

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISILOGIA - MESTRADO

FERNANDO TREVISAN

EFEITOS DO ESTRAGOL NA CONTRATILIDADE DE MÚSCULO CARDÍACO DE
RATO

CURITIBA

2015

FERNANDO TREVISAN

EFEITOS DO ESTRAGOL NA CONTRATILIDADE DE MÚSCULO CARDÍACO DE
RATO

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Setor
de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo Tadeu Hochmuller
Fogaça

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Trevisan, Fernando

Efeitos do estragol na contratilidade de músculo cardíaco de rato. /
Fernando Trevisan. – Curitiba, 2015.

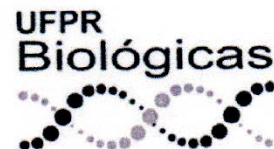
52 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



P A R E C E R

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FERNANDO TREVISAN** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

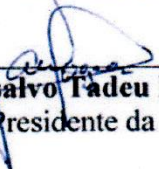
Curitiba, 02 de setembro de dois mil e quinze.



Professora Doutor Júlio Cesar Francisco
PUCPR- Membro Titular



Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

RESUMO

O estragol é um constituinte natural de diversas plantas, como manjeriço, erva-doce, anis-estrelado e *Croton zehntneri*, planta bastante popular no nordeste brasileiro. É utilizado como aromatizante nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, além de ser utilizado na medicina e culinária populares. São conhecidos alguns efeitos antimicrobianos, antifúngicos, edematogênicos, antinociceptivos, bloqueadores de transmissão neuromuscular, depressores de sistema nervoso central, diminuição de excitabilidade neuronal e antiespasmódicos. Porém inexistem estudos de seus efeitos na musculatura cardíaca. Para avaliar os efeitos do estragol sobre a atividade mecânica do músculo cardíaco foram desenvolvidos protocolos utilizando músculos papilares de ratos Wistar machos. Os experimentos foram realizados por meio de registros da tensão isométrica, evidenciados a partir de estimulação elétrica – frequência de 0,5 Hertz, pulsos de 10 volts, duração 5 milissegundos – na ausência e na presença de estragol. Os resultados demonstraram que o estragol promoveu redução na produção de força muscular isométrica. Também houve redução nas velocidades máximas de contração e relaxamento. Os parâmetros temporais da contração (tempos para atingir o pico de força e de relaxamento completo) não sofreram alteração significativa. Foram realizadas pausas (15, 30 e 60 segundos) na estimulação elétrica para verificação das potenciações pós pausa e relativa, e o que se constatou foi diminuição nas potenciações pós pausa em relação aos controles e aumento nas potenciações relativas. Todos esses efeitos ocorreram de maneira concentração-dependente. Em solução contendo concentrações crescentes de íon cálcio, o estragol reduziu a força máxima e deslocou a força/[Ca²⁺] para a direita. O efeito inotrópico negativo do estragol não foi revertido pela presença de isoproterenol. Estes dados sugerem que o efeito inotrópico negativo do estragol é consequência do bloqueio de canais de cálcio presentes na membrana celular.

Palavras-chave: músculo cardíaco, estragol.

ABSTRACT

The estragole is a natural constituent of many plants, such as sweet-basil, sweet-fennel, star anise and *Croton zehntneri*, quite popular plant in northeastern Brazil. It is used as a flavoring in the food, cosmetics and pharmaceuticals industries, as well as being used in popular medicine and cooking. There are some known effects, like antimicrobial, antifungal, edematogenic, antinociceptive, neuromuscular transmission blockers, central nervous system depressants, decreased neuronal excitability and antispasmodic. Despite that, there are no studies about his effects in heart muscle. To evaluate the effects of estragole on the mechanical activity of cardiac muscle, protocols were developed using papillary muscle of male Wistar rats. The experiments were performed through records of isometric tension, evidenced from electrical stimulation - frequency of 0.5 Hertz, 10-volts pulses, 5 milliseconds duration - in the absence and presence of estragole. The results demonstrated that the estragole promoted a decrease in the production of isometric muscle strength. There were also reductions in maximum speed of contraction and relaxation. The temporal parameters of contraction (time to peak force and complete relaxation) didn't demonstrate significant change. Breaks were sustained (15, 30 and 60 seconds) in electrical stimulation to check the post-rest and relative potentiation, and what we found was a decrease in post-rest potentiation compared to controls and increased on relative potentiation. All these effects occurred concentration-dependent manner. In solution containing increasing concentrations of calcium, estragole reduced maximum strength and shifted strength/[Ca²⁺] to the right. The negative inotropic effect of estragole was not reversed by the presence of isoproterenol. These data suggest that the negative inotropic effect of estragole is a consequence of blocking calcium channels present on the cell membrane.

Palavras-chave: cardiac muscle, estragole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização da fibra muscular	12
Figura 2: Planta de <i>Croton zehntneri</i>	16
Figura 3: Estrutura molecular do estragol	17
Figura 4: Método de mensuração dos tempos para atingir força máxima e completo relaxamento da contração de músculo papilar de rato estimulado eletricamente ...	23
Figura 5: Método de mensuração das velocidades máximas de contração e relaxamento de músculo papilar de rato estimulado eletricamente	24
Figura 6: Efeito do estragol em concentrações cumulativas na produção de força em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	27
Figura 7: Curvas de desenvolvimento de força obtidas no controle e em concentrações crescentes de estragol em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	28
Figura 8: Produção de força em músculo papilar de rato estimulado eletricamente, na ausência de estragol	29
Figura 9: Tempo necessário para obtenção do valor máximo de força a partir do início da contração de músculo papilar de rato estimulado eletricamente	30
Figura 10: Tempo necessário para obtenção do completo relaxamento a partir do valor máximo de força de músculo papilar de rato estimulado eletricamente	31
Figura 11: Velocidade máxima da contração em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	32
Figura 12: Velocidade máxima do relaxamento em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	33
Figura 13: Potenciação pós pausa de músculo papilar de rato estimulado eletricamente na ausência de estragol	34
Figura 14: Produção de força pré e pós pausas de 15, 30 e 60 segundos no controle e na concentração de estragol 0,5 mM em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	35
Figura 15: Potenciação relativa pós pausas de 15, 30 e 60 segundos no controle e em concentrações cumulativas de estragol em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	36

Figura 16: Curvas de potenciação pós pausa de 15 segundos obtidas no controle durante o protocolo concentração-resposta	37
Figura 17: Curvas de potenciação pós pausa de 15 segundos obtidas com estragol 0,5 mM durante o protocolo concentração-resposta	37
Figura 18: Produção de força em diferentes concentrações extracelulares de Ca ²⁺ , na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente (mN/mm ²)	38
Figura 19: Produção de força em diferentes concentrações extracelulares de Ca ²⁺ , na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente (%)	39
Figura 20: Produção de força no controle e após inclusão de isoproterenol 0,1 mM, na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do estragol em concentrações cumulativas na produção de força em músculo papilar de rato estimulado eletricamente.....	48
Tabela 2: Produção de força na ausência de estragol em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	48
Tabela 3: Tempo para atingir valor máximo de força a partir do início da contração isométrica de músculo papilar de rato estimulado eletricamente na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas	48
Tabela 4: Tempo para atingir relaxamento completo a partir do valor máximo da contração isométrica de músculo papilar de rato estimulado eletricamente na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas	49
Tabela 5: Velocidade máxima de contração na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	49
Tabela 6 – Velocidade máxima de relaxamento na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	49
Tabela 7 – Produção de força pós pausas de 15, 30 e 60 segundos na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	50
Tabela 8: Produção de força pós pausas de 15, 30 e 60 segundos na ausência e na presença de estragol em concentrações cumulativas em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	51
Tabela 9: Produção de força com concentrações cumulativas de cálcio extracelular, na ausência e na presença de estragol (0,5 mM), em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	52
Tabela 10: Produção de força com a adição de isoproterenol (0,1 mM), na ausência e na presença de estragol (0,5 mM), em músculo papilar de rato estimulado eletricamente	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO E CONTRATILIDADE NO MÚSCULO CARDÍACO	10
1.1.1. SARCOLEMA E TÚBULOS TRANSVERSOS	10
1.1.2. RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO	11
1.1.3. MIOFILAMENTOS	11
1.1.4. CANAIS DE CÁLCIO DO SARCOLEMA	13
1.1.5. TROCADOR SÓDIO/CÁLCIO (NCX)	13
1.1.6. RECEPTOR DIIDROPIRIDÍNICO (DHPR) E RECEPTORES DE RIANODINA (RYR)	13
1.1.8. BOMBA DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (SERCA) E FOSFOLAMBAM (PLB)	14
1.2. SUBSTÂNCIAS NATURAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS	14
1.3. ESTRAGOL	16
1.4. JUSTIFICATIVA	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. ANIMAIS	21
3.2. METODOLOGIA DAS PREPARAÇÕES COM MÚSCULO PAPILAR INTACTO	21
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	22
3.3.1. CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA.....	22
3.3.2. PROTOCOLO CONTROLE	24
3.3.3. PROTOCOLO DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA AO CÁLCIO	25
3.3.4. PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO INOTRÓPICA	25
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4. RESULTADOS	27
4.1. CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA	27
4.2. PROTOCOLO CONTROLE	28

4.3. EFEITOS DO ESTRAGOL NOS PARÂMETROS TEMPORAIS DA PRODUÇÃO DE FORÇA ISOMÉTRICA	29
4.4. EFEITOS DO ESTRAGOL SOBRE AS VELOCIDADES MÁXIMAS DE CONTRAÇÃO (+dF/dT) E RELAXAMENTO (-dF/dT)	31
4.5. EFEITOS DO ESTRAGOL SOBRE A POTENCIAÇÃO PÓS PAUSA	33
4.6. PROTOCOLO DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA AO CÁLCIO	37
4.7. PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO INOTRÓPICA	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICES	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO E CONTRATILIDADE NO MÚSCULO CARDÍACO

Acoplamento excitação-contração (AEC) é um termo utilizado para designar uma série de eventos que envolvem a geração do potencial de ação até o processo de liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. Neste processo o íon cálcio tem fundamental importância. Ringer (1883), já havia observado a importância do cálcio na contração de músculo cardíaco em seus estudos ainda no século 19.

Conforme Oliveira (2014), “no músculo cardíaco a contração é controlada pelas variações da quantidade de cálcio mobilizado, das velocidades de liberação e de captação e pela sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio. Outro fator que participa da regulação da força de contração é a modulação da extrusão de cálcio”.

Para que o acoplamento excitação-contração e a contratilidade ocorram, diversas estruturas celulares são envolvidas.

1.1.1. SARCOLEMA E TÚBULOS TRANSVERSOS

Sarcolema é a membrana plasmática da célula, sendo composto pela bicamada de moléculas fosfolípídicas. No sarcolema estão localizados os canais e bombas por onde o cálcio entra e sai da célula, além de possuir uma invaginação chamada de *túbulo transverso* (ou túbulo T) que, ao aumentar a área de superfície, facilita a propagação do estímulo excitatório para dentro da célula. Estas estruturas tubulares possuem canais de cálcio dependentes de voltagem que apresentam importante papel no processo de contração muscular e contribuem com a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (AIRES, 2012).

1.1.2. RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO

Segundo Aires (2012), trata-se de um “sistema tubular, de localização estritamente intracelular, composto por túbulos que correm longitudinalmente por entre as miofibrilas e, no disco Z, formam cisternas que entram em contato com o

sistema transverso”. Estas organelas apresentam importante papel na ativação da contração e no processo de relaxamento da fibra muscular cardíaca pois são reservatórios intracelulares de cálcio, e suas principais funções são sequestrar e liberar cálcio para o mioplasma.

1.1.3 MIOFILAMENTOS

Os miofilamentos são constituintes dos miócitos cardíacos com importante papel mecânico na contração e no relaxamento muscular. São constituídos pelos filamentos grossos, contendo miosina, e pelos filamentos finos, contendo actina, bem como por outros componentes contráteis do citoesqueleto, como a tropomiosina e o complexo troponina (subunidades TnC, TnI e TnT). Este material contrátil, organizado, formando uma estrutura repetitiva chamada *sarcômero*, é considerado a unidade contrátil básica do músculo (AIRES, 2012).

O sarcômero é limitado por duas linhas ou discos Z. Entre eles, há regiões claras e escuras denominadas, respectivamente, bandas I e A. A banda I é uma região isotrópica, não desvia a luz polarizada e é composta por filamentos finos que se ligam à linha Z. Assim, de cada lado da linha Z, temos uma hemibanda I. A banda A é anisotrópica, desvia a luz polarizada, daí sua aparência escura quando vista ao microscópio de polarização. É constituída por filamentos grossos. Nas porções laterais da banda A, existe uma região de superposição de filamentos grossos e finos e, entre estas, temos uma região onde só se encontram filamentos grossos. A esta última região, localizada no meio da banda A, chamamos de banda H. Na porção mediana dos sarcômeros, no meio da banda A, os filamentos grossos apresentam um espessamento que gera a linha M. A figura 1 mostra os componentes da fibra muscular (AIRES, 2012).

A contração muscular ocorre devido ao deslizamento dos filamentos finos (actina) sobre os filamentos grossos (miosina), decorrente da ligação em ciclos repetitivos das cabeças da miosina nos filamentos da actina, seguida de mudança conformacional das cabeças da miosina, energizadas pela hidrólise de ATP. Todavia, este deslizamento só é possível a partir de variações dos níveis do íon cálcio no mioplasma da célula. Em condição de repouso, os sítios de ligação das cabeças da miosina com a actina, para formar as pontes cruzadas em estados de forte ligação e gerar o deslizamento, estão bloqueados pela tropomiosina. Quando o potencial de

ação atinge o sarcolema e se propaga aos túbulos T, ocorre alteração conformacional dos receptores de diidropiridina sensíveis à voltagem. Estes receptores interagem com os canais liberadores de cálcio presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, os receptores rianodínicos, causando elevação considerável na concentração citoplasmática de cálcio, já que esta organela é o principal reservatório de íon cálcio do mioplasma cardíaco. Este íon liga-se à troponina C presente no filamento fino (complexo troponina/tropomiosina) gerando alteração conformacional deste complexo e expondo o sítio de ligação da miosina com a actina, permitindo o desencadeamento do ciclo de pontes cruzadas e, conseqüentemente, a geração de força e/ou o encurtamento muscular. O processo de relaxamento se dá, principalmente, pela recaptação do íon cálcio mioplasmático pela Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático. Quando o íon cálcio se desliga da troponina C, a tropomiosina volta a bloquear o ponto de ligação da miosina à actina, promovendo relaxamento muscular (OLIVEIRA, 2014).

