

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÓLEO
ESSENCIAL DO *Croton zehntneri* E DE SEUS PRINCIPAIS
CONSTITUINTES, ANETOL E ESTRAGOL, EM RATOS
NORMOTENSOS**

RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA

Recife - PE

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA: FISILOGIA

Rodrigo José Bezerra de Siqueira

**ESTUDO DOS EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÓLEO
ESSENCIAL DO *Croton Zehntneri* E DE SEUS PRINCIPAIS
CONSTITUINTES, ANETOL E ESTRAGOL, EM RATOS
NORMOTENSOS**

**Dissertação apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas, área de concentração em
Fisiologia.**

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Saad Lahlou

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE

Recife-PE

2005

Siqueira, Rodrigo José Bezerra de

Estudo dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes, anetol e estragol, em ratos normotensos / Rodrigo José Bezerra de Siqueira. – Recife : O Autor, 2005.

xviii, 53 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Fisiologia e farmacologia – Farmacologia cardiovascular. 2. Produtos naturais. – Óleo essencial do *Croton zehntneri* – Efeitos cardiovasculares. 3. Experimentos em ratos normotensos *in vitro* e *in vivo* – Comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca. I. Título.

573.6
573.1

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

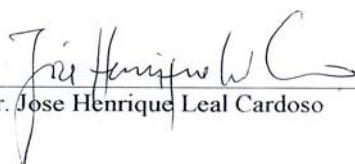
UFPE
BC2006-274

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
MESTRADO EM CIENCIAS BIOLOGICAS-FISIOLOGIA**

BANCA EXAMINADORA



Dr. Dalton Valentim Vassallo



Dr. Jose Henrique Leal Cardoso



Dr. Carlos Peres da Costa

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação aos meus pais, Nelson e Sebastiana, que nunca mediram esforços para investir naquilo que considero a minha maior herança, a educação.

Aos meus irmãos, João, Raquel e Fernando, companheiros e incentivadores sempre presentes, principalmente nos momentos mais difíceis.

À minha namorada, Rejane, pessoa ímpar que durante todo o processo de confecção desse trabalho sempre torceu pelo meu sucesso e demonstrou constantemente companheirismo e amabilidade.

AGRADECIMENTOS

À professora Glória Isolina Duarte por ter me aberto as portas do “Templo da Ciência” e ter mostrado que com dedicação, perseverança, e principalmente com profissionalismo é possível a realização de um trabalho de respaldo mesmo em condições adversas.

Ao meu orientador o professor Saad Lahlou, pela orientação científica, pelo encorajamento, pelo voto de confiança, e acima de tudo pela amizade e por me mostrar como se pratica a verdadeira ciência investigativa alheia aos interesses elitistas e corporativistas.

A todos os professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia que de alguma forma contribuíram de forma inestimável durante todo esse período de pós-graduação.

Aos funcionários das secretarias do Mestrado, Márcio Pires, e da Graduação, Edilene Menezes e Edvaldo Mendes, pela boa vontade dos serviços prestados.

Aos colegas de Laboratório, Carlos, Sarah, Marcella, Davson, Tatiana, Conceição, Pedro, Érika e Leylliane, e aos colegas de Mestrado, Gilberto, João Carlos, Mônica, Emileide e Fernanda, pelos conselhos e pela agradável convivência.

Prefaciando o livro de Max Planck “Para onde vai a ciência”, Einstein ensaiou, há tempos, uma classificação dos homens que se dedicam às atividades científicas, dividindo-os em três grupos. O primeiro grupo é integrado pelos que entram no Templo da Ciência porque nele se oferece uma oportunidade para o brilho de seus talentos peculiares. Do segundo grupo, fazem parte aqueles que se dedicam à ciência para viver, trabalhando com afinco para serem bem remunerados. Constituem o terceiro grupo os homens que foram irresistivelmente atraídos pela ciência, fascinados pela esperança de nela encontrarem uma satisfação aos seus mais íntimos anseios – ao anseio humano de obter uma imagem do mundo circundante que possa responder às atormentantes incógnitas de suas dúvidas interiores. São aqueles que fazem ciência para investigar, para conhecer, para compreender e para criar. São os verdadeiros homens da ciência, os verdadeiros artistas da ciência, desde que os outros dois grupos são simples artífices da ciência, levados ao seu templo por motivos apenas circunstanciais. Se as circunstâncias fossem outras, poderiam muito bem ser aplicados como burocratas ou bons homens de negócio.

Josué de Castro, em “Três Personagens”

ÍNDICE

Resumo.....	x-xi
Abstract.....	xii-xiii
Lista de Figuras e Tabelas.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xv-xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Óleos essenciais.....	2
1.3. Efeitos cardiovasculares dos OEs e seus principais constituintes.....	4
1.4. <i>Croton zehntneri</i>	7
1.5. Efeitos farmacológicos do óleo essencial do <i>Croton zehntneri</i> e de seus principais constituintes.....	10
1.6. Controle cardiovascular reflexo.....	11
1.6.1. Pressorreceptores arteriais e controle neural da PA.....	12
1.6.2. Receptores cardiopulmonares.....	14
1.6.3. Reflexos atriais.....	15
1.6.4. Reflexos ventriculares.....	15
1.6.5. Papel dos quimiorreceptores no controle cardiovascular.....	17
1.7. Capsaicina.....	18
1.7.1. Receptor vanilóide do subtipo 1.....	18
1.7.2. Capsaicina e nocicepção.....	20
1.7.3. Dessensibilização induzida pela capsaicina.....	22

1.7.4. Efeitos cardiovasculares da capsaicina.....	23
2. Objetivos.....	26
2.1. Geral.....	26
2.2. Específicos.....	26
3. Referências Bibliográficas.....	27
4. Manuscritos	
5. Anexo – Materiais e Métodos.....	44
5.1. Amostra vegetal.....	44
5.2. Extração e análise química.....	44
5.3. Soluções e drogas.....	44
5.4. Animais.....	45
5.5. Implantação dos cateteres.....	45
5.6. Sistema de registro.....	47
5.7. Protocolo experimental.....	47
5.7.1 Experimentos <i>in vivo</i>	47
a) Série 1.....	48
b) Série 2.....	48
c) Série 3.....	48
I. Pré-tratamento neonatal com capsaicina.....	48
II. Vagotomia cervical bilateral.....	49
III. Tratamento perineural com capsaicina.....	49
IV. Avaliação do reflexo espinhal.....	50
V. Pré-tratamento com antagonista para capsaicina.....	51
5.7.2. Experimentos <i>in vitro</i>	52
5.8. Análise estatística.....	52

RESUMO

O óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (OECZ) contém trans-anetol e estragol (42 e 46% do peso do óleo essencial, respectivamente). Este estudo investigou os efeitos cardiovasculares do OECZ e de seus principais constituintes em ratos acordados e anestesiados assim como o papel das fibras nervosas sensoriais sensíveis à capsaicina (CAP) na mediação desses efeitos em ratos anestesiados.

Em ratos acordados, injeções intravenosas (i.v.) de OECZ (5-20 mg/kg) e de seus principais constituintes, anetol e estragol (ambos em 5-10 mg/kg) evocaram respostas rápidas e dose-dependentes de hipotensão e bradicardia (fase I) que foram seguidas por um significativo efeito pressor associado com uma bradicardia retardada (fase II). A hipotensão e a bradicardia iniciais (fase I) induzidas pelo OECZ não foram alteradas pelo pré-tratamento com atenolol (1,5 mg/kg, i.v.) ou com L-NAME (20 mg/kg, i.v.), mas foram revertidas respectivamente em efeitos pressor e taquicárdico pelo pré-tratamento com metil-atropina (1 mg/kg, i.v.). Os efeitos subsequentes pressor e de bradicardia retardada (fase II) não foram alteradas pelo pré-tratamento com atenolol, mas foram abolidos respectivamente pelo pré-tratamento com L-NAME e metil-atropina. Em preparações de aorta de rato com endotélio intacto, a resposta vasoconstritora da fenilefrina foi potencializadas nas concentrações menores (1-30 µg/ml) e reduzida nas concentrações maiores (300-1000 µg/ml) de OECZ. Apenas o aumento da contração induzida pela fenilefrina foi abolido tanto pela incubação com L-NAME como pela ausência do endotélio.

Em ratos anestesiados, a injeção i.v. em bolus de OECZ (5-20 mg/kg) também evocou respostas dose-dependentes de hipotensão e bradicardia, que foram imediatas e transitórias. Respostas similares também foram observadas com o anetol e o estragol ambos na dose de 10 mg/kg (i.v.). Essas duas respostas foram abolidas na dose de 10 mg/kg (i.v.) de OECZ após a vagotomia cervical bilateral ou após o tratamento perineural de ambos os vagos com capsaicina (250 µg/ml). À semelhança da capsaicina, a injeção intra-arterial retrógrada de OECZ (10 mg/kg) na artéria femoral, através da artéria epigástrica superficial, induziu uma hipotensão monofásica. Essa resposta reflexa foi bloqueada pelo pré-tratamento neonatal com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) ou pela injeção intratecal de antagonista da substância P (7.8 nmol de RP 67580 ao nível

espinhal L5-L6), sugerindo que ela é mediada exclusivamente pela fibras aferentes primárias que contêm substância P. As duas respostas cardiovasculares, hipotensão e bradicardia, na dose de 10 mg/kg (i.v.) de OECZ foram significativamente reduzidas após o pré-tratamento com o antagonista seletivo para o receptor VR1, a capsazepina (1 mg/kg, i.v.).

Tomados em conjunto, esses achados mostram, pela primeira vez, que a administração i.v. de OECZ em ratos acordados e anestesiados evocou um reflexo bradicárdico e depressor (fase I) semelhante ao induzido pela capsaicina, que parece ser mediado através da ativação de receptores VR1 localizados nos nervos vagos sensoriais. A resposta pressora subsequente do OECZ (fase II) parece ocorrer devido a um efeito vasoconstritor indireto desse óleo provavelmente devido à inibição da produção endotelial de óxido nítrico. Ambos os efeitos cardiovasculares do OECZ parecem ser atribuídos principalmente às ações dos seus principais constituintes, anetol e estragol.

ABSTRACT

Essential oil of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (EOCZ) contains trans-anethole and estragole (42 and 46% of essential oil weight, respectively). This study investigated the cardiovascular effects of EOCZ and its main constituents in either conscious or anesthetized rats and the role of capsaicin-sensitive sensory nerve fibers in the mediation of these effects in anesthetized rats

In conscious rats, intravenous (i.v.) injections of EOCZ (5-20 mg/kg) and its main constituents anethole and estragole (both at 5-10 mg/kg) elicited brief and dose-dependent hypotension and bradycardia (phase I) that were followed by a significant pressor effect associated with a delayed bradycardia (phase II). The initial hypotension and bradycardia (phase I) of EOCZ were unchanged by atenolol (1.5 mg/kg, i.v.) or L-NAME (20 mg/kg, i.v.) pretreatment, but were respectively reversed into pressor and tachycardic effects by methylatropine (1 mg/kg, i.v.) pretreatment. The subsequent pressor effect and the delayed bradycardia (phase II) remained unaffected by atenolol, but were abolished by L-NAME and methylatropine pretreatment, respectively. In rat endothelium-containing aorta preparations, the vasoconstrictor responses to phenylephrine were potentiated and reduced, respectively, by the lower (1-30 µg/ml) and higher (300-1000 µg/ml) concentrations of EOCZ. Only the enhancement of phenylephrine-induced contraction was abolished by either the incubation with L-NAME (50 µM) or in the absence of the endothelium.

In anesthetized rats, i.v. bolus injection of EOCZ (5-20 mg/kg) also elicited dose-dependent hypotension and bradycardia, that were immediate and transient. Similar responses were also observed with anethole and estragole both at 10 mg/kg. After bilateral cervical vagotomy or perineural treatment of both cervical vagus nerves with

capsaicin (250 µg/ml) to block selectively the conduction of sensory C-fibers, both cardiovascular responses to EOCZ (10 mg/kg) were abolished. Like capsaicin, an epigastric retrograde intra-arterial injection of EOCZ (10 mg/kg) into the femoral artery elicited a monophasic hypotensive response. This reflex response was blocked by either neonatal pretreatment with capsaicin (50 mg/kg, s.c.) or intrathecal injection of substance P antagonist, RP 67580 (7.8 nmol, at the spinal level of L5-L6), suggesting that it is exclusively mediated by substance P-containing primary afferent fibers. Both cardiovascular responses to EOCZ (10 mg/kg, i.v.) were also significantly reduced by pretreatment with the selective vallinoid VR1 receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.).

Taken together, these findings show, for the first time, that i.v. administration of EOCZ in anesthetized or conscious rats elicited a like capsaicin-evoked bradycardic and depressor reflex (phase I), which appears mediated through activation of the vallinoid VR1 receptors located on sensory vagal nerves. The subsequent pressor response of EOCZ (phase II) seems to be caused by an indirect vasoconstrictive action of EOCZ most likely through inhibition of endothelial nitric oxide production. Both cardiovascular effects of EOCZ appear mainly attributed to the actions of anethole and estragole, the main constituents of this essential oil.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1. Sistemas ou órgãos-alvo onde os OEs podem agir alterando a PA.....	4
Figura 2. Estrutura química do anetol, do estragol e da capsaicina.....	14
Figura 3. O reflexo barorreceptor.....	17
Figura 4. Receptor VR1, suas correntes de influxo e os possíveis ligandos endógenos.....	24
Figura 5. Localização anatômica das fibras nervosas nociceptivas que se dirigem para o corno posterior da medula espinhal.....	27
Figura 6. Ação dose-dependente da capsaicina sobre o receptor VR1.....	29
Figura 7. Localização da artéria epigástrica superficial.....	100
Figura 8. Figura ilustrativa do protocolo experimental da injeção i.v. de OECZ e seus principais constituintes em ratos bivagotomizados	102
Figura 9. Esquema ilustrando o protocolo experimental de TPN com CAP e injeção i.v. de OECZ.....	103
Figura 10. Protocolo experimental de tratamento i.t. com antagonista de SP.....	104
Figura 11. Esquema ilustrativo do protocolo de pré-tratamento i.v. com capsazepina.....	104

TABELAS

Tabela 1. Exemplos de algumas plantas que possuem o anetol e o estragol na composição química de seus óleos.....	11
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh: acetilcolina

ANOVA : análise de variância

ANT: anetol

AVP: arginina-vasopressina

bpm: batimentos por minuto

CAP: capsaicina

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CZP: capsazepina

DOCA-sal: modelo de hipertensão por sobrecarga de mineralocorticóides e sal

ECA: enzima conversora de angiotensina

EST: estragol

FC: frequência cardíaca

g: gramas

µg: micrograma

5-HT: serotonina (5- hidroxitriptamina)

i.a.: intra-arterial

IC₅₀: concentração efetiva para bloquear 50% da resposta

i.p.: intra-peritoneal

i.t.: intra-tecal

i.v.: intra-venoso

MA: metil-atropina

L-NAME - L-N^G-arginina metil ester

µL: microlitro

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mmHg: milímetros de mercúrio

NTS: núcleo do trato solitário

OECZ: óleo essencial do *Croton zehntneri*

OE: óleo essencial

ON: óxido nítrico

PA: pressão arterial

PAD: pressão arterial diastólica

PAM: pressão arterial média

PAS: pressão arterial sistólica

PHE: fenilefrina

%: porcentagem

s: segundos

s.c.: sub-cutâneo

SNA: sistema nervoso autônomo

SNC: sistema nervoso central

SP: substância P

TPN: tratamento perineural

UI: unidades internacionais

VR1: receptor vanilóide do subtipo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

O valor intrínseco de uma planta medicinal se encontra no seu efeito terapêutico. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é qualquer planta que possua em um ou em vários de seus órgãos, substâncias usadas com finalidade terapêutica, ou que estas substâncias sejam ponto de partida para a síntese de produtos químicos e farmacêuticos. A estas substâncias é dado o nome de princípios ativos, responsáveis pelo efeito terapêutico que a planta medicinal possui. As funções fisiológicas dos princípios ativos nas plantas ainda não estão completamente esclarecidas, mas associa-se a sua produção à defesa da planta contra agentes externos como doenças, pragas, radiação solar, ou à resíduos do metabolismo vegetal. Estes princípios ativos possuem funções ecológicas importantes para a sobrevivência da espécie e são produzidos (em sua grande maioria) através do metabolismo secundário das plantas (MONTANARI, 2002).

As plantas têm fornecido um grande número de agentes clinicamente úteis, possuindo um considerável potencial como fontes de novas drogas. Há estimativas de que existam aproximadamente 200.000 espécies de plantas no mundo, várias delas correndo o risco de extinção. Aproximadamente 20.000 espécies destas plantas são utilizadas na medicina tradicional, entretanto a maioria não foi avaliada do ponto de vista químico ou farmacológico. Postula-se que aproximadamente 25% de todos os medicamentos modernos sejam derivados das plantas de forma direta ou indireta (CALIXTO, 2000).

A terapêutica baseada no uso de plantas esteve, ao longo da história, sob o domínio popular onde o conhecimento empírico do seu valor medicinal tem prestado um serviço inestimável (MENDONÇA, 1989). Nos anos recentes a fitoterapia tem obtido êxito crescente inclusive com aplicação na medicina tradicional. Apesar do Brasil possuir um grande número de espécies vegetais e recursos naturais em abundância para o desenvolvimento das mesmas, o conhecimento científico das plantas medicinais brasileiras é pouco expressivo.

Nesse contexto, o Nordeste do Brasil possui um grande número de plantas aromáticas, fontes de óleos essenciais (OEs), além de energia solar em abundância para a produção das mesmas (CRAVEIRO, 1977, 1981).

1.2. Óleos essenciais

O OE de uma planta constitui o conjunto de substâncias voláteis, farmacologicamente ativas, de natureza fluida, que produzem o aroma da mesma. Os OEs são encontrados em várias plantas, mas são especialmente abundantes nas mirtáceas, coníferas, labiadas, rutáceas, lauráceas e umbelíferas (MATOS & FERNANDES, 1975-1978; CRAVEIRO et al., 1976).

A maior parte dos OEs é insolúvel em água e menos denso que a mesma. Por outro lado dissolvem-se bem em álcool e podem compor misturas com gorduras ou óleos vegetais (MATOS & MATOS, 1989).

Os OEs são formados em células especiais, glândulas ou ductos localizados em um órgão particular ou distribuídos em várias partes da planta. Eles têm a função de proteger as plantas de doenças e parasitas, além de atrair insetos que auxiliam na polinização. Adicionalmente, catalisam reações bioquímicas, agindo como hormônios ou reguladores, e dessa forma desempenham um importante papel na bioquímica da planta (LAVABRE, 1993). O método mais empregado para a obtenção desses OEs é a destilação pelo vapor: o OE é evaporado e condensado por resfriamento (CRAVEIRO et al., 1976, 1981).

Quimicamente, os OEs são uma combinação de diversos compostos químicos (denominados constituintes) como terpenos, sesquiterpenos, aldeídos, fenóis, álcoois, cetonas, compostos sulfurados e nitrogenados (MATOS & FERNANDES, 1978; LAVABRE, 1993). Esses constituintes podem ser ativos ou inativos do ponto de vista farmacológico e as ações dos OEs provavelmente refletem uma ação combinada desses dois tipos de constituintes. Os constituintes ativos podem atuar de forma sinérgica ou não, ao passo que os constituintes inativos podem influenciar a farmacocinética dos ativos. Além disso, a composição química dos OEs pode variar durante o dia e ao longo do ano e depender do clima, do solo, da variedade e da parte da planta de onde é extraído (folha, casca, caule, raiz). Devido a essa complexa composição química, postula-se que os OEs apresentam também uma diversidade de ações farmacológicas,

sendo fontes potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (CRAVEIRO et al., 1978, 1980; ALBUQUERQUE, 1982; MAGALHÃES, 1997)

A indústria utiliza amplamente os OEs, como aromatizantes, para preparação de perfumes, sabões, desinfetantes e cosméticos, e na preparação de alimentos como doces caseiros, licores, bebidas aromáticas, refrescos e aguardentes de cana (JACOBS, 1948; LE BOURHIS, 1968, 1970; LE MOAN, 1973; CRAVEIRO et al., 1977; ITOKAWA et al., 1981). Estes OEs, assim como as plantas aromáticas das quais são extraídos, são empregados na medicina popular na forma de chás e infusatos no tratamento da rinite alérgica (BEZERRA, 1994), da cólica menstrual, da diarreia sanguinolenta, da amebíase e giardíase, e como sedativos, estomáquicos, anti-espasmódicos, anti-diarréicos (FREISE, 1935; ITOKAWA et al., 1981; KIUCHI et al., 1992; BEZERRA, 1994), anti-parasitários, anti-microbianos, analgésicos, diuréticos (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989; MENDONÇA et al., 1991), anti-maláricos (KLAYMAN, 1985), anti-sifilíticos (MENDONÇA, 1989), hipotensores e /ou anti-hipertensivos (LUZ et al., 1984; MENDONÇA, 1989). Estas duas últimas aplicações chamam a atenção para os possíveis efeitos cardiovasculares dos OEs. No que concerne ao sistema cardiovascular, sabe-se que ele utiliza uma complexa série de mecanismos de controle para manter a homeostase e que os OEs poderiam alterar a PA através de alguns mecanismos ou por agir em determinados sistemas ou órgãos-alvo como está representado na figura 1:

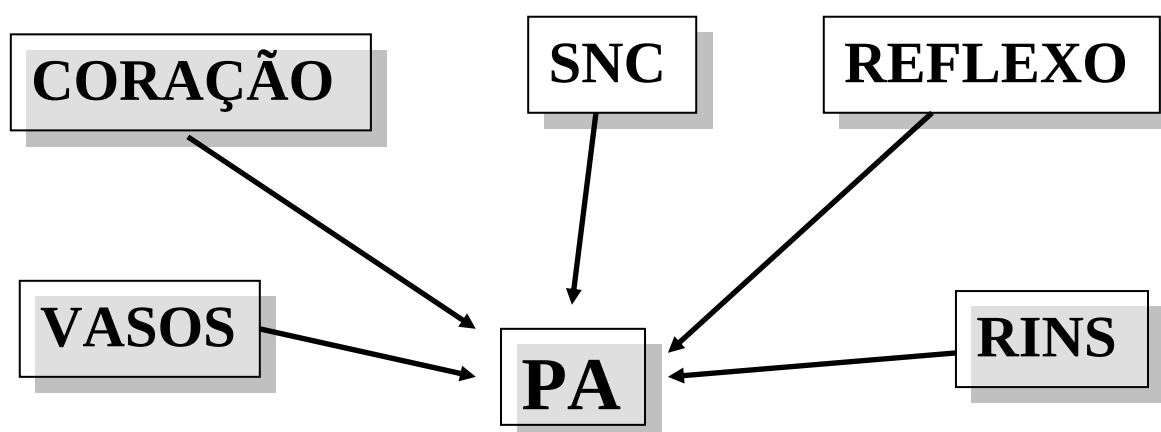


Figura 1. Sistemas ou órgãos-alvo onde os OEs podem agir alterando a PA.

1.3. Efeitos cardiovasculares dos OEs e seus principais constituintes

O Laboratório de Farmacologia Cardiovascular da UFPE em colaboração com o Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará (UECE) têm investigado os efeitos farmacológicos de vários OEs, dos quais quatro tiveram interesse especial. São os OEs provenientes de *Croton nepetaefolius* Baill. (Euphorbiaceae) (marmeleiro vermelho), *Mentha villosa* Huds. (Labiatae) (menta rasteira), *Alpinia zerumbet* ou *speciosa* K. Schum (Zingiberaceae) (colônia) e *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) (alfavaca), que são plantas medicinais aromáticas com grande uso na medicina popular e com efeito anti-espasmódico. O *O. gratissimum* também é utilizado como calmante e a *Alpinia zerumbet* como anti-hipertensivo. Fitoterápicos da *Mentha villosa* já são comercializados industrialmente no Nordeste para o tratamento de giardíase e amebíase. Estudos realizados em roedores mostraram que os OEs dessas plantas, e seus principais constituintes, apresentam grande eficácia farmacológica em tecidos excitáveis. Em preparações de músculo liso possuem um efeito em comum: são depressores da motilidade (miorrelaxantes e antiespasmódicos) (MAGALHÃES, 1997; COELHO-DE-SOUZA, 1997; MAGALHÃES et. al., 1998a; COELHO-DE-SOUZA et. al., 1998; SOUSA, 1999; LEAL-CARDOSO e FONTELES, 1999; BEZERRA et. al., 2000; MAGALHÃES, 2002; MAGALHÃES et al., 2003, 2004). Um conjunto de argumentos sugere que esses óleos agem diretamente sobre a célula muscular lisa, atuando provavelmente a nível intracelular e independentemente dos mecanismos situados na membrana plasmática (MAGALHÃES, 1997; COELHO-DE-SOUZA, 1997; COELHO-DE-SOUZA et. al., 1997, 1998; MAGALHÃES et. al., 1998a; SOUSA, 1999; MAGALHÃES, 2002, MAGALHÃES et al., 2003, 2004). Os efeitos desses OEs sobre o músculo liso não são idênticos, possuindo inclusive aspectos que implicam mecanismos de ação diferentes. Entretanto, são poucos os dados na literatura que relatam os possíveis efeitos hipotensores e/ou anti-hipertensivos dos OEs (ou de seu respectivos constituintes), e menos ainda os que analisam o mecanismo de ação no sistema cardiovascular. Estes estudos podem vir a corroborar o uso destas plantas aromáticas, na medicina popular, para o tratamento da hipertensão arterial, cuja prevalência é alta em nossa sociedade.

Dessa forma, essas quatro plantas foram estudadas sob o aspecto dos efeitos cardiovasculares. Uma das plantas foi o *C. nepetaefolius*, que é utilizada na medicina popular como anti-espasmódico. O OE do *C. nepetaefolius* (OECN) possui como

principais constituintes o 1,8-cineol e o metil-eugenol. Foi ainda mostrado que a administração i.v. do OECN induz quedas dose-dependentes da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em ratos normotensos anestesiados ou acordados (LAHLOU et al., 1996; LAHLOU et al., 1999). Foi mostrado também que a hipotensão e a bradicardia induzidas pelo OECN são independentes. A bradicardia é de origem vagal, uma vez que foi bloqueada pelo pré-tratamento com metil-atropina (MA) ou pela bivagotomia, e reduzida pelo pré-tratamento com hexametônio. A hipotensão parece não ser de origem pré-juncional, uma vez que ocorreu mesmo quando a transmissão autonômica central para o sistema vascular foi bloqueada pelo hexametônio (LAHLOU et al., 1999). Postulou-se, portanto, que a atividade hipotensora do OECN pudesse resultar de seus efeitos vasodilatadores diretos sobre a musculatura lisa vascular (LAHLOU et al., 1999). Adicionalmente, a estimulação dos receptores muscarínicos vasculares que normalmente induz uma hipotensão, provavelmente não está envolvida neste processo, uma vez que o pré-tratamento com MA não afetou a hipotensão induzida pelo OECN. A hipótese em favor de uma ação direta do OECN sobre a musculatura lisa vascular induzindo hipotensão foi posteriormente apoiada pelos achados em estudos realizados *in vivo* e *in vitro* utilizando ratos hipertensos DOCA-sal. Experimentos *in vivo* mostraram que a administração i.v. do OECN em ratos DOCA-sal acordados também induzem quedas dose-dependentes tanto da PAM como da FC, mas os efeitos hipotensores foram significativamente amplificados, tanto na magnitude (absoluta ou relativa) quanto na duração, em relação aos ratos controles uninefrectomizados normotensos (LAHLOU et al., 1996, 2000). O pré-tratamento i.v. com hexametônio reduziu a magnitude da bradicardia sem alterar a amplificação da hipotensão. Experimentos *in vitro*, utilizando preparações de aorta torácica isolada de rato, mostraram que os efeitos inibitórios do OECN na contração induzida pela fenilefrina foram significativamente maiores (a IC_{50} foi reduzida em 7 vezes) nas preparações de ratos hipertensos DOCA-sal quando comparados com animais controles (MAGALHÃES et al., 1998b; LAHLOU et al., 2000; MAGALHÃES, 2002). Esses resultados sugerem que a amplificação do efeito hipotensor induzido pelo OECN em ratos hipertensos DOCA-sal seria devido principalmente ao aumento da resposta vascular ao óleo do que ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático nesse modelo de hipertensão (LAHLOU et al., 2000).

Foi mostrado também que o 1,8-cineol, o principal constituinte do OECN, induz hipotensão e bradicardia. Este último efeito parece ser de origem vagal enquanto que a hipotensão provavelmente está relacionada a um relaxamento vascular ativo, uma vez que esse constituinte reduziu a contração induzida pelo potássio (60 mM) de forma concentração-dependente (LAHLOU et al., 2002c).

Tem sido relatado ainda que o tratamento i.v. com o OE da *Mentha villosa* (OEMV), em ratos anestesiados, induz hipotensão e bradicardia que são atribuídas às ações do principal constituinte desse óleo, o óxido de piperitenona (LAHLOU et. al., 2001). Estes efeitos cardiovasculares provavelmente também são independentes, uma vez que a bradicardia, mas não a hipotensão, induzida pelo OEMV parece necessitar da presença de um fluxo simpático funcional e operacional. Isso veio a sugerir que a atividade hipotensora do OEMV poderia ser resultante de um efeito vasodilatador direto sobre a musculatura lisa vascular (LAHLOU et al., 2001).

