KNOT, H., BRAYDEN, J., NELSON, M. Calcium channels and potassium channels, In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. New York : Academic Press, 1996. c. 16, p. 203-219.

KOBAYASHI, S., KITAZAWA, T., SOMLYO, A. V., SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 30, p. 17997-18004, 1989.

KOSTER, R., ANDERSON, M., DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412, 1959.

KOSTERLITZ, H. W., LESS, G. M. Pharmacological analysis of intrinsic intestinal reflexis. **Pharmacol. Rev.**, v. 16, p. 301-339, 1964.

KUEMERLE, A., MAKHLOUF, G. M. Activation of  $\text{Cl}^-$  channels by contractile agonists depolarizes longitudinal muscle and triggers  $\text{Ca}^{2+}$  influx via voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **Gastroenterology**, v. 106, p. A525, 1994.

KUEMERLE, A., MARTIN, D. C., MURTHY, K. S., KELLUM, J. M., GRIDER, J. R., MAKHLOUF, G. M. Coexistence of contractile and relaxant 5-hydroxytryptamine receptors coupled to distinct signaling pathways in intestinal muscle cells: convergence of the pathways on  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization. **Mol. Pharmacol.**, v. 42, n. 6, p. 1090-1096, 1992.

- LAMBERT, D. Signal transduction: G proteins and second messengers. **Br. J. Anaesth.**, v. 71, p. 86-95, 1993.
- LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Record, 1993.
- LAWRENCE, B. M. Chemical components of labiatae oils and their exploitation. In: HARLEY, R. M., REYNOLDS, T. *Advances in Labaiatae Science*, p. 399-436, Royal Botanic Gardens, Kew, 1992.
- LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO-DE-SOUZA, A. N., FIGUEIREDO, I. B., MILFONT, J. M. B., SOUZA, I. T. Benzyl-eugenol antagonizes the contracture induced by eugenol on skeletal muscle. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 28/29, n. 1/2, p. 35-39, 1988.
- LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO-DE-SOUZA, A. N., SOUZA, I. T., FIGUEIREDO, I. M. B. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 327, n. 1, p. 113-124, 1994.
- LE BOURHIS, B. Identification de quelques metabolites du trans-anéthole chez l'Homme, le Lapin et le Rat. **Ann. Pharm. Franç.**, v. 28, p. 355 - 361, 1970.
- \_\_\_\_\_. Recherches preliminaires sur le metabolisme du trans-anethole. **Ann. Biol. Clin.**, v. 26, p. 711-715, 1968.

- LE BOURHIS, B., SOENEN, A. M. Recherches sur l'action psychotrope de quelques substâncias aromatiques utilisés en alimentation. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 11, p. 1-9, 1973.
- LEFEBVRE, R. A., BAERT, E., BARBIER, A. J. Influence of NG-nitro-L-arginine on non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the guinea-pig gastric fundus. **Br. J. Pharmacol.**, v. 106. n. 1, p. 173-179, 1992.
- LE MOAN, G. Les aromatisants; problèmes toxicologiques posés par leur emploi. **Aliment. et vie**, v. 61, p. 121 - 160, 1973.
- LEVINE, J. D., LAM, D., TAIWO, Y. O. et al. Hyperalgesic properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 38, p. 5331-5334, 1986.
- LIEBESKIND, J. Pain modulation by central nervous system stimulation. **Advances in pain research and therapy**. Nova York: Raven Press, 1976. v. 1, p. 445-547.
- LIMA, C. A. H.; ALMEIDA, R. N., BARBOSA-FILHO, J. M., THOMAS, G. Efeitos farmacológicos do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson sobre o SNC. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 9, 1994, Caxambu.

- LITTEN, R. Z., SUBA, E. A., ROTH, B. L. Effects of a phorbol ester on rat aortic contraction and calcium influx in the presence and absence of BAY k 8644. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 144, p. 185-191, 1987.
- LIU, L., COUPAR, I. M. Characterisation of pre- and post-synaptic  $\alpha$ -adrenoceptors in modulation of the rat ileum longitudinal and circular muscles activities. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 356, p. 248-256, 1997.
- LIU, A., DAVIS, R. J., FLORES, C., MENON, M., SEETHALAKSHMI, L. Epidermal growth factor: receptor binding and effects on the sex accessory organs of sexually mature male mice. **J. Urol.**, v. 148, n. 2, pt 1, p. 427-431, 1992.
- LSCHER, T. F., RICHARD, V., TSCHUDI, M., YANG, Z. Serotonin and the endothelium. **Clin. Physiol. Biochem.**, v. 8, suppl. 3, p. 108-119, 1990.
- LUNDRÉN, O., SVANVIK, J., JIVEGÅRD, L. Enteric nervous system, physiology and pathophysiology of the intestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v. 34, n. 2, p. 264-283, 1989.
- 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 *Rengalinia*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 5, p. 907-908, 1984.
- MACARA, B., GIÃO-T. RICO, J. M. Effect of  $Ca^{2+}$  modulators on acetylcholine-induced phasic and tonic contractions and A23187-induced

