



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR-PPBM

ANDRESSA DE ALENCAR SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO  
E RUTINA SOBRE A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE AORTA, ÚTERO E  
ÍLEO DE RATOS WISTAR.**

CRATO-CE  
2018

ANDRESSA DE ALENCAR SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO  
E RUTINA SOBRE A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO DE AORTA, ÚTERO E  
ÍLEO DE RATOS WISTAR.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – PPBM-URCA, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de concentração: Bioprospecção de produtos naturais.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roseli Barbosa.

Co-orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes.

CRATO –CE

2018

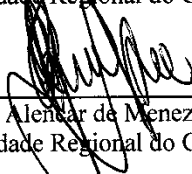
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais. A citação de qualquer texto desta dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética científica, e encontrar-se-á a disposição da biblioteca setorial do referido programa.

Dissertação aprovada em: 31 / 07 / 2018

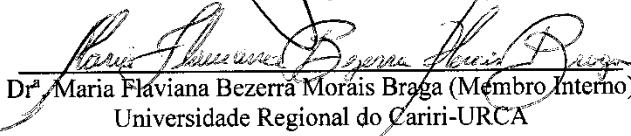
BANCA EXAMINADORA



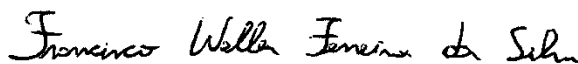
Dr.<sup>a</sup> Roseli Barbosa (Orientadora)  
Universidade Regional do Cariri-URCA



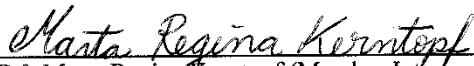
Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Co-orientador)  
Universidade Regional do Cariri-URCA



Dr.<sup>a</sup> Maria Fláviana Bezerra Morais Braga (Membro Interno)  
Universidade Regional do Cariri-URCA



Dr. Francisco Walber Ferreira da Silva (Membro Externo)  
Universidade Estadual do Ceará-UECE



Dr.<sup>a</sup> Marta Regina Kenrtopf (Membro Interno-Suplente)  
Universidade Regional do Cariri-URCA

CRATO-CE

2018

*Dedico a meu segundo maior bem, Minha família: Nilda, José Armando e Adiléia, que incansavelmente acreditaram em mim, me apoiaram, me amaram e suportaram as minhas ausências!*

## *AGRADECIMENTOS*

Ao meu **Deus**, porque dEle, por meio dEle e para Ele são todas as coisas, tudo que tenho, tudo que sou e tudo que faço! Louvores de gratidão a Ti meu Senhor, pelo caminho trilhado até aqui e por essa fidelidade que ultrapassa a compreensão de tantos. Gratidão por me dar um mãe (**Maria**) que cuidou de mim até aqui ainda que, por tempos, no escondimento. Hoje palavras não bastam!

A minha família! Vocês são graças de Deus pra mim, cada um a sua forma, mas acima de tudo no amor incondicional doado para mim, ao me compreender e apoiar cada um dos meus sonhos. Tudo isso aqui, quer compreendam ou não, o real significado pertence inteiramente a vocês! **Mãe** (Nilda), **pai** (José Armando) e **Adiléia**, obrigada por tudo! E desculpem como sempre pelos prolongados silêncios estudando, estando longe, ou trancafiada quer seja no quarto ou na URCA...! **Adileia** obrigada pelo que as palavras não transmitem!

A todos os meus familiares, que sempre acreditaram em mim! De maneira especial a **Tio Zé** por ser meu segundo pai. Por cuidar e sempre acreditar na minha família!

A minha orientadora, **Dr<sup>a</sup> Roseli Barbosa**, que me acolheu em um momento confuso da minha vida, e me inspirou para que eu sempre buscasse o meu melhor. Gratidão por toda contribuição intelectual e profissional na minha formação acadêmica. Obrigada por você ser um exemplo na paciência, coisa que nem sempre tenho, na dedicação, no profissionalismo e na pessoa, que sempre soube ouvir antes de dar bronca. E por ter continuado acreditando em mim quando eu pensei em desistir.

Ao meu co-orientador, **Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes**, que inexplicavelmente sempre me socorre nos últimos segundos. Pelas contribuições para enriquecimento deste trabalho, por ser acréscimo na minha formação acadêmica e profissional. Gratidão por sempre acreditar em mim, por todo apoio na pesquisa mesmo diante das minhas teimosias, por sempre estender a mão nas horas de maior urgência.

A professora que sempre me acresceu de motivações profissionais, intelectuais que foi responsável pela minha formação acadêmica e que se tornou uma amiga, **Prof. Dr<sup>a</sup> Marta Regina**. Gratidão por acreditar em mim, sempre me acolher com palavras de conforto e entusiasmo, por presenciar minhas lágrimas e por rir das muitas circunstâncias da vida e da academia como um todo, por ser exemplo. Mesmo diante das correções debaixo da famosa mangueira, compreendo que naqueles momentos a senhora estava tentando me fazer dar o meu melhor.

Aos meus Professores, meus Mestres que sempre me inspiraram a ser uma profissional melhor, a acreditar na ciência mesmo quando fazer ciência tem sido cada dia um luta mais árdua. De maneira especial a Prof. **Dr<sup>a</sup> Flaviana Moraes** por ser um espelho em aspectos profissionais, pessoais, enfim por ser antes de tudo alguém com quem posso contar.

Aos colegas de laboratório (LFCE, LFPN, LFQM e LMBM), graças a cada um consigo dividir trabalho, preocupações, risadas, brigas... Gratidão por me acolherem, me aturarem, – pois reconheço meu gênio “meigo” – me ajudarem desde coisas essenciais a coisas rotineiras. Não citarei nomes para não esquecer ninguém. Todos de alguma forma, ainda que simples, contribuíram pra que eu tenha chegado até aqui.

Aos colegas que Deus colocou para dividir mais que trabalhos científicos, **Franciele Gomes, Georgia Milfont, Murilo Rocha, Vitória Silva, Karen Fernandes e Renata Evaristo**. Não tenho palavras para agradecer pela ajuda, apoio, alegria, pelos muitos: “Andressa vai dar certo!”, “Eu posso te ajudar!”, “Esse dia não terei aula venho fazer teste com você!”. Essas frases fizeram e fazem a diferença. De maneira especial aos anjos: **Thaís Amorim** e **Nayane Almeida**, que permaneceram até o fim perseverando na luta comigo, desde as manhãs até os muitos dias que adentramos na noite, vocês que estavam para o que eu precisasse gratidão! Posso dizer que sem os muitos cafés e as trivialidades sobre séries eu não teria resistido da mesma maneira. À **Isaac Moura** pelas incansáveis esperas, pelo companheirismo, alegria, por rir ou mesmo por partilhar de ironias que tornavam o clima mais leve na hora do desespero, pelas incontáveis ajudas e por me aturar.

À **Luís Moraes**, o incansável amigo, que sempre me socorreu, riu comigo, ouviu meus lamentos, me apoiou no que precisei e acima de tudo por termos muito mais que histórias para contar, por termos uma história. E sim hoje somos amigos!

À **Carla Mikevelly**, por todas as ajudas, pela alegria, pelo companheirismo, pela imensa positividade, por ser ombro, ser consolo, ser presença de Deus, e óbvio pelos cafés. Acima de tudo por ter me levado ao meu lugar, ao meu carisma, a comunidade que hoje tenho como minha casa, por ser responsável por trazer até mim aquilo que seria minha base, meu quase sumo bem, por me fazer conhecer o rosto de Cristo e o meu alento. Pelo convite que me fez ser igreja de uma maneira mais que especial! Por me ajudar a crescer na minha fé, mesmo com todas as nossas diferenças e teimosias! Isso tudo começou no mestrado. Na verdade o mestrado foi o pequeno pretexto, hoje compreendo.

À um anjo que permaneceu comigo durante os passos iniciais dessa luta até agora, **Thassya Lucas**, você foi fortaleza, foi amiga, foi ouvido, voz e presença de Deus. Como lhe disse eu entrei nesse mestrado parte por sua fé em mim, obrigada por acreditar e permanecer

comigo nas incansáveis horas de estudo na biblioteca, no laboratório; pelos muitos cafés partilhados em meio as conversas incertas sobre o futuro. Por todo o resto que é indescritível.