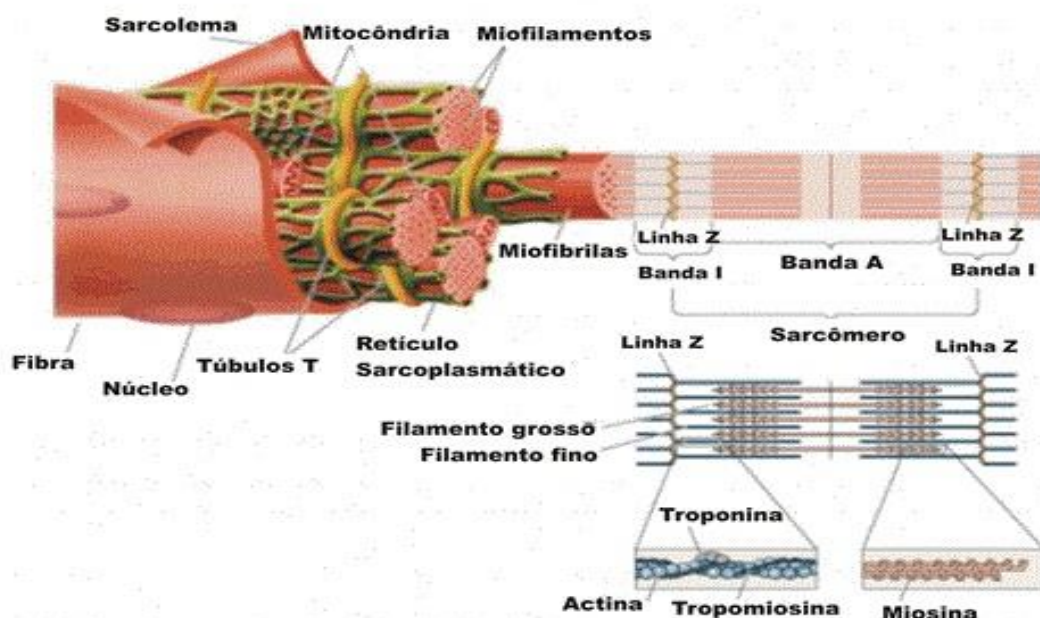


Figura 1: Organização da fibra muscular. Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio22.php> Acesso em 07-Jan-2014.

1.1.4 CANAIS DE CÁLCIO DO SARCOLEMA

Segundo Aires (2012), “os canais de cálcio dependentes de voltagem são complexos proteicos multiméricos, que intermedeiam a entrada de íons cálcio nas células excitáveis”. Dois tipos destes canais são expressos no coração: T e L ($I_{Ca,T}$ e $I_{Ca,L}$), sendo o tipo L o mais comumente expresso no coração.

No miocárdio, “o influxo de Ca^{2+} estimula a liberação de Ca^{2+} do estoque intracelular do retículo sarcoplasmático, com subsequente aumento transiente da concentração intracelular de Ca^{2+} , que resulta na ativação dos miofilamentos, produzindo a contração muscular” (AIRES, 2012).

1.1.5 TROCADOR SÓDIO/CÁLCIO (NCX)

Conforme Aires (2012), trata-se de um trocador que “funciona com uma estequiometria de 3Na:1Ca, isto é, a entrada de 3 íons Na^+ para o meio intracelular fornece energia suficiente para transportar um íon Ca^{2+} do citoplasma ao exterior da célula”. Contudo, o sentido em que ocorre a troca pode ser invertido, seja pelo potencial de membrana, seja pelo gradiente eletroquímico dos íons, o que acarreta em entrada de cálcio ao mioplasma e saída de sódio ao espaço extracelular. Desta forma, este canal pode participar da ativação do processo contrátil e auxiliar no relaxamento da fibra (AIRES, 2012; OLIVEIRA, 2014).

1.1.6 RECEPTORES DIIDROPIRIDÍNICOS (DHPR) e RECEPTORES DE RIANODINA (RYR)

Os receptores diidropiridínicos (DHPRs) estão localizados na membrana sarcolemal e os receptores de rianodina (RyRs) na membrana do retículo sarcoplasmático. O potencial de ação, ao atingir os DHPR's, induz uma alteração conformacional neste receptor. Esta alteração acarreta em entrada de cálcio para o mioplasma e gera a abertura dos canais liberadores de cálcio do retículo sarcoplasmático, os RyR's, causando o aumento da concentração de cálcio no citoplasma da célula. Este processo é conhecido como *liberação de cálcio induzida por cálcio*, e é fundamental para elevar a concentração mioplasmática deste íon a níveis suficientes para gerar a contração muscular (AIRES, 2012; OLIVEIRA, 2014).

1.1.7 BOMBA DE CÁLCIO DO RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (SERCA) E FOSFOLAMBAM (PLB)

Conforme Aires (2012), importante fase do relaxamento muscular ocorre quando o Ca^{2+} é sequestrado pelo retículo sarcoplasmático através da Ca^{2+} ATPase – SERCA – de sua membrana. Com a redução da concentração de cálcio no mioplasma, a tropomiosina retorna a sua posição de repouso, bloqueando o local de ligação para a miosina na actina, e a contração não pode ocorrer. Esta bomba tem sua atividade reduzida por um polipeptídeo chamado fosfolambam, que associa-se fisicamente à bomba quando desfosforilado.

1.2. SUBSTÂNCIAS NATURAIS E ÓLEOS ESSENCIAIS

Conforme Viegas JR & Bolzani (2006), os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos. As técnicas desenvolvidas e utilizadas no Egito para conservação de múmias ainda são um desafio para a Química moderna. Na Idade Antiga, além de técnicas medicinais, muitos venenos foram descobertos na natureza e utilizados para fins de defesa, caça e mesmo ilícitos, como a utilização do veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) na execução de prisioneiros.

O uso de produtos de fonte natural como medicamento foi muito comum na Antiguidade, período geralmente chamado de pré-científico, quando já se verificava a importância da utilização de substâncias botânicas na forma de óleos, tais como os óleos de oliva, gergelim, rícino, entre outros. No Egito Antigo, há textos famosos de medicina, como o papiro de Ebers, um dos mais antigos tratados médicos conhecidos com cerca de 3500 anos, que prescreve o uso terapêutico de óleos como os de alho,

girassol, açafrão, terebentina e outros e o uso de mel ou de cera de abelhas como veículo ou ligamento para os óleos usados visando-se a melhoria da absorção do medicamento, existindo na época inclusive um exótico extrato oleoso de víbora usado para tratamento de calvície. Na Índia da Antiguidade, têm-se os textos conhecidos desde 3000 a.C. como *Ayurvedas* (“ciência da vida”), que descreviam a utilização de diversos óleos viscosos para o tratamento de uma série de doenças e cujo maior desenvolvimento se deu no século V a.C.. Para a tradição de *Ayurvedas* há a lenda do médico dos deuses *Dhanwantari* (ou *Dhanvantari*) que é tido como o controlador da medicina e que pode ser representado carregando um pote com o néctar oleoso da imortalidade, *amrita*. Realmente, desde a Antiguidade e até a Idade Média, já se destacava o uso de remédios botânicos na forma de óleos, como os de oliva, de rosa, de meimendo, de gergelim e rícino, de mostarda e de nozes (NOGUEIRA *et al*, 2009).

Atualmente, um grande número de produtos medicinais são derivados de substâncias naturais. Conforme Viegas JR & Bolzani (2006), no início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopéias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas. Dada a importância das plantas para a medicina da época, a Química e a Medicina passaram a ter uma estreita relação, o que permitiu um rápido desenvolvimento de seus campos específicos. Desta forma, muitas substâncias ativas foram conhecidas e introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos.

Os óleos essenciais apresentam uma grande importância econômica, sendo muito utilizados na indústria como edulcorantes e aromatizantes, em perfumaria na composição de sabões, desinfetantes e cosméticos em geral, na preparação de alimentos como doces caseiros, licores, bebidas aromáticas refrescantes e aguardente de cana. São também muito utilizados na medicina popular, na forma de chás e infusatos.

1.3. ESTRAGOL

De acordo com Vincenzi *et al* (2000), o estragol (C₁₀H₁₂O) é um constituinte natural de determinadas plantas como, por exemplo, manjeriço, funcho, anis-estrelado e erva-doce. Também pode ser extraído de folhas de *Croton zehntneri*

(figura 2), também conhecida, no nordeste brasileiro, por canela de cunhã, canelinha ou canela-brava. (COELHO-DE-SOUZA, 2013).



Figura 2: Planta de *Croton zehntneri*. Disponível em <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/canelinha-croton-zehntneri.html>. Acessado em 19-Jan-2015.

Possui alguns sinônimos como: metilchavicol, p-alilanol, chavicol metiléter, 4-metoxialilbenzeno. Recebeu status de GRAS – Generally Recognized as Safe pela FEMA – Flavor and Extract Manufacturer’s Association, e foi aprovado pela Food and Drug Administration para uso alimentar (VINCENZI *et al*, 2000)

Na figura 3 está representada a estrutura molecular do estragol.

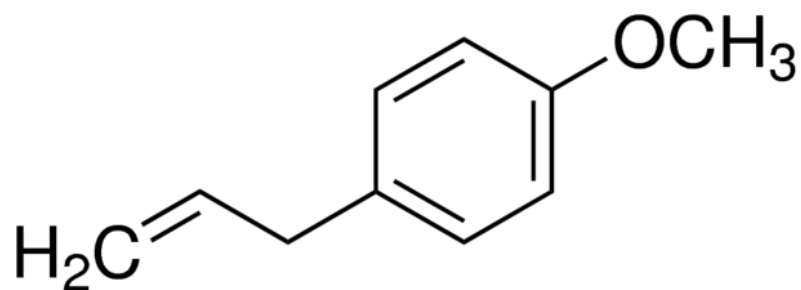


Figura 3: Estrutura molecular do estragol. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34098?lang=pt®ion=BR> Acesso em 18-Jan-2015

Apresenta ampla utilização como aromatizante nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (Vincenzi, 2000; Leal-Cardoso, 2004; Ponte, 2012; Alves,

2013), além de ser amplamente utilizado na medicina e culinária populares (Lazarini *et al*, 2000; Leal-Cardoso, 2004; Alves, 2013).

Possui ações antimicrobianas descritas (Costa, 2008; Rodrigues, 2009; Shahat, 2011; Alves, 2013), e poder de inibir o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como de potencializar o efeito do antibiótico Gentamicina em 42,8% contra *P. aeruginosa* (Rodrigues *et al*, 2009). Conforme Costa *et al* (2008), estragol apresentou atividade frente a todas as bactérias testadas exceto contra *Salmonella typhimurium*, sendo o melhor resultado frente a *Shigella flexneri*.

Também ações antifúngicas já foram percebidas, revelando atividade contra *M. canis* e *Candida spp* (Fontanelle, 2008), e mostrando um sinergismo bastante considerável com Cetoconazol no tratamento da *Candida albicans* (Shin & Pyun, 2004). Conforme Shin & Kang (2003), o óleo essencial da *Agastache rugosa* contendo 49,42% de estragol inibiu significativamente o crescimento de dez espécies fúngicas.

Conforme Ponte *et al* (2012), estragol em doses de 10 a 30 mg/kg, inibiu o efeito edematogênico induzido por diversas substâncias, tais como carragenina, substância P, bradicinina, histamina, TNF- α , composto 48/80, serotonina e nitroprussiato de sódio.

Conforme Cavalcanti *et al* (2012), utilizando *Croton zehntneri* na cicatrização de feridas cutâneas, houve redução na exsudação e no edema em proporções semelhantes ao uso de dexametasona. Também ocorreu aumento na velocidade de fechamento de feridas cutâneas.

Conforme Coelho-de-Souza *et al* (2013), o tratamento oral com o *Croton zehntneri* e seu principal constituinte, anetol, induziu uma atividade antiulcerativa, em úlceras induzidas por indometacina e por etanol em ratos. Um efeito que parece, pelo menos parcialmente, relacionado ao aumento da produção de muco gástrico.

Oliveira *et al* (2001), em sua pesquisa com óleo essencial de *Croton zehntneri*, onde predominava o constituinte anetol, mas que continha também estragol, evidenciaram eficácia deste composto como antinociceptico. Atividades vasoativas (Soares *et al*, 2007), bradicárdicas (Siqueira *et al*, 2006) e miorelaxantes (Albuquerque, 1981) também já foram observadas.

Albuquerque *et al* (1995), utilizando o extrato do *Croton zehntneri*, bem como seus constituintes anetol e estragol isoladamente, percebeu alguns eventos no músculo esquelético (ratos e sapos de ambos os sexos), e sugere que tanto o CzOE

– óleo essencial de *Croton zehntneri*, quanto os constituintes isolados, possuem dois locais de ação na fibra muscular: a membrana pós-juncional, bloqueando a transmissão neuromuscular, e o retículo sarcoplasmático, aumentando o cálcio mioplasmático. Perceberam que o estragol (além do anetol e do CzOE) reduziram a amplitude de contração muscular do gastrocnêmio de sapo gerada por estimulação ciática. Em músculo diafragma de ratos, evidenciaram acentuada inibição da resposta a estimulação indireta (via nervo frênico) pelos 3 compostos, sendo que a ação mais acentuada foi demonstrada pelo estragol (cerca de 74% de redução). Em relação a estimulação direta ao músculo (0.1 – 10.0 ms, 0.3 Hz), estragol também causou redução da resposta (cerca de 38%). Em músculo reto do abdome de sapos, estragol (e os outros 2 compostos) reduziu a amplitude de contração induzida por acetilcolina. Em reto abdominais e sartórios de sapos, evidenciaram que os 3 compostos potencializaram as contrações induzidas por cafeína. Também observaram a produção, por parte dos 3 compostos, de contrações de arrefecimento rápido.

Batatinha *et al* (1995), em sua pesquisa com óleo de *Croton zehntneri* obtido por destilação a vapor e submetido a agitação vigorosa em água e posterior filtração, evidenciou efeito depressor do sistema nervoso central de ratos e camundongos, que receberam o composto por via oral. Para tal observação, utilizaram-se de diversos protocolos experimentais, com animais que receberam o composto (grupo experimental) e animais que receberam água (grupo controle), como a avaliação de deambulação e imobilidade em campo-aberto, avaliação de tempo de perda de reflexos posturais com a administração de pentobarbital, avaliação do comportamento esteriotipado após administração de apomorfina, avaliação de catalepsia após administração de haloperidol e avaliação do limiar de convulsão após administração de pentylenetetrazol.