Resultados similares também foram recentemente obtidos após injeção i.v. do OE da *Alpinia zerumbet* (OEAZ) em ratos acordados normotensos (GALINDO et. al., 2001; LAHLOU et. al., 2002b) e hipertensos DOCA-sal (LAHLOU et. al., 2002c). Os efeitos hipotensores do OEAZ foram atribuídos ao seu principal constituinte, o terpine-4-ol (LAHLOU et. al., 2002b).

A espécie *O. gratissimum* comumente utilizada no tratamento de problemas digestivos e como anti-séptico bucal, também foi investigada. A administração i.v. de doses crescentes do OE de *O. gratissimum* (OEOG) induziu bradicardia e hipotensão dose-dependentes, tanto em ratos acordados como em anestesiados (LAHLOU et al., 2004). A análise detalhada mostrou que esses efeitos cardiovasculares parecem ser mediados pela ação do principal constituinte, o eugenol, utilizando vias diferentes, uma vez que apenas a bradicardia foi reduzida pelo pré-tratamento com metil-atropina (MA) ou pela bivagotomia.

Baseando-se nesses resultados expostos na literatura, consideramos importante estender estudos desse tipo para outros OEs provenientes de plantas aromáticas do nordeste do Brasil, como o *Croton zehntneri*, no intuito de elucidar seu mecanismo de ação e encontrar uma possível aplicação terapêutica.

1.4. *Croton zehntneri*

O *C. zehntneri* Pax. et Hoffm., popularmente conhecido como “canela de cunhã” pertence à família “Euphorbiaceae” e ao gênero *Croton*.

A família das Euforbiáceas é composta de muitas espécies que se encontram distribuídas em cerca de 290 gêneros, sendo abundantes em regiões tropicais (ALLEN, 1976; JOLLY, 1977; ALBUQUERQUE, 1982) e temperadas do mundo inteiro (LAWRENCE, 1951). O gênero *Croton* é muito importante na flora do nordeste brasileiro não somente pela sua larga ocorrência e dispersão nos cerrados, matas dos tabuleiros litorâneos, matas pluviais e, principalmente, nas caatingas nordestinas, mas também pela sua utilidade ao homem do campo (DUCKE, 1959). Seus representantes nativos do nordeste podem ser agrupados em quatro categorias distintas de acordo com as denominações populares. Três destas estão bem caracterizadas e receberam denominações de marmeleiros, canelas silvestres e velames (FERNANDES et al., 1971; ALBUQUERQUE, 1982). A quarta categoria é constituída pelas outras espécies de crótons (MATOS & FERNANDES, 1975, 1978). Um grande número de espécies desse gênero são produtoras de OEs (CRAVEIRO et al., 1978).

O *C. zehntneri* é caracterizado como um tipo nativo da caatinga do nordeste brasileiro (CRAVEIRO et. al., 1978). Uma de suas principais características é o odor forte e agradável semelhante a anis (*Illicium verum*) ou ao cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) ou à mistura de ambos (FERNANDES et. al., 1971) que é despreendido por toda parte da planta. Suas cascas e folhas são utilizadas, no nordeste brasileiro, como aromatizantes de comidas e bebidas. Na medicina popular é utilizado como sedativo, estomáquico, antiespasmódico e antidiarreico (CRAVEIRO et. al., 1977; 1978a, 1980).

O *C. zehntneri* apresenta-se como um arbusto delicado, perene, muito aromático e com muitos ramos que são revestidos por pêlos estrelados. As inflorescências apresentam-se em racemos contínuos, desinfloras de 3 a 8 cm de comprimento. O fruto mostra cápsula subglobosa, trilobulada, medindo de 4 a 5 mm de comprimento (ALBUQUERQUE, 1982).

O *C. zehntneri* produz uma quantidade razoável de OE com rendimento de aproximadamente 2,2% do peso seco de suas folhas (CRAVEIRO et al., 1980). A constituição química desse óleo tem sido determinada pelo Departamento de Física e

Química da Universidade Estadual do Ceará (UECE) por meio de cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa. De acordo com essa análise, seus principais constituintes são o anetol (principalmente o trans-anetol), o estragol e o eugenol (CRAVEIRO et al., 1978b; CRAVEIRO et al., 1981). No OE de algumas localidades do nordeste encontra-se com abundância o anetol (variedade anetol do *C. zehntneri*; contendo 86% do peso do óleo). Naquele de outras localidades não há quantidade significativa de anetol, predominando o eugenol (68% do peso do óleo; variedade eugenol) ou o estragol (80% do peso do óleo; variedade estragol). Além dessas substâncias estão presentes, em menor proporção, outras como o mirceno, o cariofileno, o 1,8-cineol (CRAVEIRO et al., 1981). O anetol e o estragol são derivados fenilpropanos que ocorrem com bastante frequência nos OEs de um grande número de plantas (Tabela 1). O estragol pode ser transformado em anetol por tratamento químico simples (CRAVEIRO et al., 1980). O anetol, em uma temperatura acima de 23 °C apresenta-se como um líquido incolor ou levemente amarelado. Possui um odor de anis e um sabor adocicado. É praticamente insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos (RAUBENHEIMER, 1912; MERCK INDEX, 1968; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975). O anetol existe na forma dos isômeros cis e trans, sendo que o isômero trans predomina nos OEs de Anis, Badiana e Fennel, e se transforma no isômero cis quando submetido a irradiações de comprimento de onda superior a 280 µm (RAUBENHEIMER, 1912; NAVES et al., 1958, 1959; NAVES, 1958a,b ; NAVES, 1960; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 1975; CRAVEIRO & LEMOS, 1977).

O estragol (p-alilanol, metoxi-4-alilbenzeno, metil-éter de chavicol) além de ocorrer naturalmente no OE de várias plantas também pode ser obtido sinteticamente. Apresenta-se como um líquido incolor, insolúvel em álcool e clorofórmio, e capaz de formar misturas azeotrópicas com a água (MERCK INDEX, 1968). É um isômero de posição do anetol e como este, possui odor aromático de anis embora não apresente seu sabor adocicado (RAUBENHEIMER, 1912). Sua isomerização em anetol pode ocorrer por tratamento químico simples determinando a formação dos compostos cis e trans (NAVES, 1958; NAVES, 1960; FERRONI et al., 1962).

Baseando-se nessas características químicas dos OECz e de seus principais constituintes, é possível postular que tais substâncias possuem efeitos farmacológicos mensuráveis.

<i>Família</i>	<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Constituinte</i>	Ocorrência
<i>Araceae</i>	<i>Acorus gramineus</i>	rizoma	E	China
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Magnifera indica</i>	folhas	E	Brasil
<i>Burseraceae</i>	<i>Borwellia serrata</i>	resina	E	Índia
	<i>Protium heptaphyllum</i>	folhas	E, A	Brasil
<i>Compositae</i>	<i>Artemísia dracunculus</i>	erva	E	Ásia
	<i>Solidago odora</i>	erva	E	USA
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Croton essequiiboensis</i>	folhas	E, A	Brasil
	<i>Croton Jacobinensis</i>	folhas	E, A	Brasil
<i>Labiatae</i>	<i>Croton zehntneri</i>	folhas	E, A	Brasil
	<i>Ocimum basilicum</i>	erva	E	Ásia, Europa
<i>Rutaceae</i>	<i>Coleus menthaefolium</i>	erva	E, A	África
	<i>Euxylophora paraensis</i>	casca	A	Brasil

Tabela 1. Exemplos de algumas plantas que possuem o anetol (A) e o estragol (E) na composição química de seus OEs (modificado de DALLMEIER, 1981).

1.5. Efeitos farmacológicos do óleo essencial do *Croton zehntneri* e de seus principais constituintes

O OE do *C. zehntneri* (OECZ) tem sido estudado em vários sistemas fisiológicos. Foi mostrado que o OECZ promove um efeito depressor sobre o sistema nervoso central (SNC) diminuindo a atividade geral em ratos e camundongos (BATATINHA et al., 1995). Na preparação de músculo esquelético, o OECZ induz contração, possivelmente através de um efeito de liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (ALBUQUERQUE et al., 1995). Em estudo realizado no íleo isolado de cobaia foi demonstrado que o OECZ exerce efeitos anti-espasmódicos (COELHO-DE-SOUZA et al., 1997; COELHO-DE-SOUZA, 1997). Além disso, o OECZ exibiu efeitos modulatórios em diversas preparações isoladas de músculo liso de cobaia, relaxando seletivamente o músculo liso intestinal (COELHO-DE-SOUZA et al., 1998). Estes dois últimos estudos vêm corroborar a utilização popular do *C. zehntneri* como anti-espasmódico gastrointestinal (COELHO-DE-SOUZA et al., 1998). Recentemente, foi relatado também um efeito anti-nociceptivo do OECZ em camundongos, (OLIVEIRA et al., 2001).

Entre os efeitos do anetol podemos citar: inibição reversível da formação de glicogênio (COTÉ et al., 1951), provavelmente por uma competição pela glicose disponível; ação estrogênica em ratos (ZONDEX & BERGMANN, 1938); ação estimuladora da secreção salivar, provavelmente através de um mecanismo colinérgico (TANIGUCHI, 1988); ação depressora sobre o SNC (BOISSIER et al., 1967); propriedades psicolépticas fugazes (somente o trans-anetol em altas doses) no camundongo (BOISSER et al., 1969; Le BOURHIS & SOENEN, 1973); discreto efeito analgésico, anticonvulsivante e hipnótico (Le BOURHIS & SOENEN, 1973); e um certo grau de atividade citotóxica sobre células HeLa (STOJCEV et al., 1967).

Para o estragol (VINCENZI, 2000) tem sido relatada uma ação depressora, relativamente fugaz, sobre o SNC, que inclui: diminuição dos reflexos comportamentais como a capacidade exploratória e de observação (Le BOURHIS & SOENEN, 1973); bloqueio da excitabilidade nervosa de forma dose-dependente (LEAL-CARDOSO et al., 2004); discreta potencialização da indução do sono (sleeping-time) pelo pentobarbital sódico (SETO & KEUP, 1969); efeito anestésico, miorrelaxante e anticonvulsivante (DALLMEIR & CARLINI, 1981; ALBUQUERQUE et al., 1981).

Ademais, a observação sugere que existe uma semelhança química estrutural entre o anetol, o estragol e a capsaicina (Figura 1). A capsaicina é um agente amplamente utilizado em pesquisa farmacológica, tendo sido atribuído à mesma um repertório de ações inclusive sobre o sistema cardiovascular, cujos efeitos podem ser diretos ou mediados por mecanismos reflexos.

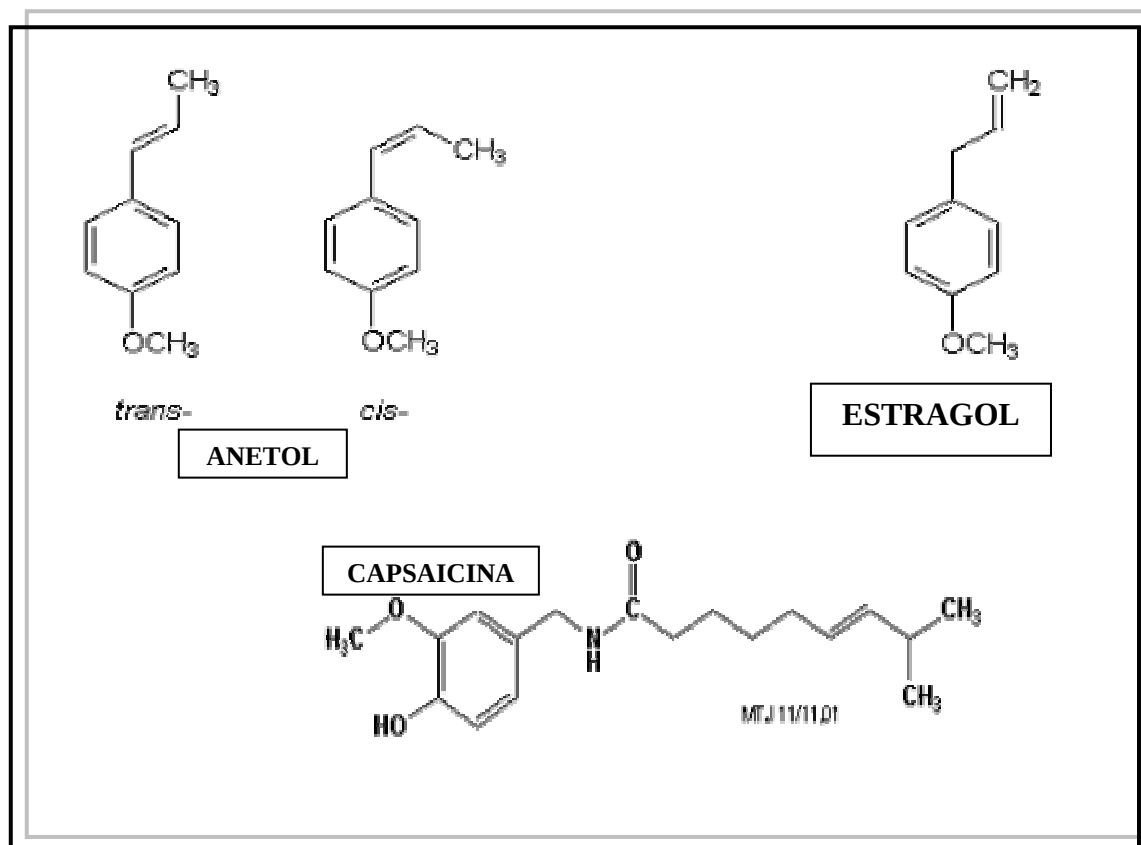


Figura. 2. Estrutura química do anetol, do estragol, e da capsaicina.

1.6. Controle cardiovascular reflexo

A regulação da PA em condições normais é complexa e conta com a participação de múltiplos sistemas na manutenção da estabilidade hemodinâmica. Esses sistemas são integrados de tal forma que o débito oriundo dos centros vasomotores medulares (via final comum) é estritamente regulado em resposta a uma variedade de estímulos e perturbações (CAMPAGNA & CARTER, 2003). A manutenção dos níveis pressóricos dentro de uma faixa de normalidade depende de variações do débito

cardíaco, da resistência vascular periférica ou de ambos. Diferentes mecanismos de controle estão envolvidos não só na manutenção como na variação momento a momento da PA, regulando o calibre e a reatividade vascular, a distribuição de fluido dentro e fora dos vasos e o débito cardíaco. Nesse contexto, o estudo dos mecanismos de controle da PA tem revelado substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e redundante para garantir que esse parâmetro seja mantido em níveis adequados nas mais variadas situações (IRIGOYEN et al., 2001, 2003).

1.6.1. Pressorreceptores arteriais e controle neural da PA

O barorreflexo constitui o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, a curto-prazo (momento a momento). Existem pressorreceptores arteriais, que são mecanorreceptores, dispostos em terminações nervosas livres situadas na camada adventícia de grandes vasos (aorta e carótida) e que são estimulados por deformações nas paredes desses vasos. Essas deformações, que são vistas durante elevações da PA, promovem ativação dos pressorreceptores, que por seu turno geram potenciais de ação. Esses sinais são conduzidos ao SNC, especificamente ao núcleo do trato solitário (NTS), via nervo glossofaríngeo (fibras carotídeas) e nervo vago (fibras aórticas). A partir daí, neurônios secundários do NTS excitam neurônios pré-ganglionares do parassimpático localizados no núcleo dorsal motor do vago e no núcleo ambíguo, que por sua vez se projetam (eferentes vagais) aos neurônios pós-ganglionares intramurais situados no coração, determinando aumento da atividade vagal e queda da FC (Figura 2). Em contrapartida, o tônus simpático para o coração e os vasos é reduzido, uma vez que outros neurônios do NTS (quando estimulados pelo aumento da PA) excitam a região do bulbo ventrolateral caudal que inibe os neurônios pré-motores simpáticos do bulbo ventrolateral rostral. Dessa forma, ocorre redução da contratilidade cardíaca e da FC, e diminuição da resistência vascular periférica que levam à redução e normalização da PA (IRIGOYEN, et al., 2001, 2003).

Sabe-se também que no valor basal da PA, existe uma descarga intermitente dos pressorreceptores sincronizada com a pressão sistólica. Dessa forma, o nível de atividade das fibras aferentes carotídeas a aórticas, mielinizadas ou não, reflete a função direta das variações instantâneas da deformação e da tensão vasculares induzidas pela

PA. Esse mecanismo garante, portanto o nível operante (“set-point”) da PA (AIRES, 1999).

Em uma situação de elevação sustentada da PA (i.e., hipertensão arterial), os pressorreceptores passam por um fenômeno de adaptação. Essa adaptação atua no sentido de diminuir a sensibilidade dos pressorreceptores e deslocar sua faixa de funcionamento para um novo nível de PA (IRIGOYEN et al., 2003).

Adicionalmente é importante frisar que a função do barorreflexo arterial é marcadamente inibida pela anestesia geral (FLUCKIGER et al., 1985), indicando que a mensuração desse fenômeno no estado acordado exerce um papel importante (SU & MIAO, 2002).

Além das respostas neurais rápidas, os pressorreceptores controlam também a liberação de vários hormônios que participam na manutenção dos valores basais da PA. Durante quedas sustentadas da PA, por exemplo, ocorre maior liberação de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, maior liberação de vasopressina (AVP ou hormônio anti-diurético) pela neuro-hipófise e aumento dos níveis plasmáticos de renina (e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona). Esses sistemas hormonais atuam no sentido de prolongar por minutos, ou até mesmo horas, as respostas cardiovasculares que são comandadas pelos pressorreceptores (MICHELINI, 2000; IRIGOYEN et al., 2001, 2003; LANFRANCHI & SOMERS, 2002). A epinefrina aumenta o débito cardíaco (por aumento da FC e da contratilidade cardíaca) e melhora o fluxo sanguíneo muscular, coronário e esplâncnico em detrimento do renal e do cutâneo, além de aumentar o metabolismo basal por ativação da glicogenólise no fígado. A norepinefrina, por sua vez, induz uma elevação acentuada na resistência periférica total (efeito vasoconstritor). A queda da PA também determina, a nível renal, maior liberação de renina que atua clivando o angiotensinogênio em angiotensina I que por sua vez é convertida em angiotensina II nos pulmões por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II exerce então suas ações como: potencialização dos efeitos da norepinefrina nos vasos de resistência; efeito vasoconstritor direto; potencialização da transmissão ganglionar; aumento na síntese e liberação de aldosterona (hormônio importante na regulação da volemia por estimular a reabsorção de sódio pelos túbulos renais). Já a AVP atua de duas maneiras: 1) ao nível dos túbulos coletores renais (receptores V2), aumentando a reabsorção de água e restaurando a

volemia e 2) no músculo liso vascular (receptores V1), promovendo vasoconstrição acentuada e conseqüentemente aumentando a resistência periférica total (AIRES, 1999).

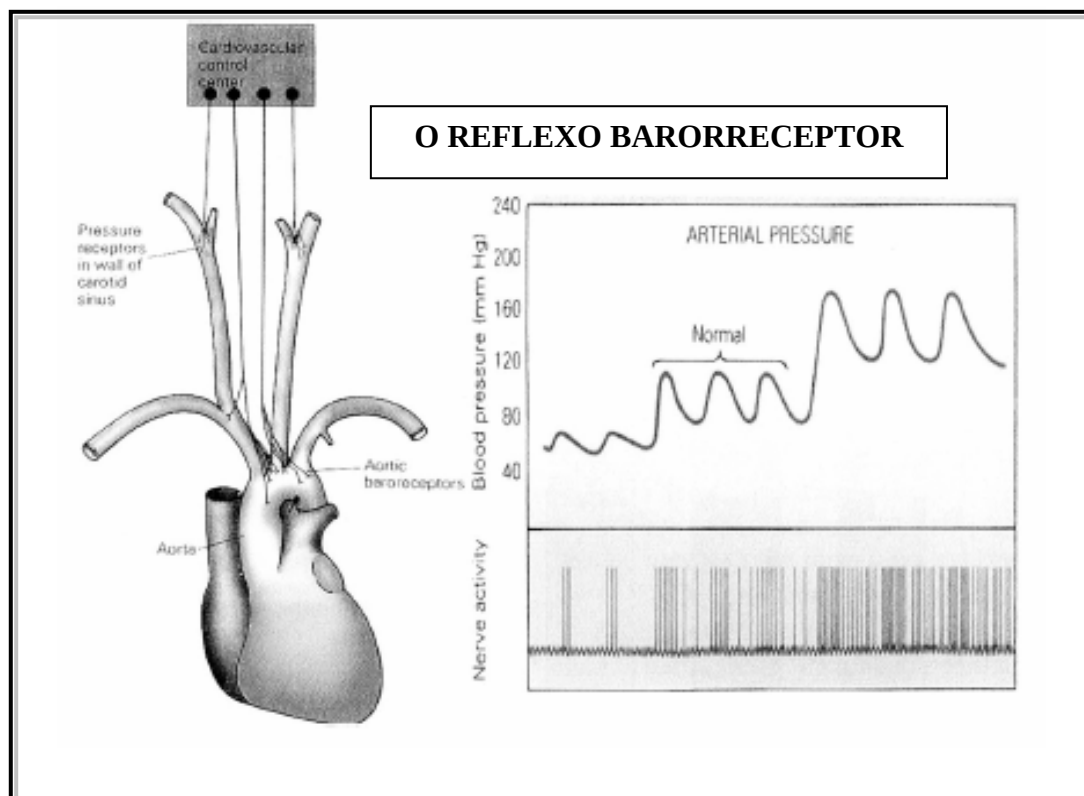


Figura 3. O reflexo barorreceptor (CAMPAGNA & CARTER, 2003).

1.6.2. Receptores cardiopulmonares

Sabe-se que existem três grupos de receptores que são ativados por mudanças pressóricas nas câmaras cardíacas: 1) receptores situados no endocárdio nas junções das veias cava superior e inferior com o átrio direito e das veias pulmonares com o átrio esquerdo (junções veno-atriais). São conectados ao SNC por fibras vagais mielinizadas; 2) receptores distribuídos de forma difusa através de todas as câmaras do coração e que se encontram conectados ao SNC por fibras vagais não-mielinizadas; 3) receptores também difusamente distribuídos por todas as câmaras cardíacas e conectados à medula espinhal por fibras mielinizadas e amielinizadas trafegando com os nervos simpáticos (MICHELINI, 2000; IRIGOYEN et al., 2001, 2003).

O primeiro grupo de receptores, que se localiza nas junções veno-atriais, é ativado pelo enchimento e pela contração atriais. A distensão mecânica dessas junções

evoca um aumento na FC devido à elevação da atividade simpática direcionada para o nodo sino-atrial, sem que ocorra alteração na atividade das fibras eferentes vagais para o coração ou das fibras simpáticas para o miocárdio. Dessa forma, o aumento reflexo da FC ajuda a manter o volume cardíaco relativamente constante durante aumentos no retorno venoso. A distensão mecânica do átrio causa um aumento no débito urinário de água pelo rim. A diurese é secundária à inibição da secreção do hormônio anti-diurético e à redução da atividade simpática renal (IRIGOYEN et al., 2001, 2003).

O segundo grupo de receptores cardiopulmonares, cujas aferências não-mielinizadas trafegam pelo nervo vago, comportam-se, quando ativados, como os mecanorreceptores carotídeos e aórticos, reduzindo a atividade simpática e aumentando a atividade do vago para o coração. A modulação na atividade simpática varia de um território para outro, mas é especialmente importante na regulação da resistência vascular renal (IRIGOYEN et al., 2001, 2003).

O último grupo de aferentes cardiopulmonares trafega junto aos aferentes cardíacos simpáticos até a medula espinhal. São aferentes mielinizados e amielinizados (em sua maior proporção) e são ativados por estímulos mecânicos ou por substâncias químicas aplicadas diretamente no epicárdio (CINCA & RODRIGUEZ-SINOVAS, 2000; IRIGOYEN et al., 2001, 2003).

1.6.3. Reflexos Atriais

Em 1915, Bainbridge demonstrou que a rápida infusão i.v. de salina ou sangue provocava aceleração cardíaca em cães anestesiados, além de taquicardia em resposta às discretas distensões nas regiões entre os átrios e as veias pulmonares ou veia cava. Entretanto, outros pesquisadores têm mostrado que a infusão de fluidos pode resultar tanto em bradicardia como em taquicardia, dependendo do valor inicial da FC (alta ou baixa, respectivamente) (MEYRELLES et al., 1994).

1.6.4. Reflexos ventriculares

A inervação aferente dos ventrículos cardíacos é, principalmente, embora não totalmente, feita por fibras amielínicas do tipo-C, sendo que o ventrículo esquerdo é um pouco mais innervado do que o direito. Nesse contexto, as vias eferentes envolvem atividade aumentada do nervo vago para o coração e inibição do efluxo simpático para os vasos periféricos (MEYRELLES et al., 1994; VERBERNE et al., 2003).

Existe ainda muita especulação sobre o que, de fato, pode constituir um estímulo fisiológico normal para os receptores ventriculares. Contudo, sabe-se que eles podem ser excitados tanto por estímulos mecânicos como químicos. Uma variedade de substâncias químicas estimulam as terminações aferentes vagais no coração e nos pulmões e produzem profunda resposta depressora (MEYRELLES, 1994; VERBERNE et al., 2003). O termo terminações quimio-sensíveis é utilizado para distinguir estas terminações (fibras-C vagais) dos quimiorreceptores clássicos que respondem somente a mudanças fisiológicas das concentrações de substâncias que ocorrem naturalmente no sangue, em situações como hipercapnia, acidemia ou hipóxia, resultando em aumento da PA e taquicardia (IRIGOYEN et al., 2001, 2003). Diferentemente do que acontece com os alcalóides do *veratrum*, que podem excitar aferências vagais tanto mielínicas como amielínicas, existem algumas substâncias que podem atuar de forma relativamente específica para as aferências vagais ventriculares. Tais substâncias incluem bradicinina, prostaglandinas, 5-hidroxitriptamina (5-HT) (serotonina), fenilbiguanida, e capsaicina (CAP) (MEYRELLES et al., 1994; VERBERNE et al., 2003). Outras substâncias como adenosina tri-fosfato, e venenos de cobras, insetos e animais marinhos, também podem estimular os aferentes cardíacos (CAMPAGNA & CARTER, 2003). A resposta de bradicardia e hipotensão observada imediatamente após a administração i.v. destes vários agentes químicos possui suas vias aferentes trafegando pelos nervos vagos e tem sido comumente denominada de reflexo Bezold-Jarisch (CAMPAGNA & CARTER, 2003).

O reflexo de Bezold-Jarisch pode ser facilmente evocado experimentalmente por injeções intravenosas de 5-HT ou fenilbiguanida. Esses agentes estimulam seletivamente fibras-C vagais amielínicas existentes na região cardiopulmonar sem que ocorra ativação antidrômica das fibras vagais aferentes (MEYRELLES, 1994), como acontece na estimulação elétrica do tronco vagal seccionado. A fenilbiguanida e a 5-HT não estimulam os receptores atriais do tipo A ou do tipo B e nem sensibilizam os barorreceptores sino-aórticos (MEYRELLES et al., 1994). Adicionalmente, a estimulação elétrica dos nervos vagos ativa tanto fibras mielínicas quanto amielínicas, incluindo aquelas provenientes das vísceras abdominais. Utilizando tal abordagem, o reflexo de Bezold-Jarisch pode ser obtido repetidamente através desses agentes, ao passo que outras substâncias químicas podem levar ao fenômeno de dessensibilização ou taquifilaxia (MEYRELLES et al., 1994).

1.6.5. Papel dos quimiorreceptores no controle cardiovascular

Os quimiorreceptores periféricos são constituídos morfo-funcionalmente por células altamente especializadas, que possuem a habilidade de detectar alterações na pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), pressão parcial de oxigênio ($p\text{O}_2$) e na concentração hidrogeniônica (pH) do sangue. Esses receptores encontram-se distribuídos em corpúsculos carotídeos e aórticos, localizados bilateralmente na bifurcação da carótida comum (quimiorreceptores carotídeos) ou em pequenos corpúsculos espalhados entre o arco aórtico e a artéria pulmonar (quimiorreceptores aórticos). São irrigados por sangue arterial através de pequenos ramos que se originam a partir da carótida externa e aorta, respectivamente. Uma importante característica desses quimiorreceptores refere-se ao fato de estarem intimamente associadas aos capilares sanguíneos, sendo cerca de 25% do volume total do corpúsculo carotídeo ocupado por capilares e vênulas (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001).

A ativação dos quimiorreceptores periféricos resulta em ajustes ventilatórios que se caracterizam por aumento do volume de ar corrente, aumento da frequência respiratória e aumento do volume minuto respiratório, exercendo, portanto, um importante papel no controle reflexo da ventilação (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001).