Aos colegas de sala, por trilharem um caminho de muito esforço, determinação, incerteza, mas de muito desejo em vencer e por me escolherem mesmo eu sendo tão ausente. De maneira especial as pessoas que me ajudaram a carregar o fardo do mestrado de uma forma mais branda, seja por meio de uma conversa encorajadora, por um café partilhado nas muitas tardes no “saraiva”, na luta em alguma disciplina, pelo companheirismo, ou por me fazer rir nas piores situações: **Adamo Brasil, Raiane Oliveira, Janaíne Camilo, Norma Fernandes, Joycy Sampaio, Datiane Moraes, Adriana Tavares, Dailon Araújo, Jessica Sousa, Álefe Brito, Gyllyandeson Delmondes, Tiago Ferreira, André Macêdo.**

Aos amigos que a URCA me deu: **Rafael Cruz, Raimundo Luiz, e Fábria Campina.** Não tenho palavras para agradecer as inúmeras vezes que vocês foram consolo, me deram força, foram motivo de alegria, acreditaram – às vezes mais do que eu – que tudo ia dar certo, aturaram as minhas palavras – nem sempre gentis –, me mostraram que amigo é mesmo uma coisa muito rara. Gratidão por permanecerem!

Aos amigos que mesmo distante são presença, que não medem esforços ou palavras para me apoiarem: **Emmily Sales e Valter Sales.** Ao amigo que me ouve, me recrimina, rir comigo, mas que sempre é alento, ouvido e presença em todos os momentos, os quais vão muito além das palavras: **Gutemberg Dantas.** Como é bom saber que o tempo, circunstâncias ou a distância, nada afetam amizades como a nossa!

Aos amigos de toda uma vida que sempre entenderam todas as minhas ausências e me ouviram sempre que precisei me aconselhando e me dando forças. Apesar de sempre acharem que eu precisava me preocupar menos e descansar mais: **Ana Ester, Ana Monica, Cícero Bruno, Gabriela Dantas, Bruno Alves, Rafael Bernardo, Karla Karen.**

A minha comunidade que me fortalece e me faz estar mais próxima de Deus, que me auxilia a encontrar a força em Deus em todos os momentos: “Fraternidade o caminho”, na pessoa dos anjos que estiveram comigo me apoiando, me ensinando a ser melhor, mais forte, mais confiante, mas paciente, mais dependente da vontade de Deus: **Irmã Maria Pastora e Irmã Vitória,** eu não tenho palavras! Ao meu ministério com quem sempre pude contar de muitas maneiras, mas principalmente no apoio e fortalecimento para com a minha fé, de maneira especial a minha emérita coordenadora: **Elânia Alves e a Irmã Anita do Coração aberto.**

Às secretárias do Programa de Mestrado: **Manuela Martins Fernandes e Maria Anderieli Rolim de Brito** pela disponibilidade e generosidade de sempre.

Ao coordenador do Programa de Mestrado: **Dr<sup>a</sup> Maria Arlene Pessoa** pela disponibilidade.

Ao laboratório de Eletrofisiologia (LEF) da UECE coordenado pelo Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, pela disponibilidade em sempre nos ajudar.

A Universidade Regional do Cariri-URCA pelo espaço, por contribuir com a minha formação desde a graduação.

Aos animais de laboratórios que propiciaram o desenvolvimento de toda a pesquisa.

A agência de fomento estadual: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

“Tudo isso é mistério e presente de um Deus bom e maravilhoso!!!”



*“O sofrimento produz paciência  
Que prova a fidelidade, gera esperança  
E a esperança não engana...  
...Eu vou dançar sobre toda dor  
O senhor deu, o senhor tomou  
E sobre todas as coisas  
Bendito seja o nome do senhor...”  
(Colo de Deus – A esperança não engana)*

## RESUMO

Os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais auxiliam nos processos de defesa e tem papel fundamental em muitos processos metabólicos dos vegetais, dentre estes metabólitos tem-se os compostos fenólicos, à exemplo, o ácido cafeico e rutina, compostos largamente distribuídos na natureza e estudados farmacologicamente quanto a sua atividade antioxidante, miorelaxante, antiasmática, vasoprotetora, neuroprotetora entre outras atividades. Sabe-se que substâncias espasmolíticas tem uma relevante aplicação em processos clínicos, cuja contração anormal está envolvida, tais como hipertensão arterial, complicações durante o parto e a diarreia. Neste sentido, muito embora o ácido cafeico e rutina apresente atividade farmacológica em vários ensaios biológicos os registros de sua atividade na motilidade vascular, uterina e intestinal não são bem detalhados ou não propõe um estudo comparativo. Dessa forma o presente trabalho propôs investigar os efeitos dos compostos fenólicos: ácido cafeico e rutina em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolados de ratos Wistar. Para o desenvolvimento experimental utilizou-se ratos Wistar de ambos os sexos, (180-350g). Após eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, ou decapitação, os órgãos, em experimentos distintos, foram preparados e seccionados para serem mantidos em Tyrode modificado aerado, com pH 7,4, a 32°C (útero) e 37°C (íleo e aorta) em banho de órgãos, para registro isométrico das contrações musculares. O ácido cafeico relaxou de forma dependente da concentração as preparações de aorta na E- (IC<sub>50</sub>: 3,52 ± 0,9 mM/mL) e na E+ ( IC<sub>50</sub> 3,54 ± 0,5mM/mL) de endotélio vascular, preparações de útero (IC<sub>50</sub>: 5,2 ± 0,5 mM/mL) e de íleo (IC<sub>50</sub>: 1,98 ± 0,1 mM/mL) sobre as contrações induzidas por KCl (60 mM). Foi verificado relaxamento promovido pelo ácido cafeico para todos os órgãos: aorta (FE 0,1 µM) na E- (IC<sub>50</sub>: 2,41 ± 0,2 mM/mL) e E+ (IC<sub>50</sub>: 1,54 ± 0,1 mM/mL) de endotélio, em útero (OT 10<sup>-2</sup> UI/mL) com IC<sub>50</sub>: 2,48 ± 0,6 mM/mL e em íleo (CCh 10<sup>-6</sup> M) com IC<sub>50</sub>: 1,66 ± 0,28 mM/mL. O efeito inibitório do ácido cafeico sobre contrações evocadas por ACh (10 µM) tanto em tiras miometriais quanto intestinais caracteriza o envolvimento desse composto fenólico em acoplamento farmacomecânico de receptores colinérgico, bem como o envolvimento dos receptores serotoninérgicos no efeito inibitório do ácido cafeico sobre a contração evocada por 5-HT (10 µM) em útero. O ácido cafeico apresentou um envolvimento parcial com os canais de Ca<sup>2+</sup> para o qual verificou-se uma potência farmacológica maior em musculatura lisa intestinal. A rutina não alterou em valores estatisticamente significantes os parâmetros contráteis da musculatura lisa para os diferentes órgãos estudados. Destaca-se aqui o promissor efeito

miorelaxante do ácido cafeíco e sua maior potência em vias farmacológicas em comparação aos mecanismos que envolvem as contrações evocadas pelo KCl, esse efeito é parcialmente dependente dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Investigações futuras são necessárias para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito do ácido cafeíco.