Alves *et al* (2013), pesquisaram a ação do estragol – dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) – na excitabilidade de gânglios da raiz dorsal de ratos, examinando a geração do potencial de ação e a corrente de sódio em neurônios intactos e isolados. Observaram que houve bloqueio na geração do potencial de ação por inibição direta da ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes. Esta ação ocorreu de forma concentração-dependente.

Leal-Cardoso *et al* (2004), investigaram os efeitos do estragol – dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) – no potencial de ação em nervo ciático de ratos estimulado eletricamente e verificaram diminuição na excitabilidade de maneira concentração-

dependente e reversível. As concentrações de estragol que demonstraram tal efeito foram as acima de 2,0 mM.

Alves (2009), utilizando óleo essencial extraído de folhas de *Croton zehntneri*, contendo anetol e estragol, e avaliando parâmetros contráteis de músculo liso traqueal de ratos, chegou às seguintes conclusões: o estragol, anetol e CzOE apresentam efeito antiespasmódico, mas não possuem efeitos sobre o tônus espontâneo do músculo liso traqueal de rato; estragol, anetol e CzOE inibem a via de ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes de forma similar à nifedipina.

1.4. JUSTIFICATIVA

Conforme observamos, o estragol vem sendo amplamente utilizado. Na medicina popular, nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica e em pesquisas científicas, vem sendo testado e utilizado como edulcorante, aromatizante e conservante; utilizado em perfumes e cosméticos; como estimulante de apetite, para distúrbios intestinais e cólicas; como sedativos, ansiolíticos, para irritabilidade e convulsões; como antiinflamatórios e até como cicatrizantes em lesões de pele.

Paralelamente, muitos estudos demonstraram efeitos deste composto em células excitáveis, como gânglios da raiz dorsal, nervo ciático, SNC, músculo liso traqueal e músculo esquelético. Porém, a despeito de todo este interesse, não existem trabalhos demonstrando seus efeitos sobre a atividade de músculo cardíaco.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do estragol em parâmetros de contratilidade do músculo cardíaco de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito inotrópico do estragol em concentrações cumulativas, sobre amplitude, parâmetros temporais, velocidade de contração e relaxamento e potenciação pós pausa na contração isométrica em músculo papilar de rato.

Avaliar o efeito inotrópico do estragol em diferentes concentrações de cálcio extracelular em músculo papilar de rato.

Avaliar o efeito da intervenção inotrópica positiva induzida por isoproterenol sobre músculo papilar de rato, na ausência e na presença de estragol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Para a execução deste trabalho, foram utilizados ratos Wistar, adultos, pesando entre 250 e 300 gramas (n=21). Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – sob o número 829/2014. Esses animais foram mantidos em gaiolas, sob condições de controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Os cuidados e o uso dos animais obedeceram às determinações das “*Normas de Uso e Manuseio de Animais Experimentais*” da Universidade Federal do Paraná.

3.2. METODOLOGIA DAS PREPARAÇÕES COM MÚSCULO PAPILAR INTACTO

Os ratos foram heparinizados (500 UI, ip) e anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg, ip) e xilazina (20 mg/kg, ip). Após constatação de efetiva anestesia, através da ausência de respostas a estímulos dolorosos, foi realizada exsanguinação e imediata toracotomia e retirada do coração, que foi colocado em uma placa de Petri com cerca de 15 a 20 mililitros de solução de Ringer, com a seguinte composição (em milimolar): NaCl = 110; KCl = 4,0; CaCl₂ = 2,0; MgCl₂ = 2,0; Trizma = 10. A solução também continha glicose 0,2% e pH ajustado para 7,4, utilizando-se NaOH 1,0 molar ou HCl 1,0 molar. Mediante o emprego de pinos metálicos colocados no ápice e na base, o coração foi afixado no fundo de silicone de uma placa de Petri. Com a utilização de pinças e tesouras oftalmológicas, bem como de um estereomicroscópio, era realizada abertura do ventrículo direito e dissecação do músculo papilar, com preservação da extremidade tendínea valvar e de uma porção do miocárdio, para servirem de fixação da preparação.

Após a dissecação apropriada, o músculo papilar foi colocado em câmara de vidro com volume de 17 mililitros, contendo a solução de Ringer supracitada, sendo mantida a temperatura da solução em 32 ±1°C, além de permanecer continuamente gaseificada com oxigênio. Nesta câmara, com o uso de pinças adequadas, as

extremidades do músculo foram então fixadas. Uma das extremidades em posição estacionária e a outra a um transdutor de força (WPI-Fort 10, *Transuction Laboratories Co.*) Antes de cada experimento, o transdutor de força foi calibrado mediante o emprego de massas conhecidas (padrão). O transdutor de força apresentou linearidade numa ampla faixa de força.

Os músculos papilares foram estimulados por pulsos retangulares de 10 volts, com duração de 5 milissegundos e frequência de 0,5 Hz, através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo e estirados até $L_{máx}$ (comprimento de músculo no qual a tensão ativa é máxima).

Os registros do desenvolvimento de força foram obtidos mediante o emprego de conversores analógico digital / digital analógico (AD Instruments PowerLab 4/30) e analisados utilizando-se o software LabChart 7.3.7. Após período de estabilização, de 30 a 45 minutos, os protocolos experimentais eram iniciados.

As contrações geradas pelas preparações eram do tipo *isométricas*, que são aquelas realizadas quando uma preparação de músculo tem suas extremidades fixas e ao ser estimulado contrai-se, gerando força. Mas o músculo não se encurta, daí o nome: iso = mesmo, métrico = comprimento.

O diâmetro das preparações foi mensurado na sua porção central, mediante o emprego de uma gráticula posicionada na ocular do estereomicroscópio. Assim, os dados estão expressos em valores absolutos, como força (em mN) pela área de seção transversa.

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA

Para avaliar a concentração a ser utilizada neste estudo, curva concentração-resposta foi realizada por meio de adição cumulativa do estragol à solução nutritiva (n=6). As concentrações testadas foram (em milimolar): 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 e 1,0. O intervalo de tempo entre as concentrações não foi pré-determinado, mas sim quando se alcançava o estado estacionário da produção de força em cada concentração testada.

Os parâmetros temporais da contração – tempo para atingir o pico de força isométrica (TP) e tempo de relaxamento completo (TR) – foram obtidos, respectivamente, fazendo-se as medidas, em milissegundos, entre o início da contração e a força máxima, e a partir desta até o relaxamento da preparação. Desta forma media-se o tempo total para atingir o pico de força e o tempo total de relaxamento. Todos os parâmetros eram obtidos e avaliados antes e após o tratamento com estragol e sob estimulação de condição-estabilizada.

Na figura 4, temos um registro original de um experimento típico da produção de força, em um intervalo de tempo, demonstrando a mensuração dos TP e TR.

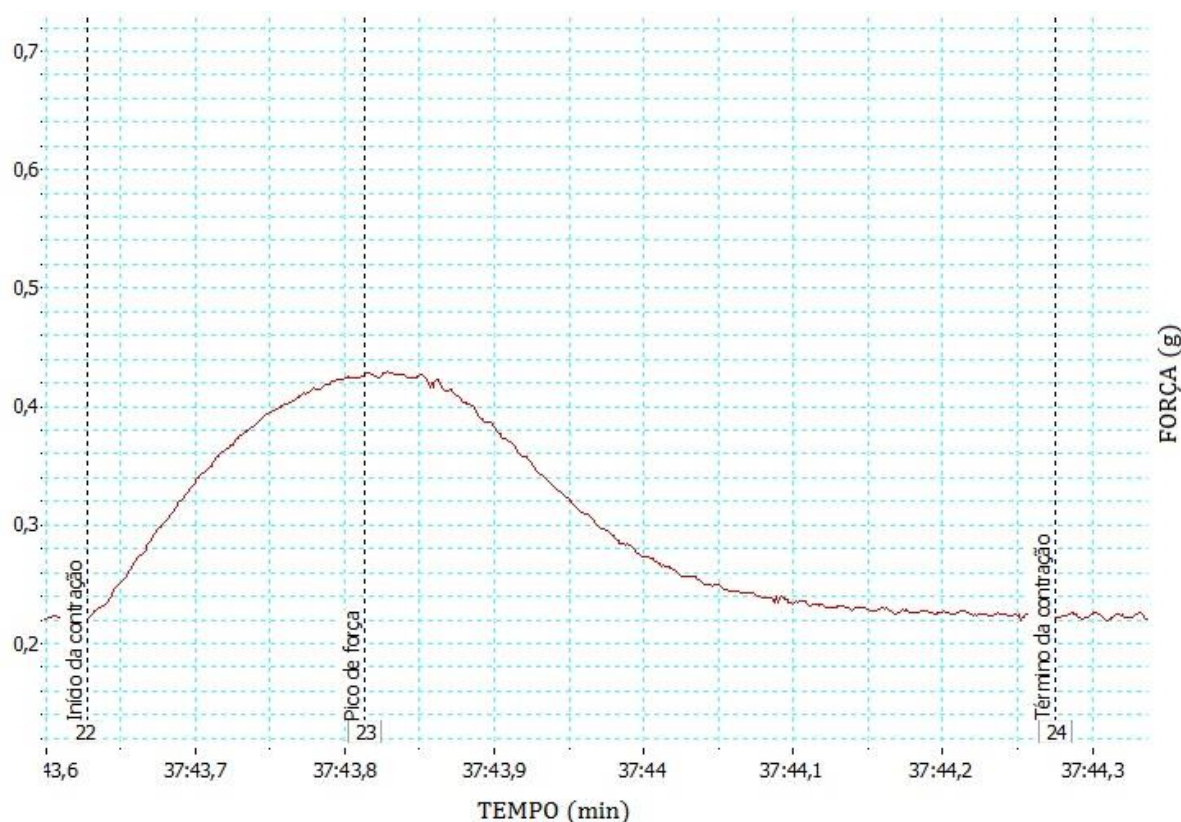


Figura 4: Método de mensuração dos tempos para atingir força máxima e completo relaxamento da contração de músculo papilar de rato estimulado eletricamente.

Foram obtidos os parâmetros de velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e relaxamento ($-dF/dT$), tomando os valores nos picos máximo e mínimo do registro de velocidade de contração e relaxamento, conforme a figura 5.

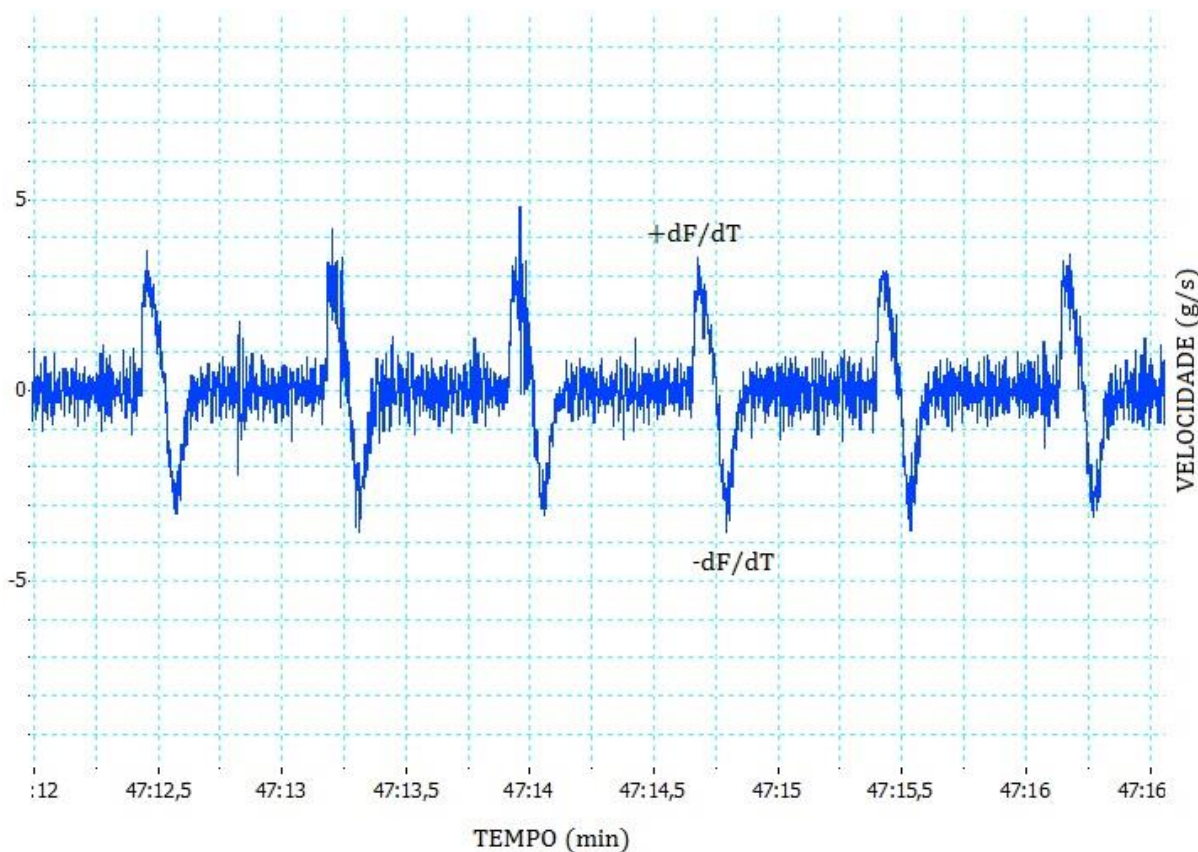


Figura 5: Método de mensuração das velocidades máximas de contração e relaxamento de músculo papilar de rato estimulado eletricamente.

No estado estacionário, na ausência e em cada concentração de estragol empregada, cessou-se a estimulação elétrica por 15, 30 e 60 segundos. Considerou-se a magnitude da primeira contração após o reinício da estimulação elétrica como potenciação pós pausa. Os valores estão expressos em valores absolutos de força em relação aos valores imediatamente anteriores ao período de cessação da estimulação elétrica, ou em valores percentuais da potenciação pós pausa.