Além de promover respostas ventilatórias, a estimulação dos quimiorreceptores periféricos também modifica de forma reflexa os valores de PA. Sugere-se que tais estruturas possuem uma influência tônica sobre o controle cardiovascular, contribuindo dessa forma para a manutenção dos níveis basais da PA e de parte da resistência periférica total (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001). É importante ressaltar que o incremento da ventilação ativa também os mecanorreceptores situados nos pulmões, provocando alterações circulatórias reflexas que podem se sobrepor parcialmente às provenientes da estimulação isolada dos quimiorreceptores. Dessa forma, a frequência e o volume pulmonar devem ser controlados para que seja avaliada a resposta cardiovascular primária dos quimiorreceptores. Quando esse controle é realizado, a PA tende a aumentar, por ativação simpática, como resultado da constrição dos vasos de resistência situados nos leitos renal e esplâncnico e nos músculos esqueléticos (CAMPAGNOLE-SANTOS & HAIBARA, 2001; IRIGOYEN et al., 2003).

1.7. Capsaicina

A CAP [trans-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida], o ingrediente pungente encontrado nas pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, tem sido amplamente utilizada por sua especificidade na estimulação dos aferentes primários C e A-delta. A administração sistêmica de CAP induz vários efeitos farmacológicos tais como hipotermia, bradicardia, diminuição da PA e inibição do trânsito intestinal (BURCK & BURKS, 1986). Muitos desses efeitos são secundários à liberação de neuropeptídeos a partir dos terminais nervosos sensoriais. Os neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), a substância P (SP) e a neuroquinina A (NKA), liberados pelos nervos sensoriais estimulados, possuem uma função sensorial-eferente dual: atuam mediando a nocicepção (vias da dor) e evocam um conjunto de alterações conhecidas como inflamação neurogênica (HOLZER, 1998b; COSTA et. al., 2001; FAJARDO et al., 2001). Estudos utilizando técnicas de clonagem têm revelado a expressão do chamado receptor vanilóide do subtipo 1 (VR-1) nos neurônios de pequeno diâmetro (sensoriais), indicando a seletividade da CAP pelos nervos sensoriais amielinizados (CATERINA et al., 1997).

1.7.1. Receptor vanilóide do subtipo 1

O receptor VR-1 é um canal catiônico não-seletivo com a característica notável de possuir uma elevada permeabilidade para íons cálcio (Ca^{+2}) (CATERINA et. al., 1997). A partir da determinação da sequência de aminoácidos pôde-se prever que o receptor VR-1 possui seis domínios trans-membrana e um “estiramento” em forma de poro, situado entre o quinto e o sexto domínios, que permite o influxo de íons (TOMINAGA & JULIUS, 2000). A CAP e a resiniferatoxina, um capsinóide ultra-potente, agem sobre os neurônios sensoriais no sentido de induzir influxo de íons, particularmente cálcio e sódio (BEVAN & SZOLCSANYI, 1990; O’NEIL & BROWN, 2003). O influxo, especialmente de íons sódio, despolariza a membrana neuronal e gera potenciais de ação na medida que o potencial de membrana ultrapassa um determinado limiar (SASAMURA & KURAISHI, 1999). O influxo de Ca^{2+} para dentro dos terminais nervosos, induzido pela CAP, através do receptor VR-1 e dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, provoca a liberação exocítica de neuropeptídeos, como a SP e o CGRP, e

de aminoácidos excitatórios, como o glutamato (BEVAN & SZOLCSANYI, 1990; HOLZER, 1991; UEDA et al., 1993; TOHDA & KURAISHI, 1996).

Grande parte dos neurônios sensíveis à CAP são ativados por prótons (H^+) (BEVAN & GEPPETTI, 1994; REEH, 2001). O calor nocivo e as condições ácidas (pH abaixo de 5,9; condições de acúmulo de H^+) evocam correntes de influxo nos neurônios sensoriais (KRESS & ZEIHOFER, 1999; VELLANI et al., 2001), e dessa forma podem potencializar os efeitos da CAP (BAUMANN & MARTENSON, 2000; RYU et. al., 2003). O calor e os prótons podem agir diretamente sobre o receptor VR-1 uma vez que o antagonista deste receptor, a capsazepina (CZP), inibe os efeitos evocados por estes dois agentes. Dessa forma, tanto o calor como os prótons podem ser ativadores endógenos e/ou moduladores do receptor VR-1. Postula-se também que derivados lipídicos do ácido araquidônico, como a anandamida, possam ativar endogenamente o receptor VR-1 (WOOD, 1997; LIN & LEE, 2002).

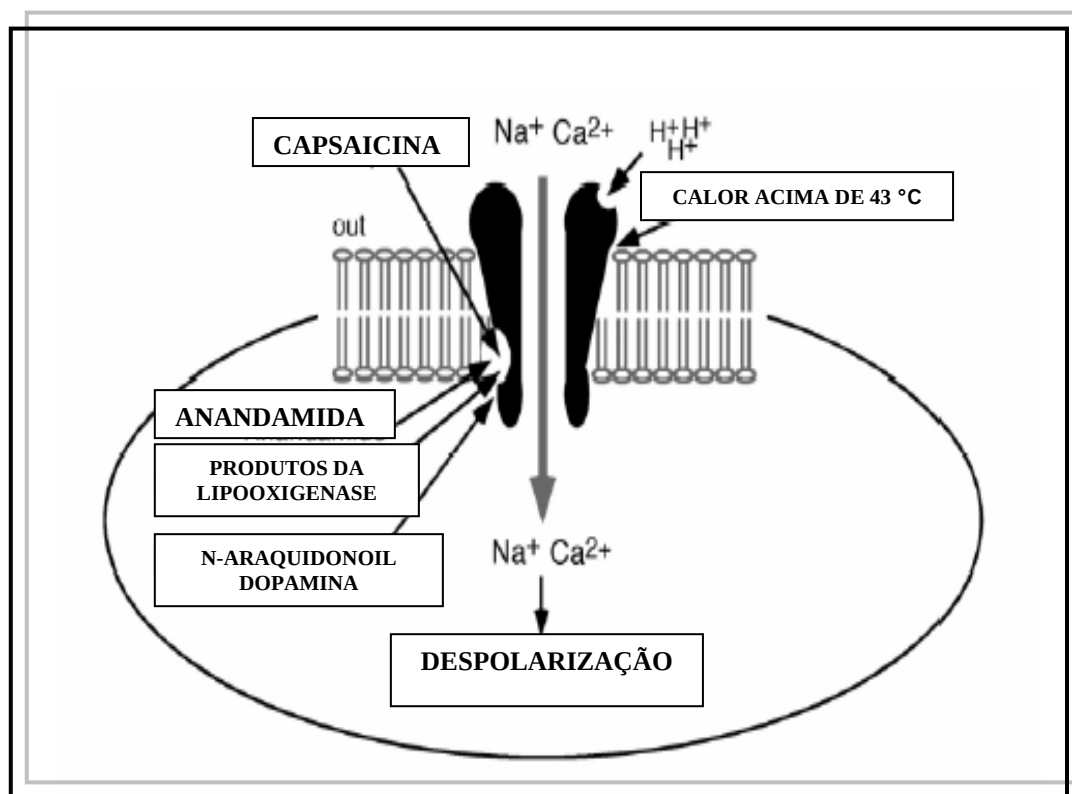


Figura 4. Receptor VR-1, suas correntes de influxo e os possíveis ligantes endógenos (TOMINAGA & JULIUS, 2000).

1.7.2. Capsaicina e nocicepção

Em condições normais, a dor está associada a uma atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos. Esses nervos possuem terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânicos, térmicos, químicos) (BLOOM, 1996; MÁRQUEZ, 2004). Os registros de atividade em fibras aferentes isoladas mostraram que os estímulos suficientes para excitar essas pequenas fibras aferentes também produzem uma sensação dolorosa. Muitas dessas fibras são fibras C não-mielinizantes com baixas velocidades de condução (menor que 1 m/s); este grupo é conhecido como nociceptores polimodais. Outras consistem em delicadas fibras mielinizadas, de condução mais rápida, mas que respondem a estímulos periféricos semelhantes (BLOOM, 1996; JULIUS & BASBAUM, 2001). Apesar da existência de algumas diferenças entre espécies, as fibras C estão associadas, em sua maioria, a terminações nociceptivas polimodais. Os aferentes dos músculos e das vísceras também conduzem a informação nociceptiva. Nos nervos desses tecidos, as pequenas fibras mielinizadas estão conectadas a mecanorreceptores de limiar elevado, enquanto as fibras não mielinizadas estão conectadas a nociceptores polimodais, como ocorre na pele (BLOOM, 1996). O mecanismo através do qual uma variedade de estímulos diferentes tem a capacidade de induzir atividade nas terminações nervosas nociceptivas está apenas parcialmente esclarecido. No caso de várias condições patológicas, a lesão tecidual constitui a causa imediata da dor, havendo conseqüente liberação local de uma variedade de mediadores químicos que se supõe irão atuar sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente ou potencializando sua sensibilidade a outras formas de estimulação (BLOOM, 1996).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas medulares situam-se nos gânglios das raízes dorsais, terminando na substância cinzenta do corno dorsal. As fibras aferentes nociceptivas terminam, em sua maioria, na região superficial do corno dorsal; as fibras C e algumas fibras mielínicas inervam os corpos celulares, enquanto outras fibras A penetram mais profundamente no interior do corno dorsal (MÁRQUEZ, 2004) (Figura 5).

Os neurônios aferentes amielinizados contêm diversos neuropeptídeos, particularmente a SP e o CGRP (WATSON et al., 2002). Esses neuropeptídeos são

liberados como mediadores nas terminações centrais ou periféricas e têm importante atividade na patologia da dor (BLOOM, 1996).

Os nociceptores também são sensíveis à CAP (DI MARZO et al., 2002), e sua exposição a esse agente provoca excitação desses neurônios induzindo a liberação de vários mediadores da inflamação (TOMINAGA & JULIUS, 2000). A CAP não somente provoca dor, mas também exibe propriedades analgésicas. Esse efeito paradoxal diz respeito à capacidade da CAP em dessensibilizar os terminais nervosos nociceptivos (TOMINAGA & JULIUS, 2000).

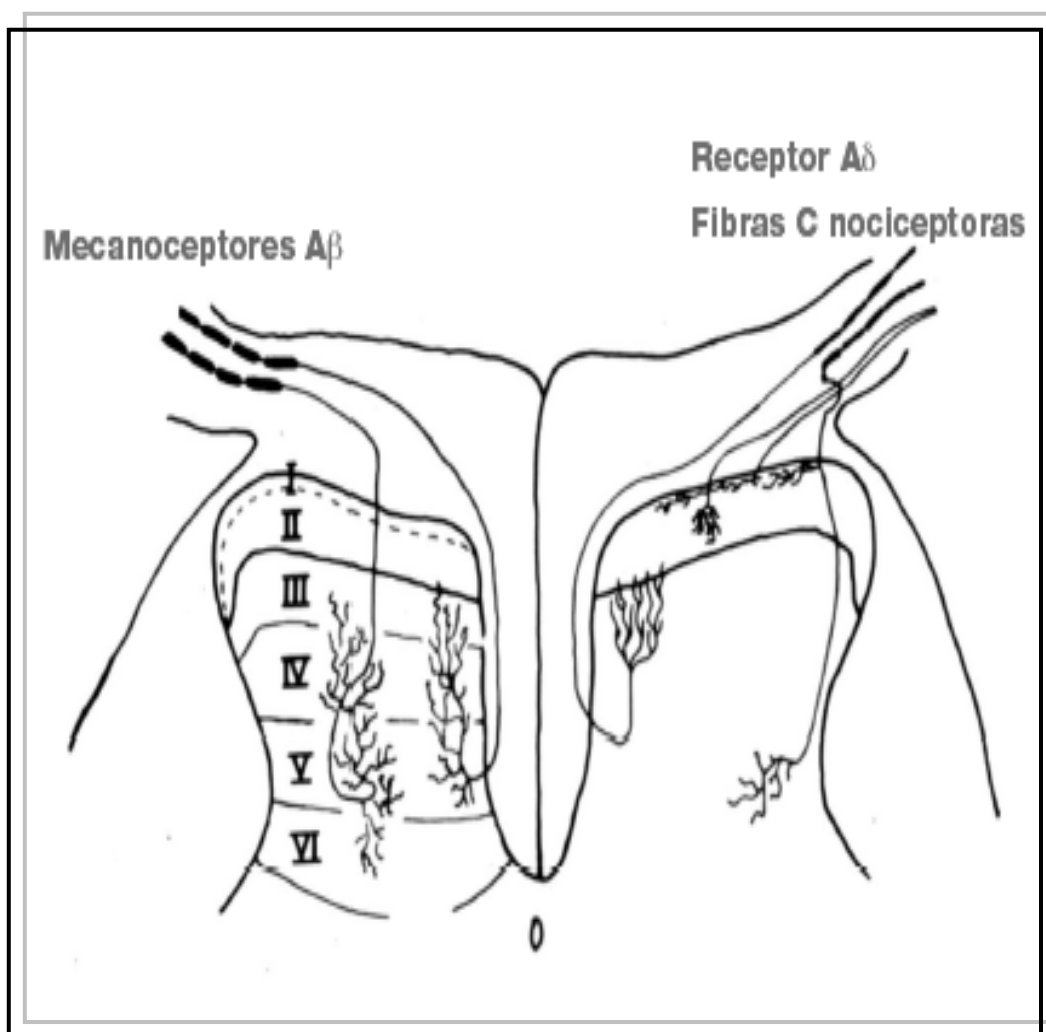


Figura 5. Localização anatômica das fibras nervosas nociceptivas que se dirigem para o corno posterior da medula espinhal (MÁRQUEZ, 2004).

1.7.3 Dessensibilização induzida pela capsaicina

Estudos têm mostrado que se a concentração da droga e o tempo de contato excedem um certo limite, a CAP ou os seus análogos exercem uma ação neurotóxica que resulta na morte de neurônios do gânglio da raiz dorsal em cultura e no dano a longo-prazo (semanas a meses) das funções neuronais aferentes *in vivo* (BEVAN & SZOLCSÁNYI, 1990; HOLZER, 1991; SZALLASI, 1994; HOLZER, 1998a). Essa ação citotóxica é provavelmente mediada pelo receptor VR-1 (CATERINA et al., 1997). O processo neurotóxico, que é iniciado após ativação do receptor VR-1 pela CAP, resulta em necrose e morte celular (CATERINA et al., 1997), resultante de dois mecanismos principais (BEVAN & SZOLCSÁNYI, 1990; SZALLASI & BLUMBERG, 1999; HOLZER, 1991; HOLZER, 1998a). Um desses mecanismos parece estar relacionado com um influxo excessivo de Ca^{+2} para dentro da célula, resultando na ativação de enzimas dependentes desse íon e em um dano a longo-prazo na função mitocondrial. O segundo mecanismo possivelmente envolve o influxo de sódio através do receptor VR-1 e o movimento passivo de cloro para dentro da célula. Esse influxo de cloro e sódio é seguido por entrada de água e lise osmótica da célula (HOLZER, 1998a). Esses mecanismos descritos anteriormente podem ser secundários a duas abordagens amplamente utilizadas na pesquisa farmacológica: a administração sistêmica e o tratamento perineural (TPN) com a CAP (HOLZER, 1998a).

A administração sistêmica de uma dose única de 50 mg/kg de CAP por via subcutânea (s.c.) em ratos recém-nascidos reduz o número de neurônios de pequeno diâmetro no gânglio nodoso em até 70% (CAROBI, 1996). O tratamento sistêmico com doses neurotóxicas em ratos adultos provoca também um certo grau de degeneração de neurônios do gânglio nodoso, que é acompanhada por uma depleção de longa duração da SP no gânglio e no nervo vago (HOLZER, 1991).

No que se refere ao TPN com CAP em ratos, tem sido mostrado que esse procedimento resulta em excitação neuronal seguida por inibição da condução nervosa na maioria das fibras C, em algumas fibras A-delta e A-alfa-beta (SUCH & JANCSÓ, 1986; WADDELL & LAWSON, 1989; SCHELEGLE et al., 2000). Enquanto que o bloqueio da fibra A-alfa-beta é revertido no período de uma hora, o bloqueio da fibra C ocorre por um tempo maior que 90 min (WADDELL & LAWSON, 1989). Embora as consequências a longo-prazo do tratamento perivagal com CAP não tenham sido

estudadas detalhadamente a nível celular, as informações disponíveis sugerem que ocorre degeneração de um número significativo de aferentes vagais (HOLZER, 1998a).

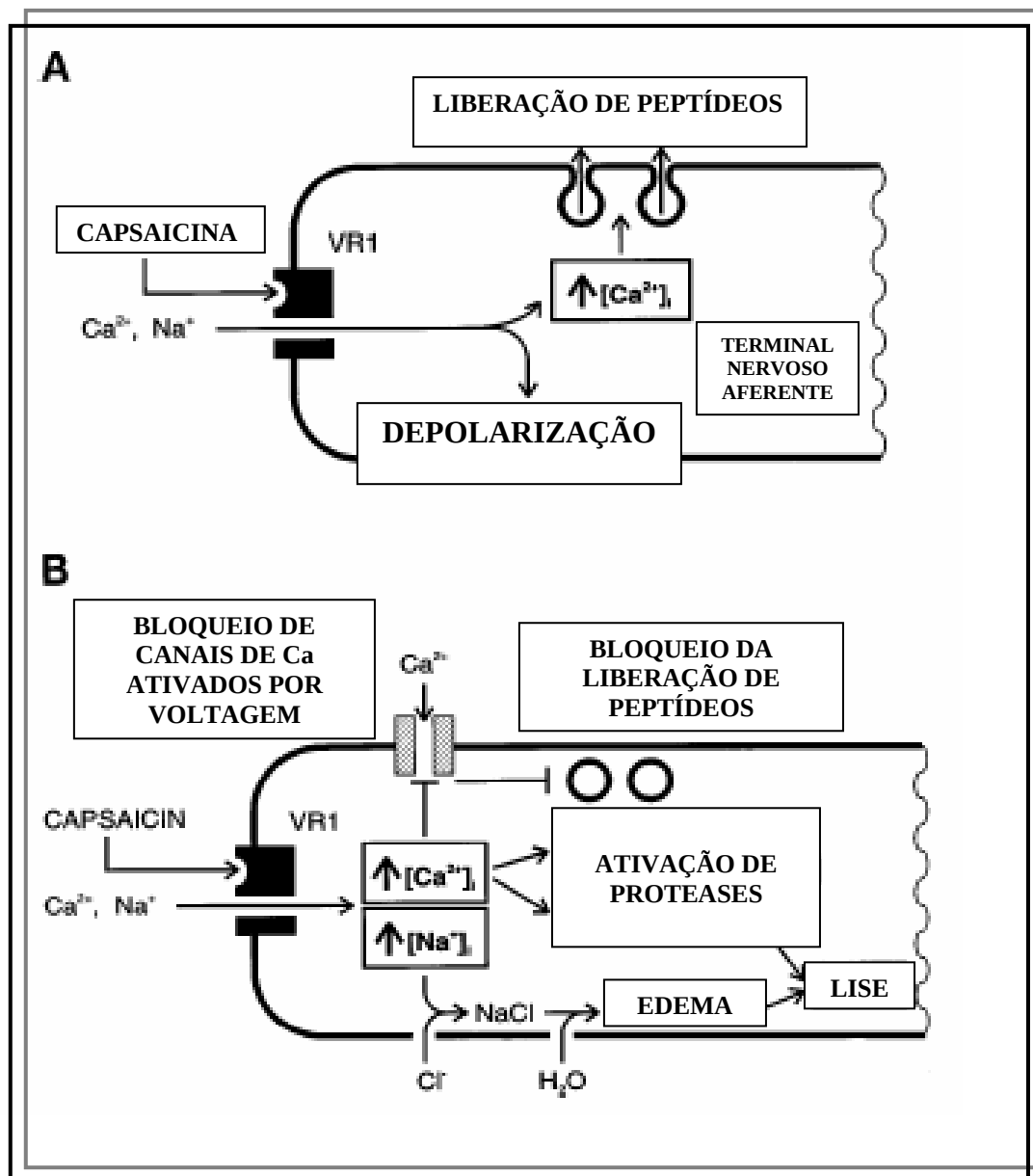


Figura. 6. Ação dose-dependente da capsaicina sobre o receptor VR1 (HOLZER, 1998a)

1.7.4. Efeitos cardiovasculares da capsaicina

Os efeitos cardiovasculares da CAP têm sido extensivamente estudados em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Os nervos aferentes sensíveis à CAP estão amplamente

distribuídos no sistema cardiovascular, sendo encontrados no coração e na adventícia de muitos vasos sanguíneos (BARJA et al., 1983; WHARTON et al., 1986). Esses nervos liberam certos neurotransmissores (mais comumente a SP e o CGRP) a partir dos seus terminais centrais ou periféricos quando ativados por uma variedade de substâncias químicas, incluindo a CAP que age sobre o receptor VR1 (GAMSE et al., 1981; MAGGI & MELI, 1988; WANG, 2005). Através de suas terminações aferentes, os nervos sensíveis à CAP podem enviar informações para o SNC no sentido de iniciar reflexos autonômicos. Em vários órgãos, os neurotransmissores liberados a partir das terminações eferentes podem evocar respostas como vasodilatação e extravasamento de proteínas plasmáticas (MAGGI & MELI, 1988; HOLZER, 1992; LUNDBERG, 1996).

Tem sido relatado que a injeção i.v. em bolus de CAP ou de seu análogo, nonivamida, em ratos anestesiados, induz uma resposta trifásica na PA: uma ligeira queda inicial associada com uma bradicardia rápida (efeito f ; “fast”), um retorno intermediário ao nível normal (ou um pouco maior que o normal) e uma subsequente hipotensão retardada associada com um segundo efeito de bradicardia lenta (efeito s ; “slow”) (DONNERER & LEMBECK, 1982; YANG et al., 1993; LO et al., 1994). Foi visto que a hipotensão inicial (efeito A) e a bradicardia rápida (efeito f), em resposta à CAP, estavam ausentes após a vagotomia cervical bilateral (DONNERER & LEMBECK, 1982; YEH et al., 1993; LO et al., 1994) e reduzidas pelo pré-tratamento com CAP e com atropina (DONNERER & LEMBECK, 1983; LO et al., 1994). Isso tem indicado que o efeito A é mediado por um mecanismo colinérgico associado a um reflexo vagal a terminações nervosas sensíveis à CAP. O aumento intermediário (efeito B) não se mostra alterado pela bivagotomia, mas está aumentado em ratos tratados no período neonatal com CAP e tem sido associado como um efeito vasoconstritor direto da CAP (DONNERER & LEMBECK, 1982; YEH et al., 1993; LO et al., 1994). A queda secundária e mais gradual da PA (efeito C) não é alterada pela bivagotomia, mas está ausente em ratos tratados no período neonatal. Propõe-se que da mesma forma que o efeito A, o efeito C seja atribuído à estimulação de fibras aferentes de pequeno diâmetro sensíveis à CAP (DONNERER & LEMBECK, 1982; YEH et al., 1993; LO et al., 1994).

A injeção i.a. retrógrada de CAP na artéria femoral, acessada através da artéria epigástrica superficial, estimula os receptores perivasculares para dor (SZOLCSÁNYI, 1977) levando a uma hipotensão monofásica em ratos (DONNERER & LEMBECK,

1982). Esse efeito não foi afetado pela descerebração intercolicular, mas foi completamente bloqueado após a secção ipsilateral dos nervos ciático e safeno, após a injeção i.t. de um antagonista específico para SP ao nível L5-L6 da medula espinhal, ou em ratos espinais (DONNERER & LEMBECK, 1982; YANG et al., 1993). Portanto, essa hipotensão induzida pela CAP foi designada como uma resposta reflexa, que é mediada exclusivamente por fibras aferentes primárias que contêm SP (DONNERER & LEMBECK, 1983). Essa conclusão é suportada pelos achados que mostram que o reflexo depressor após a injeção i.a. de CAP foi convertido a um reflexo pressor em ratos tratados com CAP no período neonatal (DONNERER & LEMBECK, 1982), ou seja, após degeneração dos aferentes primários de pequeno diâmetro (JANCSÓ et al., 1977) resultando em depleção da SP dessas estruturas nervosas (GAMSE et al., 1981).

Foi mostrado também que a CAP possui potentes efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos quando aplicada no átrio isolado da cobaia, sendo sugerido que essa ação inotrópica positiva é decorrente da liberação de CGRP dos neurônios sensoriais intra-cardíacos (FRANCO-CERECEDA et. al., 1988). Além disso, o CGRP e a CAP também prolongam a duração do potencial de ação no átrio isolado do cobaia (FRANCO-CERECEDA et. al., 1988).

Também foram relatados outros efeitos cardiovasculares da CAP tais como: papel facilitador na atividade do barorreceptor isolado (ZHANG et al., 2004); vasodilatação nas artérias coronárias (ZHANG et al., 2004); aumento na PAM e na FC secundárias à microinjeção desse agente na área postrema (ZHANG et al., 2004); aumento na sensibilidade da PA ao sal e remodelamento vascular após tratamento neonatal (ZENG et al., 2004); bradicardia e hipotensão após microinjeção em determinadas áreas do NTS do rato (LUKOVIC et al., 1987).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar os efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Cróton zehntneri* (OECz) e de seus principais constituintes em ratos normotensos.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer a curva dose-efeito da ação do OECz e seus principais constituintes sobre a PAM e a FC em ratos acordados e anestesiados.
- Investigar, em ratos acordados, o papel do sistema nervoso autônomo e do óxido nítrico na mediação dos efeitos cardiovasculares do OECz.
- Estudar, em ratos anestesiados, o envolvimento das fibras nervosas sensoriais na mediação dos efeitos cardiovasculares do OECz.
- Avaliar os efeitos vasorrelaxantes do OECz em preparações de aorta isolada.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. Fisiologia. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.

ALBUQUERQUE, A. A. C., VIANA, G. S. B., SILVA, E. A. T. Efeitos farmacológicos dos princípios ativos do óleo essencial de *Croton zehntneri* em nervo isolado. *Cienc. Cult.* 33. p. 722, 1981.

ALBUQUERQUE, A. A. C. 1982. Efeitos farmacológicos do óleo essencial do *Croton zehntneri* Pax et. Hoffm. Tese (Mestrado em Farmacologia) Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.

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

ALLEN, A. C. 4 novas espécies de *Croton* L (Euphorbiaceae) do Rio Grande do Sul. *Cienc. Cult.* 28. p. 406. supl., 1976.

BARJA, F., MATHISON, R., HUGGEL, H. Substance P-containing nerves fibres in large peripheral blood vessels of the rat. *Cell Tissues Res.* 229. p. 411-422, 1983.

BATATINHA, M. J. M., SOUZA-SPINOSA, H., BERNARDI, M.M. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 45, p.53-57, 1995.

BAUMANN, T. K., MARTENSON, M. E. Extracellular protons both increase the activity and reduce the conductance of capsaicin-gated channels. *J. Neurosci.* 30. p. 1-5, 2000.

BEVAN, S., SZOLCSANYI, J. Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Neurosci.* 11. p. 330-333, 1990.

BEVAN, S., HOTH, S., HUGHES, G., JAMES, I. F., RANG, H. P., SHAK, K., WALPOLE, C. J. J., YEATS, J. C. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 107. p. 544-552, 1992.

BEVAN, S., GEPPETTI, P. Proton: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. *Trends Neurosci.* 17. p. 509-512, 1994.

BEZERRA, M. A. C. 1994. *Alpinia speciosa* Schum: estudo de frações fixas e óleo essencial. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

BEZERRA, M. A. C., LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO-DE-SOUZA, A. N., CRIDDLE, D. N., FONTELES, M. C. Myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Alpinia Speciosa* on rat ileum. *Phytother. Res.* 14. p. 1-3, 2000.

BLOOM, F. E., ZIGMON, M. J., SQUIRE, L. R. Fundamental neuroscience. 3.ed. USA. Academic Press, 1996.

BOISSIER, J. R., SIMON, P., LE BOURHIS, B. A psychotrope du trans-anethole et de l'ethanol administres conjointement a la souris. *Ann. Nutr. Alim.* 23. p. 215-222, 1967.

BOUSSAIRI, H., SASSARD, J. Cardiovascular effects of basic fibroblast growth factor in rats. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 23. p. 99-102, 1994.

BURCK, S. H., BURKS. T. F. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol. Rev.* 38. p. 179-226, 1986.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines phytotherapeutic agents. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33. p. 179-189, 2000.

CAMPAGNA, J. A., CARTER, C. Clinical relevance of the Bezold-Jarisch reflex. *Anesthesiology*. 98(5). p. 1250-1260, 2003.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J., HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens*. 8. p. 30-40, 2001.

CAROBI, C. A quantitative investigation of the effects of neonatal capsaicin treatment on vagal afferent neurons in the rat. *Cell. Tissue. Res*. 283. p. 305-311, 1996.

CATERINA, M. J. M., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 389. p. 816-824, 1997.

CINCA, J., SINOVAS, A.R. Cardiovascular reflex responses induced by epicardial chemoreceptor stimulation. *Cardiovasc. Res*. 45. p. 163-171, 2000.

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

COELHO-DE-SOUZA, A. N., BARATA, E. L., MAGALHÃES, P. J. C., LIMA, C. C., LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytother. Res*. 11. 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 smooth muscle preparations of the guinea-pig. *Phytother. Res*. 12. p. 189-194, 1998.

COSTA, S. K. P., ESQUISATTO, L. C. M., CAMARGO, E., GAMBERO, A., BRAIN, S. D., NUCCI, G., ANTUNES, E. Comparative effect of *Phoneutria nigriventer* spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. *Life Sciences*. 69, p. 1573-1585, 2001.