**Palavras chave:** Compostos fenólicos – Ácido cafeíco – Rutina – Músculo liso.

## ABSTRACT

The secondary metabolites existing in medicinal plants assist in defense processes and play a key role on several metabolic processes of plants. Among the secondary metabolites are phenolic compounds, as an example, we have the caffeic acid and rutin, compounds that are widely distributed in nature and have been studied pharmacologically for its antioxidant, myorelaxant, antiasthmatic, vasoprotective, neuroprotective properties among others. It is known that spasmolytics substances have an average application in clinical processes in which the abnormal contraction is involved, as: hypertension, complications during labor and diarrhea. In this sense, although both caffeic acid and rutin present a pharmacological activity in several biological assays, there is no record of its activity in the motility: vascular, uterine and intestinal. Thus the present work aims to investigate the effect of the phenolic compounds: caffeic acid and rutin in the smooth muscle of the aorta, the uterus and the ileum isolated from Wistar rats. To develop the experiment, Wistar rats of both sexes were used (180-350g). After euthanasia in CO<sub>2</sub> chamber, or decapitation, the organs, in separated experiments, were prepared and sectioned to be maintained in an aerated modified Tyrode, pH 7.4, at 32° C (uterus) and 37 ° C (ileum and aorta) in an organ bath for isometric recording of the muscle contractions. The caffeic acid relaxed in a dependent manner than the concentration of E- aorta preparations (IC<sub>50</sub>: 3,52 ± 0,9 mM/mL) and E+ (IC<sub>50</sub> 3,54 ± 0,5mM/mL) of vascular endothelium, uterine preparations (IC<sub>50</sub>: 5,2 ± 0,5 mM/mL) and ileum (IC<sub>50</sub>: 1,98 ± 0,1 mM/mL) over the KCl (60 mM) evoked contractions. Through the contractions evoked by different pharmacological agonists were also verified the relaxing caused by the caffeic acid to all the organs: aorta (FE 0.1 μM) at E- (IC<sub>50</sub>: 2,41 ± 0,2 mM/mL) and E + (IC<sub>50</sub>: 1,54 ± 0,1 mM/mL) of endothelium, in uterus (OT 10<sup>-2</sup> UI/mL) with IC<sub>50</sub>: 2,48 ± 0,6 mM/mL and in ileum (CCh 10<sup>-6</sup> M) with IC<sub>50</sub>: 1,66 ± 0,28 mM/mL. The inhibitory effect of caffeic acid on the contractions evoked by ACh (10 μM) in both myometrials and intestinals characterizes the involvement of this phenolic compound in pharmomechanical coupling of cholinergic receptors, as well the involvement of the serotonergic receptors in the inhibitory effect of caffeic acid on the contraction evoked by 5-HT (10 μM) in uterus. The caffeic acid presented a partial involvement with the Ca<sup>2+</sup> channels to which a higher pharmacology potency was found on the smooth intestinal musculature. The rutin did not change statistically significant values the contractile parameters of the smooth muscle for the different organs studied. It is worth mentioning the promising myorelaxant effect of the

caffeic acid and the major potency on pharmacological pathways compared to the mechanisms that involves the contractions evoked by KCl, This effect is partially dependent of the Ca<sup>2+</sup> channels type L. Further research is needed to better understand the mechanisms involved in the effect of the caffeic acid.

**Key words:** phenolic compound, caffeic acid, rutin, smooth muscle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b>	Classe de compostos fenólicos presentes nas plantas.....	25
<b>Figura 1</b>	Estrutura química do ácido cafeico.....	27
<b>Quadro 2</b>	Atividades farmacológicas mais citadas para o ácido cafeico.....	28
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da rutina .....	29
<b>Quadro 3</b>	Atividades farmacológicas mais citadas para a rutina.....	30
<b>Figura 3</b>	Representação esquemática da contração e do relaxamento do músculo liso no acoplamento farmacomecânico.....	35
<b>Figura 4</b>	Representação das principais camadas encontradas nos vasos.....	37
<b>Figura 5</b>	Ilustração comparativa dos principais aspectos anatômicos de útero de ratas e útero humano.....	40
<b>Figura 6</b>	Variações hormonais durante o ciclo estral em ratas.....	42
<b>Figura 7</b>	Representação das principais camadas e estruturas observadas na organização intestinal.....	44
<b>Quadro 4</b>	Substâncias utilizadas para a realização dos experimentos, bem como seus fornecedores.....	53
<b>Figura 8</b>	Imagem ilustrativa do equipamento utilizado para medir a resposta mecânica do músculo liso.....	57
<b>Figura 9</b>	Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do ácido cafeico e rutina sobre tônus intrínseco em aorta isolada de ratos.....	58
<b>Figura 10</b>	Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em aorta, útero e íleo isolados de ratos.....	59
<b>Figura 11</b>	Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por diferentes agentes contracturantes FE (0,1 µM), OT (10 <sup>-2</sup> UI/mL) e CCh (10 <sup>-6</sup> M).....	60

<b>Figura 12</b>	Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do envolvimento de receptores serotoninérgicos e colinérgicos no efeito do ácido cafeico em útero e íleo isolado de ratos na presença de ACh (10 µM) e 5-HT (10 µM).....	<b>61</b>
<b>Figura 13</b>	Avaliação do envolvimento do efeito do ácido cafeico com os canais de Ca <sup>2+</sup> tipo L em aorta, útero e íleo isolado de ratos.....	<b>62</b>
<b>Tabela 1</b>	Valores da concentração do ácido cafeico capaz de desencadear 50% da resposta relaxante (IC <sub>50</sub> ) nos diferentes órgãos estudados (aorta, útero e íleo) na presença de diferentes agentes contracturantes (AC).....	<b>69</b>
<b>Figura 1</b>	Efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico da contração evocadas por KCl (60 mM) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos.....	<b>71</b>
<b>Figura 2</b>	Efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, FE (0,1 µM), OT 10 <sup>-2</sup> UI/mL, ACh (10 µM) e 5-HT (10 µM) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo, isolados de ratos.....	<b>74</b>
<b>Figura 3</b>	Efeito do envolvimento do ácido cafeico com receptores serotoninérgicos e colinérgicos, na presença de ACh (10 µM) e 5-HT (10 µM) sobre a musculatura lisa de útero e íleo, isolados de ratos.....	<b>76</b>
<b>Figura 4</b>	Efeito do ácido cafeico (7 mM/mL) em contrações evocadas por Ba <sup>2+</sup> exógeno, em aorta, útero e íleo de ratos, com a curva-resposta de bloqueio da nifedipina (1 µM) utilizado como controle positivo.....	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- [Ca<sup>2+</sup>]<sup>i</sup> - Concentração intracelular de cálcio
- [GDI] - Inibidor de Dissociação Rho-GDP
- [K<sup>+</sup>]<sup>E</sup> - Concentração Externa de Potássio
- 0Ca<sup>2+</sup> - Solução de Tyrode isenta de cálcio
- 4Ca<sup>2+</sup>-CaM - Complexo cálcio calmodulina
- ACh - Cloridrato de Acetilcolina
- ANOVA - Análise de variância
- BK<sub>Ca</sub> - Canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca<sup>2+</sup>
- Bloq - Bloqueador
- Ca<sup>2+</sup> - Íons cálcio
- CaM - Calmodulina
- cAMP - Adenosina Monofosfato cíclica-5 (cAMP)
- CAPE - Ester Fenetil do Ácido Cafeico
- CCh - Carbacol
- CEUA - Comissão de Ética e Uso de Animais
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX - Cicloxigenase
- DAG - Diacilglicerol
- IC<sub>50</sub> - Concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista
- EDHF - Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
- EGTA - Ácido Etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
- Gα<sub>i</sub> - Subunidade α inibitória da proteína G
- GDP - Guanosina Difosfato
- GEF - Fator de Troca do Nucleotídeo Guanina
- GMPc/PKG - Proteína cinase G dependente de Guanosina Monofosfato cíclico
- GPCRs - Receptores acoplados a proteína G
- GTP - Guanosina Trifosfato
- IP3 - Trifosfato de Inositol
- IP3R - Receptores de Inositol Trifosfato
- LPA - Ácido Lisofosfatídico



M - Molar  
M2 - Receptor Muscarínico tipo 2  
M3 - Receptor Muscarínico tipo 3  
MBS - Subunidade de Ligação da Miosina  
MLCK - Kinase de Cadeia Leve de Miosina  
MLCP - Fosfatase da Cadeia Leve de Miosina  
mM - Milimolar  
MP - Miosina Fosfatase  
Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase - Bomba de Sódio e Potássio  
nM - Nanomolar  
NO - Óxido Nítrico  
NOS - Óxido Nítrico Sintase  
OT - Ocitocina  
PGF2a - Prostaglandina F2a  
PGI2 - Prostaciclina  
PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato  
PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato  
PKA - Proteína Cinase A  
PKC - Proteína Cinase C  
PKG - Proteína Cinase G Dependente de GMPc  
PLC - Fosfolipase C  
PMCA - Ca<sup>2+</sup>-ATPase na membrana plasmática  
RhoA - Proteína monomérica Rho A  
rMLC - Cadeia Leve Regulatória da Miosina  
ROCCs - Canais de Cálcio Operados por Receptores  
ROK - Rho cinase  
RS - Retículo Sarcoplasmático  
RYr - Receptores de rianodina  
S1P - Esfingosina-1-fosfato  
SNE - Sistema Nervoso Entérico  
SOCCs - Canais de cálcio operados por estoque  
TM - Tyrode modificado  
UI - Unidade Internacional  
Vm - Potencial de Membrana