contractions in ileal longitudinal muscle and IP<sub>3</sub> production. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 218, p. 27-33, 1992.

MAGALHÃES, P. J. C. **Ações do óleo essencial do marmeleiro sabiá (*Croton nepetaefolius*) na musculatura intestinal de cobaio.** Fortaleza, 1997. 60 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1997.

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

MAKHLOUF, G. M., MURTHY, K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. **Cell. Signal.**, v. 9, n. 3, p. 269-276, 1997.

MANAKA, Y. **The layman's guide to acupuncture.** New York: Westherhill, 1972. p. 21.,

MANN, F. Personal communication, 1977.

MANN, S. A preliminary clinical study of smoking treated by stitch - auriculo acupuncture. In: THIRD WOLRD SYMPOSIUM ON ACUPUNCTURE AND CHINESE MEDICINE, 1975, New York.

MANN, S., BARAGAR, P. Local skin sensory changes after acupuncture. **C. M. A. Jour.**, v. 109, 1973.

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.

MATHIAS, J. R., MARTIN, J. L., BURNS, T. W., CARLSON, G. M., SHIELDS, R. P. Ricinoleic acid effect on the electrical activity of the small intestine in rabbits. **J. Clin. Invest.**, v. 61, n. 3, p. 640-644, 1978.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. Fortaleza : Edições UFC, 1991.

\_\_\_\_\_. **Farmácias vivas**. 2.ed. Fortaleza : Edições UFC, 1994.

MATOS, F. J. A.; FERNANDES, A. **Relatórios de excursões do Programa Estudo Químico de Óleos Essenciais de Plantas Nativas e Cultivadas no Nordeste 1975-1978**. Fortaleza: BNB/CNPq/UFC, 1978. (mimeógrafado)

MAYER, D., PRICE, D., BARBER, J., RAFIL, A. Acupuncture analgesia. Evidence for activation of a pain inhibitory system as a mechanism of action. **Adv. Pain Res. Ther.**, v. 1, p. 751-754. 1976.

- McCARSON, K. E., GOLDSTEIN, B. D. Time course of the alteration in dorsal horn substance P levels following formalin: blockade by naloxone. **Pain**, v. 41, p. 95-100, 1990.
- 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. **Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum.** Fortaleza, 1989. 152 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 1989.
- MENDONÇA, V. L. M., OLIVEIRA, C. L. A., CRAVEIRO, A. A., RAO, V. S., FONTELES, M. C. Pharmacological and toxicological evaluation of *Alpinia speciosa*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 93-97, 1991.
- MILENOV, K., NIKOLOV, R., RAKOVSKA, A. Effect of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) on the mechanical activity of isolated longitudinal and circular muscle strips of quinea-pig stomach. **Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 369-374, 1983.
- MILENOV, K., RAKOVSKA, A. The role of prostaglandins in the spontaneous and cholinergic nerve-mediated motility of guinea-pig gastric muscle. **Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n. 2, p. 121-126, 1983.

- MIOLAN, J. P., NEIL, J. P. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 58, p. 125-138, 1996.
- MISHIMA, K., KURIYAMA, H. Effects of prostaglandins on electrical and mechanical activities of the guinea pig stomach. **Jpn. J. Physiol.**, v. 26, n. 5, p. 537-548, 1976.
- MISSIAEN, I., DE SMEDT, H., DROOGMANS, G., CASTEELS, R.  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by inositol 1,4,5- triphosphate is a steady-state phenomenon controlled by luminal  $\text{Ca}^{2+}$  in permeabilized cells. **Nature**, v. 357, p. 599-602, 1992.
- MONCADA, S., FERREIRA, S. H., VANE, J. R. Pain and inflammation mediators. In: VANE, J. R., FERREIRA, S. H. **Inflammation**. Berlin : Springer Verlag Heidelberg, 1978. p. 588-616.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 1709-1715, 1989.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.
- MONOS, E., BÉRCI, V., NÁDASY, G. Local control of veins: biomechanical, metabolic, and humoral aspects. **Physiol. Rev.**, v. 75, n. 3, p. 611-666, 1995.