COTÉ, L. OLENSON, J. J. Antagonism of anethole and adrenal extract on glycogen formation in adrenalectomized rats. *Fed. Proc.* 10. p. 175-176, 1951.

CRAVEIRO, A. A., MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W. A simple and inexpensive steam generator for essential oils extractions. *J. Chem. Educ.* 53. p. 652, 1976a.

CRAVEIRO, A. A., ALENCAR, J. W., MATOS, F. J. A. Estudo de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro. *Cienc. Cult.* 28. p. 180, 1976b.

CRAVEIRO, A. A., LEMOS, T. L. G. Fotólise do trans-anetol. *Cienc. Cult.* 29. p. 446, 1977.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Cienc. Cult.* 29. p. 445, 1977.

CRAVEIRO, A. A., ALENCAR, J. W., MATOS, F. J. A. Composição química de óleos essenciais de espécies nordestinas de *Croton*. *Cienc. Cult.* 30. p. 326-327, 1978a.

CRAVEIRO, A. A., ANDRADE, C. H. S., MATOS, F. J. A. Anise-like flavor of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. *J. Agric. Food. Chem.* 26. p. 772-773, 1978b.

CRAVEIRO, A. A., ALENCAR, J. W., MATOS, F. J. A. Projeto integrado de Química e Farmacologia. Relatório de Atividades. 227p. 1980.

CRAVEIRO, A. A., ALENCAR, J. W., MATOS, F. J. A. Volatile constituents of brazilian Euphorbiaceae genus *Croton*. *J. Nat. Prod.* 44. p. 509-632, 1981.

DALLMEIER, K., CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivates. *Pharmacology.* 22. p. 113-117, 1981.

DI MARZO, V., BLUMBERG, P. M., SZALLASI, A. Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin. Neurobiol.* 12. p. 372-379, 2002.

DONNERER, J., LEMBECK, F. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 320. p. 54-57, 1982.

DONNERER, J., YAN, Z., LEMBECK, F. Capsaicin-induced reflex fall in rat blood pressure is mediated by afferent substance P-containing neurones via a reflex centre in brain stem. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 324. p. 293-295, 1983.

DUCKE, A. Estudos botânicos no Ceará. *Ann. Acad. Brasil. Cienc.* 31. p. 231, 1959.

FAJARDO, L. E. G., LINARES, M. P., OLAYA, H. L. Inflamación y dolor: câmbios em el sistema nervioso periférico y central. *MEDUNAB.* 10. p. 1-14, 2001.

FERRONI, E., FICALBI, A., SECCI, M. Determination of cistrans isomers of anethole. *Gazz. Chim. Ital.* 92. p. 1198-1203, 1962.

FLUCKIGER, J. P., SONNAY, M. BOILLAT, N., ATKINSON, J. Attenuation of the baroreceptor reflex by general anesthetic agents in the normotensive rat. *Eur. J. Pharmacol.* 109. p. 105-109, 1985.

FRANCO-CERECEDA, A., LUNDBERG, J. M., SARIA, A., SCHREIBMAYER, W., TRITTHART, H. A. Calcitonin gene-related peptide: released by capsaicin and prolongation of the action potential in the guinea-pig heart. *Acta Physiol. Scand.* 132. p. 181-190, 1988.

FREISE, F. W. Essential oils from brasilian Euphorbiaceae. *Perfum. Essent. Oil Res.* 26. p. 219-220, 1935.

GALINDO, C. A. B., CARNEIRO-LEÃO, R. F. L., FONTELES, M. A., LEAL-CARDOSO, J. H., LAHLOU, S. Role of the autonomic nervous system in mediation of hypotensive effects of the essential oil of *Alpinia speciosa* in rats. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, Minas Gerais, MG, Brasil. pp. 101, 2001.

GAMSE, R., IACKNER, D., GAMSE, G., LEEMAN, S. E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary sensory neurons. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 316. p. 38-41, 1981.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 43. p. 143-201, 1991.

HOLZER, P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 121. p. 49-146, 1992.

HOLZER, P. Neural injury, repair, and adaptation in the GI tract II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *Am. J. Physiol.* 275. p. G8-G13, 1998a.

HOLZER, P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen. Pharmacol.* 30 (1). p. 5-11, 1998b.

IRIGOYEN, M. C., CONSOLIM-COLOMBO, F. M., KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev. Bras. Hipertens.* 8. p. 55-62, 2001.

IRIGOYEN, M. C., LACCHINI, S., ANGELIS, K., MICHELINI, L. C. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo.* 1. p. 20-45, 2003.

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

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

JANCSÓ, G., KIRALY, E., JANCSÓ-GABOR, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons. *Nature*. 270. p. 741-743, 1977.

JANCSÓ, G., SUCH, G. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. *J. Physiol*. 341. p. 359-370, 1983.

JOLLY, A. B. Botânica – Introdução a taxonomia vegetal. 4. ed. São Paulo. Nacional. P. 398-406, 1977.

JULIUS, D., BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413. p. 203-210, 2001.

KIUCHI, F., IWAKAMI, S., SHIBUYA, M. Inhibition of prostaglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diarylheptanoids. *Chem. Pharm. Bull.* 40. p. 387-391, 1992.

KLAYMAN, D. L. *Qinghaosu* (artemisinin) an antimalarial drug from China. *Science*. 228. p. 1049-1055, 1985.

KRESS, M., ZEIHOFER, H. U. Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 20. p. 112-118, 1999.

LAHLOU, S., LEAL-CARDOSO, J. H., MAIA, M. B. S., COELHO-DE-SOUZA, A. N., PINTO DUARTE, G. Avaliação dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* em ratos com hipertensão DOCA-sal, acordados. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis, SC, Brasil, pp. 107, 1996.

LAHLOU, S., LEAL-CARDOSO, J. H., MAGALHÃES, P. J. C., COELHO-DE-SOUZA, A. N., PINTO DUARTE, G. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* in rats: role of the autonomic nervous system. *Planta Med.* 65. p. 553-557, 1999.

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

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

LAHLOU, S., MAGALHÃES, P. C. J., CARNEIRO-LEÃO, R. F. L., LEAL-CARDOSO, J. H. Involvement of the nitric oxide in the mediation of the hypotensive action of the essential oil of *Mentha x villosa* in normotensive conscious rats. *Planta Med.* 68. p. 694-699, 2002a.

LAHLOU, S., CARNEIRO-LEÃO, R. F. L., LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt hypertensive rats. *Phytomedicine.* 9. p. 715-720, 2002b.

LAHLOU, S., FIGUEIREDO, A. F., MAGALHÃES, P. J. C., LEAL-CARDOSO, J. H. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Can J. Physiol. Pharmacol.* 80. p. 1125-1131, 2002c.

LAHLOU, S., INTERAMINENSE, L. F. L., LEAL-CARDOSO, J. H., PINTO DUARTE, G. Enhanced hypotensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17. p. 323-330, 2003.

LAHLOU, S., INTERAMINENSE, L. F. L., LEAL-CARDOSO, J. H., MORAIS, S. M., DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in rats: role of the autonomic nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31. p. 219-225, 2004.

LANFRANCHI, P. A., SOMERS, V. K. Arterial baroreflex function and cardiovascular variability: interactions and implications. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283. p. 815-826, 2002.

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

LAWRENCE, G. H. M. Taxonomy of vascular plants. New York: Mac Millan, 1951.

LEAL-CARDOSO, J. H., FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *Anais Acad. Bras. Ciênci.* 71. p. 201-213, 1999.

LEAL-CARDOSO, J. H., MATOS-BRITO, B. G., LOPES-JUNIOR, J. E. G., VIANA-CARDOSO, K. V., SAMPAIO-FREITAS, A. B., BRASIL, R. O., COELHO-DE-SOUZA, A. N., ALBUQUERQUE, A. A. C. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37. p. 1193-1198, 2004.

LE BOURHIS, B. Recherches préliminaires sur le métabolisme du trans-anéthole. *Ann. Biol. Clin.* 26. p. 711-715, 1968.

LE BOURHIS, B. Identification de quelques métabolites du trans-anéthole chez l'Homme, le Lapin et le Rat. *Ann. Pharm. Fran.* 28. p. 355-361, 1970.

LE BOURHIS, B., SOENEN, A. M. Recherches sur l'action psychotrope de quelques substances aromatiques utilisées en alimentation. *Food Cosmet. Toxicol.* 11. p. 1-9, 1973.

LE MOAN, G. Les aromatisants: problèmes toxicologiques posés par leur emploi. *Aliment. Et. Vie.* 61. p. 121-160, 1973.

LIN, Y. S., LEE, L. Y. Stimulation of pulmonary vagal C-fibres by anandamide in anaesthetized rats: role of vanilloid type 1 receptors. *J. Physiol.* 539(3). P. 947-955, 2002.

LO, Y. C., YEH, J. L., WU, J. R., YANG, J. M., CHEN, S. J., CHEN, I. J. Autonomic and sensory cardiovascular activities of nonivamide: intrathecal administration of clonidine. *Brain Res. Bull.* 35. p. 15-22, 1994.

LOREZ, H. P., HAEUSLER, G., AEPPLI, L. Substance P neurones in medullary baroreflex áreas and baroreflex function of capsaicin-treated rats; comparison with other primary afferent systems. *Neuroscience.* 3. p. 507-523, 1983.

LUKOVIC, L., JONG, W., WIED, D. Cardiovascular effects of substance P and capsaicin microinjected into the nucleus tractus solitarii of the rat. *Brain Res.* 422. p. 312-318, 1987.

LUNDBERG, J. M. Pharmacology of co-transmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 48. p. 113-178, 1996.

LUZ, A. I. R., ZOGHBI, M. G. B., RAMOS, L. S. Essential oils of some *Amazonian zingiberaceae*, 3 genera alpinia and rengalmia. *J. Nat. Prod.* 47. p. 907-908, 1984.

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

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.* 12. p. 172-177, 1998a.

MAGALHÃES, P. J. C., CRUZ, G. M. P., BABADOPULOS, R. F. A. L., ALBUQUERQUE, A. A. C., BORGES, G. C. O., CRIDDLE, D. N., LAHLOU, S., PINTO DUARTE, G., LEAL-CARDOSO, J. H. Efeito do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* (OECN) sobre a aorta isolada de ratos normotensos e hipertensos. In. XIII Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brasil. pp. 109, 1998b.

MAGALHÃES, P. J. C. 2002. Estudo farmacológico do óleo essencial do *Croton nepetaefolius* Baill sobre o músculo liso traqueal e vascular e sobre as propriedades eletrofisiológicas de neurônios fásicos de gânglio celiaco. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, CE, Brasil.

MAGALHÃES P. J., LAHLOU S., VASCONCELOS DOS SANTOS M. A., PRADINES T. L., LEAL-CARDOSO J. H. Myorelaxant effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on the contractile activity of the guinea-pig tracheal smooth muscle. *Planta Med.* 69. p. 874-877, 2003

MAGALHÃES P. J., LAHLOU S., LEAL-CARDOSO J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fundam Clin Pharmacol.* 18. p. 539-546, 2004.

MAGGI, C. A., MELI, A. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19. p. 1-43, 1988.

MALINOWSKA, B., KWOLEK, G., GOTHERT, M. Anandamide and methanandamide induce both vanilloid VR1- and CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 364. p. 562-569, 2001.

MÁRQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. *Dor Diagnóstico e Tratamento.* 1. p. 3-10, 2004.

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

MATOS, J. M. D., MATOS, M. E. O, Farmacologia – Curso teórico-prático. Fortaleza, Edições UFC, 1989.

MENDONÇA, V. L. M. 1989 Estudo farmacológico e toxicológico de *Alpinia speciosa* Schum. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

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. 86. p. 93-97, 1991.

MERCK INDEX. An encyclopedia of chemical and drugs. 8 ed., Rahway, 1968.

MEYRELLES, S. S., CABRAL, A. M., VASQUEZ, E. C. Contribuição do reflexo cardiopulmonar na regulação cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 62. p. 123-130, 1994.

MICHELINI, L. C. Regulação momento a momento da pressão arterial na normo e na hipertensão. *Hipertenso*. 3. p. 90-98, 2000.

MONTANARI, I. Plantas medicinais. Campinas-SP-Brasil. www.cpqba.unicamp.br

NAVES, Y. R., ARDIZIO, P., FAVRE, C. Etude sur lês matières végétales volatiles – Isolement et caracterisation du cis anéthole. *Bull. Soc. Chim. France*. 4. p. 566-569, 1958.

NAVES, Y. R. L'anéthole, sés sources et sés emplois. *Parf. Cosm. Savons*. 1. p. 219-221, 1958a.

NAVES, Y. R. Sur la recherche et l'évaluation de l'anéthole cis dans des huiles essentielles et dans des préparations de anéthole. *C. R. Acad. Sci.* 246. p. 1734-1736, 1958b.

NAVES, Y. R., TUCAKOV, J. Presence d'anétholes dans l'essence de fenouil de Yougoslavie. *C. R. Acad. Sci.* 248. p. 843-845, 1959.

NAVES, Y. R. Etude sur les matières végétales volatiles – synthèse du cis anéthole à partir du trans-anéthole. *Helv. Chim. Acta.* 43 p. 230-232, 1960.

OLIVEIRA, A. C., LEAL-CARDOSO, J. H., SANTOS, C. F., MORAIS, S. M., COELHO-DE-SOUZA, A. N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34(11). P. 1471-1474, 2001.

O'NEIL, R. G., BROWN, R. C. The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol. Sci.* 18. p. 226-231, 2003.

POULAT, P., CHAMPLAIN, J., COUTURE, R. Cardiovascular responses to intrathecal neuropeptide gamma in conscious rats: receptor characterization and mechanism of action. *Br. J. Pharmacol.* 117. p. 250-257, 1996.

RAUBENHEIMER, O. Anethole versus oil of Anise. *J. Am Pharm. Ass.* 1. p. 337-342, 1912.

REEH, P. W., KRESS, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1. p. 45-51, 2001.

RYU, S., LIU, B., QIN, F. Low pH potentiates both capsaicin binding and channel gating of VR-1 receptors. *J. Gen. Physiol.* 122. p. 45-61, 2003.

SASAMURA, T., KURAISHI, Y. Peripheral and central actions of capsaicin and VR1 receptor. *Jpn. J. Pharmacol.* 80. p. 275-280, 1999.

SCHELEGLE, E. S., CHEN, A. T., LOH, C. Y. Effects of vagal perineural capsaicin treatment on vagal efferent and airway neurogenic responses in anesthetized rats. *J. Bas. Clin. Physiol. Pharmacol.* 11. p. 1-16, 2000.

SETO, T. A., KEUP, W. Effects of alkylmethoxybenzene and alkylmethylbenzene essential oils on pentobarbital sleeping-time. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 180. p. 232-240, 1969.

SOUSA, P. J. C. 1999 Estudo farmacológico do óleo essencial de *Mentha villosa* e seu principal constituinte, óxido de piperitenona, em músculos lisos gastrintestinais de cobaia e pressão arterial de rato. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

STOJCEV, S. T., ZOLOTOVICH, G., NACHEU, T. Cytotoxic effect of phenols, phenol ethers, furan derivates and oxides isolated from essential oils. *C. R. Acad. Bulg. Sci.* 20. p. 1341-1344, 1967.

SU, D. F., MIAO, C. Y. Arterial baroreflex function in conscious rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 23(8). p. 673-679, 2002.

SUCH, G., JANCSÓ, G. Axonal effects of capsaicin: na electrophysiological study. *Acta Physiol. Hung.* 67. p. 53-63, 1986.

SZALLASI, A. The vanilloid (capsaicin) receptor : receptor type and species differences. *Gen Pharmacol.* 25. p. 223-243, 1994.

SZALLASI, A., BLUMBERG, P. M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51. p. 159-211, 1999.

SZOLCSÁNYI, J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerves fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol.* 73. p. 251-259, 1977.

TANIGUCHI, U. Y., TAKESHITA, K., OGASAWARA, T., KIMURA, K. Enhancement of salivary secretion by chronic anethole trithione treatment. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 294. p. 248-258, 1988.

TOHDA, C., KURAISHI, Y. Visualization of glutamate release from rat spinal cord with a confocal laser scanning microscope. *Neurosci. Res.* 24. p. 183-187, 1996.

TOMINAGA, M., JULIUS, D. Capsaicin receptor in the pain pathway. *Jpn. J. Pharmacol.* 83. p. 20-24, 2000.

UEDA, M., KURAISHI, Y., SATOH, M. Detection of capsaicin-evoked release of glutamate from spinal dorsal horn slices of rat with on-line monitoring system. *Neurosci. Lett.* 155. p. 179-182, 1993.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 19 ed., Rockville, 824p, 1975.

VASQUEZ, E. C., KRIEGER, E. M. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in rat. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 15. p. 377-387, 1997.

VELLANI, V., MAPPLEBECK, S., MORIONDO, A., DAVIS, J. B., MCNAUGHTON, P. A. Protein kinases C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR-1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J. Physiol.* 534. p. 813-825, 2001.

VERBERNE, A. J. M., SAITA, M., SARTOR, D. M. Chemical stimulation of vagal afferent neurons and sympathetic vasomotor tone. *Brain Res. Rev.* 41. p. 288-305, 2003.

VINCENZI, M., SILANO, M., MAIALETTI, F., SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: Estragole. *Fitoterapia.* 71. p. 725-729, 2000.

WADDELL, P. J. & LAWSON, S. N. The C-fibre conduction block caused by capsaicin on rat vagus nerve in vitro. *Pain.* 39. p. 237-242, 1989.

WANG, D. H. The vanilloid receptor and hypertension. *Acta Pharmacol. Sin.* 26. p. 286-294, 2005.

WATSON, R. E., SUPOWIT, S. C., ZHAO, H., KATKI, K. A., DIPETTE, D. J. Role of sensory nervous system vasoactive peptides in hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (9). p. 1033-1045, 2002.

WHARTON, J., GULBENKIAN, S., MULDERRY, P. K., GHATEI, M. A., MCGREGOR, G. P., BLOOM, S. R., POLAK, J. M. Capsaicin induces a depletion of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive nerves in the cardiovascular system of the guinea pig and rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 16. p. 289-309, 1986.

WOOD, J. N., DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 59. p. 457-482, 1997.

YANG, J-M., WU, S-N., CHEN, I-J. Spinal adenosine modulates capsaicin-induced depressor reflex: involvement of adenosine A2 receptor. *Gen. Pharmacol.* 24. p. 961-970, 1993.

YEH, J-L., LO, Y-C., WANG, Y., CHEN, I-J. Cardiovascular interactions of nonivamide, glyceryl nonivamide, capsaicin analogues, and substance P antagonist in rats. *Brain Res. Bull.* 30. p. 641-648, 1993.

ZENG, Z. H., LUO, B. H., GAO, Y. J., SU, C. J., HE, C. C., LI, N., LEE, M. K. W. Arterial structural changes in hypertensive rats induced by capsaicin and salt loading. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 31. p. 502-505, 2004.

ZHANG, H., LIU, Y.X., WU, Y. M., WANG, Z. M., HE, R. R. Capsaicin facilitates carotid sinus baroreceptor activity in anesthetized rats. *Acta Pharmacol Sin.* 25 (11). p. 1439-1443, 2004.

ZONDEX, B., BERGMANN, E. Phenol methyl ethers as oestrogenic agents. *Biochem. J.* 32. p. 641-645, 1938.



Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats

Rodrigo José Bezerra de Siqueira^a, Pedro Jorge Caldas Magalhães^b, José Henrique Leal-Cardoso^c,
Gloria Pinto Duarte^a, Saad Lahlou^{a,*}

^a Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, PE, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Received 3 May 2005; accepted 22 September 2005

Abstract

Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) were investigated in conscious rats. In these preparations, intravenous (i.v.) injections of EOCZ (1–20 mg kg⁻¹) and its main constituents anethole and estragole (both at 1–10 mg kg⁻¹) elicited brief and dose-dependent hypotension and bradycardia (phase I) that were followed by a significant pressor effect associated with a delayed bradycardia (phase II). The initial hypotension and bradycardia (phase I) of EOCZ were unchanged by atenolol (1.5 mg kg⁻¹, i.v.) or L-NAME (20 mg kg⁻¹, i.v.) pretreatment, but were respectively reversed into pressor and tachycardic effects by methylatropine (1 mg kg⁻¹, i.v.) pretreatment. The subsequent pressor effect and the delayed bradycardia (phase II) remained unaffected by atenolol, but were abolished by L-NAME and methylatropine pretreatment, respectively. In rat endothelium-containing aorta preparations, the vasoconstrictor responses to phenylephrine were enhanced and reduced, respectively, by the lower (1–30 µg mL⁻¹) and higher (300–1000 µg mL⁻¹) concentrations of EOCZ. Only the enhancement of phenylephrine-induced contraction was abolished by either the incubation with L-NAME (50 µM) or in the absence of the endothelium. These data show, for the first time, that i.v. administration EOCZ induces an initial hypotension followed by a pressor response, two effects that appear mainly attributed to the actions of anethole and estragole. The EOCZ-induced hypotension (phase I) is mediated by a cholinergic mechanism and seems to result mainly from the concomitant bradycardia. The pressor response of EOCZ (phase II) seems to be caused by an indirect vasoconstrictive action of EOCZ most likely through inhibition of endothelial nitric oxide production.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Anethole; Cardiovascular effects; *Croton zehntneri*; Essential oil; Estragole; Isolated thoracic aorta

Introduction

Croton zehntneri Pax et Hoffm. (Euphorbiaceae) is an abundant aromatic plant in northeastern Brazil, where it is commonly known as “cana de cana”. In folk medicine, infusions or decoctions of leaves from *C. zehntneri* are commonly used to treat anxiety, anorexia, and for the relief of gastrointestinal disturbances (Craveiro et al., 1977; Bata-tinha et al., 1995; Leal-Cardoso and Fonteles, 1999). Furthermore, because *C. zehntneri* is characterized by a strong and pleasant odor reminiscent of anise and clove, extracts of its

bark and leaves are used in perfumes and as sweeteners in foods and in drinks (Craveiro et al., 1977, 1978).

Leaves of *C. zehntneri* have an essential oil content of approximately 2% of the plant dry weight, comprised principally of mono- and sesquiterpenes (Craveiro et al., 1977, 1978). Notwithstanding, little is known about the biological actions of the essential oil of *C. zehntneri* (EOCZ). Previously, the EOCZ and its main constituents, estragole and *trans*-anethole, have been reported to exert antispasmodic effects on guinea-pig isolated ileum (Coelho-de-Souza et al., 1997, 1998), justifying the use of the plant in folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Recently, it has been reported that EOCZ induces an antinociceptive effect in mice, probably through a central nervous system mechanism or by an indirect mechanism such as an anti-inflammatory

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2126 8530; fax: +55 81 2126 8976.

E-mail address: lahlou@ufpe.br (S. Lahlou).

effect (Oliveira et al., 2001). However, there have been no systematic studies of the cardiovascular effects of EOCZ in rats.

The present investigation was undertaken to address this issue and comprises two parts. The first part was performed in conscious rats in order to assess the cardiovascular effects of EOCZ and its main constituents, estragole and anethole, and the role of cholinergic mechanism as well as the endothelial L-arginine/nitric oxide (NO) pathway in the mediation of these effects. The second part was performed in vitro, using rat isolated thoracic aorta, to assess the potential vascular effects of the EOCZ and the influence of either nitric oxide synthase (NOS) inhibition or mechanical removal of endothelium on these effects.

Materials and methods

Plant material

Aerial parts of *C. zehntneri* were collected on May 2003, near the city of Viçosa, State of Ceará, Brazil. The identification of the plants was confirmed by Dr. FJ Abreu Matos (Laboratory of Natural Products, Federal University of Ceará). A voucher specimen (No. 277477) is deposited in the herbarium of Prisco Viana, Federal University of Ceará.

Extraction and chemical analysis

The EOCZ was prepared from freshly chopped leaves by steam distillation and analyzed chemically as previously described (Craveiro et al., 1976). Briefly, analytical conditions were as follows: EOCZ analysis was performed by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS; model 6971; Hewlett-Packard, USA). The column was a dimethyl-polysiloxane DB-1 fused silica capillary column (20 m × 0.25 mm; 0.1 µm), the carrier gas: helium (1 mL min⁻¹), the injector temperature was 250 °C, the detector temperature was 280 °C and the column temperature was 50–180 °C at 4 °C min⁻¹ then 180–250 °C at 20 °C min⁻¹. The mass spectrum was an electronic impact at 70 eV. The composition of EOCZ and the retention indices of their various constituents are given in Table 1. These compounds were identified using a mass spectral library search and [¹³C]-nuclear magnetic resonance spectroscopy (Alencar et al., 1984).

Solutions and drugs

For in vivo experiments, anethole and estragole (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) and EOCZ were dissolved in Tween 80 (2%), brought to the chosen volume with sterile isotonic saline and sonicated just before use. Previous studies showed that this vehicle had no significant effects on either baseline mean aortic pressure (MAP) or heart rate (HR) over a period of 20 min (Lahlou et al., 2002, 2004a,b). Sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) and heparin (Laboratoires Léo SA, Montigny-le-Bretonneux, France) were used as

Table 1

Chemical composition and retention indices of the constituents of the essential oil of *Croton zehntneri* (data bank of the Department of Physics and Chemistry of the State University of Ceará, Brazil)

Compounds	Composition (% of total weight)	Retention indices
α-Pinene	0.38	939
Sabinene	0.29	975
β-Myrcene	0.94	991
1,8-Cineole	1.22	1031
Estragole	45.95	1196
Z-anethole	0.49	1253
E-anethole	42.09	1285
β-Elementene	0.43	1391
trans-Caryophyllene	1.52	1419
γ-Cadinene	1.04	1514
Germacrene-B	4.84	1561
Espatulenol	0.47	1593
Total identified	99.66	

commercially available injectable solutions. Methylatropine bromide, atenolol hydrochloride and L-NAME were purchased from Sigma Chemical, dissolved in saline just before use and administered in volumes of 1 mL kg⁻¹ body weight. For in vitro experiments, EOCZ was prepared directly in Tyrode's solution and sonicated just before use while phenylephrine hydrochloride (Sigma), acetylcholine chloride (Sigma) and verapamil hydrochloride (Sigma) were first dissolved in distilled water and were brought to volume with Tyrode's solution. The perfusion medium used was fresh modified Tyrode solution (pH 7.4) of the following composition (mM): NaCl 136, KCl 5, MgCl₂ 0.98, CaCl₂ 2, NaH₂PO₄ 0.36, NaHCO₃ 11.9, and glucose 5.5.

Animals

Male Wistar rats (280–340 g) were obtained from our local colonies maintained at the Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. They were kept under conditions of constant temperature (22 ± 2 °C) with a 12 h light/12 h dark cycle and free access to food and water. All animals were cared for in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH Publication 85-23, revised 1996).

In vivo experiments

Rats were anesthetized with intraperitoneally injected sodium pentobarbital (50 mg kg⁻¹; supplemented by an additional 15 mg kg⁻¹ when necessary) and catheters (PE-10 fused to PE-50) were implanted in the abdominal aorta (for the recording of arterial blood pressure) and in the inferior vena cava (for drug administration) through the left femoral artery and vein, respectively. These catheters, filled with heparin-saline solution (125 IU mL⁻¹), were exteriorized at the dorsal neck level. Postoperatively, the rats were housed individually in plastic cages (40 × 32 × 16 cm) and allowed to recover for 24–48 h before any circulatory experiments. At the time of an experiment (10.00 am–1.00 pm), the arterial catheter was

connected to a blood pressure transducer (Statham P23ID) coupled to a polygraph recorder; HR was obtained from a cardiometer triggered by the pressure pulses. Both signals were recorded on a Gilson model 5/6H polygraph (Medical Electronics Inc., Middletown, WIS, USA). The MAP was calculated as diastolic + [(systolic – diastolic)/3]. Cardiovascular responses were performed 1 h after the rats were transported to an isolated and quiet room. Rats remained in their resident cage but the top grid was removed and they had no more access to the food and water during the whole recording period. Only one compound alone or associated with an antagonist was administered to any individual animal per day. All the following experiments were performed in conscious, freely moving rats.

Series 1 This series of experiments was carried out to establish a dose–effect relationship. After stable MAP and HR were obtained, each rat received a series of increasing bolus (100 μ L) doses of EOCZ (1–20 mg kg^{−1}, $n=9$), anethole (1–10 mg kg^{−1}, $n=8$) or estragole (1–10 mg kg^{−1}, $n=6$) via the i.v. catheter, and the time-course of the changes in MAP and HR was recorded. When subsequent doses of EOCZ, anethole or estragole were administered, MAP and HR were first allowed to return to respective baseline levels.

Series 2 The time-course of changes in MAP and HR elicited by i.v. injections of EOCZ (1–20 mg kg^{−1}) were determined in rats which had been pretreated intravenously 10 min earlier with one of the following pretreatments: vehicle (1 mL kg^{−1}, $n=9$), or methylnatropine (1 mg kg^{−1}, $n=6$) (Vasquez and Krieger, 1997), atenolol (1.5 mg kg^{−1}, $n=5$) or L-NAME (20 mg kg^{−1}, $n=7$) (Boussairi and Sassard, 1994). Each rat received increasing bolus doses as described above. Doses of antagonists were chosen according to those recommended in the literature.