3.3.2. PROTOCOLO CONTROLE

Este protocolo (n=4) foi realizado com o objetivo de verificar se as respostas musculares obtidas no protocolo de concentração-resposta não eram provenientes da ação do tempo de experimento. Para tal, os experimentos foram realizados por um período de 120 minutos, tempo máximo utilizado no protocolo anterior, porém sem a

adição do estragol à solução nutritora. A força de contração foi mensurada aos 30, 60, 90 e 120 minutos.

3.3.3. PROTOCOLO DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA AO CÁLCIO

Visando avaliar a ação do estragol em diferentes concentrações de cálcio extracelular, curvas concentração-resposta foram realizadas por meio da adição cumulativa de CaCl_2 ao banho, tanto na ausência como na presença de estragol 0,5 mM (n=5). As concentrações de cálcio extracelular testadas foram (em milimolar): 0,1; 0,3; 2,0; 4,0 e 10. Empregamos 0,5 mM de estragol pois esta concentração reduziu em aproximadamente 50% a produção de força nas condições controle, conforme será descrito no item 4.1.

3.3.4. PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO INOTRÓPICA

Para verificar a ação de intervenções inotrópicas positivas sobre o efeito do estragol, foi realizado o seguinte protocolo (n=6): após estabilização da preparação conforme descrito anteriormente, era adicionado isoproterenol (0,1 mM) à solução nutritora. Após nova estabilização, era mensurado o pico de força (F) nesta condição. A preparação era então submetida novamente ao Ringer. Mais uma vez após estabilização, era adicionado estragol (0,5 mM). Por fim, aguardando mais uma vez a estabilização da preparação, era adicionado isoproterenol (0,1 mM), para verificar se este agonista de receptores beta-adrenérgicos possuía a capacidade de reverter o efeito inotrópico negativo induzido pelo estragol.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados obtidos foram analisados usando-se o teste t-Student, para a comparação de uma única condição experimental em relação ao controle, e ANOVA, para múltiplas comparações na mesma condição experimental. Quando ANOVA revelou uma

diferença significativa, o teste de Tukey foi aplicado para comparação dos contrastes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software SigmaPlot 12.0.

4. RESULTADOS

4.1. CURVA DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA

Neste protocolo experimental (n=6), o objetivo foi observar o efeito do estragol em concentrações cumulativas, além de estabelecer a concentração a ser utilizada nos demais protocolos experimentais do estudo. Conforme demonstrado na figura 6, o estragol induziu redução na produção de força muscular isométrica de maneira concentração-dependente.

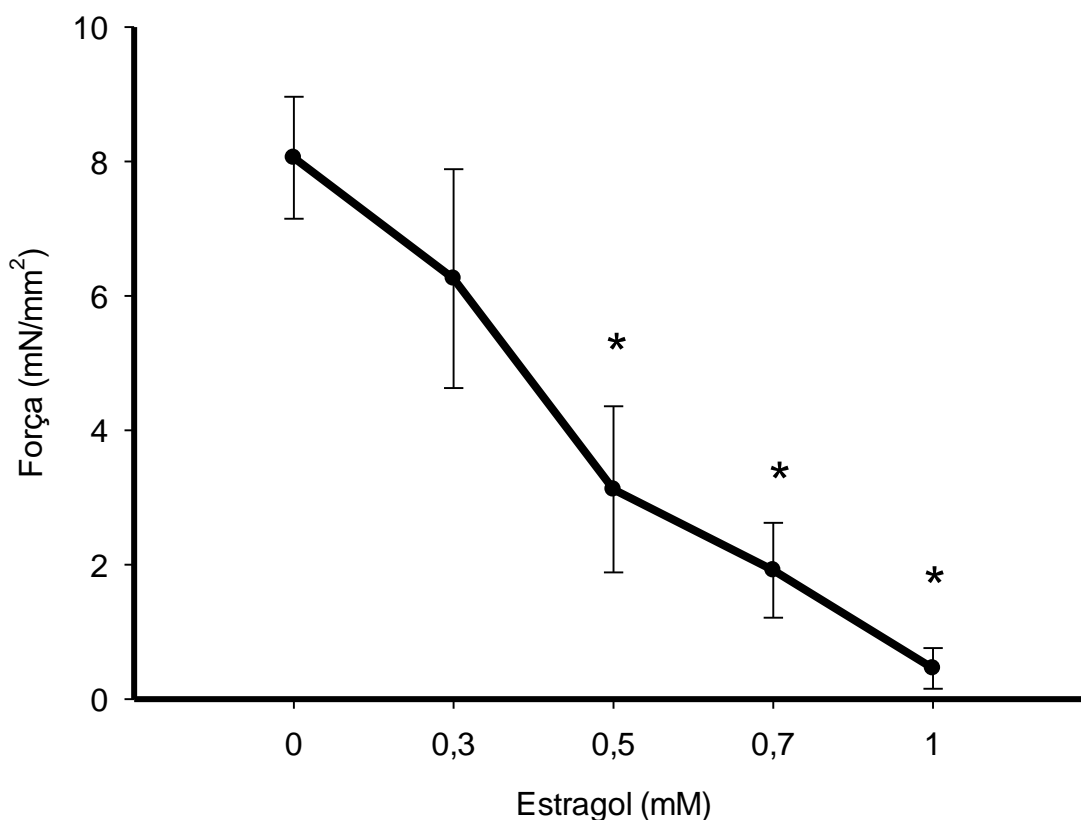


Figura 6: Efeito do estragol em concentrações cumulativas na produção de força em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores expressos em mN/mm². Média, EPM. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de força no controle ($p < 0,05$).

Os dados estão apresentados como média \pm EPM (em miliNewtons por milímetro quadrado). Notamos que o estragol na concentração de 0,5 mM reduziu em aproximadamente 50% a força de contração em relação ao controle. Desta forma, foi empregada como CI50 (concentração inibitória de 50% da produção de força) em protocolos experimentais que necessitassem o uso de dose única do composto.

Na tabela 1 (em anexo), estão os dados obtidos neste protocolo experimental.

A figura 7 é um registro original de um experimento típico demonstrando o efeito do estragol na produção de força de músculo papilar isolado de rato.

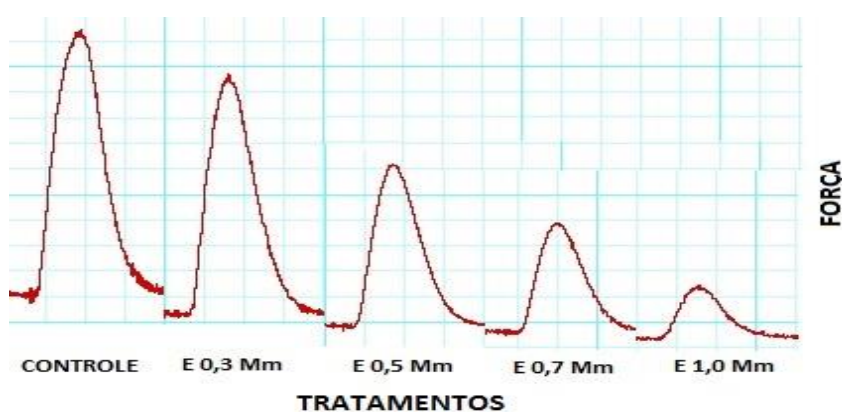


Figura 7: Curvas de desenvolvimento de força obtidas no controle e em concentrações crescentes de estragol em músculo papilar isolado de rato estimulado eletricamente.

4.2. PROTOCOLO CONTROLE

Este protocolo (n=4) visava verificar se as respostas musculares obtidas nos protocolos experimentais não eram provenientes da ação do tempo de experimento. A figura 8 mostra os resultados obtidos, indicando que a força de contração manteve-se praticamente estável durante todo o tempo de experimento.

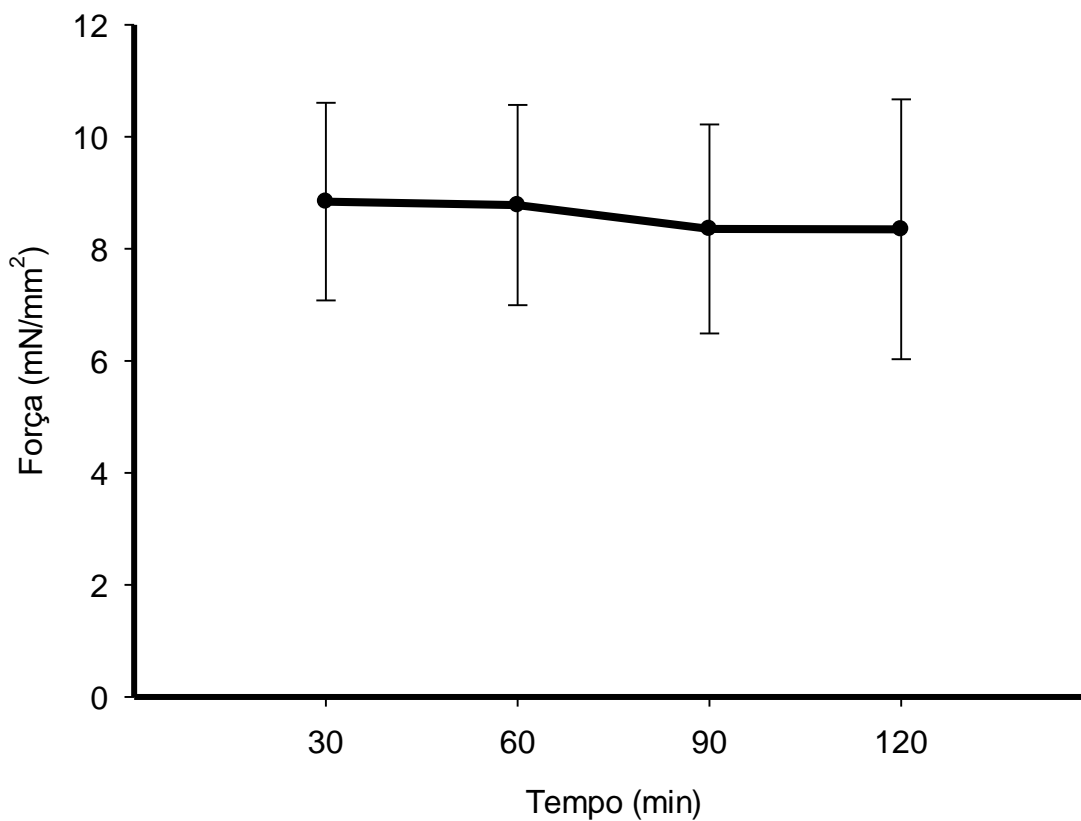


Figura 8: Produção de força em músculo papilar de rato estimulado eletricamente, na ausência de estragol. Valores em mN/mm². Média, EPM.

Houve uma redução de apenas 5,59% entre a maior e a menor produção de força neste protocolo.

A tabela 2 (em anexo) mostra os dados obtidos neste protocolo.

4.3. EFEITOS DO ESTRAGOL NOS PARÂMETROS TEMPORAIS DA PRODUÇÃO DE FORÇA ISOMÉTRICA

As figuras 9 e 10 demonstram, respectivamente, os efeitos do estragol (0,3; 0,5; 0,7 e 1,0 mM) no intervalo de tempo necessário, a partir do início da contração, para se alcançar o valor de força isométrica máxima e no intervalo de tempo, a partir do valor máximo de força, até o completo relaxamento, de músculos papilares estimulados eletricamente.

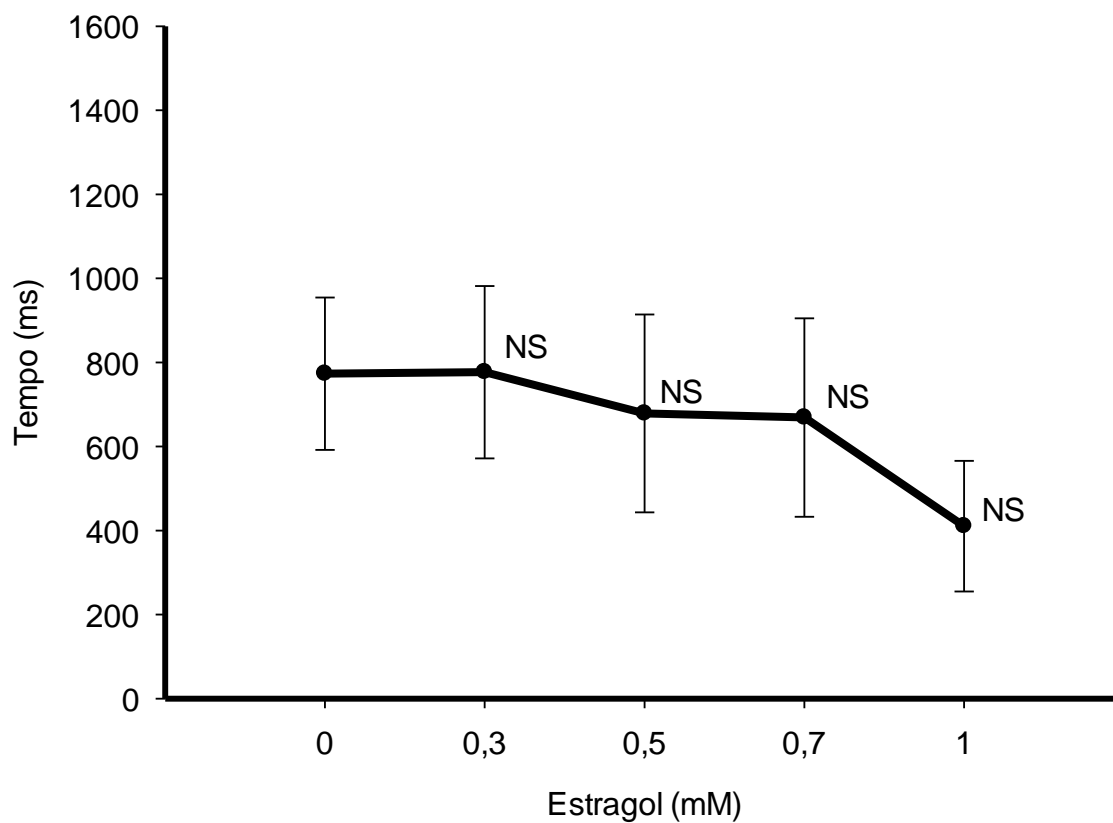


Figura 9: Tempo necessário para obtenção do valor máximo de força a partir do início da contração de músculo papilar isolado de rato estimulado eletricamente. Valores expressos em milissegundos. Média, EPM. NS indicam valores que não diferiram de forma estatisticamente significativa em relação ao controle.