- MOORE, P. K., OLUYOMI, A. O., BABBEDGE, R. C., WALLACE, P., HART, S. L. L-N<sup>g</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 198-202, 1991.
- MORGAN, J. P, MORGAN, K. G. Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. **J. Physiol. (Lond)**, v. 351, p. 155-167, 1984.
- MOSS, R., HOFMANN, P. Cellular and molecular basis of muscle contraction. In: **Fundamentals of medical cell biology**. JAI Press, 1992. v. 5B, p. 185-273.
- MURTHY, K. S., GRIDER, J. R., MAKHLOUF, G. M. Receptor-coupled G proteins mediate contraction and Ca<sup>2+</sup> mobilization in isolated intestinal muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 260, p. 90-97, 1992.
- MURTHY, K. S., KUEMMERLE, J. F., MAKHLOUF, G. M. Agonist-mediated activation of PLA2 initiates Ca<sup>2+</sup> mobilization in intestinal longitudinal smooth muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 269, n.1, pt. 1, p. G93-102, 1995.
- NAKATANI, Y., YAMASHITA, K. Ryodoraku acupuncture. **Ryodoraku research institute**. Tokio: Seiwa, 1977a. p. 90, 170.

- NARAHASHI, T. J., MOORE, J. W., SCOTT, W. R. Tetrodotoxin blockage of sodium conductance increase in lobster giant axons. **J. Gen. Physiol.**, v. 47, p. 965-974, 1964.
- NIEBER, K., MILENOV, K., BERGMANN, J., OEHME, P. Contractile response of longitudinal and circular smooth muscles of guinea pig stomach and ileum to substance P. **Acta. Biol. Med. Ger.**, v. 40. n. 2, p. 209-216, 1981.
- NIITA, H., ISHIZAWA, M. Endogenous prostaglandins and spontaneous contractions in the circular muscle of the guinea-pig stomach. **Jpn. J. Physiol.**, v. 30, n. 6, p. 815-826, 1980.
- 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. 682-700, 1994.
- 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. **Biochemistry**, v. 314, p. 11915-11920, 1992.
- NORTHOVER, B. J. The permeability to plasma proteins of the peritoneal blood vessels of the mouse and the effect of substances that alter permeability. **J. Path. Bact.**, v. 85, p. 361-370, 1963.

NORTHOVER, B. J. The action of anti-inflammatory compounds in mice with peritonitis. **J. Path. Bact.**, v. 87, p. 395-404, 1964.

OATES, J. A. Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, L.E. **GOODMAN & GILMAN'S The pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. U.S.A: McGraw-Hill, 1996. c. 33, p. 781.

OHTA, T., ITO, S., OHGA, A. Effects of vasoactive intestinal peptide (VIP) on contractile responses of smooth muscle in rat stomach. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 621-626, 1991.

OHYA, T., KITAMURA, K., KURIYAMA, H. Cellular calcium regulates outward currents in rabbit intestinal smooth muscle cell. **Am . J. Physiol.**, v. 254, p. 401-410, 1987.

OHYA, T., TERADA, K., KURIYAMA, H. Membrane currents recorded from a fragment of rabbit intestinal smooth muscle cells. **Am . J. Physiol.**, v. 251, p. 335-46, 1986.

OLIVEIRA, L. F. Dor: fisiopatologia. **Ver. Bras. Anesthesiol.**, v. 28, n. 3, p. 227-288, 1979.

ORIHATA, M., SARNA, S. K. Inhibition of nitric oxide synthase delays gastric emptying of solid meals. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 271, n. 2, p. 660-670, 1994.

- PALMER, R. M. J., FERRIGE, A. G., MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.
- PAPASOVA, M. Sphincteric function. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D. et al., (Eds.). **Handbook of physiology**. Baltimore: American Physiological Society, 1989. s. 6, v. 1, part. 2, p. 987-1024.
- PAREKH, A. B., BRADING, A. F. The sources of calcium for carbachol-induced contraction in the circular smooth muscle of guinea-pig stomach. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, n. 2, p. 412-418, 1991.
- PEARL, J., HARRIS, L. S. Inhibition of writhing by narcotic antagonists. **J. pharmac. Exp. Ther.**, v. 154, p. 319-323, 1966.
- PÉREZ RAYA, M. D., UTRILLA, M. P., NAVARRO, M. C., JIMÉNEZ, J. CNS Activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil mice and rats. **Phytother. Res.**, v. 4, n. 6, p. 232-235, 1990.
- PETTIBONE, D. J., MULLER, G. P. Alpha adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. **Endocrinology**, v. 109, p. 798-802, 1989.
- PHAOSAWASDI, K., FISHER, R. S. Hormonal effects on the pylorus. **Am. J. Physiol.**, v. 243, n. 5, p. G330-G335, 1982.