In vitro experiments

Rats were stunned and then exsanguinated. Thoracic aortae were removed and immersed in perfusion medium at room temperature. After removing adhering fat and connective tissue, the aorta was cut into cylindrical strips (1 × 5 mm), which were suspended in a 10-mL organ baths containing continuously aerated (95% O₂ and 5% CO₂) perfusion medium at 37 °C (pH 7.4). Strips were stretched with a passive tension of 0.5 g and tension was recorded using an isometric transducer (Grass Model FT03, Quincy, MA, USA) connected to a PC-based Dataq acquisition system (PM-100, CWE Inc., Akron, OH, USA). After an equilibration period of 60 min, control contractions were induced by adding 60 mM potassium chloride to the bath. When two successive control contractions showed similar amplitude, preparations were considered to be equilibrated. In order to assess the effects of EOCZ on phenylephrine-induced contraction, preparations were exposed to increasing concentrations (1–1000 μ g mL^{−1}, $n=6$) of EOCZ during 5-min period once a sustained contraction

elicited by a submaximal concentration (3 μ M) of phenylephrine was established.

In order to examine whether the vascular responses to EOCZ is an endothelium/NO dependent effect, the vascular effects of EOCZ (1–1000 μ g mL^{−1}) were determined in preparations without endothelium ($n=7$) or in endothelium-containing preparations incubated with L-NAME (50 μ M, $n=6$) 10 min prior to addition of phenylephrine. The endothelium was removed immediately after dissection by gentle rubbing of the aortic lumen with a stainless steel wire. Each endothelium-containing or endothelium-denuded preparation was challenged at the beginning of the experiment with 1 μ M of acetylcholine. The absence of acetylcholine-induced vasorelaxant effects was taken as evidence that the preparation was effectively stripped of endothelium. Contractions data were expressed as a percentage of the phenylephrine-induced contraction.

Statistical analysis

All the results are expressed as mean ± SEM. Maximal changes (expressed as a percentage of baseline values) in MAP and HR after each dose of the EOCZ, anethole or estragole, were used to construct a dose–response curve. The IC₅₀ value, defined as the EOCZ concentration (μ g mL^{−1}) required to produce half maximum reduction of phenylephrine-induced contraction, was used to evaluate vascular sensitivity to EOCZ. It was calculated by interpolation from semi-logarithmic plots, and expressed as geometric means [95% confidence interval]. The significance ($P<0.05$) of the results was assessed by means of paired and unpaired Student's *t*-tests, and one- or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparison tests when appropriate.

Results

In vivo experiments

In conscious rats, average baseline values of MAP and HR before any treatment were 119 ± 2 mm Hg and 364 ± 5 beats/min, respectively (pooled data from 50 rats). There was no significant change in either MAP or HR after the i.v. administration of vehicle as well as EOCZ, anethole and estragole at the dose of 1 mg kg^{−1} (Fig. 1). However, increasing i.v. bolus doses of EOCZ (5, 10 and 20 mg kg^{−1}), anethole (5 and 10 mg kg^{−1}) or estragole (5 and 10 mg kg^{−1}) evoked immediate and dose-dependent decreases in MAP and HR (Fig. 1). These effects occurred within about 4–8 s after the injection of EOCZ, anethole and estragole and became significant at the dose of 5 mg kg^{−1} (Fig. 1).

At the higher doses (5 and 10 mg kg^{−1}) of anethole and estragole and the higher ones (10 and 20 mg kg^{−1}) of EOCZ, the initial pronounced hypotension and bradycardia (phase I) were followed by a significant pressor response associated with a second period of bradycardia (phase II), which peaked at 15–30 s after injection. For both EOCZ and anethole, the pressor component and the delayed bradycardia lasted for about 3–5

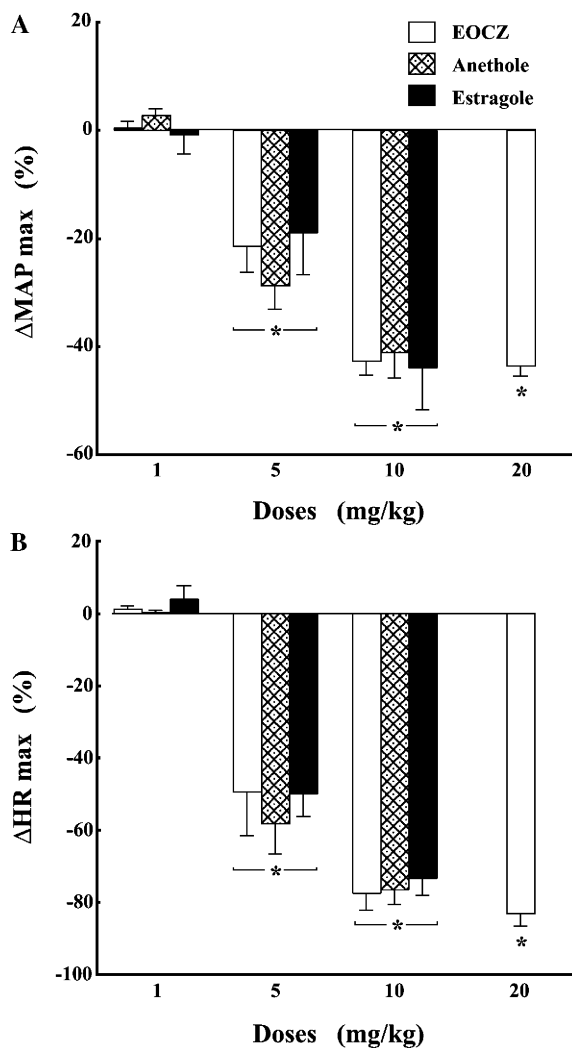


Fig. 1. Maximal decreases in mean aortic pressure (Δ MAP max, A) and heart rate (Δ HR max, B) elicited by intravenous (i.v.) injections of increasing bolus doses of essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ; 1–20 mg kg⁻¹) (group 1), anethole (1–10 mg kg⁻¹) (group 2) and estragole (1–10 mg kg⁻¹) (group 3) in conscious, freely moving rats. Values are means of changes expressed as a percentage of baseline values. Vertical bars indicate SEM (6–9 rats per group). Baseline MAP (mm Hg) and heart rate (beats min⁻¹) were 120±3 and 362±12, respectively in group 1, 120±4 and 368±18, respectively in group 2, and 118±3 and 374±21, respectively in group 3. The initial hypotension and bradycardia responses (phase I) are correlated to the dose of EOCZ, anethole and estragole. ANOVA $P < 0.001$ among absolute values and $*P < 0.05$ by Dunnett's a posteriori test with respect to basal values.

and 5–10 min, respectively. However, at both 5 and 10 mg kg⁻¹, the estragole-evoked pressor component lasted only for about 15 s, while the second period of bradycardia was observed only for the highest dose (10 mg kg⁻¹) of estragole and remained statistically significant during a 5-min recording period. Fig. 2 shows the time-course of the pressor component and the delayed bradycardia (phase II) elicited by EOCZ, anethole and estragole, all administered at 10 mg kg⁻¹ of body weight.

The dose-dependent initial decreases in MAP and HR (phase I) elicited by EOCZ were not only abolished (Fig. 3) by methylatropine pretreatment (1 mg kg⁻¹, i.v.), but reversed into

a significant and dose-dependent (Fig. 3) pressor and tachycardiac effects, respectively. The same pattern of responses was observed for anethole and estragole in rats pretreated with methylatropine. Thus, in the latter animals, maximal percent increases in MAP and HR elicited by anethole (10 mg kg⁻¹, i.v.) ($n = 5$) were 49.1±7.9% and 15.7±4.5%, respectively, and 34.1±9.1% and 16.1±8.1% for those elicited by estragole (10 mg kg⁻¹, i.v.) ($n = 4$).

However, neither hypotensive nor bradycardic response induced by EOCZ during phase I was significantly affected by atenolol (1.5 mg kg⁻¹, i.v.) or L-NAME (20 mg kg⁻¹, i.v.) pretreatment (Fig. 3). While the subsequent pressor effect associated with the delayed bradycardia (phase II) evoked by EOCZ (10 and 20 mg kg⁻¹) remained unaffected by atenolol pretreatment, both were completely and respectively abolished

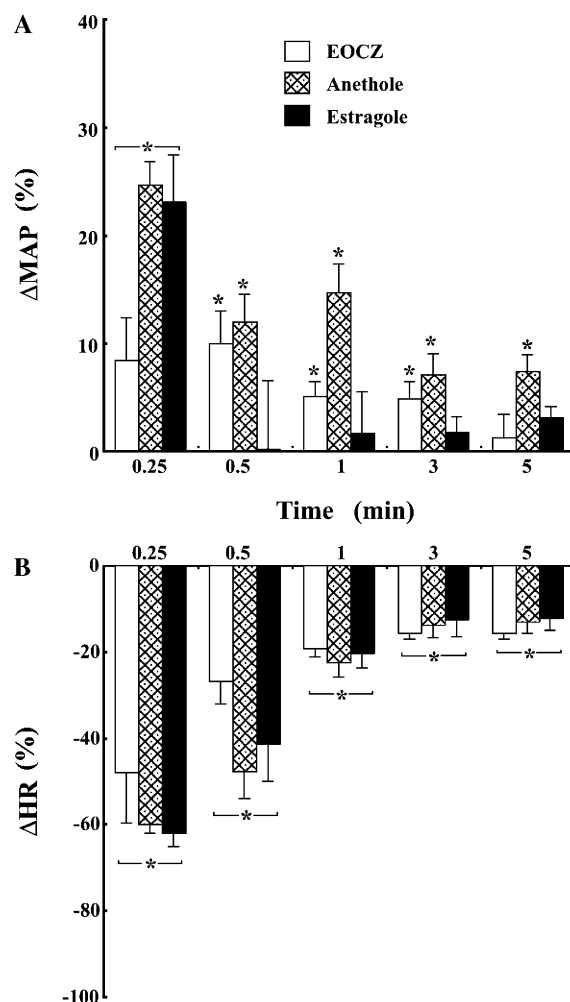


Fig. 2. Time-course of the increase in MAP (A) and the decrease in heart rate (HR) (B) (phase II, subsequent to the phase I) elicited by i.v. administration of a bolus dose (10 mg kg⁻¹) of essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) (group 1), anethole (10 mg kg⁻¹) (group 2) and estragole (10 mg kg⁻¹) (group 3) in conscious, freely moving rats. Values are means of changes expressed as a percentage of baseline values. Vertical bars indicate SEM (6–9 rats per group). For baseline parameter values see details in Fig. 1. ANOVA $P < 0.001$ among absolute values and $*P < 0.05$ by Dunnett's a posteriori test with respect to basal values.

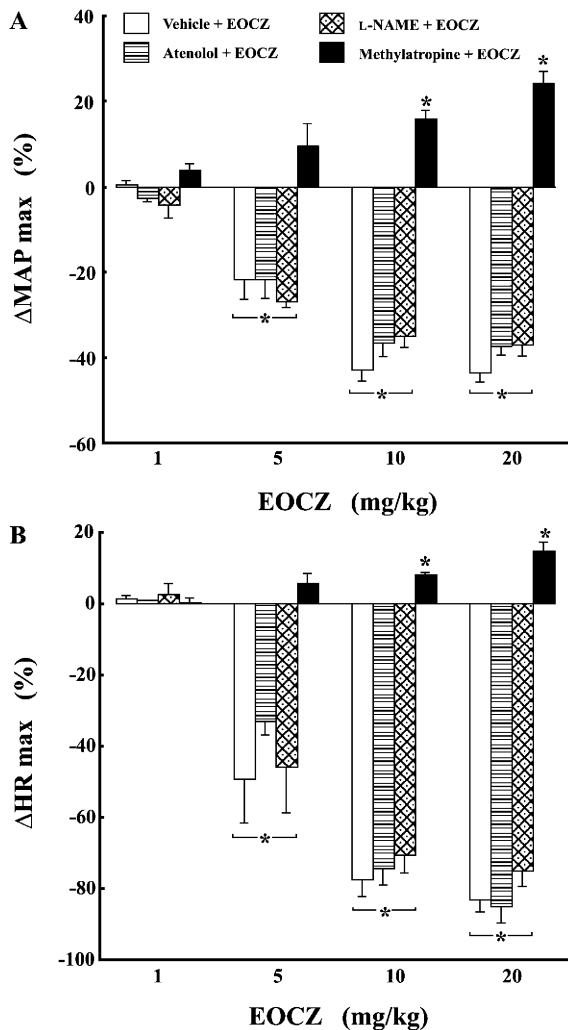


Fig. 3. Maximal decreases in mean aortic pressure ($\Delta\text{MAP max}$, A) and heart rate (HR max , B) elicited by increasing bolus doses (1–20 mg kg^{-1} , i.v.) of essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) in conscious rats subjected to i.v. pretreatment with vehicle (1 mL kg^{-1}) (group 1), atenolol (1.5 mg kg^{-1}) (group 2), L-NAME (20 mg kg^{-1}) (group 3) or methylatropine (1 mg kg^{-1}) (group 4). Values are means of changes expressed as a percentage of baseline values. Vertical bars indicate SEM (5–9 rats per group). Baseline MAP (mm Hg) and HR (beats min^{-1}) were 120 ± 3 and 362 ± 12 , respectively in group 1, 116 ± 6 and $320 \pm 15^\psi$, respectively in group 2, $162 \pm 5^\psi$ and $260 \pm 17^\psi$, respectively in group 3, and, 123 ± 4 and $433 \pm 10^\psi$, respectively in group 4. ANOVA $P < 0.001$ among absolute values and $*P < 0.05$ by Dunnett's *a posteriori* test with respect to basal values. $^\psi P < 0.05$ by paired Student's *t*-test with respect to pre-injection values.

by L-NAME and methylatropine pretreatment (Fig. 4). Interestingly, in L-NAME-pretreated rats, the pressor component of EOCZ (10 and 20 mg kg^{-1}) during phase II was actually reverted into a fall in blood pressure, which was statistically significant only at 3 and 5 min after giving the highest dose of EOCZ (20 mg kg^{-1}) (Fig. 4).

In vitro experiments

In rat endothelium-containing isolated aorta preparations, the vasoconstrictor responses to phenylephrine were enhanced by the lower concentrations (1, 3, 10 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of

EOCZ. However, this enhancement was statistically significant only at 10 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of EOCZ (Fig. 5). By contrast, at the higher concentrations (300–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), EOCZ inhibited the phenylephrine-induced contractions in a concentration-dependent manner (Fig. 5).

The enhancement of phenylephrine-induced contraction by EOCZ was completely abolished by the mechanical removal of endothelium or the incubation of endothelium-containing aorta preparations with L-NAME (50 μM) (Fig. 5). However, the IC_{50} (geometric mean $\pm 95\%$ confidence interval) values for EOCZ-induced reduction of phenylephrine-induced contractions in preparations with intact endothelium (185.6 [123.1–273.9] $\mu\text{g mL}^{-1}$) were not statistically ($P > 0.05$) different from those in endothelium-denuded preparations (165.3 [96.9–282] $\mu\text{g mL}^{-1}$) or in preparations with intact

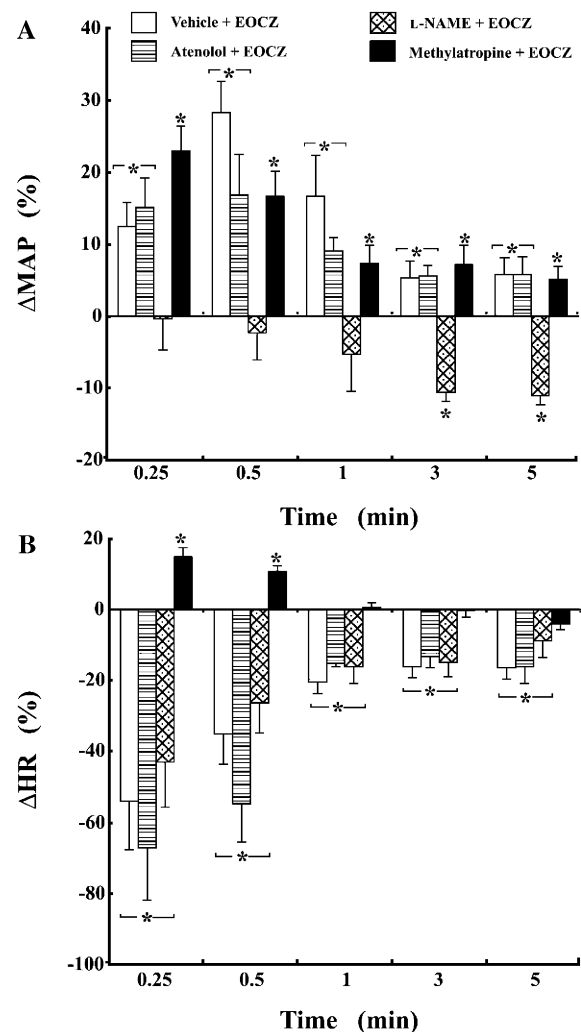


Fig. 4. Time-course of the changes in MAP (A) and heart rate (HR) (B) (phase II, subsequent to the phase I elicited by i.v. administration of a bolus dose (20 mg kg^{-1}) of essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) in conscious rats subjected to i.v. pretreatment with vehicle (1 mL kg^{-1}) (group 1), atenolol (1.5 mg kg^{-1}) (group 2), L-NAME (20 mg kg^{-1}) (group 3) or methylatropine (1 mg kg^{-1}) (group 4). Values are means of changes expressed as a percentage of baseline values. Vertical bars indicate SEM (6–9 rats per group). For baseline parameter values see details in Fig. 3. ANOVA $P < 0.001$ among absolute values and $*P < 0.05$ by Dunnett's *a posteriori* test with respect to basal values.

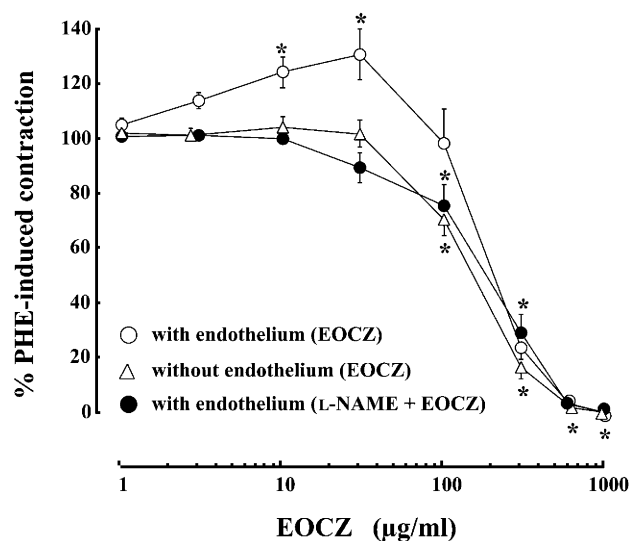


Fig. 5. Effects of increasing concentrations ($1-1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) of the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) on the contraction induced by phenylephrine (PHE) in rat isolated thoracic aortae with (open circles, $n=6$) or without functional endothelium (solid circles, $n=7$) or in endothelium-containing aortae pre-incubated with L-NAME ($50 \mu\text{M}$) (open triangles, $n=6$). Vertical bars indicate SEM. ANOVA $P < 0.001$ among absolute values and $*P < 0.05$ by Dunnett's a posteriori test with respect to basal values.

endothelium incubated with L-NAME ($149.6 [120.8-185.2] \mu\text{g mL}^{-1}$).

Discussion

Baseline MAP and HR values of conscious normotensive rats were of the same order of magnitude as those previously reported in the same preparation (Lahlou et al., 2002, 2004a,b). In this study, i.v. administration of EOCZ and its main constituents anethole and estragole induced biphasic changes in blood pressure and two periods of bradycardia. Initially a rapid bradycardia (onset time of 4–8 s) occurred coincidentally with an arterial hypotension (phase I) and then, an increase in blood pressure was associated with a second, more lasting bradycardia (phase II). To the best of our knowledge, this is the first time that such cardiovascular effects of EOCZ, anethole and estragole have been reported in normotensive, conscious rats.

Cardiovascular effects of EOCZ can be attributed in part to the actions of anethole (42% of essential oil weight) and in part to the actions of estragole (46% of essential oil weight), which are the two main constituents of EOCZ (Table 1). The following lines of evidence support such a conclusion. First, the magnitude and time-course of the changes in MAP and HR elicited by both anethole and estragole (5 and 10 mg kg^{-1}) are very close to those observed with the same doses of EOCZ. Second, in methylatropine-pretreated rats, the maximal hypotensive and bradycardic effects (phase I) evoked by these constituents were also abolished and reversed into pressor and tachycardic effects, respectively, as was observed with EOCZ. Such a partial contribution of these constituents has been previously advanced for the antispasmodic (Coelho-de-Souza et al., 1997), antinociceptive (Oliveira et al., 2001) and skeletal

muscle (Albuquerque et al., 1995) effects of EOCZ. However, a possible participation of other minor constituents, besides anethole and estragole, in the mediation of cardiovascular effects of EOCZ cannot be excluded. Furthermore, it seems unlikely that the latter effects could be related to a toxic effect of this essential oil. In fact, the value for oral acute toxicity LD_{50} of EOCZ was found greater than 2500 mg kg^{-1} (Coelho-de-Souza et al., 1998; Oliveira et al., 2001).

The initial hypotensive and bradycardic responses (phase I) to EOCZ were not only abolished by the peripheral muscarinic receptor antagonist, methylatropine, but reversed into significant pressor and tachycardic effects, respectively. This may indicate that a peripheral cholinergic mechanism is involved in the mediation of these effects. The initial bradycardia elicited by EOCZ appears independent of an operational sympathetic nerve drive to the heart since it remained unaffected by pretreatment with the selective β_1 -adrenoceptor antagonist atenolol. However, this response seems to result from cardiac M_2 -muscarinic receptor stimulation. This stimulation could result from a direct effect of EOCZ on (i) the cardiac M_2 -muscarinic receptors, (ii) the intracardiac ganglia, known to modulate the activity of the pacemaker cells of the sinoatrial node (Gray et al., 2004), and/or (iii) the brainstem (given its high liposolubility, EOCZ can easily cross the blood–brain barrier) leading to activation of vagal cholinergic efferents. It is well known that acetylcholine causes generalized vasodilatation, which is an indirect effect mediated by released NO from vascular endothelial cells (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vanhoutte et al., 1995). The muscarinic receptor mediating relaxation of vascular smooth muscle, through released NO, is the M_3 subtype (Eglen et al., 1991). It might have suggested that the initial hypotension elicited by EOCZ have been related to vasodilatation mediated by an endothelial L-arginine/NO pathway through peripheral muscarinic receptor activation. However, such a possibility seems unlikely since (i) the present in vitro findings show that vasorelaxant effects of EOCZ (at higher concentrations) are mediated by an endothelium-independent mechanism, as they were unaffected after the blockade of endothelial function by removal of endothelium or pretreatment with L-NAME, and (ii) the initial hypotensive response to EOCZ remained unchanged by i.v. pretreatment with L-NAME.

It is noteworthy that the initial cardiovascular responses to EOCZ showed rapid and similar time of latency, and were simultaneously blocked by methylatropine. This may raise the possibility that EOCZ can also stimulate primary sensory vagal afferents from the heart or the lungs to elicit vago-vagal reflex decreases in HR and blood pressure (McQueen et al., 1998). Experiments using several pretreatments are presently underway to assess the precise mechanism of the phase I cardiovascular responses to EOCZ. At the present moment, we did not find any clue for the origin of the tachycardia response to EOCZ after blocking the cardiac M_2 -muscarinic receptors. This tachycardia could be related to the actions of other constituents present in the essential oil. However, this explanation is less plausible since anethole and estragole (which represent 88% of essential oil weight) also evoked a

tachycardia response in methylatropine-pretreated rats, the magnitude of which was similar to that evoked by EOCZ. The precise origin for such an effect of the EOCZ also requires further investigation.

An attempt was made to determine the mechanism underlying the second phase of the EOCZ-induced cardiovascular responses. We found that the latter responses remained unaffected by atenolol pretreatment indicating that they are unrelated to mechanisms involving cardiac β_1 -adrenoceptors. The delayed bradycardia was fully prevented by methylatropine pretreatment, an effect suggestive of cardiac M_2 -muscarinic receptor stimulation. It remains, however, to determine whether the initial and the second bradycardia responses (phase I and II, respectively) of EOCZ are mediated through the same mechanism. Interestingly, the increase in MAP evoked by EOCZ was completely abolished and even reversed into a hypotension by L-NAME pretreatment. It seems unlikely that such an abolition in L-NAME-pretreated rats is due to the higher baseline MAP in these animals since i.v. injection of EOCZ also induces significant increases in MAP (phase II) in conscious DOCA-salt hypertensive rats treated with EOCZ (personal data). Therefore, it was postulated that EOCZ is likely to inhibit NO production and/or release through an action upon vascular endothelium, leading to an increase in blood pressure (phase II).

To corroborate this hypothesis we examined the vascular effects of the EOCZ and the influence of either NOS inhibition or mechanical removal of endothelium on these effects. We found that EOCZ caused different effects on vascular smooth muscle function depending on the concentration investigated, as was observed for the intestinal smooth muscle effects of EOCZ (Coelho-de-Souza et al., 1997). In rat endothelium-containing aorta preparations, the vasoconstrictor responses to phenylephrine were significantly enhanced by EOCZ at 10 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This potentiation is abolished either in the endothelium-denuded rings or in the presence of L-NAME, suggesting that endothelium is likely a target for EOCZ-induced vasoconstrictor action. These observations support our hypothesis that EOCZ may latterly inhibit endothelial NO production and/or release (phase II). Whether EOCZ is directly interacting with the endothelial NOS (e-NOS) or with other factors, which may inhibit the e-NOS activity remains to be further investigated.

At the higher concentrations (300–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), EOCZ induced significant and dose-dependent reduction of the phenylephrine-induced contractions, an effect that was unaffected by the endothelium removal or L-NAME pretreatment. It is possible that this direct endothelium-independent vasorelaxant effect counteracts with the potentiation of phenylephrine vasoconstriction. When injected intravenously at higher doses, EOCZ may induce a delayed hypotension due to its direct vasorelaxant effects. However, this delayed hypotension seems to be buffered by the pressor effect of EOCZ (phase II). This suggestion is supported by the finding that i.v. pretreatment with L-NAME did not only abolish the pressor response (phase II) elicited by the highest dose of EOCZ (20 mg/kg, i.v.), but reverted it into a significant hypotensive response (Fig. 4). It

has been previously shown that EOCZ (at concentrations $>10 \mu\text{g mL}^{-1}$) exerts an antispasmodic effect on isolated ileum of the guinea-pig (Coelho-de-Souza et al., 1997), possibly explaining the use of this plant in the treatment of gastrointestinal disorders (Craveiro et al., 1977). This effect is not related to a modulation of neuronal activity but likely to a direct action on smooth muscle, probably through a blockade of calcium influx or release from storage sites, a decrease in sensitivity to intracellular calcium of the contractile mechanism and/or a direct interference with the contractile proteins (Coelho-de-Souza et al., 1997). It could be possible to have such effect on vascular smooth muscle, although whether higher concentrations EOCZ could induce such intracellular events still requires further investigation.

We cannot totally exclude any contribution of baroreceptor reflex in the mediation of the delayed cholinergic bradycardia elicited by EOCZ and its main constituents, which is usually correlated with an increase in MAP (phase II) subsequent to the blockade of e-NOS. However, the following arguments make this possibility less plausible. First, it has been reported that in mice lacking the e-NOS gene, NOS inhibitors such as L-NAME no longer elicit an increase in blood pressure but still cause profound bradycardia (Kojda et al., 1999). Secondly, in the present study, pretreatment with i.v. L-NAME fully abolished the increase in MAP evoked by EOCZ without affecting the delayed bradycardia. Finally, although the increase in MAP elicited by estragole (5 and 10 mg kg^{-1}) was very transient, the second bradycardia was observed only for the highest dose (10 mg kg^{-1}) of estragole and remained statistically significant during a 5-min recording period. These findings point to independent mechanisms for EOCZ-induced pressor effect and delayed bradycardia (phase II) and preclude any possibility that the EOCZ-induced delayed bradycardia resulted from the concomitant increase in MAP through an activation of the baroreflex.

In conclusion, the present study demonstrated that i.v. treatment of normotensive conscious rats with EOCZ induces an initial fall in blood pressure followed by a pressor response, two effects that appear mainly attributable to the actions of anethole and estragole, the main constituents of EOCZ. The initial EOCZ-induced hypotension (phase I) is mediated by a cholinergic mechanism and seems to result reflexly from the concomitant pronounced bradycardia. The subsequent pressor response of EOCZ (phase II) seems to result from an indirect vasoconstriction action of EOCZ most likely through inhibition of endothelial NO production. The latter hypothesis is supported by the in vitro findings that phenylephrine-induced contractions on rat aorta were enhanced by lower concentrations of EOCZ, an effect that was abolished in the endothelium-denuded rings or under blockade of NOS with L-NAME. The present in vivo and in vitro findings are the first reported pharmacological effects of EOCZ on the cardiovascular system.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Selene Maia de Morais (Department of Physics and Chemistry, State University of Ceará, Brazil) for

kindly providing us with EOCZ, and to Mr. Nilson Vieira Pinto for his technical assistance. This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (Edital Universal and Pronex) and the Federal University of Pernambuco (UFPE). RJB de Siqueira is a MSc fellow.