VOCCs - Canais de cálcio dependentes de Voltagem

Y-27632 - Inibidor específico da RhoK

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 PRODUTOS NATURAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.2 ÁCIDO CAFEICO.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.3 RUTINA.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4 MÚSCULO LISO ASPECTOS GERAIS.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.1 Músculo liso e mecanismos contráteis: contração e relaxamento.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4.2 Musculatura lisa vascular.....</b>	<b>36</b>
<b>2.4.3 Musculatura lisa uterina.....</b>	<b>38</b>
<b>2.4.4 Musculatura lisa intestinal .....</b>	<b>43</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>48</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>51</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>51</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 MATERIAIS.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.1 Sais e fármacos.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.2 Soluções.....</b>	<b>53</b>
<b>5.1.3 Animais experimentais.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1 Preparação do tecido.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1.1 Preparação da musculatura lisa vascular.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1.2 Preparação da musculatura lisa uterina.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2.1.3 Preparação da musculatura lisa intestinal.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.2 Medida da resposta mecânica do músculo liso .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.3 Protocolos experimentais.....</b>	<b>57</b>
<b>5.2.3.1 Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina sobre o tônus intrínseco da aorta isolada de rato.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2.3.2 Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico da contração evocadas por KCl (60</b>	

mM) em muscular lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos.....	<b>58</b>
5.2.3.3 Avaliação do efeito do ácido cafeíco e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, FE (0,1 µM), OT (10 <sup>-2</sup> UI/mL), e CCh (10 <sup>-6</sup> M) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo, respectivamente, isolados de ratos.....	<b>59</b>
5.2.3.4 Avaliação do envolvimento de receptores serotoninérgicos e colinérgicos no efeito do ácido cafeíco em útero e íleo isolado de ratos na presença de ACh (10 µM) e 5-HT (10 µM).....	<b>60</b>
5.2.3.5 Avaliação do envolvimento do efeito do ácido cafeíco com os canais de Ca <sup>2+</sup> tipo L em aorta, útero e íleo isolado de ratos.....	<b>61</b>
<b>5.2.4 Análise Estatística.....</b>	<b>62</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6.1 ARTIGO: EFEITO MIORRELAXANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO E RUTINA EM MUSCULATURA LISA DE AORTA, ÚTERO E ÍLEO DE RATOS WISTAR.....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	
<b>APÊNDICES</b>	
<b>ANEXOS</b>	

# *Introdução*

---

# 1 INTRODUÇÃO

Os produtos de origem natural advêm das mais diversas fontes: vegetais, micro-organismos, anfíbios, répteis, dentre outros. Muitas substâncias produzidas nestes organismos fazem parte do seu metabolismo geral e estão envolvidos em processos de manutenção do funcionamento fisiológico destes seres (JOHN, 2010). É importante destacar dentre esses organismos as plantas medicinais, as quais desempenharam um importante papel, desde as mais antigas civilizações, seja no uso de chás ou outros preparos que apresentassem uma ação medicamentosa ( LÓPEZ, 2006; FIRMO et al., 2011) .

Os estudos etnobotânicos que citam as utilizações populares, relatam as mais distintas indicações e as mais diversas espécies. Algumas indicações dos vegetais são para tratar doenças tais como: dor em geral (ex: *Mentha piperita* L), inflamação (ex *Amburana cearensis*), cólica menstrual (ex: *Allium sativum* L.), hipertensão (ex: *Annona muricata* L), tosses (ex: *Anadenanthera colubrina*,) e asma (ex: *Musa paradisiaca* L) (OSOSKI et al., 2002; CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010; MACÊDO; RIBEIRO; SOUZA, 2013; SOUZA et al., 2014; YAZBEK et al., 2016).

Em relação aos estudos científicos sobre as plantas, áreas como farmacologia dos produtos naturais, bioquímica, fitoquímica e química dos produtos naturais, que atuam conjuntamente à etnobiologia, – especialmente a etnobotânica – contribuem para as descobertas farmacológicas obtidas de plantas medicinais apontando atividades: miorrelaxante (LOVASZ et al., 2015; REIS, 2015; REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000; SILVA, 2016), antioxidante (AMORATI et al., 2006; DA SILVA OLIVEIRA, 2015; SOARES, 2002), antiasmática (MA et al., 2016), anticancerígena (OZTURK et al., 2012) etc.

As plantas medicinais por sua vez, possuem metabólitos secundários, à exemplo dos compostos fenólicos que podem estar presentes na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (RIBÉREAU-GAYON, 1968; SOARES, 2002). Esses metabólico secundários por sua vez têm o papel importante de auxiliar nos processos de defesa da planta, (RIBÉREAU-GAYON, 1968; SOARES, 2002; WURTELE et al., 2012).

Dos compostos fenólicos destacam-se os ácidos fenólicos, em específico os ácidos cinâmicos, que são mais comumente encontrados na natureza, dos quais faz parte o ácido cafeico (Ácido 3,4-dihidroxibenzenoacrílico) produzido pelo metabolismo secundário das plantas e frequentemente encontrado no café, pêra, maçã, uva etc. (SHI et al., 2003; SOARES,

2002), facilmente ingerido na dieta, no entanto sua absorção e metabolização bem como seus efeitos bioativos são ainda bastante discutidos (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Uma variedade de estudos já demonstraram propriedades farmacológicas para o ácido cafeico, embora algumas destas estejam relacionadas ao seu derivado éster fenetil do ácido cafeico. Para atividade farmacológica tem-se: antioxidante (AMORATI et al., 2006; GÜLÇİN, 2006), antimicrobiano (MATEJCZYK et al., 2017) anti-inflamatório, anticancerígeno (MATEJCZYK et al., 2017), antiasmático (CORRÊA; DE MELO; COSTA, 2008; MA et al., 2016) e miorelaxante (AVIELLO et al., 2010; FUKUDA et al., 2015). A atividade miorelaxante relacionada ao ácido cafeico corresponde ao estudo de extrato vegetais que apresentam em sua composição o ácido cafeico e há apenas um breve relato de sua atividade em musculo liso vascular (CICALA et al., 2003).

A rutina (3, 3', 4', 5, 7 -pentahidroxi flavona-3-rhamnoglucósido) é outro exemplo de composto fenólico bastante estudado, que por sua vez, é quimicamente definido como um glicosídeo. É encontrada abundantemente na natureza em vegetais como: trigo mourisco, chá e maçã, sendo considerado um componente nutricional vital nos alimentos. Estudos farmacológicos atribuem à rutina as atividades: inibidora da disfunção endotelial (FUENTES; CÉSPEDES; SEPULVEDA, 2015), antioxidante (DA SILVA OLIVEIRA, 2015), cardioprotetora (ALI; MUDAGAL; GOLI, 2009) etc.

A atividade miorelaxante é de grande interesse clínico, uma vez que o tecido muscular liso ocupa papel importante no funcionamento e homeostase de muitos órgãos. Processos patológicos tais como, hipertensão arterial, asma brônquica, disfunção erétil, complicações durante o parto e a diarreia, em cuja alteração da contração da musculatura lisa está envolvida possuem grande interesse de estudo, devido às implicações desencadeadas nestes processos que alteram a homeostase do organismo.