- PRESTWICH, S. A., BOLTON, T. B. G-protein involvement in muscarinic receptor-stimulation of inositol phosphates in longitudinal smooth muscle from the small intestine of the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 119-126, 1995.
- 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. Essent. Oil Res.**, v. 5, n. 3, p. 255-264, 1993.
- RANG, H. P., BEVAN, S., DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurones. **Br. Med. Bull.**, v. 47, p. 534-548, 1991.
- RANG, H. P., DALE, M. M. **Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 1993. 595 p.
- RASMUSSEN, H., TAKUWA, Y., PARK, S. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. **FASEB J.**, v. 1, p. 177-185, 1987.
- REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20. n. 2, p. 129-137, 1992.
- REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in biochemistry of smooth muscle contraction. **Academic Press.**, v. 18, p. 227-239, 1996.

- REMBOLD, C. M., MURPHY, R. Myoplasmic  $[Ca^{2+}]$  determines myosin phosphorylation in agonist-stimulated swine arterial smooth muscle. **Circ. Res.**, v.63, n. 3, p. 593-603, 1988.
- REYNOLDS, J. C., OUYANG, A., COHEN, S. Evidence for an opiate-mediated pyloric sphincter reflex. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. 130-136, 1984.
- RHEE, S. G., CHOI, K. D. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 12393-12396, 1992.
- RIMELE, T. J., STURM, R. J., ADAMS, L. M., HENRY, D. E., HEASLIP, R. J., WEICHMAN, B. M., GRIMES, D. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of neutrophil-derived relaxin factor. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, p. 102-111, 1988.
- RIZZO, C. A., TOZZI, S., MONAHAN, M. E., HEY, J. A. Pharmacological characterization of histamine  $H_3$  receptors in isolated quinea pig pulmonary artery and ileum. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 294, p. 329-335, 1995.
- ROBERTSON, R. M., ROBERTSON, D. Drugs used for the treatment of myocardial ischemia. In: HARDMAN, J. G., GILMAN, A. G., LIMBIRD, L.E. **GOODMAN & GILMAN'S The pharmacological basis of therapeutics**. 9.ed. U.S.A: McGraw-Hill, 1996. c. 32, p. 759-779.
- RODGER, I. W. Biochemistry of airway smooth muscle contraction. In: **Basic Mechanisms and clinical management**. London : Academic Press, 1990.

- RODGER, I. W. Calcium ions and contraction of airway smooth muscle. In: KAY, A. B (ed) **Asthma: Clinical Pharmacology and Therapeutic Progress**. Oxford: Blackwell, 1986. p. 114-127.
- RODGER, I. W. Excitation-contraction coupling and uncoupling in airway smooth muscle. **Br. J. Clin. Pharmac.**, v. 20, p. 255S-266S, 1983.
- ROSLAND, J. H., TJØLSEN, A., MAEHLE, B., HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.
- RUBIO, R., BERNE, R. M. Release of adenosine by normal myocardium in dogs and its relationship to regulation of coronary resistance. **Circ. Res.**, v. 25, p. 407-415, 1969.
- 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.
- SAKAMOTO, Y., NASU, Y. Electrical and mechanical interaction between circular and longitudinal muscle layers of the guinea-pig stomach. **Jpn. J. Smooth Muscle Res.**, v. 23, p. 67-73, 1987.
- SAKUMA, I., LEVI, R. Vasomotor effects of leukotrienes C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> on canine pulmonary artery and aorta. Characterization and mechanisms. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 524, p. 91-102, 1988.