References

- Albuquerque, A.A., Sorenson, A.L., Leal-Cardoso, J.H., 1995. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 41–49.
- Alencar, J.W., Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., 1984. Kovats indices as a pre-selection routine in mass spectra library search of volatiles. *Journal of Natural Products* 47, 890–892.
- Batatinha, M.J.M., de Souza-Spinosa, H., Bernadi, M.M., 1995. *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 45, 53–57.
- Boussairi, E.H., Sassard, J., 1994. Cardiovascular effects of basic fibroblast growth factor in rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 23, 99–102.
- Coelho-de-Souza, A.N., Barata, E.L., Magalhães, P.J.C., Lima, C.C., Leal-Cardoso, J.H., 1997. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytotherapy Research* 11, 299–304.
- Coelho-de-Souza, A.N., Criddle, D.N., Leal-Cardoso, J.H., 1998. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. *Phytotherapy Research* 12, 189–194.
- Craveiro, A.A., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., 1978. Anise-like flavour of *Croton aff zehntneri* Pax. Et Hoffm. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26, 772–773.
- Craveiro, A.A., Fernandes, A.G., Andrade, C.H.S., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., 1977. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciência e Cultura* 29, 445 (Abstract).
- Craveiro, A.A., Matos, F.J.A., Alencar, J.W., 1976. Simple and inexpensive steam-generator for essential oils extraction. *Journal of Chemical Investigation* 53, 562 (Abstract).
- Eglen, R.M., Hedge, S.S., Watson, N., 1991. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacological Review* 43, 109–142.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial-cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Gray, A.L., Johnson, T.A., Ardell, J.L., Masari, V.J., 2004. Parasympathetic control of the heart: II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate. *Journal of Applied Physiology* 96, 2273–2278.
- Kojda, G., Laursen, J.B., Ramasary, S., Kent, J.D., Kurz, S., Burchfield, J., Shesely, E.G., Harrison, D.G., 1999. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovascular Research* 42, 206–213.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhães, P.J.C., Leal-Cardoso, J.H., 2002. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80, 1125–1130.
- Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhães, P.J.C., Leal-Cardoso, J.H., Duarte, G.P., 2004a. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. *Life Sciences* 74, 2401–2412.
- Lahlou, S., Interaminense, L.F.L., Leal-Cardoso, J.H., Morais, S.M., Duarte, G.P., 2004b. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in rats: role of the autonomic nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31, 219–225.
- Oliveira, A.C., Leal-Cardoso, J.H., Santos, C.F., Morais, S.M., Coelho-de-Souza, A.N., 2001. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Sciences* 34, 1471–1474.
- Leal-Cardoso, J.H., Fonteles, M.C., 1999. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 71, 207–213.
- McQueen, D.S., Bond, S.M., Moores, C., Chessell, I., Humphrey, P.P.A., Dowd, E., 1998. Activation of P2X receptors for adenosine triphosphate evokes cardiorespiratory reflexes in anaesthetized rats. *Journal of Physiology* 507, 843–855.
- Vasquez, E.C., Krieger, E.M., 1997. Decreased chronotropic responses to adrenergic stimulation following sinoaortic denervation in rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Sciences* 15, 377–387.
- Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M., Mombouli, J.V., 1995. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *American Journal of Cardiology* 76, E3–E12.

ROLE OF CAPSAICIN-SENSITIVE SENSORY NERVES IN MEDIATION OF THE CARDIOVASCULAR EFFECTS OF THE ESSENTIAL OIL OF *CROTON ZEHNTNERI* LEAVES IN ANAESTHETIZED RATS

RJB de Siqueira,* JH Leal-Cardoso,[†] R Couture[‡] and S Lahlou*

*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, [†]Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil and [‡]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

SUMMARY

1. The essential oil of *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. (EOCZ) contains anethole (42%) and estragole (46%), two isomers that share some chemical structural similarities with capsaicin. The present study investigated the cardiovascular effects of EOCZ and the role of capsaicin-sensitive sensory nerve fibres in the mediation of these effects in anaesthetized rats.

2. Intravenous bolus injection of EOCZ (1–20 mg/kg) elicited dose-dependent hypotension and bradycardia that were immediate and transient. Similar responses were also observed with anethole and estragole (both at 10 mg/kg). After cervical bivagotomy or perineural treatment of both cervical vagus nerves with capsaicin (250 µg/mL) to selectively block the conduction of sensory C-fibres, both cardiovascular responses to EOCZ (10 mg/kg) were abolished.

3. Like capsaicin, an epigastric retrograde intra-arterial injection of EOCZ (10 mg/kg, i.a.) into the femoral artery elicited a monophasic hypotensive response. This reflex response was blocked by either neonatal pretreatment with capsaicin (50 mg/kg, s.c.) or intrathecal injection of the substance P receptor antagonist RP 67580 (7.8 nmol, at the spinal level L5–L6), suggesting that it is mediated exclusively by substance P-containing primary afferent fibres.

4. The cardiovascular responses to EOCZ (10 mg/kg, i.v.) were also significantly reduced by the selective vallinoid TPRV1 receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.).

5. It is concluded that i.v. administration of EOCZ in anaesthetized rats elicits a capsaicin-like bradycardic and depressor reflex, which appears to be mediated by the activation of vallinoid TPRV1 receptors located on vagal sensory nerves. Like capsaicin, i.a. injection of EOCZ induces a spinally mediated sensory reflex.

Key words: anethole, *Croton zehntneri*, essential oil, estragole, perineural capsaicin treatment, sensory C-fibres, vagal and spinal reflexes, vallinoid receptors.

INTRODUCTION

Croton zehntneri Pax et Hoffm. (Euphorbiaceae) is an aromatic plant abundant in north-eastern Brazil, where it is commonly known as *canella de cunhã*. In folk medicine, infusions or decoctions of leaves from *C. zehntneri* are commonly used to treat anxiety, anorexia and for the relief of gastrointestinal disturbances.^{1–3} Furthermore, because *C. zehntneri* is characterized by a strong and pleasant odour reminiscent of anise and cloves, extracts of its bark and leaves are used in perfumes and as sweeteners in foods and drinks.^{1,4}

Leaves of *C. zehntneri* have an essential oil content of approximately 2% of the plant dry weight, comprised principally of mono- and sesquiterpenes.^{1,4} Little is known about the biological actions of the essential oil of *C. zehntneri* (EOCZ). Previously, EOCZ and its main constituents, estragole and anethole, have been reported to exert antispasmodic effects on guinea-pig isolated ileum,^{5,6} justifying the use of the plant in folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Recently, it has been reported that EOCZ induces an antinociceptive effect in mice, probably through a central nervous system (CNS) mechanism or by an indirect mechanism that could be an anti-inflammatory effect.⁷

Capsaicin, the pungent ingredient present in a variety of red peppers of the genus *Capsicum*, is known to activate primary sensory C-fibres,^{8,9} but results in their destruction when administered systemically to neonatal rats.^{10–12} Capsaicin-sensitive sensory nerves are widely distributed in the cardiovascular system, being found in the heart and in the adventitia of many blood vessels.^{13,14} Capsaicin-sensitive sensory nerves, both central and peripheral, release a number of neurotransmitters, mostly substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP), when activated by a variety of chemical substances, including capsaicin, that act on vallinoid TPRV1 receptors.^{8,15–19} By their afferent endings, capsaicin-sensitive sensory nerves relay the information to the CNS to initiate an autonomic reflex. At various end organs, neurotransmitters released from their efferent endings evoke neurogenic inflammatory responses, including arterial vasodilation and plasma protein extravasation.^{8,16,17}

The two main constituents of the sample EOCZ used in the present study, estragole (46% of essential oil weight) and *trans*-anethole (42% of essential oil weight), share some structural similarities with capsaicin and, thus, may evoke a reflex fall in blood pressure similar to that elicited by capsaicin administered intravenously (i.v.) or intra-arterially (i.a.) into the hindlimb in rats.^{20–24} Therefore, the aim of the present study was to investigate the cardiovascular responses following i.v. administration of EOCZ, anethole and estragole in

Correspondence: Dr Saad Lahlou, Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, Pernambuco, PE, Brazil. Email: lahlou@ufpe.br

Received 1 June 2004; revision 14 October 2005; accepted 25 October 2005.

© 2006 Blackwell Publishing Asia Pty Ltd

anaesthetized rats and to assess the role of capsaicin-sensitive sensory nerves in the mediation of EOCZ-induced cardiovascular changes. Furthermore, cardiovascular responses to an epigastric retrograde i.a. injection of EOCZ into the femoral artery were determined.

METHODS

Plant material

Aerial parts of *C. zehntneri* were collected in May 2003, near the city of Viçosa, Ceará, Brazil. Plant identification was confirmed by Dr FJ Abreu Matos (Laboratory of Natural Products, Federal University of Ceará). A voucher specimen (No. 277477) is deposited in the herbarium of Prisco Viana, Federal University of Ceará.

Extraction and chemical analysis

The EOCZ was prepared from freshly chopped leaves by steam distillation and was analysed chemically as described previously.²⁵ Briefly, the analytical conditions were as follows: EOCZ analysis was performed by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS; model 6971; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The column was a dimethylpolysiloxane DB-1 fused silica capillary column (20 m × 0.25 mm; 0.1 µm), the carrier gas was helium (1 mL/min), the injector temperature was 250°C, the detector temperature was 280°C and the column temperature was 50–180°C at 4°C/min then 180–250°C at 20°C/min. The mass spectra was an electronic impact at 70 eV. The composition of EOCZ and the Kovats indices of its various constituents are given in Table 1. These compounds were identified using a mass spectral library search and [¹³C]-nuclear magnetic resonance spectroscopy.²⁶

Solutions and drugs

Anethole, estragole (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) and EOCZ were dissolved in Tween 80 (2%), brought to the chosen volume with sterile isotonic saline and sonicated just before use. Previous studies have shown that i.v. injection of this vehicle has no significant effect on either mean arterial pressure (MAP) or heart rate (HR) over a period of 20 min.^{27–29} Sodium pentobarbital (Sanofi, Libourne, France) and heparin (Laboratoires Léo SA, Montigny-le Bretonneux, France) were used as commercially available injectable solutions. Capsaicin (Sigma) was used for the perineural treatment of the vagus at a concentration of 250 µg/mL and was prepared in 1% Tween 80, 1% ethanol and 98% saline. For i.v. injection, a solution of capsaicin at the desired concentration was prepared daily by dilution with saline on the

basis of an animal's bodyweight. Capsazepine (Tocris, Ballwin, MO, USA) was first diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO; Sigma) to 0.1 mol/L and further diluted with saline containing 10% Tween 80 and 10% ethanol to a final concentration of 1 mg/mL. RP 67580 (Tocris) was first diluted in DMSO and further diluted in saline to the desired concentration. For intrathecal (i.t.) administration, drug or vehicle was given in a volume of 10 µL and the catheter was flushed using a Hamilton microsyringe with 10 µL (catheter volume) saline to ensure complete delivery of the dose.

Animals

Male Wistar rats (280–350 g) were kept under conditions of constant temperature (22 ± 2°C) with a 12 h light–dark cycle and free access to food and water. All animals were cared for in compliance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication 85–23, revised 1996; <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/index.html>). All procedures described herein were reviewed by and had prior approval from the local animal ethics committee.

Neonatal capsaicin pretreatment

Neonatal male Wistar rats weighing 7–10 g were pretreated subcutaneously at the back of the neck on the second day of life with a single dose of capsaicin (50 mg/kg; *n* = 5) or the corresponding volume (40 µL) of its vehicle (10% ethanol and 10% Tween in saline; *n* = 5) under ether anaesthesia.¹⁰ Circulatory experiments were performed 90 days after neonatal capsaicin or vehicle pretreatment. Success of capsaicin treatment was confirmed by a significant reduction in the number of wiping movements following topical application of capsaicin (1% in 50 µL) to the conjunctiva of neonatally pretreated rats (10.0 ± 0.4) compared with their age-matched controls that received vehicle only during the neonatal period (23.0 ± 1.1). As an additional positive control for the depletion of capsaicin-sensitive sensory nerves, three neonatally capsaicin-pretreated rats received an implantar injection of formalin (0.9% formaldehyde in saline; 100 µL/paw) and the licking behaviour during the first 10 min (early phase) was assessed and compared with their age-matched controls. It is well known that formalin-induced licking is partially dependent on tachykinin NK₁ receptor-acting neuropeptides from sensory nerves. The early (0–10 min) licking response to formalin injection was significantly reduced by 70% in capsaicin-pretreated compared with vehicle-pretreated rats (composite licking time 73 ± 7 vs 244 ± 13 s, respectively).

Catheterization procedure

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and this dose of anaesthesia was supplemented with an additional 15 mg/kg whenever necessary to maintain abolition of the pain reflex evoked by pinching the skin of the hindlimbs. Catheters (PE-10 fused to PE-50), filled with heparin–saline solution (125 IU/mL), were implanted in the abdominal aorta (for the recording of arterial blood pressure) and in the inferior vena cava (for drug administration) through the left femoral artery and vein, respectively. In some animals (see Series 3 below), one (*n* = 10) or two (*n* = 10) additional catheters (PE 10) were implanted as follows. One catheter, filled with heparin–saline solution (125 IU/mL), was inserted into the right superficial epigastric artery for retrograde i.a. injections into the femoral artery. The second catheter allowed lumbar i.t. administration of drugs. This catheter was filled with isotonic saline and inserted into the spinal subarachnoid space through an incision made at T13 and its tip was advanced caudally to reach the L5–L6 spinal cord level (afferent input from the sciatic and saphenous nerve). A short tracheal cannula was inserted via a tracheotomy, through which rats breathed spontaneously in the supine position. Body temperature was maintained by an electric heating pad.

At the end of the experiments, rats were killed with an overdose of i.v. pentobarbital and their lumbar cords were examined by dye injection (bromophenol blue) to assess the correct positioning of the tip of the i.t. catheter as well as the absence of catheter-induced spinal lesions. Individual results were discarded if these criteria were not met.

Table 1 Chemical composition and Kovats indices of the constituents of the essential oil of *Croton zehntneri* (data bank of the Department of Physics and Chemistry of the State University of Ceará, Brazil)

Compound	Composition (% total weight)	Retention indices
α-Pinene	0.38	939
Sabinene	0.29	975
β-Myrcene	0.94	991
1,8-Cineole	1.22	1 031
Estragole	45.95	1 196
Z-anethole	0.49	1 253
E-anethole	42.09	1 285
β-Elemene	0.43	1 391
trans-Caryophyllene	1.52	1 419
γ-Cadinene	1.04	1 514
Germacrene-B	4.84	1 561
Espatulanol	0.47	1 593
Total identified	99.66	

Recordings of MAP and HR

At the time of the experiments, the arterial catheter was connected to a blood pressure transducer coupled to a polygraph recorder; HR was obtained using a cardiachometer triggered by the pressure pulses. Both signals were recorded on a Gilson model 5/6H polygraph (Gilson Medical Electronics, Middletown, WI, USA). Mean arterial pressure was calculated as diastolic + ((systolic blood pressure – diastolic blood pressure)/3).

Experimental design and protocols

In order to explore the cardiovascular responses to EOCZ, the following protocol was used. Before each experiment, a period of 15–20 min was allowed to obtain a stable MAP and HR tracing. Baseline values of these variables were determined and their changes were measured during a 10 min post-injection period. The EOCZ, its main constituents or capsaicin were injected manually as a bolus in a volume of 0.1 mL, followed by a 0.2 mL flush with physiological saline. The drug reaches the general circulation 2–4 s after the beginning of the injection. Doses of agonists and antagonists were chosen according to those recommended in the literature. Four series of experiments were performed as described below.

Series 1

This series of experiments was performed to establish a dose–effect relationship. Each animal received a series of increasing bolus doses of EOCZ (1, 5, 10 and 20 mg/kg) via the i.v. catheter and the time-course of changes in MAP and HR was recorded. These experiments were performed in both intact rats ($n = 8$) and in rats ($n = 7$) that had been subjected to a bilateral vagotomy performed at the cervical level 15 min earlier. Cardiovascular responses to i.v. administration of anethole and estragole (both at 10 mg/kg) were also determined in either intact ($n = 7$ and 6, respectively) or biva-gotomized ($n = 5$ and 4, respectively) rats.

Series 2

A series of experiments was performed to assess the role of vagal sensory C-fibres in the mediation of cardiovascular responses to EOCZ. This was achieved using the well-known method of bilateral perineural treatment with capsaicin, which produces a selective blockade of neural conduction of vagal sensory C-fibres.^{30,31} Briefly, cotton strips soaked in capsaicin solution (250 µg/mL) were wrapped around a 2–3 mm segment of the isolated cervical vagus nerve for 20 min and then removed. Maximal changes in MAP and HR elicited by EOCZ (10 mg/kg, i.v.) were assessed before and after perineural treatment with capsaicin ($n = 7$) or its vehicle ($n = 3$). Similar changes elicited by anethole ($n = 5$) and estragole ($n = 5$), both at 10 mg/kg, were also determined after perineural treatment with capsaicin. Abolition of the immediate hypotension and bradycardic reflex (vagal reflex) responses to capsaicin (1 µg/kg, i.v.) in the same animal was taken as an indication of successful perineural treatment with capsaicin.

Series 3

The aim of this series of experiments was to provide direct evidence for the involvement of substance P-containing primary afferent fibres in the mediation of depressor response to i.a. injection of EOCZ, as shown previously for i.a.-administered capsaicin.^{21–23} Therefore, each animal received an injection of EOCZ (10 mg/kg, i.a.) and the maximal MAP and HR changes were determined. Three minutes later, and 7 min before the second injection of EOCZ (10 mg/kg, i.a.), the NK₁-selective antagonist RP 67580 (7.8 nmol; at the L5–L6 level;³² $n = 7$) or its vehicle ($n = 3$) was administered i.t. and the maximal MAP and HR changes were again determined. The cardiovascular changes elicited by an i.a. injection of capsaicin (1 µg/kg) or EOCZ (10 mg/kg) were also determined in neonatally capsaicin-pretreated rats ($n = 5$) and were compared with those obtained in their age-matched controls ($n = 5$).

Series 4

This series of experiments was performed to determine the putative involvement of vallinoid TPRV1 receptor activation in the mediation of EOCZ-induced cardiovascular changes. Therefore, each animal ($n = 6$) received an injection of EOCZ (10 mg/kg, i.v.) and the maximal MAP and HR changes were determined. Eight minutes later, and 2 min before the second injection of EOCZ (10 mg/kg, i.v.), the competitive TPRV1 receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.)^{33,34} or its vehicle ($n = 4$) was administered and the maximal MAP and HR changes were determined. As a positive control experiment, the effects of capsazepine (1 mg/kg, i.v.) were determined on the initial hypotensive and bradycardic responses to i.v. capsaicin (1 µg/kg; $n = 4$) according to the same protocol as described above.

Statistical analysis

All results are expressed as the mean ± SEM. Maximal changes (expressed as a percentage of baseline values) in MAP and HR after each dose of the EOCZ were used to construct a dose–response curve. Paired Student's *t*-test was used to determine statistical significance in cardiovascular changes following: (i) i.t., i.v. or i.a. administration of various drugs or their vehicles alone; and (ii) perineural treatment with capsaicin or bilateral vagotomy. Paired Student's *t*-test was also used to assess the statistical significance of the effects of perineural treatment with capsaicin as well as pretreatment (i.t. or i.v.) with antagonist/vehicle on the MAP and HR responses to EOCZ or capsaicin. Comparisons between neonatally capsaicin-pretreated rats and their age-matched controls were performed using unpaired Student's *t*-test. Multiple comparisons used a one-way (doses) or two-way (treatment × doses) analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test when appropriate. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Mean values of baseline MAP and HR recorded in anaesthetized rats before any treatment were 114 ± 2 mmHg and 367 ± 4 b.p.m., respectively (pooled data from 91 rats).

Effects of bilateral vagotomy on the cardiovascular responses to increasing bolus intravenous doses of EOCZ (Series 1)

As shown in Fig. 1, i.v. bolus injection of the vallinoid receptor agonist capsaicin (10 µg/kg) led to the typical triphasic changes in blood pressure (termed as effects A, B and C; Fig. 1a) and biphasic bradycardia (termed as effects F and s; Fig. 1c), as found previously by others.^{20–23,36} Increasing bolus i.v. injections of EOCZ (1–20 mg/kg) induced immediate and dose-dependent ($P < 0.001$) decreases in MAP (Figs 1b,2a) and HR (Figs 1d,2b). Both effects became significant at a dose of 5 mg/kg EOCZ (Fig. 2; $P < 0.05$) and were maximal within the first 4–8 s after EOCZ treatment. The vehicle, injected in the same volume, did not induce any significant changes in either MAP or HR. At the higher doses of EOCZ, the initial hypotension and bradycardia were often followed by a pressor response (Fig. 1b) associated with a second period of bradycardia (Fig. 1d). All changes in MAP and HR elicited by i.v. EOCZ lasted for a period of 6–8 min. Bilateral cervical vagotomy did not affect MAP, but induced a significant ($P < 0.05$) increase in HR (Table 2). However, this treatment abolished the immediate and dose-dependent hypotensive and bradycardic responses to EOCZ (Fig. 2; $P < 0.001$).

Intravenous treatment of intact rats with anethole or estragole (both at 10 mg/kg; $n = 7$ and 6, respectively) also evoked an

Fig. 1 Representative recordings showing changes in (a,b) mean arterial pressure (MAP) and (c,d) heart rate (HR) induced by intravenous injection of 10 µg/kg capsaicin (a,c) and essential oil of *Croton zehntneri* 10 mg/kg (b,d) in rats under pentobarbital anaesthesia. Arrows indicate the time of injection. A, B, C, typical triphasic changes in blood pressure following capsaicin; F, S biphasic bradycardia following capsaicin.

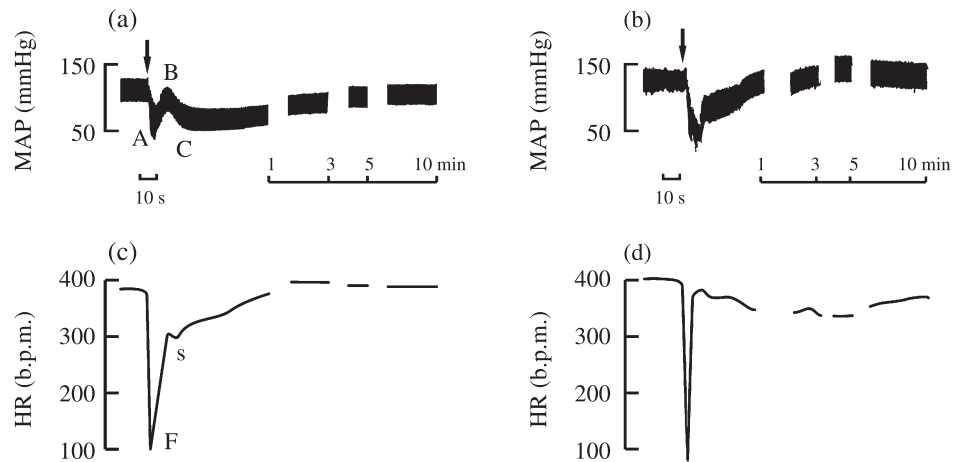


Table 2 Effects of various pretreatments on mean arterial pressure and heart rate in anaesthetized rats in which the effects of the essential oil of *Croton zehntneri* were investigated

Pretreatment	n	MAP (mmHg)		HR (b.p.m.)	
		Basal	After pretreatment	Basal	After pretreatment
Bivagotomy	7	108.3 ± 6.2	109.4 ± 5.9	377 ± 11	410 ± 7*
Perineural treatment with capsaicin	7	116.1 ± 3.9	113.5 ± 5.6	360 ± 9	378 ± 14
RP 67580	7	114.6 ± 3.8	113.8 ± 4.2	354 ± 16	368 ± 16
Capsazepine	6	112.1 ± 3.0	110.6 ± 3.4	370 ± 24	367 ± 16
Neonatal capsaicin	5	—	108.5 ± 2.3	—	351 ± 22
Neonatal vehicle for capsaicin	5	—	114.3 ± 2.9	—	351 ± 19

Data are the mean ± SEM. * $P < 0.05$ compared with respective basal values.

immediate and significant hypotension (-34.6 ± 3.4 and $-45.6 \pm 5.1\%$, respectively) and bradycardia (-72.2 ± 2.5 and $-68.5 \pm 5.2\%$, respectively; $P < 0.001$), which also peaked within 4–8 s after injection. Baseline MAP and HR before anethole and estragole injection were 112.8 ± 3.9 mmHg and 345 ± 14 b.p.m., respectively, and 110.0 ± 2.7 mmHg and 354 ± 9 b.p.m., respectively. In another set of rats, bilateral vagotomy also abolished ($P < 0.001$) the maximal hypotensive and bradycardic responses to anethole (3.3 ± 3.3 and $-2.6 \pm 1.1\%$, respectively; $n = 5$) and estragole (2.3 ± 5.4 and $-1.1 \pm 2.0\%$, respectively; $n = 4$).

Effects of perineural treatment of both vagi with capsaicin on maximal hypotensive and bradycardic responses to intravenous EOCZ (Series 2)

Perineural capsaicin treatment of both vagi failed to evoke significant changes in MAP and HR (Table 2). In all animals, the immediate hypotensive and bradycardic responses to capsaicin (1 µg/kg, i.v.) were completely abolished 20 min after perineural treatment with capsaicin, justifying its effectiveness in blocking the vagal sensory C-fibre-mediated reflex responses. In the same animals, maximal hypotensive (Fig. 3a) and bradycardic (Fig. 3b) responses elicited by EOCZ (10 mg/kg, i.v.) were similarly abolished after perineural treatment with capsaicin ($P < 0.001$). In contrast, these responses remained unchanged after perineural treatment with capsaicin's vehicle (Fig. 3; $P > 0.05$). It is of note that the magnitude of the hypotension remained statistically ($P > 0.05$) unchanged after

two subsequent injections of EOCZ ($n = 6$) separated by a 10 min interval (-35.3 ± 3.6 vs $-33.3 \pm 2.1\%$ for the first and second injections, respectively). The same was true for the bradycardia response (-73.5 ± 1.4 vs $-71.1 \pm 8.3\%$ for the first and second injections, respectively). Furthermore, perineural treatment with capsaicin abolished the hypotensive and bradycardic responses to i.v. injection of 10 mg/kg anethole (6.58 ± 7.28 and $8.66 \pm 4.72\%$, respectively; $n = 5$) and 10 mg/kg estragole (0.46 ± 4.76 and $3.97 \pm 3.30\%$, respectively; $n = 5$). Baseline MAP and HR before anethole and estragole injection were 111.6 ± 4.7 mmHg and 386 ± 14 b.p.m., respectively, and 115.1 ± 1.9 mmHg and 390 ± 14 b.p.m., respectively.

Effect of i.t. pretreatment with a substance P antagonist or neonatal pretreatment with capsaicin on the hypotensive response to i.a. EOCZ (Series 3)

Typical recordings of MAP and HR changes after retrograde epigastric injection of capsaicin (1 µg/kg, i.a.) or EOCZ (10 mg/kg, i.a.) into the femoral artery are shown in Fig. 4. Both capsaicin and EOCZ induced a monophasic hypotensive effect (Fig. 4a,b) without any significant changes in HR (Figs 4c,d,5b). The EOCZ-induced reflex hypotension was statistically significant (Fig. 5a; $P < 0.001$) and its magnitude remained unchanged after two subsequent injections of EOCZ separated by a 10 min interval (-27.7 ± 5.4 vs $-22.8 \pm 3.6\%$ for the first and second injections, respectively; $n = 3$). Neither MAP nor HR was changed by Tween 80/saline

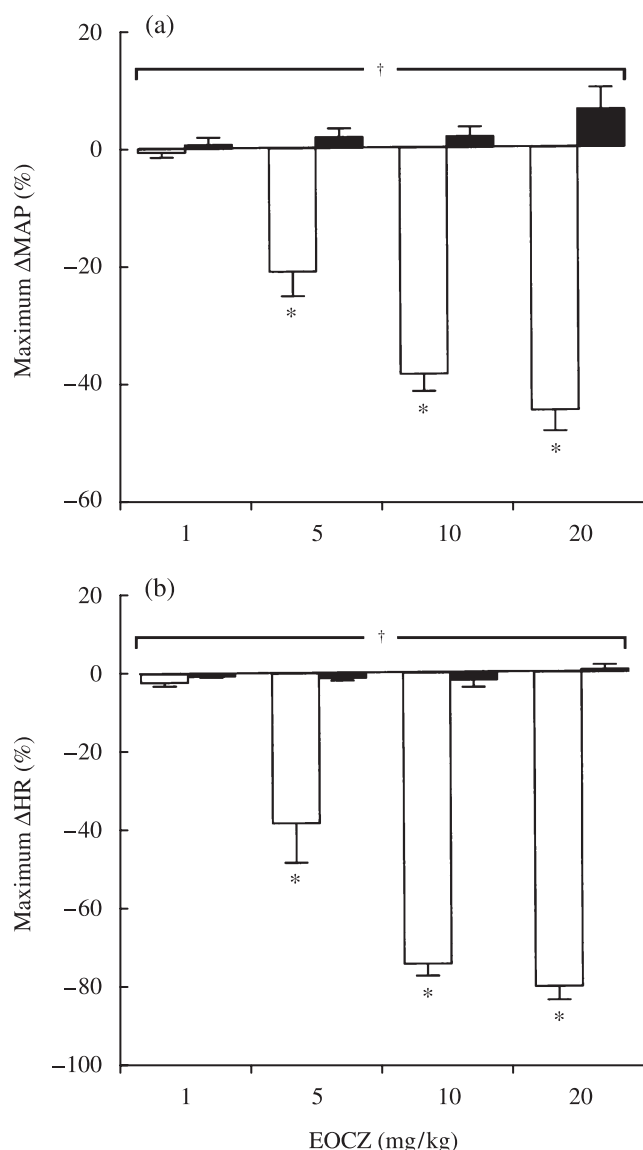


Fig. 2 Maximal decreases in (a) mean arterial pressure (Δ MAP) and (b) heart rate (Δ HR) elicited by intravenous (i.v.) injections of increasing bolus doses (1–20 mg/kg) of essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) in pentobarbital-anaesthetized rats with (■) or without (□) bilateral vagotomy. Data are the mean $\pm$ SEM expressed as a percentage of baseline ($n = 7$ –8 rats per group). Baseline MAP and HR before EOCZ injection were 116.6 ± 1.8 mmHg and 366 ± 15 b.p.m., respectively in intact rats and 109.4 ± 5.9 mmHg and 410 ± 7 b.p.m., respectively, in bivotomized rats. $P < 0.001$ among absolute values (ANOVA) and $*P < 0.05$ compared with corresponding baseline values (Dunnett's test); $^\dagger P < 0.05$ compared with intact rats (two-way ANOVA).

vehicle when injected i.a. Pretreatment with i.t. injection of the NK₁ receptor antagonist RP 67580 (7.8 nmol at the L5–L6 level) did not significantly alter MAP and HR (Table 2). However, RP 67580, but not its vehicle, almost completely abolished the hypotension elicited by i.a.-injected EOCZ (Fig. 5a; $P < 0.01$). The remaining hypotension after i.t. RP 67580 pretreatment was not statistically significant with respect to baseline values (Fig. 5a; $P > 0.05$).