Por esse motivo a utilização do músculo liso em ensaios farmacológicos que proporcionem a avaliação e identificação de substâncias, incluindo produtos naturais, faz-se de grande relevância clínica. Dessa forma o estudo da atividade do ácido cafeico e a rutina na musculatura lisa de aorta, útero e íleo, é de alta relevância, uma vez que, uma boa parte da população mundial é acometida por algum distúrbio na musculatura lisa que muitas vezes pode levar a óbito, como a hipertensão arterial. Além disso, há um interesse da indústria farmacêutica em desenvolver novas drogas a partir de compostos isolados de plantas medicinais, visto que, esses produtos na maioria das vezes possuem baixa toxicidade. A proposta deste trabalho é investigar o efeito dos compostos fenólicos: ácido cafeico e rutina em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolados de ratos wistar.

# *Revisão de Literatura*

---



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUTOS NATURAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS

A prática milenar da utilização dos recursos naturais pela espécie humana é algo intrínseco da sua evolução, adaptação e sobrevivência. Estes recursos, oriundos de diferentes fontes, são empregados em diversas situações e finalidade tais como: construção de casa, ornamentação, agricultura, criação, tratamento de doenças etc.; vegetais, microrganismos, anfíbios, répteis, dentre outros (JOHN, 2010). Neste contexto, historicamente as plantas medicinais assumem um papel fundamental no tratamento de doenças, nas diversas civilizações como Egito, China, pela região mediterrânea e europeia (HOEFFEL et al., 2011; LEONTI; VERPOORTE, 2017). No Brasil a utilização de plantas com fins medicinais teve origem com os indígenas, devido à vasta riqueza de diversidade biológica que o país abriga, o que confirma o quanto antiga é essa prática (LORENZI; MATOS; 2002).

O aumento do interesse para com os estudos etnobotânicos, os quais apresentam o direcionamento das plantas que devem ter seu potencial farmacológico verificado, cresceu mundialmente desde as últimas décadas, em especial na América Latina em países como México, Colômbia e o Brasil (DE OLIVEIRA et al., 2009; HAMILTON et al., 2003), onde o empirismo de diversas populações vem conquistando espaço nos trabalhos científicos, e contribuindo para a produção de conhecimento sobre os vegetais, principalmente na vertente das suas propriedades medicinais (ALBUQUERQUE, 2006; LAGO et al., 2016; NETO et al., 2014). Diversas áreas como a fitoquímica, a etnofarmacologia, a química e a farmacologia, abordam os aspectos de isolamento, purificação, caracterização dos princípios ativos e as atividades biológicas presentes nas mais diversas plantas (ALBUQUERQUE, 2006).

Algumas investigações com técnicas de fitoquímica e química e as triagem de extratos vegetais ou óleos essenciais favorecem a identificação dos componentes presentes nestes produtos naturais. Pode-se ainda utilizar de técnicas de isolamento ou mesmo extração de substâncias puras que possam ser utilizadas como moléculas bioativas na terapêutica ou como possíveis fármacos (HONG et al., 2011).

Neste âmbito, as moléculas bioativas, estão intrinsecamente ligadas ao efeito farmacológico do vegetal. Dentre essas moléculas destacam-se aquelas que são produzidas pelas plantas: os metabólitos secundários ou metabólitos especiais, os quais apresentam importância em funções fisiológicas do vegetal estando muitas vezes envolvidos nos

processos de fotossíntese, respiração, transporte de solutos etc., podendo ainda atuar na defesa da planta, como atrativo de odor para polinizadores entre outras funções. Diferentemente dos metabólitos primários, os metabólitos secundários encontram-se restritos no reino vegetal, sendo, portanto, moléculas de interesse científico. Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011; MADY, 2000).

Os compostos fenólicos (Quadro 1), são uma classe de polifenóis presentes de maneira relativamente abundante entre os metabólitos secundários dos vegetais. Devido à sua larga diversificação de substâncias (fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas) têm sido alvo de diversos pesquisadores que buscam a separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos em alimentos, uma vez que tais compostos também apresentam atividades farmacológicas relevantes (ADOLPHO, 2015; ANGELO; JORGE, 2007; DA SILVA OLIVEIRA, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2016; FRUET, 2015; KUNASEGARAN et al., 2017; PARASHAR; MEHTA; UDAYABANU, 2017; SHI et al., 2003).

**Quadro 1** – Classe de compostos fenólicos presentes nas plantas.

<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzóicos	$C_6-C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6-C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	$C_6-C_3$
Nafitoquinonas	$C_6-C_4$
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides e isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neoglicanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

**Fonte:** Adaptado de Angelo; Jorge 2007.

Sabe-se que há uma grande diversidade de compostos fenólicos. Com a finalidade de melhor organizar essa diversidade adota-se uma classificação geral que organiza esses compostos em três grupos principais: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Destaca-se aqui os compostos largamente distribuídos na natureza que se subdividem ainda em, flavonóides e derivados, os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002).

Os flavonóides constituem a maior classe de compostos fenólicos vegetais estando presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (ANGELO; JORGE, 2007). O esqueleto básico de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos (C6-C3-C6) organizados em dois anéis aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos. Neste grupo se encontram, antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, auronas, chalconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002). Esse grupo é envolto de grande interesse econômico devido suas diferentes propriedades como: a cor, que possibilita seu uso como corante, no processo de fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau além de conferir cor e valor nutricional para alguns alimentos (SIMÕES et al., 2016).

Desempenham nas plantas algumas atribuições funcionais semelhantes aos metabólitos secundários gerais: protege a planta contra os raios ultravioletas e visíveis, contra os insetos, fungos, vírus e bactérias; auxilia na atração de animais no processo de polinização; possui ação antioxidante; controla a ação dos hormônios vegetais; são agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas (SIMÕES et al., 2016).

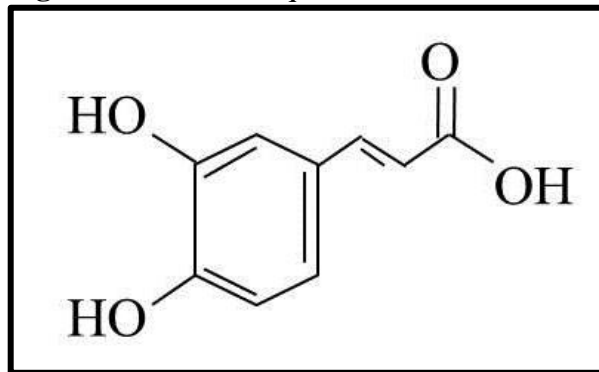
Os ácidos fenólicos são substâncias que também compõem os compostos fenólicos. Quimicamente este grupo caracteriza-se por ter um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo caracteristicamente a propriedade antioxidante para os vegetais em que estão presentes, bem como efeito vasorrelaxante, tratamento de doenças dermatológicas entre outras (ANGELO; JORGE, 2007; FUKUDA et al., 2015; MAGNANI et al., 2014; NIERO, 2010; SOARES, 2002). Para melhor compreensão os ácidos fenólicos são subdivididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos que derivam do ácido hidroxibenzóico são os mais simples encontrados na natureza e incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e sirínico, que têm estrutura comum, (C6-C1); os ácidos hidroxicinâmicos, por sua vez, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6-C3), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico, sendo os mais comuns. Há ainda as cumarinas, as quais são lactonas derivadas do ácido cinâmico (ácido-*o*-hidroxi-cinâmico) por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (ANGELO; JORGE, 2007; SOARES, 2002).

## 2.2 ÁCIDO CAFEICO

O ácido cafeico também denominado ácido 3,4-diidroxicinâmico faz parte do grupo dos compostos fenólicos, largamente distribuídos na natureza, produzidos pelo metabolismo secundário. É um dos representantes dos ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanóides mais largamente distribuído nos tecidos vegetais, bastante encontrado em maçã, pêra, uvas (SHI et al., 2003), sendo normalmente encontrado como uma variedade de derivados incluindo amidas simples, ésteres, ésteres de açúcar e glicosídeos, possuindo fórmula molecular  $C_9H_8O_4$ . Um bom exemplo dos derivados estruturalmente do ácido cafeico é o ester fenilíco do ácido cafeico (CAPE), o qual foi identificado pela primeira vez em 1987 em própolis e tem sido bastante estudado farmacologicamente sendo por vezes correlacionado em artigos ou em sites de busca como citação para atividade farmacológica do ácido cafeico (AVIELLO et al., 2010; AYTEKIN; MORIMURA; KIDA, 2011) (Figura 1).