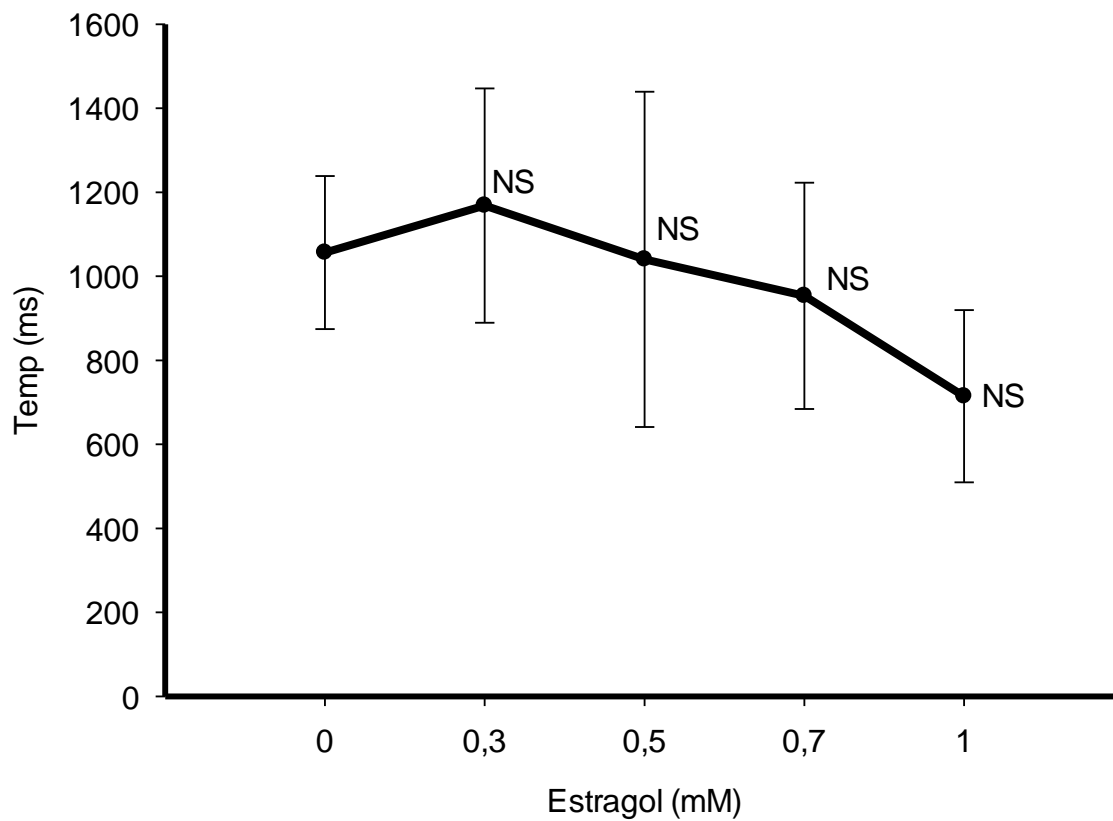


Figura 10: Tempo necessário para obtenção do completo relaxamento a partir do valor máximo de força de músculo papilar isolado de rato estimulado eletricamente. Valores expressos em milissegundos. Média, EPM. NS indicam valores que não diferiram de forma estatisticamente significativa em relação ao controle.

Com exceção da concentração de estragol 0,3 mM no tempo de relaxamento (e levemente da concentração de estragol 0,3 mM no tempo para atingir o pico de força), todas as outras testadas diminuíram os parâmetros temporais da contração, porém sem significância estatística.

Os dados obtidos neste protocolo estão descritos nas tabelas 3 e 4 (em anexo).

4.4. EFEITOS DO ESTRAGOL SOBRE AS VELOCIDADES MÁXIMAS DE CONTRAÇÃO (+dF/dT) E RELAXAMENTO (-dF/dT)

As figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos em relação à velocidade máxima, tanto no processo de contração quanto de relaxamento.

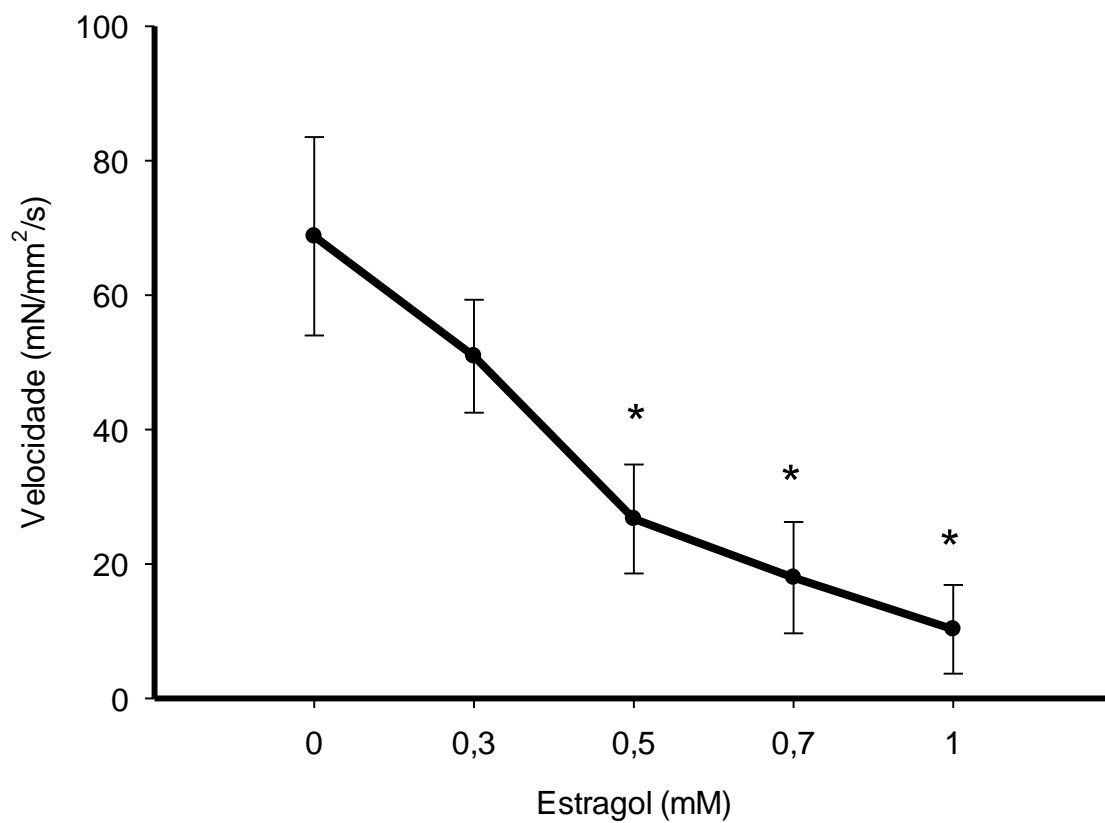


Figura 11: Velocidade máxima da contração em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em mN/mm²/s. Média, EPM. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significante em relação aos valores de força no controle ($p < 0,05$).

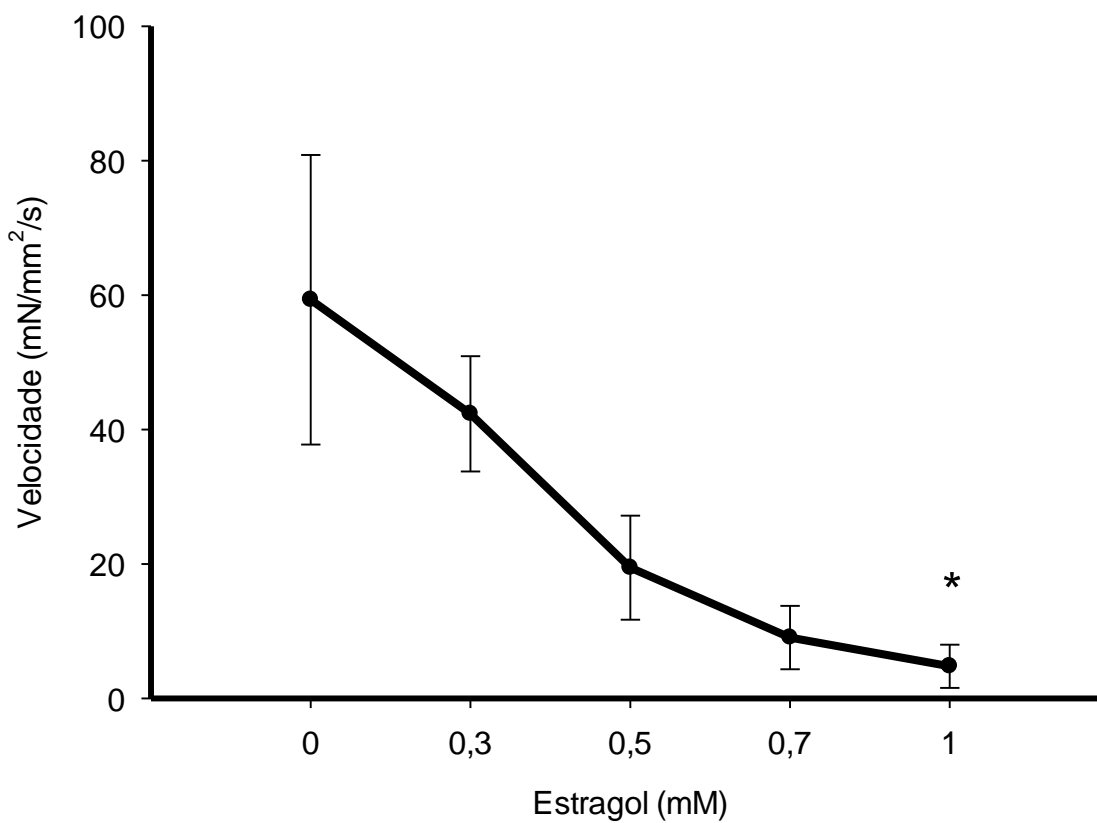


Figura 12: Velocidade máxima do relaxamento em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em mN/mm²/s. Média, EPM. O símbolo indica diferença estatisticamente significativa em relação aos valores de força no controle ($p < 0,05$).

As tabelas 5 e 6 (em anexo) demonstram os dados obtidos neste protocolo.

4.5. EFEITOS DO ESTRAGOL SOBRE A POTENCIAÇÃO PÓS PAUSA

Foram realizadas pausas de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica, visando-se obter a potenciação pós pausas (PPP) e, posteriormente, calcular a potenciação relativa pós pausa (PRPP). A figura 13 é um registro original de um experimento típico demonstrando a potenciação pós pausa de músculo papilar de rato na ausência de estragol.

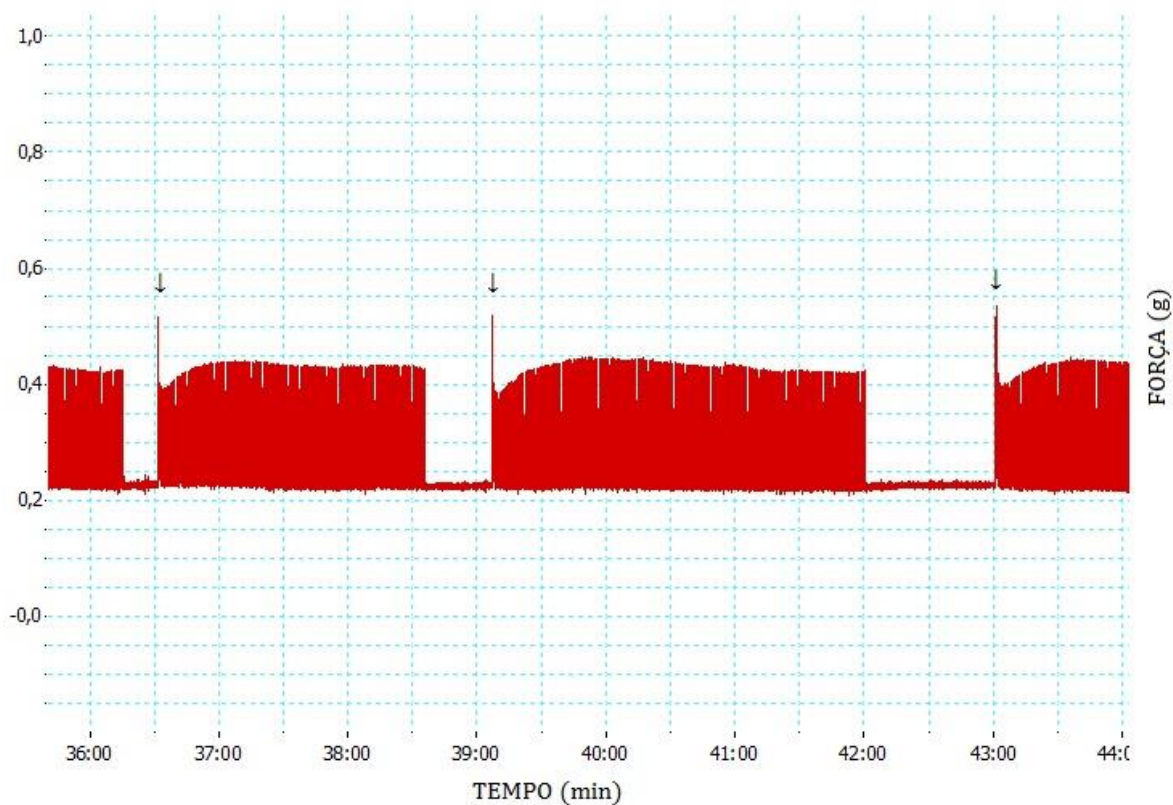


Figura 13: Potenciação pós pausa de músculo papilar de rato na ausência de estragol. A seta vertical indica a potenciação da força após período de pausa.

Na figura 14 observamos que as forças pós pausas são potencializadas de maneira tempo de pausa-dependente, tanto na ausência quanto na presença do estragol. Analisando as potenciações relativas pós pausas (figura 15), percebemos que a presença do estragol torna a relação matemática (força obtida na contração pós pausa com a força imediatamente anterior à pausa) maior.