Neonatal pretreatment with capsaicin did not significantly alter MAP and HR values (Table 2). However, the depressor response to

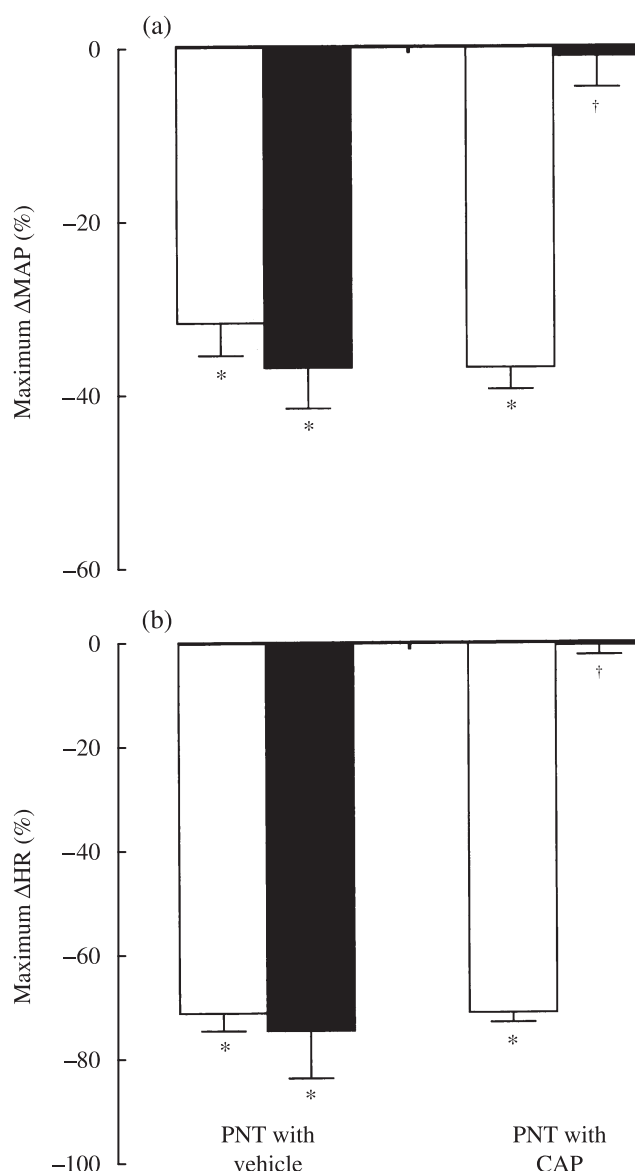


Fig. 3 Maximal decreases in (a) mean arterial pressure (Δ MAP) and (b) heart rate (Δ HR) elicited by intravenous (i.v.) administration of the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ; 10 mg/kg) in pentobarbital-anaesthetized rats before (□) or 20 min after (■) perineural treatment (PNT) of both cervical vagi with capsaicin (CAP, 250 μ g/mL) or its vehicle. Data are the mean $\pm$ SEM expressed as a percentage of baseline ($n = 3$ –7 rats per group). Baseline MAP and HR were 114.4 ± 6.5 mmHg and 370 ± 18 b.p.m., respectively, before and 113.8 ± 5.8 mmHg and 358 ± 22 b.p.m., respectively, after PNT with the vehicle for capsaicin and 118.3 ± 2.1 mmHg and 366 ± 11 b.p.m., respectively, before and 113.5 ± 5.6 mmHg and 378 ± 14 b.p.m., respectively, after PNT with capsaicin. $*P < 0.05$ compared with corresponding baseline values; $^\dagger P < 0.001$ compared with corresponding responses before PNT with capsaicin.

both capsaicin (1 μ g/kg, i.a.) and EOCZ (10 mg/kg, i.a.) occurring in neonatally vehicle-pretreated rats was converted to a significant pressor effect in neonatally capsaicin-pretreated rats (Fig. 6; $P < 0.001$). It is of note that the depressor effect evoked by EOCZ (10 mg/kg, i.a.) in neonatally vehicle-pretreated rats is not statistically different from that obtained by the same dose of EOCZ (i.a.) in intact rats.

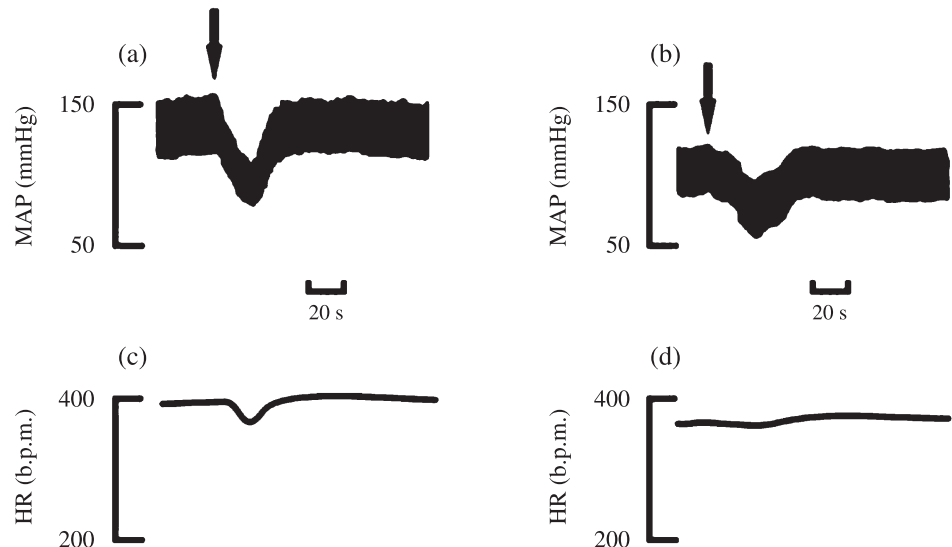


Fig. 4 Representative recordings showing changes in (a,b) mean arterial pressure (MAP) and (c,d) heart rate (HR) induced by intra-arterial injection of capsaicin 1 µg/kg (a,c) and essential oil of *Croton zehntneri* 10 mg/kg (b,d) in rats under pentobarbital anaesthesia. Arrows indicate the time of injection.

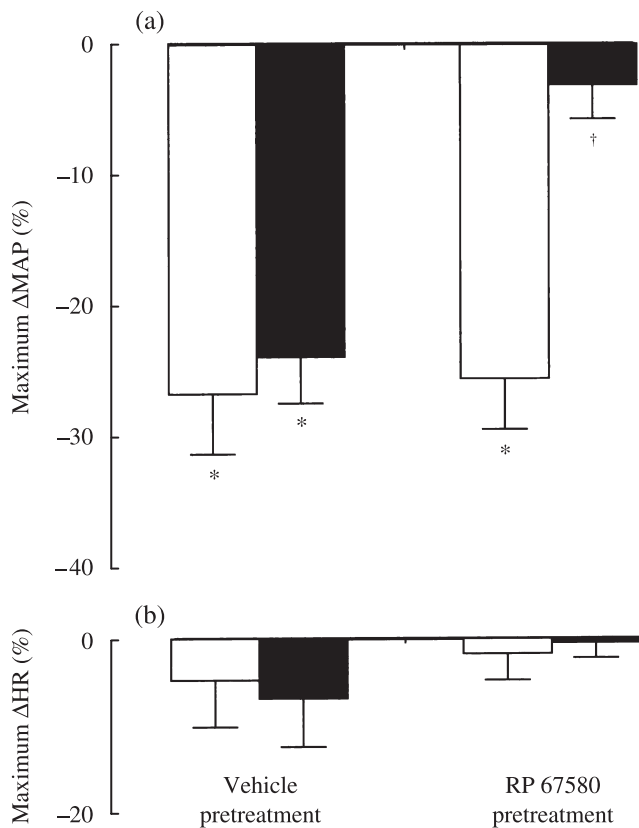


Fig. 5 Maximal decreases in (a) mean arterial pressure (ΔMAP) and (b) heart rate (ΔHR) elicited by intra-arterial administration of the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ; 10 mg/kg) in pentobarbital-anaesthetized rats before (□) or 7 min after (■) intrathecal pretreatment with selective the NK₁ receptor antagonist RP 67580 (7.8 nmol at the L5–L6 level) or its vehicle. Data are the mean ± SEM expressed as a percentage of baseline ($n = 3–7$ rats per group). Baseline MAP and HR were 116.6 ± 1.0 mmHg and 375 ± 22 b.p.m., respectively, before and 118.0 ± 2.5 mmHg and 377 ± 22 b.p.m., respectively, after vehicle pretreatment and 115.0 ± 3.0 mmHg and 355 ± 16 b.p.m., respectively, before and 113.8 ± 4.2 mmHg and 368 ± 16 b.p.m., respectively, after RP 67580 pretreatment. * $P < 0.05$ compared with corresponding baseline values; † $P < 0.001$ compared with corresponding responses before RP 67580 pretreatment.

Effects of i.v. pretreatment with capsazepine on the hypotensive and bradycardic responses to i.v. EOCZ (Series 4)

The selective vallinoid receptor antagonist capsazepine (1 mg/kg, i.v.) given alone had no effect on MAP and HR (Table 2). However, it significantly reduced the maximal hypotensive and bradycardic responses to EOCZ (10 mg/kg, i.v.; Fig. 7; $P < 0.001$). This dose of capsazepine produced a reduction of approximately 60% of the maximal EOCZ-induced cardiovascular effects. In contrast, these effects remained statistically unchanged by i.v. pretreatment with the vehicle of capsazepine (Fig. 7). The same dose of capsazepine also significantly ($P < 0.01$) reduced, by nearly 60–68%, the initial hypotensive (-11.8 ± 3.3 vs $-30.1 \pm 2.3\%$ for capsazepine- and vehicle-pretreated rats, respectively) and bradycardic (-24.5 ± 7.7 vs $-77.2 \pm 5.4\%$ for capsazepine- and vehicle-pretreated rats, respectively) responses to i.v. capsaicin (1 µg/kg; $n = 4$). In this experiment with capsaicin, MAP and heart rate were 110.0 ± 3.0 mmHg and 341 ± 19 b.p.m., respectively, before and 109.2 ± 4.8 mmHg and 370 ± 22 b.p.m., respectively, after capsazepine pretreatment.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present study is the first to investigate the cardiovascular effects of i.v. EOCZ in anaesthetized rats. The immediate decreases in MAP and HR evoked by i.v. EOCZ can be attributed, in part, to the actions of anethole and estragole, the two main constituents of EOCZ. The following lines of evidence support such a conclusion. First, the time-course of the cardiovascular changes elicited by both anethole and estragole was very close to that observed with EOCZ. Second, the hypotensive and bradycardic responses to both constituents and EOCZ were abolished by cervical bilateral vagotomy or perineural treatment with capsaicin. A partial contribution of these constituents was suggested for the antispasmodic,⁵ antinociceptive⁷ and skeletal muscle³⁵ effects of EOCZ. However, we cannot exclude the possible participation of other minor constituents, in addition to anethole and estragole, in the mediation of the cardiovascular effects of EOCZ. Furthermore, it seems unlikely that the cardiovascular effects are related to a toxic

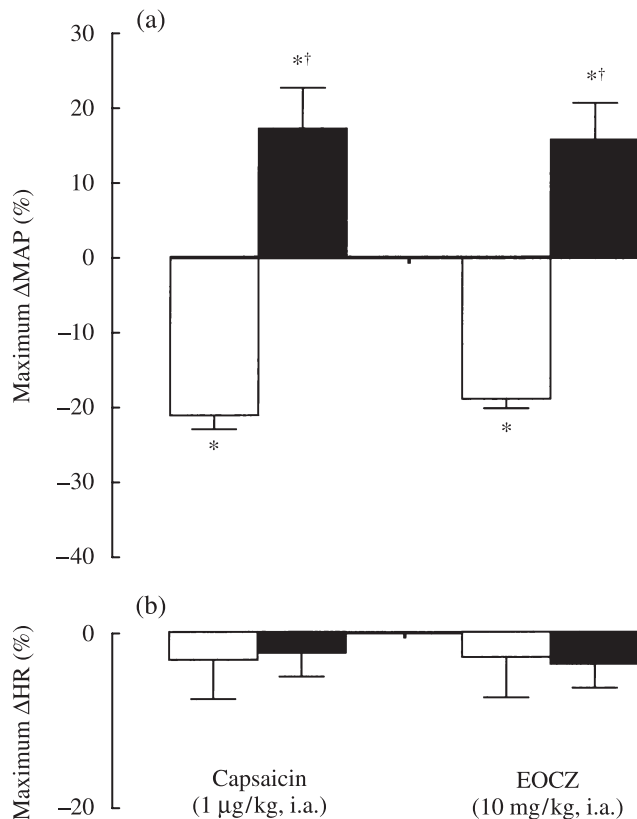


Fig. 6 Maximal decreases in (a) mean arterial pressure (Δ MAP) and (b) heart rate (Δ HR) elicited by intra-arterial administration of capsaicin (1 μ g/kg) or the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ; 10 mg/kg) in pentobarbital-anaesthetized rats that were pretreated as neonates with capsaicin (50 mg/kg, s.c.; ■) or its vehicle (40 μ L, s.c.; □). Data are the mean $\pm$ SEM expressed as a percentage of baseline ($n = 3-7$ rats per group). Baseline MAP and HR before EOCZ injection were 112.0 ± 3.8 mmHg and 374 ± 16 b.p.m., respectively, in neonatally vehicle-pretreated rats and 109.1 ± 3.8 mmHg and 350 ± 19 b.p.m., respectively, in neonatally capsaicin-pretreated rats. For MAP and HR values before capsaicin injection, refer to Table 2. * $P < 0.05$ compared with corresponding baseline values; † $P < 0.001$ compared with corresponding responses in rats pretreated neonatally with the vehicle for capsaicin.

effect of this essential oil because acute toxicity (LD_{50}) with EOCZ was found at a dose larger than 2 500 mg/kg given orally.⁷

Anethole and estragole share some structural similarities with capsaicin, the pungent ingredient in hot peppers. This compound is most commonly used as a tool to investigate the function of primary sensory neurons because of its specificity and potency to stimulate non-myelinated C-afferent fibres.^{8,9,30,31} Therefore, we investigated the possibility that EOCZ could induce a capsaicin-like bradycardic and depressor reflex.²⁰⁻²³ Previous studies have shown that i.v. injection of capsaicin or its analogue nonivamide in anaesthetized rats induces a triphasic change in blood pressure: (i) an initial short fall associated with a fast bradycardia; (ii) an intermediate return to normal (or slightly higher than normal) levels; and (iii) a subsequent delayed hypotensive response associated with a secondary slow bradycardia.^{20-23,36} It was found that the initial hypotension (effect A) and fast bradycardiac (effect F) responses to capsaicin were absent after cervical bilateral vagotomy^{20,22,36} and reduced by either atropine or capsaicin pretreatment,^{22,36} suggesting that this cardiovascular

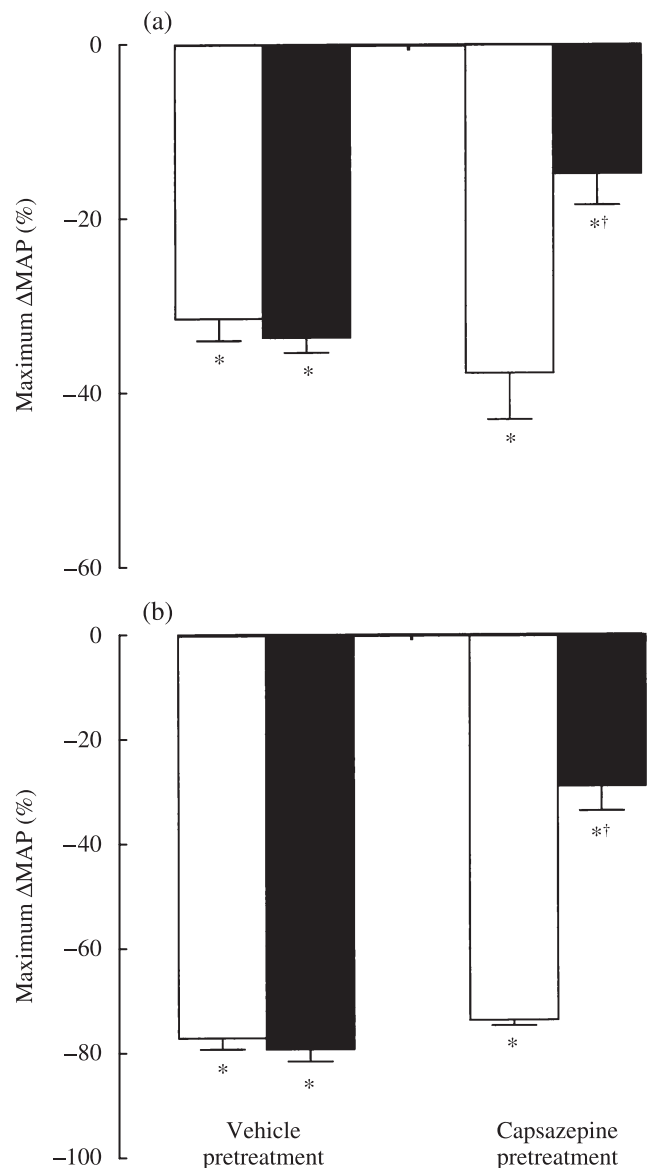


Fig. 7 Maximal decreases in (a) mean arterial pressure (Δ MAP) and (b) heart rate (Δ HR) elicited by the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ; 10 mg/kg, i.v.) in pentobarbital-anaesthetized rats before (□) or 2 min after (■) i.v. pretreatment with capsazepine (1 mg/kg) or its vehicle. Data are the mean $\pm$ SEM expressed as a percentage of baseline ($n = 4-6$ rats per group). Baseline MAP and HR were 116.6 ± 1.8 mmHg and 378 ± 20 b.p.m., respectively, before and 115.0 ± 3.9 mmHg and 377 ± 20 b.p.m., respectively, after vehicle pretreatment and 112.8 ± 3.3 mmHg and 380 ± 16 b.p.m., respectively, before and 110.6 ± 3.4 mmHg and 367 ± 16 b.p.m., respectively, after capsazepine pretreatment. * $P < 0.05$ compared with corresponding baseline values; † $P < 0.001$ compared with corresponding responses before capsazepine pretreatment.

effect is mediated by a vagal reflex involving capsaicin-sensitive fibres. The intermediate slight increase in blood pressure (effect B), which was unaffected by bivatotomy but was enhanced in rats treated neonatally by capsaicin, was identified as a result of a direct short vasoconstriction by capsaicin.^{20,22,36} The delayed hypotensive response (effect C) remained unaltered by bivatotomy, but was absent in neonatal rats treated with capsaicin, suggesting that this latter response is also mediated by capsaicin-sensitive sensory C-fibres.^{20,22,36}

The present study shows that i.v. EOCZ induces a biphasic blood pressure response, which is different from the triphasic blood pressure changes evoked by capsaicin. The reason for this difference is unclear at the present time. However, the following possibilities could be considered. First, it is possible that this difference could be related to the doses of EOCZ used in the present study. In this regard, Yeh *et al.* showed that the triphasic blood pressure response to i.v. capsaicin in Wistar rats is not observed at doses lower than 10 µg/kg.²² Second, it is also possible that the delayed depressor effect (effect C) is not completely absent, but is masked by an enhanced pressor response (effect B) to EOCZ. As a corollary to this, Malinowska *et al.* showed, in Wistar rats, that i.v. treatment with anandamide, but not capsaicin (3 µg/kg), induced a more prolonged decrease in MAP, yet the capsaicin-induced increase in blood pressure lasted more (150 s) than that evoked by anandamide (30 s).³³

The present study focused on the initial bradycardia that occurred concomitantly with the initial hypotension. Identification of the mechanism by which higher doses of EOCZ evoke the subsequent pressor effect associated with the delayed bradycardia requires further investigation. The EOCZ-induced initial hypotension and bradycardia occurred with a short time of onset (4–8 s) and were abolished after bilateral cervical vagotomy. Both cardiovascular effects were also shown to be fully abolished, and even converted to a pressor and tachycardic response, following i.v. pretreatment with methylatropine, a non-selective muscarinic receptor antagonist that does not cross the brain–blood barrier.³⁷ This indicates that EOCZ-induced maximal hypotensive and bradycardic responses are mediated by a vagal reflex and an efferent cholinergic mechanism. Furthermore, perineural treatment with capsaicin of both cervical vagi, which has been demonstrated to selectively block the conduction of C-fibre afferents,^{30,31} fully prevented the reflex bradycardia and hypotension evoked by EOCZ. Taken together, these findings suggest that i.v. treatment with EOCZ stimulates vagal sensory C-fibres to elicit vagovagal reflex decreases in HR and blood pressure. In keeping with this finding, it was reported previously that acute or chronic treatment with anethole trithione (Sulfarlem S25), which is known to have beneficial effects in treating drug-induced xerostomia, increased the concentration of substance P and α -CGRP in the saliva.^{38,39} These two peptides coexist in a subpopulation of primary sensory C-fibres⁴⁰ and significantly enhance blood flow in salivary glands in rats⁴¹ and humans.⁴²

The nucleus tractus solitarius (NTS) plays a major role in the regulation of blood pressure. It receives direct input, via the vagus and glossopharyngeal nerves, from baroreceptors in the carotid sinus and aortic arch, activation of which leads to a decrease in blood pressure.⁴³ It was proposed that substance P released from the afferent sensory neurons in the NTS results in the initial hypotension and bradycardia evoked by i.v. capsaicin (i.e. the classic vagus reflex).²² It is possible that the vagovagal reflex evoked by i.v. EOCZ is relayed through the same mechanism. Our results suggest that the i.v. EOCZ-induced vagus reflex is due, at least in large part, to activation of vallinoid TPRV1 receptors, as was reported for capsaicin.³³ This is corroborated by the findings that i.v. pretreatment with the TPRV1 receptor antagonist capsazepine⁴⁴ significantly reduced the EOCZ-induced reflex responses. The dose of capsazepine used in the present study achieved the same inhibition (by approximately 60%) of the initial decreases in MAP and HR elicited by i.v. capsaicin, as shown in a previous study.³³ According to a previous report, the incomplete inhibition induced by capsazepine may be due to the

moderate potency of this drug.⁴⁵ One may suggest that EOCZ activates vallinoid receptors indirectly via its metabolites. However, this hypothesis seems unlikely because the latency of the EOCZ-induced reflex response is too short to be the result of a metabolic pathway and/or a secondary effect of the release of other substances by EOCZ.

It has been reported that retrograde epigastric i.a. injection of capsaicin stimulates perivascular pain receptors⁴⁶ leading to a monophasic hypotension in rats.^{20–24} This was unaffected by intercollicular decerebration, but it was completely blocked after section of the ipsilateral saphenous and sciatic nerves, i.t. injection (at the L5–L6 level) of a specific substance P receptor antagonist or in decerebrated rats with intact spinal cord.^{20–23} Thus, it was suggested that the capsaicin-induced hypotension is a reflex response mediated by substance P-containing primary afferent fibres.^{21–23} This conclusion is supported by the present findings and a previous study²⁰ showing that the depressor reflex after i.a. injection of capsaicin is converted to a pressor response in neonatally capsaicin-pretreated rats (i.e. after degeneration of small diameter primary afferents¹⁰ resulting in a depletion of substance P from these nerve structures¹⁵). Different theories have been advanced to explain the reflex hypotensive response to i.a. capsaicin and its analogues. Studies using decerebrated rats with intact spinal cords suggested that the reflex centre is located in the brainstem and the efferent pathway consists of a loss of the sympathetic vasoconstrictor tone.^{21,34} However, other studies support the hypothesis that this reflex response is most likely spinally mediated or, alternatively, could involve the peripheral release of substance P as a consequence of the antidromic stimulation of primary sensory fibres.²² An i.a. injection of EOCZ also induced a monophasic hypotensive response that was suppressed by i.t. injection of the NK₁ receptor antagonist RP 67580 and converted into a pressor effect in neonatally capsaicin-pretreated rats. This finding indicates that EOCZ, like capsaicin and its analogues, is able to induce not only a vagal sensory reflex, but also a spinally mediated sensory reflex. Whereas the complete blockade of the spinal hypotensive reflex with RP 67580 supports a primary role for substance P, the possibility that other sensory neurotransmitters (e.g. CGRP) are also involved in this phenomenon cannot be completely ruled out.

The possibility that EOCZ may directly activate NK₁ receptors within the NTS or the spinal cord to decrease blood pressure seems less plausible because, if this was the case, then the depressor responses to i.v. or i.a. EOCZ should remain unaltered following bilateral vagotomy or prenatal pretreatment with capsaicin, respectively. However, this was not the case. The findings that the EOCZ depressor effects are completely abolished by the above pretreatments suggest that these effects are mediated reflexly through the activation of substance P-containing afferent fibres. Finally, it is also unlikely that the blockade of EOCZ responses by perineural treatment with capsaicin, RP 67580 or capsazepine is due to tachyphylaxis because no tolerance was observed in the cardiovascular effects of i.v. or i.a. EOCZ when injected at 10 min intervals.

In conclusion, the present results show that i.v. administration of EOCZ in anaesthetized rats elicits a capsaicin-like bradycardic and depressor reflex (i.e. vagus reflex), which appears to be mediated through activation of the vallinoid TPRV1 receptors located on sensory vagal nerves. This reflex appears to be attributed, in part, to the actions of anethole and estragole, the two main constituents of EOCZ. Like capsaicin, i.a. injection of EOCZ induces a hypotensive spinal reflex mediated by substance P-containing primary afferent fibres.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq; Edital Universal and Pronex) and the Federal University of Pernambuco (UFPE). The authors thank Dr Andreolina Noronha Coelho-de-Souza (Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil) for kindly providing us with capsaicin, Dr Steven D Aird (Norfolk State University, VA, USA) for improving the manuscript and Carlos Antônio de Barros Correia Junior for technical assistance. RJBdeS is an MSc Student and CABJC is an undergraduate student (PIBIC/CNPq Fellow).