**Figura 1** – Estrutura química do ácido cafeico.



Fonte: Monteiro, 2016. (MONTEIRO, 2016)

O ácido cafeico tem sido estudado principalmente ao que se refere à sua absorção no organismo, a qual varia de acordo com a quantidade de café ingerida. A presença do AC em algumas plantas conferem-lhe propriedades farmacológicas principalmente atividade antioxidante (GÜLÇIN, 2006; MICHALAK, 2006; MOHAMMADIAN; MOBRAMI; SAJEDI, 2011), muito embora diversas outras atividades já venham sendo verificadas, como demonstrado em estudo de revisão de Magnani et al., (2014). Algumas das atividades bastante citadas pode ser conferido no quadro 2.

**Quadro 2** – Atividades farmacológicas mais citadas para o ácido cafeico.

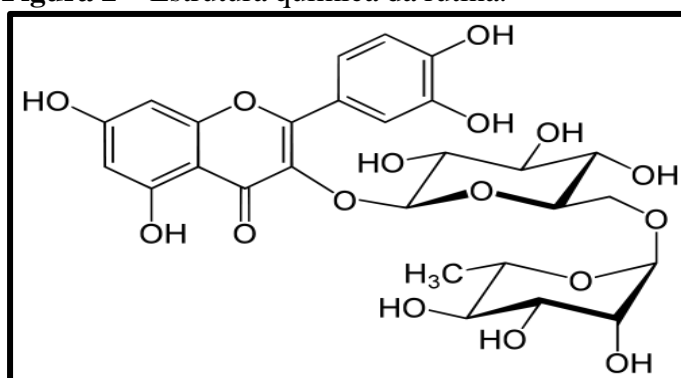
<b>Atividade</b>	<b>Tipo de Estudo</b>	<b>Detalhamento</b>	<b>Referência</b>
Antimutagênico	<i>In vitro</i>	Inibição da mutagenicidade de Trp-P-1 e Glu-P-2 de <i>Salmonella typhimurium</i>	Yamada; Tomita, 1996
Antioxidante	<i>In vitro</i>	Atividade antioxidante em diferentes ensaios antioxidantes <i>in vitro</i> : inibição na peroxidação lipídica da emulsão de ácido linoleico; eliminação de radicais de ânions superóxido, potência de redução total e quelação de metal em atividades de íons ferrosos;  Atividade antioxidante dependente de pH: com o aumento do pH, sua atividade antioxidante cresceu substancialmente, tornando-se comparável ou melhor do que a de Trolox.	Gülçin, 2006;  Amorati et al., 2006
Inibição da peroxidação lipídica	<i>In vitro</i>	Ensaio antioxidante na presença de 3 sistemas distintos, para os quais a maior atividade inibitória exibida pelo caféico foi na reação catalisada por Cu (2+).	Nardini et al., 1995
Antimicrobiana	<i>In vitro</i>	Efeitos antimicrobianos contra vários microrganismos estudados: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Kokuria rhizophila</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> .	Almajano et al., 2007
Citotóxico e Anticancerígeno	<i>In vitro</i>	Análise por citometria de Ow: aprisionamento celular de células de carcinoma de células escamosas orais, Meng-1 (OEC-M1) na fase G2 / M da divisão celular.	Lee et al., 2005
	<i>In vitro</i>	Inibição da taxa de migração de células: adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 triplas negativas.	Kabała-Dzik et al., 2017
Vasorrelaxante	<i>In vivo e In vitro</i>	Vasorrelaxamento em ratos envelhecidos e espontaneamente hipertensos.	Fukuda et al., 2015
Anti-inflamatória	<i>In vivo e In vitro</i>	Inibição periférica de substâncias inflamatórias e à influência sobre o sistema nervoso central constatado por testes: edema de pata, permeabilidade vascular, janela de pele.	Chen; Tsai; Wu, 1995

### 2.3 RUTINA

A rutina (3, 3', 4', 5, 7 -pentahidroxi flavona-3-rhamnoglucósido) ou mesmo rutoside, quercetina-3-rutinoside e sophorin pertence ao grupo dos flavonóides e a subclasse dos flavonóis, é encontrada abundantemente nas plantas, sendo portanto considerada um nutriente vital dos alimentos. Fontes de alimento tais como: cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto, chá preto e flor de paixão apresentam em sua composição química a rutina. É possível destacar que de maneira mais característica é um flavonoide cítrico e abundantemente encontrado em trigo mourisco (KREFT; KNAPP; KREFT, 1999).

A denominação “rutina” foi empregada devido a espécie *Ruta graveolens*, que a contém na composição química. Quimicamente classifica-se como um flavonol sendo uma composição de glicósido compreendendo a quercetina de aglicona flavonólica juntamente com a rutina de dissacarídeo, tal composição é evidenciada no trabalho de Manach, et al., (2004), no qual demonstraram que a rutina foi completamente hidrolisada por glicosidases produzidas pelas enterobactérias dando origem a quercetina 3-glicosídica e a quercetina aglicona (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009) (Figura 2).

**Figura 2** – Estrutura química da rutina.



Fonte: Becho, et al., 2009.

Assim como os demais flavonóides, a rutina tem se destacado devido suas propriedades farmacológicas bem condensadas em trabalho de revisão de Ganeshpurkar; saluja, (2017), dentre as quais para as mais citadas estão as listadas no quadro 3.

**Quadro 3** – Atividades farmacológicas mais citadas para rotina.

Continua ...

<b>Atividade</b>	<b>Tipo de estudo</b>	<b>Detalhamento</b>	<b>Referência</b>
Antioxidante	<i>In vivo</i>	As atividades da superóxido dismutase foram elevadas pela ingestão de rotina. Os efeitos antioxidantes deste flavonoide, aumentando a concentração de colesterol-HDL, estão relacionados à elevação nas atividades da superóxido dismutase.	Rodrigues et al., 2003
Efeito neuroprotetivo	<i>In vivo</i>	Demonstrou o efeito neuroprotetivo na isquemia cerebral: causando a atenuação da "apoptose neural isquêmica" devido ao constrangimento da expressão de P53 e à peroxidação lipídica, juntamente com incremento em "enzimas de defesa antioxidantes endógenas".	Khan et al., 2009
Efeito sedativo	<i>In vivo</i>	Ação depressora no SNC, que não possui envolvimento do receptor GABA a	Fernández et al., 2006
Atividade anticonvulsivante	<i>In vivo</i>	A rotina têm apenas potencial anticonvulsivante fraco e de curto prazo. Este flavonóide parece ser seguro para pacientes com epilepsia porque não alterar a atividade dos AED (drogas antiepilépticas) estudados nem produziu efeitos adversos	Nieoczym et al., 2014
Atividade cardioprotetora	<i>In vivo</i>	O infarto do miocárdio produzido no grupo que recebeu o infarto do miocárdio (IM/ R ) foi significativamente reduzido em tetrahidrocurcumina e rutina do estado antioxidante do miocárdio, redução do tamanho do infarto; diminuição da peroxidação lipídica.	Ali; Mudagal; Goli, 2009
Atividade analgésica	<i>In vivo</i>	Efeito analgésico da rutina foi estabelecido por meio de teste de placa quente em camundongos albinos Swis.	Rylski; et al., 1979
Atividade Antinociceptiva	<i>In vivo</i>	A simulação de ancoragem demonstrou que a Rutina interagiu fortemente com a cicloxigenase, formando uma série de ligações específicas de hidrogênio. Identificou-se atividades anti-nociceptivas periféricas e centrais de <i>Excoecaria agallocha</i> que envolvem receptor de opióides e em que o composto ativo é Rutina.	Selvaraj et al., 2014
Efeito antidiabético	<i>In vivo</i>	A diminuição da glicemia plasmática em jejum, níveis de hemoglobina glicosilada, C-peptído e malondialdeído foi observada em ratos diabéticos com estreptozotocina com tratamento com rutina	Kamalakkannan; Prince, 2006