- SAMUELSSON, B., DAHLEN, S. E., LINDGREN, J. A., ROUZER, C. A., SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, p. 1171-1176, 1987.
- SANDERS, K. M., SZURSZEWSKI, J. H. Does endogenous prostaglandin affect gastric antral motility? **Am. J. Physiol.**, v. 241. n.2, p. 191-195, 1981.
- SANTANA, C. F., ALMEIDA, E. R., DOS SANTOS, E. R., SOUZA, L. A. Action of *Mentha crispata* hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v. 63, n. 5, p. 409-410, 1992.
- SARNA, S. K. In vivo myoelectric activity: methods, analysis and interpretation. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D. et al. (Eds.). **Handbook of physiology**. Baltimore: American Physiological Society, 1989. v. 1, part. 2, p. 817-863.
- SARNA, S. K. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity (2). **Dig. Dis. Sci.**, v. 36, n. 7, p. 998-1018, 1991.
- SCHULZE-DELRIEU, K., SHIRAZI, S. S. Neuromuscular differentiation of the human pylorus. **Gastroenterology**, v. 84, p. 287-292, 1983.
- SCHWINN, D. A. Adrenoceptors as models for G protein-coupled receptors: structure, function and regulation. **Br. J. Anaesth.**, v. 71, p. 77-85, 1993.
- SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H., INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

- SHIBUTA, S., MASHIMO, T., ZHANG, P., OHARA, A., YOSHIYA, I. new nitric oxide donor, NOC-18, exhibits a nociceptive effect in the rat formalin model. **J. Neurol. Sci.**, v. 141, n. 1/2, p. 1-5, 1996.
- SHUBINA, L. P., SIURIN, S. A., SAVCHENKO, V. M. [Inhalations of essential oils in the combined treatment of patients with chronic bronchitis]. **Vrach. Delo.**, v. 5, p. 66-67, 1990.
- SIEGMUND, E., CADMUS, R., LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.95, p. 729-731, 1957.
- SING, A. K., VENGLARIK, C. J., BRIDGES, R. J. Development of chloride channel modulators. **Kidney Int.**, v. 48, p. 985-993, 1995.
- SMITS, G. J., LEFEBVRE, R. A. ATP and nitric oxide: inhibitory NANC neurotransmitters in the longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the rat ileum. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 3, p. 695-703, 1996.
- SOMLYO, A. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. **Circ. Res.**, v. 57, p. 479-507, 1985.
- SOMLYO, A., HIMPENS, B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. **FASEB. J.**, v. 3, p. 2266-2276, 1986.

SOMLYO, A., SOMLYO, A. Effects and subcellular distribution of magnesium in smooth and striated muscle. **Fed. Proc.**, v. 40, n. 12, p. 2667-2671, 1981.

\_\_\_\_\_. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 159, p. 129-145, 1968.

\_\_\_\_\_. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.

SPEEDING, M., PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacol. Rev.**, v. 44, n. 3, p. 363-376, 1992.

SPERELAKIS, N. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle and smooth muscle. In: SPERELAKIS, N., BANKS, R. O. (Eds.). **Physiology**. Boston: Little-Brown, 1993. c. 15, p. 223-241.

STEWART J. J., GAGINELLA, T. S., OLSEN, W. A., BASS, P. Inhibitory actions of laxatives on motility and water and electrolyte transport in the gastrointestinal tract. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 192, n. 2, p. 458-467, 1975a.

STEWART J. J., GAGINELLA, T. S., BASS, P. Actions of ricinoleic acid and structurally related fatty acids of the gastrointestinal tract. I. Effects on smooth muscle contractility in vitro. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 195, n. 2, p. 347-354, 1975b.

STRUNZ, W., MITZNEGG, P., DOMESCHKE, S., DOMESCHKE, W., WUNCH, E., DEMLING, L. VIP antagonises motilin-induced antral contractions in vitro. In: DUTHIE. **Gastrointestinal motility in healthy and disease**. Lancaster : MTP Press, 1978. p. 125-131.

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.

SUGAWARA, K., ISAZA, J., CURT, J., WOODWARD, E. R. Effect of secretin and cholecystokinin on gastric motility. **Am. J. Physiol.**, v. 217, p. 1633-1638, 1969.

SUPRENANT, A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 56, p. 117, 1994.

SZOLCSÁNYI, J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultraviolet irradiation. **J. Physiol.**, v. 388, p. 9-23, 1987.

SZURSZZEWSKY; J. H. KING, B. K. Physiology of prevertebral ganglia in mammals with special reference to inferior mesenteric ganglion. In: SCHULTZ, S. G., WOOD, J. D. et al. (Eds.). **Handbook of physiology**. Baltimore: American Physiological Society, 1989. v. 6, p. 519-592.