REFERENCES

- Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW. Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. *Ciênc. Cult.* 1997; **29**: 445 (Abstract).
- Batatinha MJM, de Souza-Spinosa H, Bernardi MM. *Croton zehntneri*: Possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 1995; **45**: 53–7.
- Leal-Cardoso JH, Fonteles MC. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 1999; **71**: 207–13.
- Craveiro AA, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW. Anise-like flavor of *Croton aff zehntneri* Pax. et Hoffm. *J. Agric. Food Chem.* 1978; **26**: 772–3.
- Coelho-de-Souza AN, Barata EL, Magalhães PJC, Lima CC, Leal-Cardoso JH. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri*, and its constituent estragole on intestinal smooth muscle. *Phytother. Res.* 1997; **11**: 299–304.
- Coelho-de-Souza AN, Criddle DN, Leal-Cardoso JH. Selective and modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea pig. *Phytother. Res.* 1998; **12**: 189–94.
- Oliveira AC, Leal-Cardoso JH, Santos CF, Morais SM, Coelho-de-Souza AC. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001; **34**: 1471–4.
- Maggi CA, Meli A. The sensory–efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 1988; **19**: 1–43.
- Holzer P. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol. Rev.* 1991; **43**: 143–201.
- Jancsó G, Kiraly E, Jancsó-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 1977; **270**: 741–3.
- Szallasi A. The vallinoid (capsaicin) receptor: Receptor type and species differences. *Gen. Pharmacol.* 1994; **25**: 223–43.
- Hiura A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch. Histol. Cytol.* 2000; **63**: 199–215.
- Barja F, Mathison R, Huggel H. Substance P-containing nerve fibres in large peripheral blood vessels of the rat. *Cell. Tissue Res.* 1983; **229**: 411–22.
- Wharton J, Gulbenkian S, Mulderry PK *et al.* Capsaicin induces a depletion of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactive nerves in the cardiovascular system of the guinea pig and rat. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1986; **16**: 289–309.
- Gamse R, Lackner D, Gamse G, Leeman SE. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary sensory neurons. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1981; **316**: 38–41.
- Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: Mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1992; **121**: 49–146.
- Lundberg JM. Pharmacology of co-transmission in the autonomic nervous system: Integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol. Rev.* 1996; **48**: 113–78.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; **389**: 816–24.
- Wang DH. The vallinoid receptor and hypertension. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; **26**: 286–94.
- Donnerer J, Lembeck F. Analysis of the effects of intravenously injected capsaicin in the rat. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1982; **320**: 54–7.
- Donnerer J, Lembeck F. Capsaicin-induced reflex fall in rat blood pressure is mediated by afferent substance P-containing neurones via a reflex centre in the brain stem. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 1983; **324**: 293–5.
- Yeh J-L, Lo Y-C, Wang Y, Chen I-J. Cardiovascular interactions of nonivamide, glyceryl nonivamide, capsaicin analogues, and substance P antagonist in rats. *Brain Res. Bull.* 1993; **30**: 641–8.
- Yang J-M, Wu S-N, Chen I-J. Spinal adenosine modulates capsaicin-induced depressor reflex: Involvement of adenosine A2 receptor. *Gen. Pharmacol.* 1993; **24**: 961–70.
- McQueen DS, Bond SM, Smith PJW, Balali-Mood K, Smart D. Cannabidiol lacks the vallinoid VR1-mediated vasorespiratory effects of capsaicin and anandamide in anaesthetized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; **491**: 181–9.
- Craveiro AA, Matos FJA, Alencar JW. Simple and inexpensive steam-generator for essential oils extraction. *J. Chem. Educ.* 1976; **53**: 562 (Abstract).
- Alencar JW, Craveiro AA, Matos FJA. Kovats indices as a pre-selection routine in mass spectra library search of volatiles. *J. Nat. Prod.* 1984; **47**: 890–2.
- Lahlou S, Carneiro-Leão RFL, Leal-Cardoso JH, Toscano CF. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha × villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetized rats: Role of the autonomic nervous system. *Planta Med.* 2001; **67**: 638–3.
- Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhães PJC, Leal-Cardoso JH. Cardiovascular effects of 1,8-cineole, a terpenoid oxide present in many plant essential oils, in normotensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2002; **80**: 1125–30.
- Lahlou S, Interaminense LFL, Leal-Cardoso JH, Morais SM, Duarte GP. Cardiovascular effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves in rats: Role of the autonomic nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2004; **31**: 219–15.
- Jancsó G, Such G. Effects of capsaicin applied perineurally to the vagus nerve on cardiovascular and respiratory functions in the cat. *J. Physiol.* 1983; **341**: 359–70.
- Schelegle ES, Chen AT, Loh CY. Effects of vagal perineural capsaicin treatment on vagal efferent and airway neurogenic responses in anesthetized rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 2000; **11**: 1–16.
- Poulat P, de Champlain J, Couture R. Cardiovascular responses to intrathecal neuropeptide gamma in conscious rats: Receptor characterization and mechanism of action. *Br. J. Pharmacol.* 1996; **117**: 250–7.
- Malinowska B, Kwolek G, Göthert M. Anandamide and methanandamide induce both vallinoid VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 2001; **364**: 562–9.
- Smith PJW, McQueen DS. Anandamide induces cardiovascular and respiratory reflexes via vasosensory nerves in the anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 2001; **134**: 655–63.
- Albuquerque AA, Sorenson AL, Leal-Cardoso JH. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *J. Ethnopharmacol.* 1995; **49**: 41–9.
- Lo Y-C, Yeh J-L, Wu J-R, Yang J-M, Chen S-J, Chen I-J. Autonomic and sensory cardiovascular activities of nonivamide: Intrathecal administration of clonidine. *Brain Res. Bull.* 1994; **35**: 15–22.
- de Siqueira RJB. Estudo dos efeitos cardiovasculares do óleo essencial do *Croton zehntneri* e seus principais constituintes, anetole e estragole, em ratos normotensos. Masters Thesis, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. 2005.

38. Takeyama M, Nagano T, Ikawa K. Anethole trithione raises levels of substance P in human saliva. *Pharm. Sci.* 1996; **2**: 581–4.
39. Nagano T, Takeyama M. Enhancement of salivary secretion and neuropeptide (substance P, α -calcitonin gene-related peptide) levels in saliva by chronic anethole trithione treatment. *J. Pharm. Pharmacol.* 2001; **53**: 1697–702.
40. Domoto T, Yang H, Bishop AE, Polak JM, Oki M. Distribution and origin of extrinsic nerve fibers containing calcitonin gene-related peptide, substance P, and galanin in the rat upper rectum. *Neurosci. Res.* 1992; **15**: 64–73.
41. Ekström J, Ekman R, Luts A, Sundler F, Tobin G. Neuropeptide Y in salivary glands of the rat: Origin, release and secretory effects. *Regul. Pept.* 1996; **61**: 125–34.
42. Dawidson I, Bloom M, Lundeberg T, Theodorsson E, Angmar-Mansson B. Neuropeptides in the saliva of healthy subjects. *Life Sci.* 1997; **60**: 269–78.
43. Pernow B. Substance P. *Pharmacol. Rev.* 1983; **35**: 85–141.
44. Bevan S, Hothi S, Hughes G *et al.* Capsazepine: A competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 1992; **107**: 544–52.
45. Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 1999; **51**: 159–211.
46. Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J. Physiol.* 1977; **73**: 251–9.

5. ANEXO - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra vegetal

As partes aéreas do *C. zehntneri* foram coletadas em Maio de 2003 nas proximidades da cidade de Viçosa, no Estado do Ceará, Brasil. A identificação das plantas foi confirmada pelo Dr. Abreu Matos (Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal do Ceará).

5.2. Extração e análise química

O OECZ foi preparado a partir de folhas frescas por destilação a vapor e analisado quimicamente conforme previamente descrito (Craveiro et al., 1976). A análise do OECZ foi realizada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC/MS; modelo 6971; Hewlett-Packard, USA). Os componentes desse processo foram: uma coluna de dimetilpolisiloxano DB-1 acoplada a uma coluna capilar de sílica (20 m x 0.25 mm; 0.1 μ m); hélio como gás carreador (1 ml/min); temperatura injetora de 250 °C; detector de temperatura em 280 °C; e a temperatura da coluna foi 50-180 °C em 4 °C/min e 180-250 °C em 20 °C/min. A composição foi identificada utilizando uma pesquisa em uma livreria de massa espectral e com espectroscopia por ressonância nuclear magnética [^{13}C] (ALENCAR et al., 1984).

5.3. Soluções e drogas

O pentobarbital sódico (Sanofi, Libourne, França) e a heparina (Laboratórios Léo AS, Montigny-le-Bretonneux, França) foram utilizados em soluções injetáveis comercialmente disponíveis.

Para os experimentos *in vivo*, anetol, estragol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) e OECZ foram dissolvidos em Tween 80 (2%), diluídos até o volume desejado com solução salina isotônica e agitados, imediatamente antes do uso. Estudos prévios têm mostrado que esse veículo não tem efeitos significativos sobre a PAM e a FC basais durante um período de 20 minutos (LAHLOU et al., 2002a, 2004). O brometo de metil-atropina, o atenolol hidrocloreídrico e o L-NAME foram adquiridos da Sigma Chemical,

dissolvidos em salina isotônica imediatamente antes do uso, e administrados em volumes de 1 mL/kg de peso corporal do animal.

Nos experimentos *in vitro*, o OECZ foi preparado diretamente em solução Tyrode e agitado imediatamente antes do uso, enquanto que a fenilefrina hidrocloreídrica (Sigma), a acetilcolina hidrocloreídrica (Sigma) e o verapamil hidrocloreídrico (Sigma) foram inicialmente dissolvidos em água destilada e depois com solução Tyrode até a concentração desejada.

A capsaicina (Sigma) que foi utilizada no tratamento perineural do vago foi preparada em 1% de Tween 80, 1% de etanol e 98% de salina. Para a injeção i.v., a solução de CAP na concentração desejada, foi preparada no dia do experimento pela diluição de uma solução-mãe (1% Tween; 1% etanol; 98% salina) com salina isotônica de acordo com o peso do animal. A capsazepina (Tocris, Ballwin, MO, USA) foi primeiro diluída em dimetil-sulfóxido (Sigma), em uma concentração de 0,1 M, e diluída adicionalmente com salina contendo 10% de Tween 80 e 10% de etanol até uma concentração final de 1 mg/ml. O RP 67580 (Tocris) foi inicialmente diluído em dimetil-sulfóxido e diluído adicionalmente com salina até obter a concentração desejada.. Para a administração intra-tecal (i.t.) a droga ou o seu veículo foram administrados em um volume de 10 µl e o cateter foi preenchido, utilizando uma micro-seringa Hamilton, com 10 µl (volume do cateter) de salina para assegurar a administração completa da dose.

5.4. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar machos com peso entre 280 e 340g, mantidos sob condições de temperatura constante (22 ± 2 °C) com ciclo claro-escuro padrão (12h claro/ 12h escuro), e com água e alimento *ad libitum*. Os cuidados com os animais estavam de acordo com o Guia para Cuidado e Utilização de Animais de Laboratório, publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH Publicações 85-23, revisado em 1996).

5.5. Implantação dos cateteres

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg), por via intra-peritoneal (i.p.), e dois cateteres (PE-10 conectado PE-50) heparinizados (125

UI/ml em salina isotônica) foram implantados na aorta abdominal (para o registro da PA e da FC) e na veia cava inferior (para administração de drogas), ambos 1 cm abaixo da artéria renal, conforme descrito previamente (LAHLOU et al., 1999). Após fixação com amarras locais nos vasos e nos tecidos adjacentes, as cânulas foram levadas por via s.c. até a região cervical onde foram exteriorizadas e fixadas em posição inacessível para o animal. Em seguida, as feridas cirúrgicas foram suturadas e os animais receberam uma injeção intramuscular de penicilina (24000 UI). Esses animais foram mantidos em gaiolas individuais e foi guardado um período de 24 horas antes da realização de qualquer experimento circulatório, tanto em ratos acordados como em ratos anestesiados.

Em um outro grupo de animais, foram realizados dois procedimentos adicionais de cateterização, sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg de anestesia inicial e 15 mg/Kg de suplementação quando necessário):

- Um outro cateter (PE 10), preenchido com solução salina heparinizada (125 UI/ml), foi inserido na artéria epigástrica superficial direita para permitir a injeção retrógrada i.a. dentro da artéria femoral (Figura 7).

- Um segundo cateter permitiu a administração i.t. de drogas a nível lombar. Ele foi preenchido com salina isotônica, inserido no espaço sub-aracnoideo através de uma incisão feita em T13 e sua extremidade foi avançada no sentido caudal até o nível medular L5-L6 (local do “input” aferente proveniente dos nervos ciático e safeno).

Adicionalmente, uma curta cânula traqueal foi inserida nos animais por meio de uma traqueostomia permitindo a respiração espontânea em posição supina. No final dos experimentos, os animais foram sacrificados com uma overdose de Tiopental, por via i.v., e tiveram suas colunas lombares examinadas com a injeção de azul de bromofenol para avaliar o posicionamento correto do cateter i.t assim como a ausência de lesões espinhais induzidas pelo cateter. Os resultados individuais foram descartados caso não fossem atingidos esses critérios.

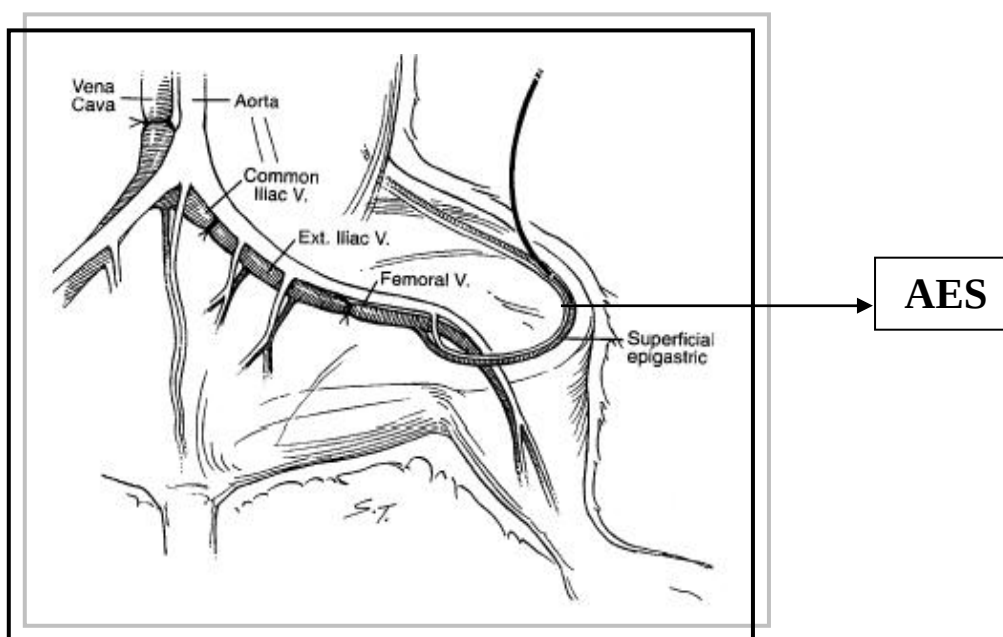


Figura. 7. Localização da artéria epigástrica superficial (AES)

5.6. Sistema de Registro

No momento do experimento, o cateter aórtico foi conectado a um transdutor de pressão (Statham P23 DI) acoplado a um polígrafo Gilson modelo 5/6H (Gilson Medical Eletronics, Middletown, USA). Esta unidade forneceu as pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD). A PAM foi calculada através da fórmula: $PAM = PAD + [(PAS - PAD) / 3]$. A FC foi obtida por derivação do sinal da PA através de um cardiotacômetro.

5.7. Protocolo experimental

5.7.1. Experimentos *in vivo*:

A administração i.v. do OECZ (ou de seus principais constituintes) foi sempre efetuada após um período de estabilização da PAM e da FC. Tais parâmetros foram registrados durante 10 a 20 minutos, de acordo com a duração dos efeitos. Quando foram administradas injeções subseqüentes do OECZ (ou de seus principais constituintes) os valores da PAM e da FC foram acompanhados até que retornassem aos seus respectivos níveis de controle (base). As doses do OE (ou seus principais

constituintes) ou dos antagonistas foram escolhidas de acordo com as recomendadas na literatura e com base em experimentos previamente realizados em nosso laboratório.

a) Série 1

- Esta série de experimentos foi realizada no intuito de estabelecer a relação dose-efeito. Para isso, doses crescentes, em bolus, do OECZ (1, 5, 10, 20 mg/kg) e de seus principais constituintes, anetol (1, 5, 10 mg/kg) e estragol (1, 5, 10 mg/kg) foram administradas por via i.v. em ratos acordados (n = 9, 8, e 6, respectivamente) e anestesiados (n = 6, 7, e 6, respectivamente). O curso temporal das variações da PAM e da FC foi registrado após a administração desses agentes.

b) Série 2

- Nessa série, o papel do sistema nervoso autônomo (SNA) e do óxido nítrico (ON) foi investigado em ratos acordados. Dessa forma, a curva dose-resposta para os efeitos do OECZ sobre a PAM e a FC foi determinado em animais pré-tratados, 10 minutos antes por via i.v., com um dos seguintes agentes:

- salina: 1ml/Kg
- L-NAME: 20 mg/Kg (BOUSSAIRI & SASSARD, 1994)
- metil-atropina: 1 mg/Kg (VASQUEZ & KRIEGER, 1997)
- atenolol: 1.5 mg/Kg (VASQUEZ & KRIEGER, 1997)

c) Série 3

Nesta série experimental o objetivo foi investigar a participação das fibras sensoriais na mediação do efeito hipotensor do OECZ. Para isso foram realizados, em ratos anestesiados e traqueostomizados, os seguintes experimentos:

I) Pré-tratamento neonatal com capsaicina

Ratos Wistar machos recém-nascidos (7-10g), sob anestesia com éter, foram pré-tratados por via subcutânea (s.c.) no segundo dia de vida com uma dose única de

capsaicina (50 mg/kg) ($n = 5$) ou com o mesmo volume (40 μ L) de veículo (10% de etanol, e 10% de Tween 80 em salina) ($n = 5$). (JANCSÓ et al, 1977). Os experimentos circulatórios foram realizados 90 dias após o pré-tratamento com capsaicina ou com o seu veículo. O sucesso do tratamento com capsaicina foi confirmado por uma significativa redução no número de movimentos de esquiva (“wiping test”) (LOREZ et al., 1983) após a aplicação tópica desse agente (1% em 50 μ L) na conjuntiva de ratos tratados no período neonatal que receberam a capsaicina (10.0 ± 0.4) quando comparado com os respectivos controles que receberam veículo (23.0 ± 1.1).

II) Vagotomia cervical bilateral

O curso temporal da ação do OECZ (1-20 mg/Kg) e seus principais constituintes, anetol (ANT) e estragol (EST) (1-10 mg/Kg), sobre a PAM e a FC, foi estudado 15 minutos após bivaotomia cervical.

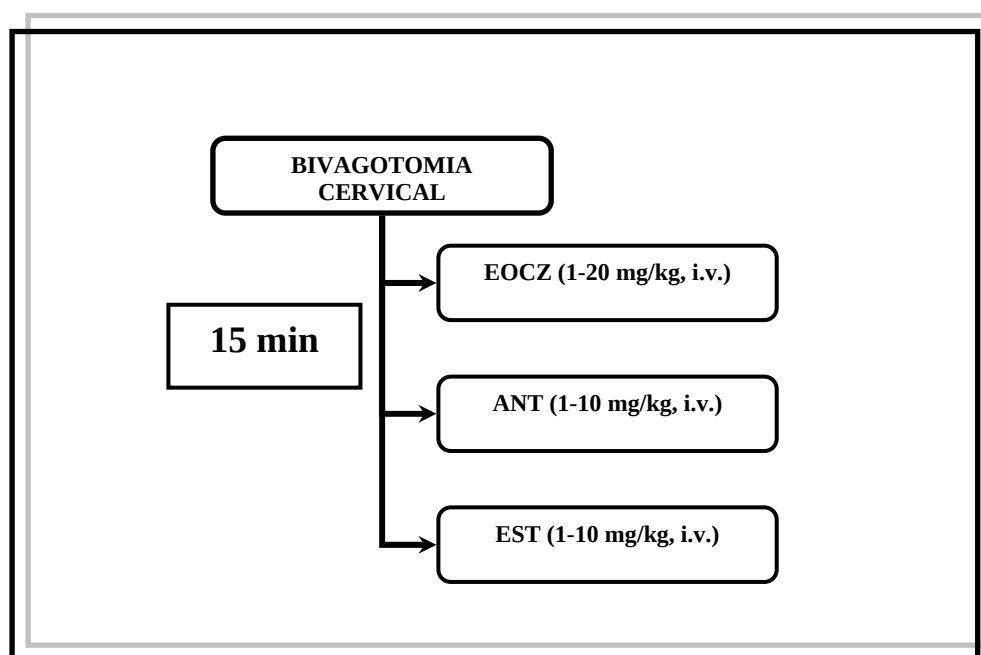


Figura 8. Figura ilustrativa do protocolo experimental da injeção i.v de OECZ e seus principais constituintes em ratos bivagotomizados.

III) Tratamento perineural com capsaicina

Esses experimentos foram realizados para avaliar o papel das fibras aferentes vagais tipo-C na mediação das respostas cardiovasculares ao OECZ. Para este propósito, nós utilizamos o TPN bilateral com CAP, que é um método bem conhecido para induzir um bloqueio seletivo da condução neural dos aferentes vagais tipo-C

(JANCÓS & SUCH, 1983; SCHELEGLE et al., 2000). Dessa forma, pedaços de algodão embebidos em uma solução da CAP (250 µg/ml) foram colocados ao redor de um segmento de 2-3 mm do nervo vago isolado bilateralmente por 20 minutos e depois removidos.

As alterações máximas na PAM e na FC evocadas pelo OECZ (10 mg/kg, i.v.) foram avaliadas antes e após o TPN com CAP (n = 7) ou seu veículo (n = 3) (Figura 8). A abolição do reflexo hipotensor e bradicartizante em resposta à CAP (1 µg/kg, i.v.) foi tomado como critério de êxito do TPN com CAP.

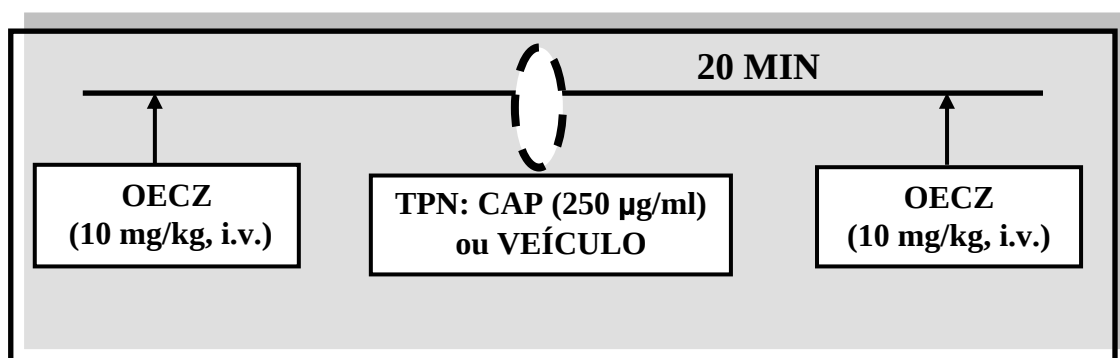


Figura 9. Esquema ilustrando o protocolo experimental de TPN com CAP e injeção i.v. de OECZ.

IV) Avaliação do reflexo espinhal

O objetivo desses experimentos foi fornecer evidência direta do envolvimento das fibras aferentes primárias que contêm SP na mediação da resposta depressora secundária à injeção i.a. de OECZ (reflexo espinhal), conforme tem sido demonstrado para a administração i.a. de CAP (DONNERER & LEMBECK, 1982; YEH ET AL., 1993, YANG et al., 1993). Portanto, cada animal (n = 6) recebeu uma injeção de OECZ (10 mg/kg, i.a.) e as alterações máximas da PAM e da FC foram determinadas. Três minutos após a primeira e sete minutos antes da segunda injeção de OECZ (10 mg/kg, i.a.), o antagonista seletivo para NK1 (RP 67580; 7,8 nmol i.t. ao nível de L5-L6) (POULAT et al., 1996) ou o seu veículo foram administrados e as alterações máximas da PAM e da FC foram novamente determinadas (Figura 9).

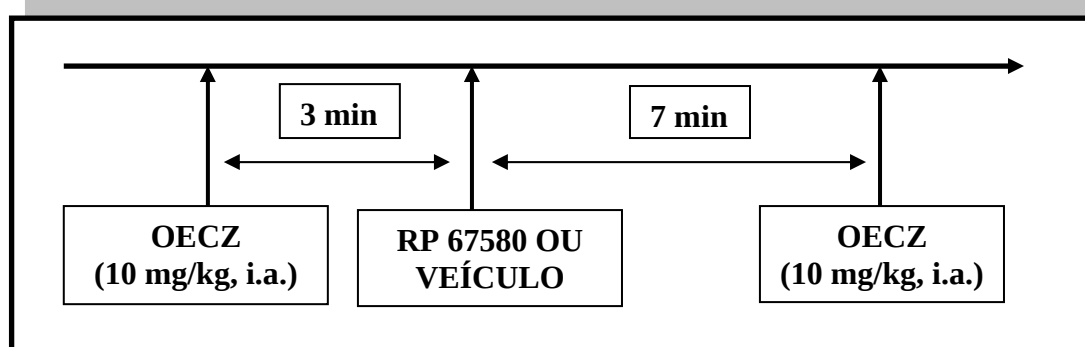


Figura 10. Protocolo experimental de tratamento i.t. com antagonista de SP.

V) Pré-tratamento com antagonista para capsaicina

Esses experimentos foram realizados na intenção de determinar o possível envolvimento da ativação do receptor VR1 na mediação das alterações cardiovasculares induzidas pelo OECZ. Portanto, cada animal ($n = 6$) recebeu uma injeção de OECz (10 mg/kg, i.v.) e as alterações máximas da PAM e da FC foram determinadas. Oito minutos após a primeira e dois minutos antes da segunda injeção de OECz (10 mg/kg, i.v.), o antagonista competitivo do receptor VR1, CZP (1 mg/kg, i.v.) (MALINOWSKA et al., 2001; BEVAN et al., 1992) ou o seu veículo ($n = 4$) foram administrados e mais uma vez foram determinadas as alterações máximas da PAM e da FC (Figura 10).

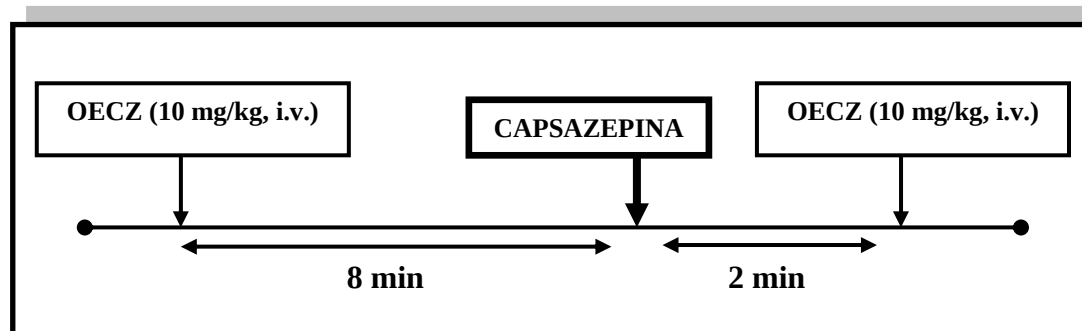


Figura 11. Esquema ilustrativo do protocolo de pré-tratamento i.v. com capsazepina.

5.7.2. Experimentos *in vitro*

Os animais foram sacrificados, a aorta torácica removida e imersa em meio de perfusão a temperatura ambiente. Após remoção do tecido adiposo e do tecido conectivo aderidos, a aorta foi cortada em tiras cilíndricas (1 mm x 5 mm), dispostas em anéis, que foram suspensas em banhos para órgão isolado (10 ml) contendo o meio de perfusão a 37 °C, com pH = 7,4 e aerado continuamente. Os anéis de aorta foram estiradas com uma tensão passiva de 0,5 g que foi registrada através de um transdutor de força isométrico (Grass Model FTO3, Quincy, Mass., USA) conectado a um transdutor isométrico (Modelo Grass FT03, Quincy, Mas., USA) conectado a um sistema computadorizado de aquisição de dados (Dataq, Akron, OH, USA). Após um período de equilíbrio da preparação (cerca de 60 minutos), foi induzida uma contração controle pela adição de 60 mM de KCl ao banho. Quando duas contrações controles sucessivas mostraram amplitudes similares, a preparação foi considerada como equilibrada. Para avaliar os efeitos do OECZ sobre a contração induzida pela fenilefrina, as preparações foram expostas a concentrações crescentes do óleo (1-1000 µg/mL, n = 6) durante 5 minutos uma vez que uma contração sustentada em resposta a uma concentração sub-máxima (3 µM) de fenilefrina (PHE) foi estabelecida.

Para avaliar se as respostas vasculares do EOCZ eram dependentes do endotélio / ON, os efeitos vasculares do óleo (1-1000 µg/mL) foram determinados em preparações sem endotélio (n = 7) ou em preparações com endotélio incubadas com L-NAME (50 µM, n = 6) 10 minutos antes da adição de PHE. O endotélio foi removido imediatamente após a dissecação através de movimentos suaves na luz do vaso com um dispositivo apropriado. Toda preparação, com ou sem endotélio, foi testada no início do experimento com 1 µM de acetilcolina (ACh). A ausência de efeito vasorrelaxante induzido pela ACh foi tomada como evidência de que a preparação estava efetivamente desprovida de endotélio. Os dados do relaxamento foram expressos como porcentagens da contração induzida pela PHE.

5.8. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± SEM.

Nos experimentos *in vivo* as alterações máximas (expressas como porcentagem dos valores basais) na PAM e na FC após cada dose de OECz, anetol e estragol, foram usadas para construir uma curva dose-resposta.

Nos experimentos *in vitro* o valor da IC₅₀, definido como a concentração do OECZ (em µg/mL) necessária para produzir uma redução de 50% da contração máxima induzida pela fenilefrina, foi utilizado para avaliar a sensibilidade vascular ao OECZ. Ela foi calculada a partir da interpolação de plotagens semi-logarítmicas, e expressa como média geométrica [intervalo de confiança de 95%].

A significância ($P < 0.05$) dos resultados foi avaliada por meio do teste t de Student pareado e não-pareado, e pela análise de variância (ANOVA) a uma e a duas vias, seguida pelos testes de comparações múltiplas de Dunnett ou de Bonferroni quando apropriados.