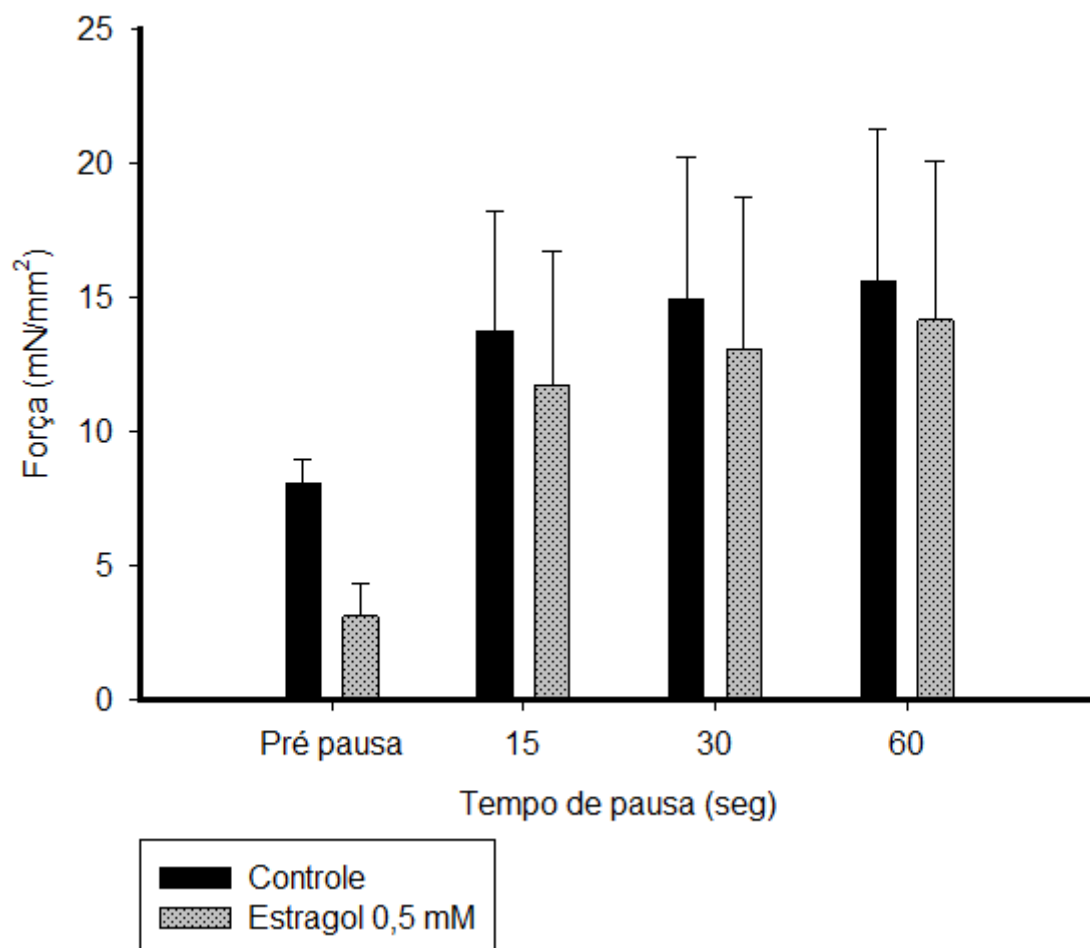


Figura 14: Produção de força pré e pós pausas de 15, 30 e 60 segundos no controle e na concentração de estragol 0,5 mM em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em mN/mm². Média, EPM.

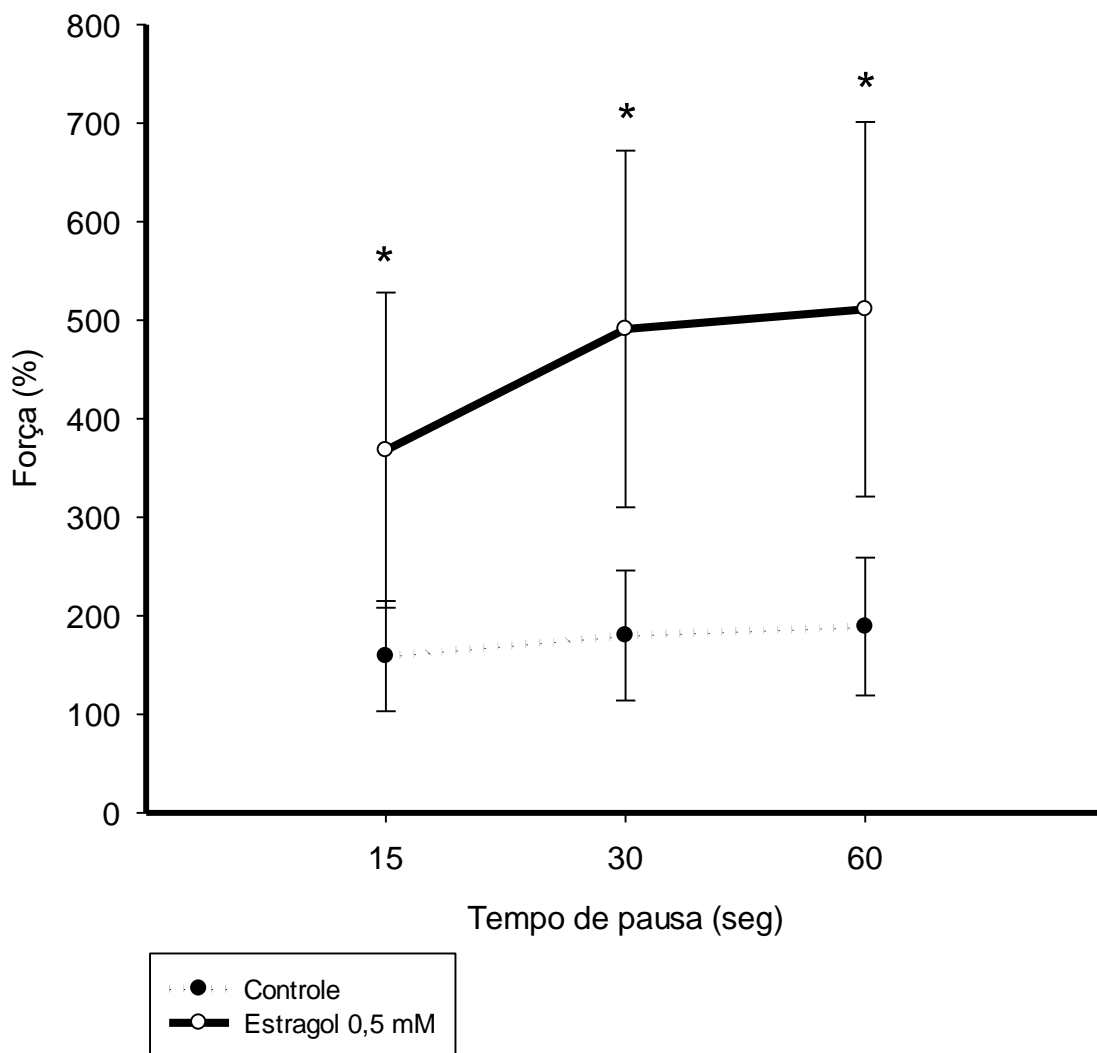


Figura 15: Potenciação relativa pós pausas de 15, 30 e 60 segundos no controle e em concentrações cumulativas de estragol em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Os valores de força estão normalizados como percentuais do abalo anterior ao período de pausa. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores no controle ($p < 0,05$).

As figuras 16 e 17 mostram, respectivamente, registros originais de pausa de 15 segundos realizadas no controle e na concentração de 0,5 mM de estragol.

Nota-se que a pausa era realizada quando as contrações estavam já estabilizadas, como em todos os demais protocolos. A estabilização das preparações era critério para a realização das etapas sequenciais dos experimentos. A força gerada imediatamente após a pausa era potencializada, em virtude do aumento dos estoques de cálcio no interior da célula, provenientes do retículo sarcoplasmático.

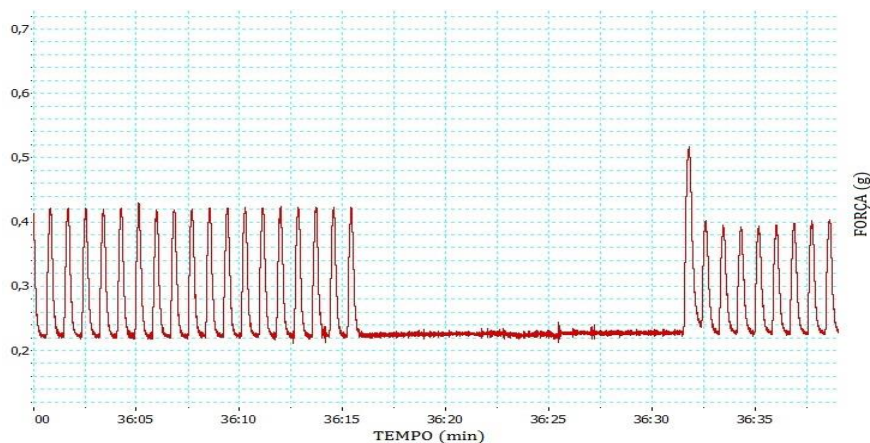


Figura 16: Curvas de potenciação pós pausa de 15 segundos obtidas no controle durante o protocolo concentração-resposta.

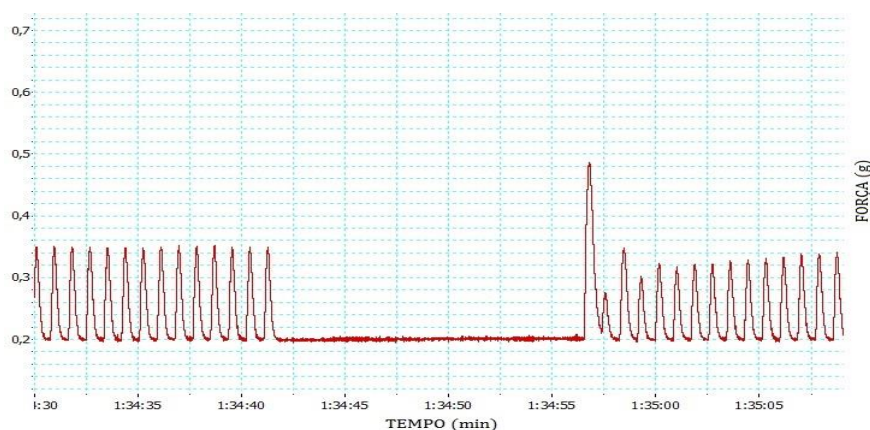


Figura 17: Curvas de potenciação pós pausa de 15 segundos obtidas com estragol 0,5 mM durante o protocolo concentração-resposta.

As tabelas 7 e 8 (em anexo) demonstram os dados obtidos nestes protocolos.

4.6. PROTOCOLO DE CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA AO CÁLCIO

Neste protocolo (n=5), notou-se importante incremento na força gerada com as elevações de concentração de cálcio extracelular. Mas com a adição do estragol (0,5 mM) nas preparações, reduziu-se a força de contração em todas as concentrações de cálcio. Os dados obtidos estão expostos na figura 18.

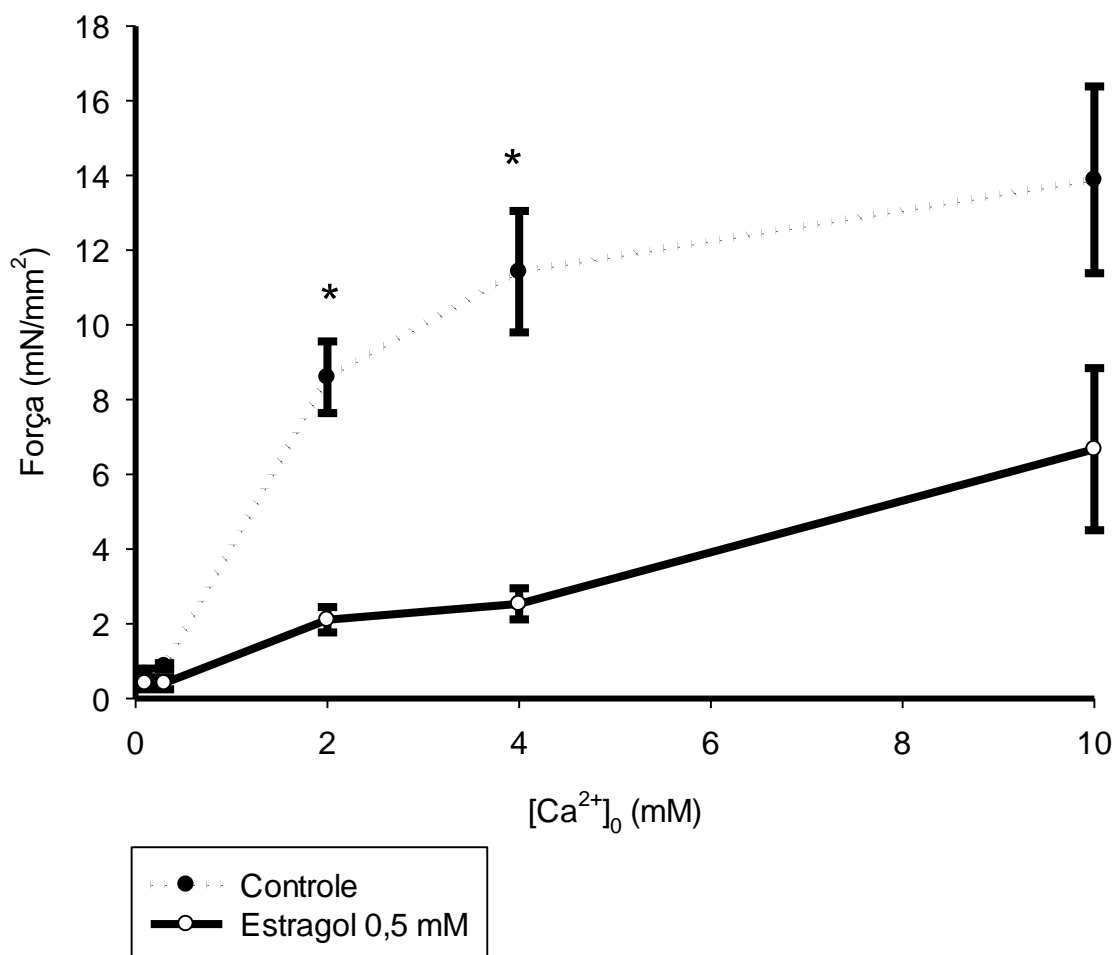


Figura 18: Produção de força em diferentes concentrações extracelulares de Ca^{2+} , na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em mN/mm². Média, EPM. Os símbolos indicam diferença estatisticamente significativa em relação aos valores no controle ($p < 0,05$).