- TABER, R. I., GREENHOUSE, D. D., IRWIN, S. Inhibition of phenylquinone-induced writhing by narcotic antagonists. **Nature**, v. 204, p. 189-190, 1964.
- TAKAHASHI, R. N., PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 607-610, 1987.
- TANG, D. C., STULL, J. T., KUBOTA, Y., KAMM, K. E. Regulation of the calcium dependence of smooth muscle contraction. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 11839-11845, 1992.
- TANSEY, M. G., WORD, R. A., HIDAKA, H., SINGER, H. A., SCHWORER, C. M., KAMM, K. E., STULL, J. T. Phosphorylation of myosin light chain kinase by the multifunctional calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 12511-12516, 1992.
- TAYLOR, G. S., DANIEL, E. E., TOMITA, T. Origin and mechanism of intestinal slow waves. In: VAN TRAPPEN, Proc. 5th Int. Symp. on Gastrointestinal motility, p. 102-106 (Typoff Press, Herentals), 1975.
- TELFORD, G. L., MIR, S. S., MASON, G. R., ORMSBEE, H. S. Neural control of the canine pylorus. **Am. J. Surg.**, v. 137, p. 92-98, 1979.
- TIFFANY, C. W., BURCH, R. M. Bradykinin stimulates tumour necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. **FEBS Lett.**, v. 247, p. 189-192, 1989.

- TJØLSEN, A., BERGE, O. G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.
- TRIGGLE, D. J. Calcium, the control of smooth muscle function and bronchial hyperreactivity. **Allergy**, v. 38, p. 1-9, 1983.
- UEHARA, Y., BURNSTOCK, G. Demonstration of "gap junctions" between smooth muscle cells. **J. Cell. Biol.**, v. 44, p. 215-217, 1970.
- VANDER WENDE, C., MARGOLIN, S. Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fedn. Proc.**, v. 15, p. 494, 1956.
- VON KÜGELSEN, I., STARKE, K. Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 319-323, 1991.
- WATERMAN, S. A., COSTA, M., TONINI, M. Accommodation mediated by enteric inhibitory reflexes in the isolated guinea-pig small intestine. **J. Physiol.**, v. 474, n. 3, p. 539-546, 1994.
- \_\_\_\_\_. Modulation of peristalsis in the guinea-pig isolated small intestine by exogenous and endogenous opioids. **Br. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 1004-1010, 1992.

- WEISS, G. B., PANG, I. H., GOODMAN, F. R. Relationship between  $^{45}\text{Ca}$  movements, different calcium components and responses to acetylcholine and potassium in tracheal smooth muscle. **J. Pharmac. Exp. Ther.** v. 233, p. 389-394, 1985.
- WHITTLE, B. A. A kinin as mediator of chemically induced pain. **Biochem. Pharmac.**, v. 12, suppl., p. 17, 1963.
- \_\_\_\_\_. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, v. 22, p. 246-253, 1964a.
- \_\_\_\_\_. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmac.**, v. 3, p. 369-378, 1964b.
- WIESNER, T. F., BERK, B. C., NEREM, R. M. A mathematical model of cytosolic calcium dynamics in human umbilical vein endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 39, p. C1556-CC1569, 1996.
- WILBUR, B. G., KELLY, K. A. Effect of proximal gastric; complete gastric and truncal vagotomy on canine gastric electric activity motility and emptying. **Ann. Surg.**, v. 178, p. 295-303, 1973.
- YAKSH, T. L., RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 202, n. 2, p. 411-428, 1977.

- YANAGISAWA, T., OKADA, Y. KCl depolarization increases  $Ca^{2+}$  sensitivity of contractile elements in coronary arterial smooth muscle. **Am J. Physiol.**, v. 276, n. 36, p. H614-H621, 1994.
- YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleamine in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 235, p. 683-688, 1986.
- ZHANG, A., CARELLA, A., ALTURA, B. T., ALTURA, B. M. Interactions of magnesium and ions on tone and contractility of vascular muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 203, p. 223-235, 1991.
- ZHANG, Y., LANG, R. J. Effects of intrinsic prostaglandins on the spontaneous contractile and electrical activity of the proximal renal pelvis of the guinea-pig. **Br. J. Pharmacol.**, v. 113, p. 431-438, 1994.
- ZHANG, W. I., YU, X. J., HONJO, M. S., KIRBY, M. S., BOYETT, M. R. On the role of G-protein activation and phosphorylation in desensitization to acetylcholine in guinea-pig arterial cells. **J. Physiol.**, v. 464, p. 649-679, 1993.
- ZHOLOS, A. V., BAIDAN, L. V., SHUBA, M. F. Properties of the late transient current in isolated intestinal smooth muscle cells of the guinea-pig. **J. Physiol. (Lond.)**, v. 443, p. 555-74, 1991.