## Conclusão

Efeito hipertensivo	anti-	<i>In vivo e in vitro</i>	O extrato germinado de trigo sarraceno demonstrou efeito anti-hipertensivo e, possivelmente, abrigou "células endoteliais arteriais" por efeitos prejudiciais do estresse oxidativo.	Kim et al., 2009
		<i>In vivo</i>	A redução do estresse oxidativo devido à rutina, quando administrada por via oral, é o principal motivo para a restauração da "sensibilidade barorreflexa prejudicada" e da "reatividade vascular" em ratos hipertensos.	Mendes-Junior et al., 2013
		<i>In vitro</i>	Ao aumentar a produção de NO em células endoteliais humanas, a rutina melhorou as funções endoteliais.	Ugusman et al., 2014



## 2.4 MÚSCULO LISO ASPECTOS GERAIS

O músculo liso distribui-se por diversos órgãos, os quais desempenham funções fisiológicas essenciais. Para órgãos tais como vasos sanguíneos, estômago, bexiga, vias aéreas, intestinos, corpos cavernosos e útero, tem-se que as suas respostas fisiológicas estão intrinsecamente relacionada à contratilidade dos miócitos da musculatura lisa, que ao contrair-se encurtam-se produzindo força, que por sua vez permite a motilidade (propulsão do quimo), alteração das dimensões de alguns órgãos (diminuição do volume da bexiga) e a manutenção da tensão (vasos sanguíneos) (AIRES, 2012; SOMLYO; SOMLYO, 1990).

Neste sentido pode-se acreditar que a fisiologia dos órgãos acima citados ao que se refere à funcionalidade contrátil são semelhantes, no entanto é importante destacar que o músculo liso assume particularidades em alguns aspectos como: localização (órgão), para o qual assume as classificações de vascular, gastrointestinal, urinário, genital, respiratório e ocular; disposição das fibras, as quais podem encontrar-se horizontais e longitudinais; acoplamento elétrico que pode ser: unitário (células acopladas eletricamente, em que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pela estimulação da célula adjacente) ou multiunitário (células que não estão acopladas eletricamente); padrão de atividade: fásico ou tônico; molécula que desencadeia uma resposta que pode variar na resposta final de acordo com o órgão; e morfogenética e função fisiológica dos receptores (AIRES, 2012; BAUMANN et al., 2017; WEBB, 2003).

Devido aos aspectos citados quanto às características intrínsecas desse tecido, a vasta distribuição do músculo liso e sua importância fisiológica, a farmacologia experimental utiliza esse tecido como modelo para o estudo de diversas moléculas. Tais estudos utilizando o músculo liso como modelo experimental já propiciaram a descoberta de diversas drogas que auxiliam na terapêutica moderna sendo exemplo, a pilocarpina (colinesterásico), a sildenafil (vasodilatador) e o captopril (anti-hipertensivo) (HONG et al., 2011).

Para o estudo do músculo liso aspectos gerais devem ser ressaltados, para o qual destaca-se a participação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  como determinante para o processos de contração e relaxamento. Sabe-se que a presença do  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula desencadeia numerosos eventos intracelulares desde mecanismos de contração até secreção, transmissão sináptica, regulação enzimática, fosforilação e desfosforilação de proteínas e transcrição gênica (CATTERALL, 2011).

### 2.4.1 Músculo liso e mecanismos contráteis: contração e relaxamento

O envolvimento do  $\text{Ca}^{2+}$  na contração da musculatura lisa medeia toda a resposta contrátil final. Para desencadear este processo intracelular os íons  $\text{Ca}^{2+}$  se ligam a sítios específicos em proteínas de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . No músculo liso a calmodulina (CaM) é a proteína de ligação com alta afinidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (HEIZMANN; HUNZLKER, 1991; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

No músculo liso o aumento da concentração de cálcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  caracteriza-se como a causa primária de todo o processo contrátil. Este processo de regulação funcional da  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  envolve dois tipos de acoplamentos essenciais do músculo liso: acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico. A diferença crucial está que, no primeiro caso, é necessária indispensavelmente uma mudança do potencial de membrana ( $V_m$ ), no segundo caso a ligação de um agonista ao receptor pode ou não desencadear uma mudança no  $V_m$ , em ambos os acoplamentos a resposta contrátil precisa do aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  (REMBOLD, 1992).

Detalhadamente o acoplamento eletromecânico acontece mediante uma despolarização da membrana que ocorre com o aumento da concentração de potássio extracelular  $[\text{K}^+]^E$  ou ainda de maneira indireta pela ligação de algum agonista ao seu receptor, e conseqüentemente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCCs) resultando na entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (CATTERALL, 2011; REMBOLD, 1992).

O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  mediado pelo acoplamento farmacomecânico, ou misto, já que pode ou não depender de uma despolarização de membrana, se dá pela ligação de um agonista a um receptor caracteristicamente acoplado à proteína G (GPCRs) o qual ativa a cascata do inositol através das proteínas Gq/11, que medeia a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 induz a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) ao ativar os receptores de IP3 (IP3R) e o DAG ativa a proteína cinase C (PKC), que, por sua vez, leva a um aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  através da ativação direta dos VOCCs ou, indiretamente, por inibição de canais de  $\text{K}^+$  presentes na membrana plasmática (FUKATA; KAIBUCHI; AMANO, 2001; HEIZMANN; HUNZLKER, 1991). O aumento na  $[\text{Ca}^{2+}]^i$  favorece a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  com a proteína CaM, formando o complexo  $4\text{Ca}^{2+}\text{-CaM}$ , complexo responsável por ativar a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cadeia leve regulatória da miosina (rMLC), promovendo a interação dos filamentos de miosina com os de actina, desencadeando o processo de contração do músculo liso (SOMLYO; SOMLYO, 2000; WEBB, 2003).

A resposta contrátil pode ocorrer ainda através da abertura dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, os quais levam a um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  sem mudança do  $V_m$ , ou ainda a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  provocada

por  $\text{Ca}^{2+}$  através dos receptores de rianodina [RYr], sensíveis à cafeína, que estão presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) (KOMORI et al., 1995). É importante destacar que nas células musculares lisas as fontes de  $\text{Ca}^{2+}$ , advêm de dois locais principais: do meio extracelular que permite o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais presentes na membrana plasmática, e outra intracelular, representada pelos estoques internos principalmente o RS, que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  para o citosol (WEBB, 2003).

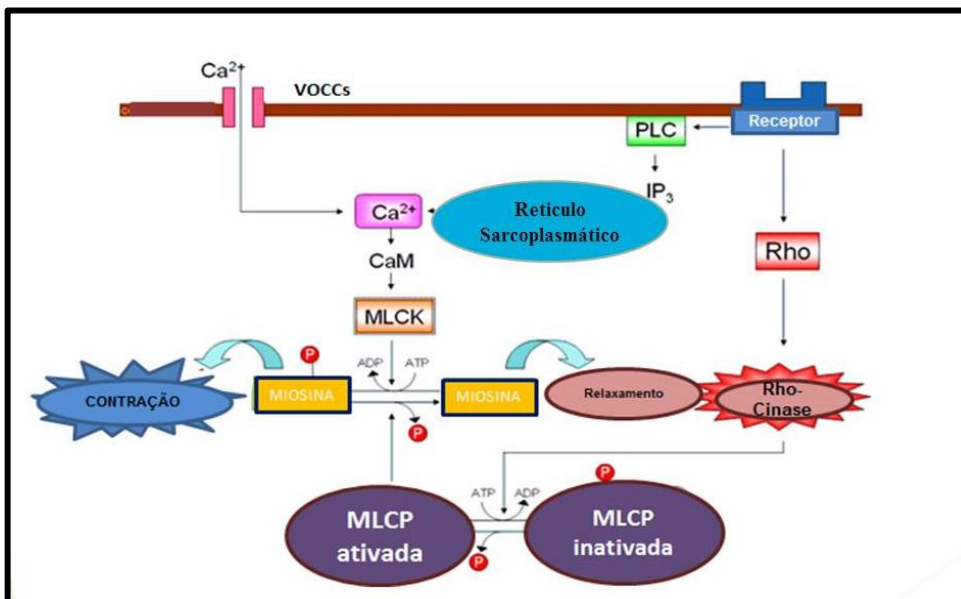
Um mecanismo adjacente ao processo de contração caracteriza-se pela modulação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP). Ocorre entre a MLCK e a MLCP uma harmonia que se desenvolve como mecanismo regulador de fosforilação/ desfosforilação na contração da musculatura lisa. Esse processo envolve a RhoA que ativa a Rho cinase (ROK), que, por sua vez, inibe a MP por mecanismos direto e indireto (FUKATA; KAIBUCHI; AMANO, 2001; LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2009; SOMLYO; SOMLYO, 2000).