A Figura 19 demonstra os dados obtidos neste protocolo normalizados para a porcentagem em relação ao valor máximo de força.

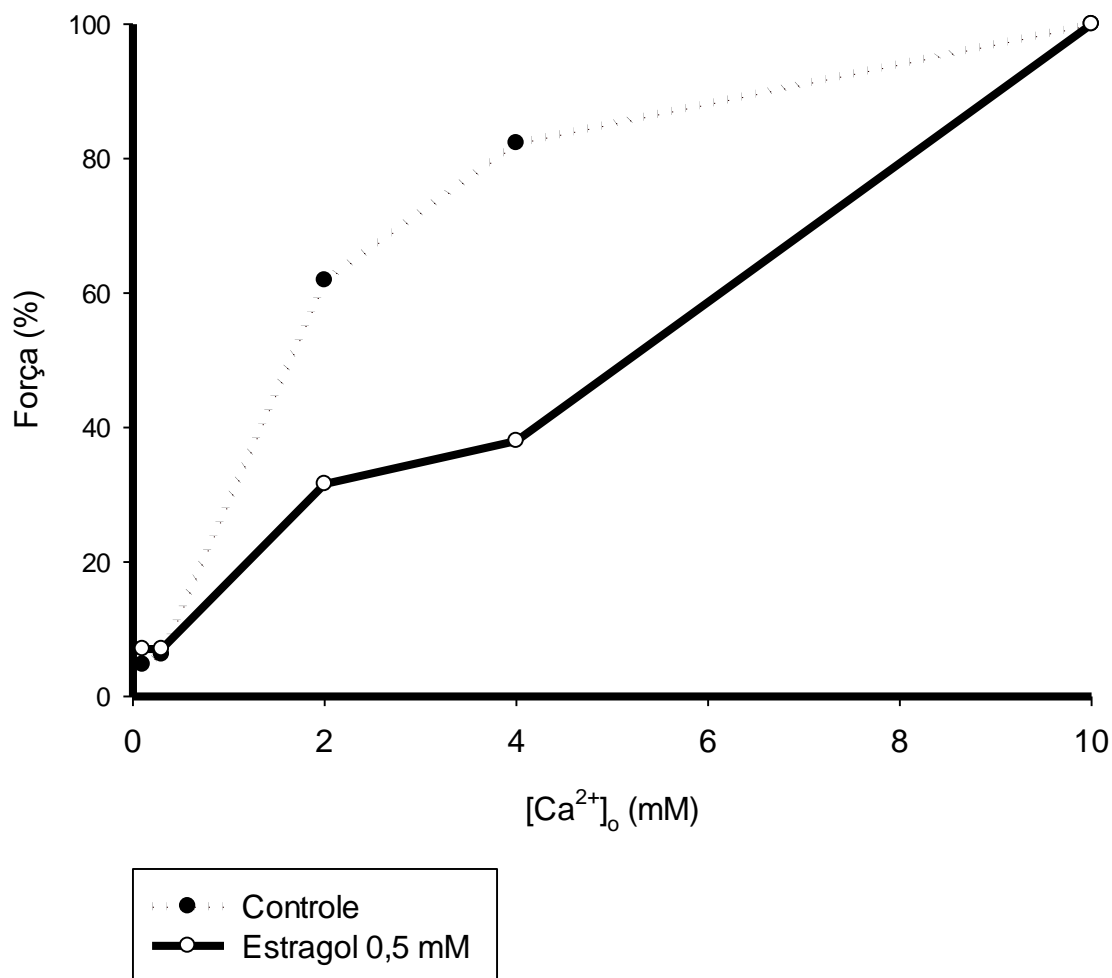


Figura 19: Produção de força em diferentes concentrações extracelulares de Ca^{2+} , na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em % em relação aos valores máximos de força.

Percebe-se deslocamento para a direita da força/ $[Ca^{2+}]_o$. A tabela 9 (em anexo) demonstra os dados obtidos neste protocolo.

4.7. PROTOCOLO DE INTERVENÇÃO INOTRÓPICA

Este protocolo (n=6) teve como intenção avaliar se o efeito inotrópico negativo gerado pelo estragol (0,5 mM) seria revertido pelo isoproterenol (0,1 mM). A figura 20 demonstra os resultados deste protocolo experimental.

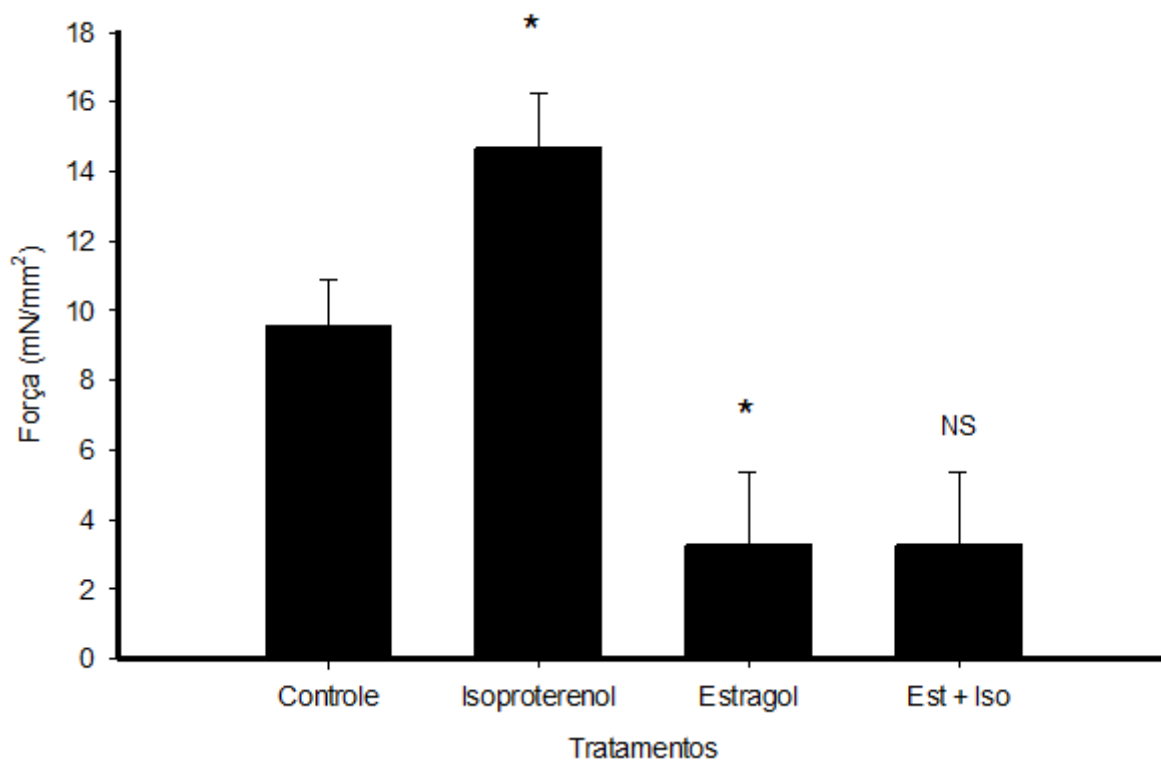


Figura 20: Produção de força no controle e após inclusão de isoproterenol 0,1 mM, na ausência e na presença de estragol 0,5 mM, em músculo papilar de rato estimulado eletricamente. Valores em mN/mm². Média, EPM. * = diferenças estatísticas significantes em relação ao controle; NS = diferença não significativa em relação à força gerada com estragol 0,5 mM.

Com a adição do isoproterenol 0,1 mM, houve incremento na força de contração muscular, em relação àquela gerada no controle, em virtude de sua atividade beta-adrenérgica. A preparação foi então novamente submetida à solução contendo ringer. Após nova estabilização, foi submetida ao estragol (0,5 mM) e houve decremento nos parâmetros de força. Por fim, adicionou-se o isoproterenol (0,1 mM) nesta solução, e os parâmetros foram os mesmos obtidos com o uso do estragol. Notamos, desta maneira, que o isoproterenol não apresentou capacidade de reverter o efeito inotrópico negativo causado pelo estragol.

A tabela 10 (em anexo) mostra os valores obtidos neste protocolo.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o estragol promoveu efeito inotrópico negativo de forma concentração-dependente (Figura 6 e Tabela 1). Também de forma concentração-dependente, apresentaram redução os parâmetros de velocidades máximas de contração [$+dF/dT$ (Figura 11 e Tabela 5)] e de relaxamento [$-dF/dT$ (Figura 12 e Tabela 6)]. Foram mensurados os parâmetros temporais da contração [tempo para atingir força máxima (Figura 9 e Tabela 3) e tempo para atingir relaxamento completo (Figura 10 e Tabela 4)], mas estes não apresentaram redução estatisticamente significativa.

Ao submeter as preparações a pausas na estimulação elétrica, observamos importante incremento relativo nas forças pós pausas (Figuras 13, 16 e 17). Com a adição cumulativa de estragol, e também de maneira concentração-dependente, as potenciações pós pausas apresentaram diminuição de força em relação às potenciações pós pausas no controle (Figura 14 e Tabela 7). Contudo, calculando a potenciação pós pausa relativa, observamos que o estragol causou aumento considerável das mesmas (Figura 15 e Tabela 8). Este efeito demonstra que as contrações do abalo foram mais afetadas do que as contrações pós pausas e sugere que a possibilidade de bloqueio de receptores rianodínicos não esteja envolvido no efeito inotrópico negativo do estragol, uma vez que tal bloqueio geraria decremento também nas potenciações pós pausas. Da mesma forma, um possível bloqueio da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático também é improvável, uma vez que tal bloqueio afetaria a recaptção do íon pela organela e, conseqüentemente, os estoques de cálcio seriam insuficientes para gerar aumento na potenciação pós pausa. O bloqueio na recaptção de cálcio ocasionaria também elevação no nível basal de tensão, o que não foi observado. O efeito inotrópico negativo do estragol poderia ser ocasionado por alterações na excitabilidade, alteração nos canais de cálcio da membrana e/ou redução na sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio.

São de grande importância para a geração de força contrátil no músculo cardíaco tanto o Ca^{2+} proveniente do espaço extracelular, através dos canais voltagem-dependentes, quanto o Ca^{2+} liberado pelo retículo sarcoplasmático, liberação, esta, influenciada pelo próprio cálcio proveniente do espaço extracelular (BERS, 2002; AIRES, 2012; OLIVEIRA, 2014). Intervenções que aumentem a entrada

de Ca^{2+} na célula irão, proporcionalmente, aumentar a força de contração. Nos experimentos de concentração-resposta ao cálcio, onde concentrações cumulativas de Ca^{2+} foram realizadas na ausência e na presença de estragol, obtivemos aumento na força de contração, de maneira $[\text{Ca}^{2+}]$ -dependente, nos experimentos realizados na ausência de estragol. Contudo, na presença do estragol, a força de contração apresentou incremento muito aquém daquele observado em sua ausência, isto é, ocorria elevação de força com a adição cumulativa de cálcio, mas de maneira inferior às encontradas sem o composto (Figura 18 e Tabela 9). Da mesma forma, houve um deslocamento da força/ $[\text{Ca}^{2+}]$ para a direita (Figura 19). Este efeito reforça as hipóteses de bloqueio dos canais de cálcio do sarcolema e/ou de diminuição da sensibilidade ao íon cálcio pelo sistema contrátil, mas não podemos excluir que o efeito do estragol seja decorrente de alteração na excitabilidade, já que estudos de excitabilidade de gânglios da raiz dorsal de ratos demonstram que este composto bloqueia canais de sódio de neurônios intactos e isolados, também de maneira concentração-dependente (Alves, 2013). Efeitos em mais de um sítio podem ser considerados, atuando paralelamente no desenvolvimento do inotropismo negativo.

A estimulação dos receptores β -adrenérgicos ativa AMPc que, por sua vez, ativa a proteína quinase PKA, que induz a fosforilação de outras proteínas importantes no acoplamento excitação-contração, tais como a troponina I, os canais de Ca^{2+} do sarcolema e os canais liberadores de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Assim, na presença de um agonista β -adrenérgicos, concentração maior de Ca^{2+} encontra-se disponível na célula a cada excitação (AIRES, 2012). O isoproterenol (agonista β -adrenérgico) não reverteu o efeito inotrópico negativo induzido pelo estragol (Figura 20 e Tabela 10). Estes dados sugerem que o efeito inotrópico negativo produzido pelo estragol não envolve a cascata de sinalização produzida pela ativação de beta receptores.

Muitos trabalhos utilizando o estragol em tecidos excitáveis demonstraram alguns efeitos. Albuquerque *et al* (1995), utilizando extrato do *Croton zehntneri*, bem como anetol e estragol isoladamente, observando eventos em músculo esquelético de ratos e sapos, sugerem que tanto o CzOE, quanto os constituintes isolados, possuem dois locais de ação na fibra muscular: a membrana pós juncional, bloqueando a transmissão neuromuscular, e o retículo sarcoplasmático, aumentando o cálcio mioplasmático. Batatinha *et al* (1995) utilizando óleo de *Croton zehntneri* obtido por destilação, observaram depressão do sistema nervoso central de ratos e

camundongos que receberam o composto por via oral. Leal-Cardoso *et al* (2004) estudaram efeitos do estragol, dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), no potencial de ação em nervo ciático de ratos estimulado eletricamente e observaram diminuição na excitabilidade de maneira dose-dependente e reversível. Alves (2009) utilizando óleo essencial extraído de folhas de *Croton zehntneri*, contendo anetol e estragol, estudou parâmetros contráteis de músculo liso traqueal de ratos e observou inibição da via de ativação dos canais de cálcio voltagem dependentes. Finalmente, Alves *et al* (2013) estudaram a ação do estragol, também dissolvido em DMSO, na excitabilidade de gânglios da raiz dorsal de ratos, e observaram bloqueio na geração do potencial de ação por inibição direta da ativação dos canais de sódio voltagem-dependentes.

Nossos estudos corroboram com resultados obtidos em dois outros realizados em musculatura cardíaca, mas com análogos do estragol (Damiani *et al*, 2004, utilizando eugenol e Soares *et al*, 2005, utilizando eucaliptol). Os protocolos de concentração-resposta, potenciação pós pausa e concentração extracelular de cálcio obtiveram a mesma tendência de resultados, isto é, inotropismo negativo, aumento da potenciação relativa pós pausa e desvio da curva força-concentração de cálcio extracelular para a direita, todos de maneira concentração-dependente. Resultado diferente foi observado no protocolo de isoproterenol, onde os dois trabalhos citados mostraram reversão, por parte deste agonista beta adrenérgico, do efeito inotrópico negativo promovido pelos compostos estudados.

6. CONCLUSÕES

O estragol, de maneira concentração-dependente, reduz a força de contração isométrica desenvolvida por músculos papilares de rato estimulados eletricamente ($p < 0,001$), com $CI_{50\%}$ de aproximadamente 0,5 mM. De forma concentração-dependente, o estragol reduz os parâmetros de velocidade máxima de contração ($+dF/dT$) e de relaxamento ($-dF/dT$) ($p = 0,002$ e $p = 0,005$, respectivamente), as potenciações pós pausas ($p > 0,05$), elevando, porém, as potenciações pós pausas relativas ($p < 0,05$).

O estragol (0,5 mM) deslocou a curva força-contração extracelular Ca^{2+} para a direita reduzindo também a força máxima desenvolvida. O efeito inotrópico negativo do estragol não foi revertido pelo isoproterenol.

Os dados sugerem que o estragol possui ação inotrópica negativa provavelmente devido ao bloqueio dos canais de cálcio do sarcolema e/ou por diminuição na sensibilidade do sistema contrátil ao íon cálcio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2012.
- ALBUQUERQUE, A. A. C.; SORENSON. A. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, Anethole, and Estragole in skeletal muscle. **J. Ethno Pharmacol**, v. 49, p.41-49, 1995.
- ALBUQUERQUE, A. A. C., VIANA, G. B. S., SILVA, E. A. T., MATOS, F. J. A. Pharmacological effects of active components of *Croton zehntneri* essential oil in isolated nerves. **Cienc Cult**, 33, 722, 1981.
- ALVES, C. M. H. A. **Óleo essencial de *Croton zehntneri* e seus principais constituintes químicos anetol e estragol inibem parâmetros contráteis do músculo liso traqueal de rato**. Fortaleza, 2009. 123f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual do Ceará.
- ALVES, K. S. S. *et al* Estragole blocks neuronal excitability by direct inhibition of Na⁺ channels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 46, p.1056-1063, 2013.
- BATATINHA, M. J. M., SOUZA-SPINOSA, H. de, BERNARDI, M. M., *Croton zehntneri*: possible central nervous system effects of the essential oil in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 45, p.53-57, 1995.
- CAVALCANTI, J. M. *et al* The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, 144, p.240-247, 2012.
- COELHO-DE-SOUZA, A. N. *et al* Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastro protective effect by increasing the surface mucous layer. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 27, p.288–298, 2013.
- COSTA, J. G. M. *et al* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18(4), p.583-586, 2008.
- DAMIANI, C. E. N. *et al* Effects of Eugenol, na Essential Oil, on the Mechanical and Electrical Activities of Cardiac Muscle. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 44(6), p.688-695, 2004.
- ESTRUTURA molecular do estragol. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/34098?lang=pt®ion=BR>. Acesso em 18-Jan-2015.
- FONTANELLE, R. O. S. *et al* Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**, 104, p.1383-1390, 2008.

LAZARINI, C. A. *et al* *Croton zehntneri* essential oil: effects on behavioral models related to depression and anxiety. **Phytomedicine**, 7(6), p.477-481, 2000.

LEAL-CARDOSO, J. H. *et al* Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 37, p.1193-1198, 2004.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A. & DONICCI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Ver. Virtual Quim. RJ**, 1(3), p227-240, 2009.

OLIVEIRA, A. C. *et al* Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntneri* in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34, p.1471-1474, 2001.

OLIVEIRA, J. R. de **Biofísica Para Ciências Biomédicas** 4ª Ed. Editora PUC-RS. Porto Alegre, 2014.

ORGANIZAÇÃO da fibra muscular. Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio22.php>. Acesso em 07-Jan-2014

PLANTA de *Croton zehntneri*. Disponível em <http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com/canelinha-croton-zehntneri.html>. Acessado em 19-Jan-2015

PONTE, E. L. *et al* Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacological Reports**, 64, p.984-990, 2012.

RINGER, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. **Journal of Physiology**, 4, p.29-47, 1883.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. & COUTINHO, H. D. M. Synergy effects of the antibiotics gentamicin and the essential oil of *Croton zehntneri*. **Phytomedicine**, 16, p.1052–1055, 2009.

SHAHAT, A. A.; EL-BAROUTY, G.; HASSAN, R. A.; HAMMOUDA, F. M.; ABDELRAHMAN, F. H.; SALEH, M. A. Chemical composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essencial Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars. **Molecules** 16, p.1366-1377, 2011.

SHIN, S., KANG, C. A. Antifungal activity of the essential oil of *Agastache rugosa* Kuntze and its synergism with ketoconazole. **Lett Appl Microb**, 36, p.111–115, 2003.

SHIN, S. & PYUN, M.-S. Anti-Candida Effects of Estragole in Combination with Ketoconazole or Amphotericin B. **Phytotherapy Research** 18, p.827-830, 2004.

SIQUEIRA, R. J. B., MAGALHÃES, P. J. C., LEAL-CARDOSO, J. H., DUARTE, G. P., LAHLOU, S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and

its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. **Life Sci**, 78, p. 2365–2372, 2006.

SOARES, M. C. M. S. *et al* Eucalyptol, an Essencial Oil, reduces contractile activity in rat cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38, p.453-461, 2005.

SOARES, P. M. G., LIMA, R. F., PIRES, A. F., SOUZA, E. P., ASSREUY, A. M. S., CRIDDLE, D.N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca²⁺-channels. **Life Sci**, 81, p.1085–1093, 2007.

VINCENZI, M. *et al* Constituents of aromatic plants: II. Estragole. **Fitoterapia**, 71, p.725-729, 2000.

VIEGAS JR, C. & BOLZANI, V. S. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quim. Nova**, 29(2), p326-337, 2006.

APÊNDICES

TABELA 1 – EFEITO DO ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS NA PRODUÇÃO DE FORÇA EM MÚSCULO CARDÍACO DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM mN/mm².

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	8,054	2,225	0,908	2,335	7,464	6,633	10,488
Estragol 0,3 mM	6,255	3,987	1,628	4,184	5,8	2,536	7,63
Estragol 0,5 mM	3,12	3,027	1,236	3,176	2,39	0,585	5,549
Estragol 0,7 mM	1,916	1,727	0,705	1,813	1,891	0	3,815
Estragol 1,0 mM	0,456	0,743	0,303	0,78	0	0	0,999

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 2 – PRODUÇÃO DE FORÇA NA AUSÊNCIA DE ESTRAGOL EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM mN/mm².

Tempo	Média	DP	EPM	IC	Mediana
30 min	8,842	3,527	1,763	5,611	7,755
60 min	8,780	3,575	1,787	5,688	7,630
90 min	8,355	3,730	1,865	5,935	6,780
120 min	8,348	4,640	2,320	7,383	5,675

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 3 – TEMPO PARA ATINGIR VALOR MÁXIMO DE FORÇA A PARTIR DO INÍCIO DA CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA DE MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS. VALORES EM ms.

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	773,083	444,061	181,287	466,013	565,18	437,68	1222,31
Estragol 0,3 mM	776,807	502,351	205,084	527,185	547,48	417,79	1069,52
Estragol 0,5 mM	678,78	526,563	235,486	653,814	415,75	357,703	901,88
Estragol 0,7 mM	668,85	472,02	236,01	751,087	508,5	360,665	977,035
Estragol 1,0 mM	410,28	220,052	155,6	1977,085	410,28	254,68	565,88

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 4 – TEMPO PARA ATINGIR RELAXAMENTO COMPLETO A PARTIR DO VALOR MÁXIMO DA CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA DE MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS. VALORES EM ms.

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	1056,343	446,227	182,171	468,287	936,885	676,41	1426,03
Estragol 0,3 mM	1168,097	682,873	278,782	716,631	1012,315	560,23	1578,82
Estragol 0,5 mM	1040,27	892,308	399,052	1107,947	675,6	466,525	1485,448
Estragol 0,7 mM	953,28	538,415	269,207	856,735	816,345	540,48	1366,08
Estragol 1,0 mM	714,43	290,098	205,13	2606,424	714,43	509,3	919,56

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 5 – VELOCIDADE MÁXIMA DE CONTRAÇÃO NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM ms/mm²/s.

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	68,73	32,998	14,757	40,973	62,84	45,517	80,505
Estragol 0,3 mM	50,9	18,778	8,398	23,316	56,38	39,395	60,77
Estragol 0,5 mM	26,686	18,112	8,1	22,489	19,1	12,98	44,847
Estragol 0,7 mM	17,956	18,5	8,273	22,97	17,38	0	33,505
Estragol 1,0 mM	10,26	14,758	6,6	18,324	0	0	22,455

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 6 – VELOCIDADE MÁXIMA DE RELAXAMENTO NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM ms/mm²/s.

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	59,294	48,189	21,551	59,834	36,97	31,39	78,925
Estragol 0,3 mM	42,338	19,176	8,576	23,81	36,05	26,733	55,668
Estragol 0,5 mM	19,454	17,313	7,743	21,497	10,21	6,37	36,28
Estragol 0,7 mM	9,042	10,555	4,72	13,106	9,24	0	14,078
Estragol 1,0 mM	4,774	7,19	3,216	8,928	0	0	9,818

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 7 – PRODUÇÃO DE FORÇA PÓS PAUSAS DE 15, 30 E 60 SEGUNDOS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM mN/mm².

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
15 SEGUNDOS							
Controle	13,748	10,956	4,473	11,498	9,615	8,99	11,49
Estragol 0,3 mM	14,27	13,448	5,49	14,113	9,88	7,02	11,49
Estragol 0,5 mM	11,716	11,196	5,007	13,902	8,49	4,752	15,35
Estragol 0,7 mM	11,63	9,501	4,75	15,118	7,58	6,05	17,21
Estragol 1,0 mM	5,545	1,478	1,045	13,278	5,545	4,5	6,59
30 SEGUNDOS							
Controle	14,933	12,994	5,305	13,636	10,025	9,56	10,99
Estragol 0,3 mM	14,797	14,422	5,888	15,135	10,19	7,22	12,49
Estragol 0,5 mM	13,06	12,616	5,642	15,665	9,99	4,995	16,587
Estragol 0,7 mM	12,398	9,553	4,776	15,201	8,6	6,675	18,12
Estragol 1,0 mM	5,695	0,29	0,205	2,605	5,695	5,49	5,9
60 SEGUNDOS							
Controle	15,592	13,819	5,642	14,502	10,7	9,56	10,99
Estragol 0,3 mM	15,465	15,226	6,216	15,979	10,735	7,8	12,49
Estragol 0,5 mM	14,15	13,235	5,919	16,434	10,49	6,232	17,428
Estragol 0,7 mM	13,528	11,989	5,994	19,077	9,025	6,415	20,64
Estragol 1,0 mM	6,04	0,778	0,55	6,988	6,04	5,49	6,59

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 8: PRODUÇÃO DE FORÇA PÓS PAUSAS DE 15, 30 E 60 SEGUNDOS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL EM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM % EM RELAÇÃO A ÚLTIMA CONTRAÇÃO ANTERIOR À PAUSA.

	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
15 SEGUNDOS							
Controle	165	84	34	88	145	135	152
Estragol 0,3 mM	221	66	27	69	216	162	277
Estragol 0,5 mM	368	174	78	216	286	261	491
Estragol 0,7 mM	382	191	95	304	320	271	493
Estragol 1,0 mM	640	368	260	3304	640	380	900
30 SEGUNDOS							
Controle	180	100	41	104	150	145	158
Estragol 0,3 mM	272	132	54	139	247	159	329
Estragol 0,5 mM	491	407	182	506	333	262	638
Estragol 0,7 mM	484	265	133	422	415	292	675
Estragol 1,0 mM	445	148	105	1334	445	340	550
60 SEGUNDOS							
Controle	189	119	49	125	148	144	150
Estragol 0,3 mM	305	138	56	145	298	173	400
Estragol 0,5 mM	511	349	156	433	367	314	675
Estragol 0,7 mM	594	496	248	789	390	322	867
Estragol 1,0 mM	488	18	13	159	488	475	500

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 9: PRODUÇÃO DE FORÇA COM CONCENTRAÇÕES CUMULATIVAS DE CÁLCIO EXTRACELULAR, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL (0,5 mM), EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM mN/mm².

Solução	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Ca²⁺ 0,1 mM	0,657	0,29	0,145	0,461	0,64	0,425	0,89
Ca²⁺ 0,3 mM	0,867	0,157	0,0787	0,25	0,89	0,735	1
Ca²⁺ 2,0 mM	8,599	2,15	0,961	2,669	8,58	6,581	10,615
Ca²⁺ 4,0 mM	11,424	3,636	1,626	4,515	11,7	8,843	14,355
Ca²⁺ 10 mM	13,884	5,591	2,5	6,942	13,27	10,147	18,605
Ca²⁺ 0,1 mM + Estragol 0,5 mM	0,407	0,325	0,162	0,517	0,425	0,175	0,64
Ca²⁺ 0,3 mM + Estragol 0,5 mM	0,407	0,325	0,162	0,517	0,425	0,175	0,64
Ca²⁺ 2,0 mM + Estragol 0,5 mM	2,108	0,761	0,34	0,945	2,08	1,75	2,535
Ca²⁺ 4,0 mM + Estragol 0,5 mM	2,534	0,932	0,417	1,158	2,34	1,89	3,078
Ca²⁺ 10 mM + Estragol 0,5 mM	6,672	4,853	2,17	6,025	5,2	2,34	11,115

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.

TABELA 10: PRODUÇÃO DE FORÇA COM A ADIÇÃO DE ISOPROTERENOL (0,1 mM), NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ESTRAGOL (0,5 mM), EM MÚSCULO PAPILAR DE RATO ESTIMULADO ELETRICAMENTE. VALORES EM mN/mm².

Solução	Média	DP	EPM	IC	Mediana	25%	75%
Controle	8,42	2,737	1,117	2,872	7,505	6,99	10,54
Isoproterenol 0,1 mM	12,247	4,496	1,835	4,718	12,985	7,49	16,39
Estragol 0,5 mM	2,435	3,489	1,424	3,661	1,28	0,5	1,56
Estragol 0,5 mM + Isoproterenol 0,1 mM	2,435	3,489	1,424	3,661	1,28	0,5	1,56

DP=desvio padrão; EPM=erro padrão da média; IC=intervalo de confiança.