Para que ocorra a inibição direta da MP pela ROK ativada, é necessária a fosforilação da ROK da subunidade da MP de ligação à miosina (MBS). A inibição indireta da MP pela ROK ativada, por sua vez, abrange a fosforilação do CPI-17, proteína endógena de 17 kDa, que, então, inibe a MP. Alguns hormônios agonistas como, por exemplo, as catecolaminas – atuando nos receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos, a vasopressina, a endotelina, a angiotensina e os agonistas muscarínicos, aumentam a sensibilidade da contração do músculo liso ao  $\text{Ca}^{2+}$ , por meio da sinalização RhoA/ ROK. A ROK também pode ser ativada pelo ácido araquidônico e inibida pelo Y-27632, inibidor altamente específico (BERNE & LEVY, 2009; SILVERTHORN et al., 2010).

A RhoA inativa localiza-se geralmente, no citosol, ligada ao GDP e à proteína inibidora (inibidor de dissociação Rho-GDP [GDI]). A ligação do agonista a vários receptores pode ativar a RhoA pela estimulação do fator de troca do nucleotídeo guanina (GEF), para produzir RhoA-GTP, que se localiza no sarcolema e ativa a ROK (SILVERTHORN et al., 2010) (Figura 3).

O processo contrário a contração que ocorre no músculo liso é o relaxamento o qual acontece como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que estimula a inibição do mecanismo contrátil, e assim como na contração se diferencia em resposta ao tipo de acoplamento. No mecanismo eletromecânico pode ocorrer diretamente pela abertura dos canais de  $\text{K}^+$  o que aumentará o efluxo de  $\text{K}^+$  da célula, resultando em uma hiperpolarização. Pode ser provocado ainda por drogas, como por exemplo, a cromacalina, ou através de outros fatores como, por exemplo, os fatores dependente de endotélio que acontece no músculo vascular (MEDHORA et al., 2001; SOMLYO; SOMLYO, 1994).

**Figura 3** – Representação esquemática da contração e do relaxamento do músculo liso no acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.



Na imagem observa-se diversos agonistas de receptores ligados a uma proteína G, que estimulam, simultaneamente, a produção de IP<sub>3</sub> e a via da Rho-quinase. O IP<sub>3</sub> é produzido pela hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato, mediado pela fosfolipase C- PLC. O IP<sub>3</sub> aumenta o cálcio intracelular pela abertura dos canais de cálcio dependentes de IP<sub>3</sub> no retículo sarcoplasmático, resultando assim no aumento de cálcio e na ativação da enzima cálcio/calmodulina e na fosforilação subsequente da cadeia leve da miosina MLCK, promovendo a integração actina-miosina (contração). O cálcio de origem dos canais catiônicos operados por voltagem-VOCCs promove uma potencialização da resposta de contração. Outra via de potencialização é via proteína Rho, que estimula a Rho-quinase que ativa a MLCP-fosfatase de cadeia leve da miosina promovendo um aumento da contração.

**Fonte:** Adaptado de Berne e Levy, 2009.

No acoplamento farmacomecânico, o relaxamento pode ser resultado do aumento da atividade da enzima Ca<sup>2+</sup>-ATPase ao agir no RS ou na membrana plasmática, pela fosforilação através da PKG e/ou PKA, processo que resulta no aumento do sequestro e saída de Ca<sup>2+</sup>, reduzindo dessa forma a [Ca<sup>2+</sup>]<sup>i</sup>. Pode também ocorrer diminuição da formação de IP<sub>3</sub> e consequente diminuição da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares. Outra forma é acontecer redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> via GMPc/PKG ou AMPc/PKA por diminuir indiretamente o influxo de Ca<sup>2+</sup>. E ainda poderá diminuir a concentração de Ca<sup>2+</sup> por ativar o trocador de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> na membrana plasmática (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2009; REMBOLD, 1992; SOMLYO et al., 1999).

As particularidades ao que concerne a localização do músculo liso são necessárias para compreensão de muitos processos fisiológicos desempenhados pelo órgão no qual os miócitos desempenham a atividade contrátil.

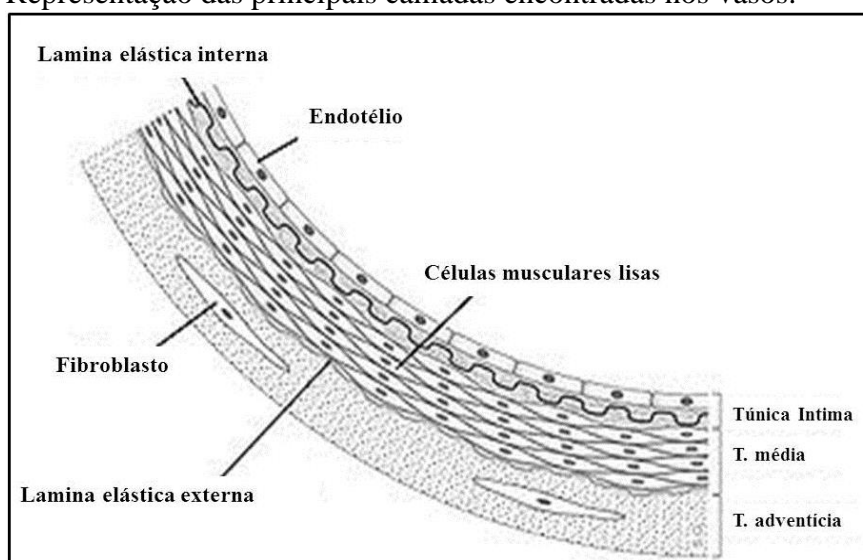
### 2.4.2 Músculo liso vascular

O músculo liso vascular encontrado caracteristicamente nos vasos sanguíneos constitui um importante modelo experimental, uma vez que a vasculatura mantém funções essenciais a homeostase do organismo tais como: manutenção do tônus vascular, manutenção da pressão arterial por meio do fluxo sanguíneo. O sistema vascular é formado por artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias (PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000).

Anatomicamente os vasos apresentam-se organizados em camadas denominadas túnicas: túnica externa, túnica média e túnica interna. A túnica externa localizada na porção mais externa do vaso é caracteristicamente composta por predominância de fibras elásticas; a túnica média localiza-se na porção intermediária do vaso sendo composta principalmente por músculo liso e fibras elásticas, nas artérias essa camada é mais desenvolvida; a túnica interna por sua vez encontra-se na porção mais interna do vaso apresentando composição predominantemente de tecido epitelial, denominado especificamente para este local de endotélio. Nos vasos de pequeno calibre como os capilares encontra-se somente a túnica interna (AIRES, 2012; PUGSLEY; TABRIZCHI, 2000) (Figura 4).

As túnicas presentes nas artérias apresentam lâminas que as delimitam entre si, essas lâminas constituem-se de tecido elástico, distribuindo-se em lâmina interna e externa. A capacidade de distensibilidade de vasos de grande calibre como as artérias permitem paredes que se distendem facilmente, mediante à grande quantidade de elastina da túnica média, tal característica é importante no momento de receberem o volume de sangue principalmente na ejeção durante a sístole ventricular bem como para o retorno da sua forma original durante a diástole, ou seja, essas artérias são responsáveis pela manutenção da pressão e perfusão sanguínea (LANNOY; SLOVE; JACOB, 2014; SEIDELMANN; LIGHTHOUSE; GREIF, 2014).

**Figura 4** – Representação das principais camadas encontradas nos vasos.



Na figura está exemplificada cada camada que compõe a anatomia morfológica do vaso: lâmina elástica interna e externa; endotélio; células musculares lisas; fibroblastos; Túnicas: íntima, média e adventícia.

**Fonte:** Weill Cornell Medical College, 2010.

Neste aspecto o tônus vascular desempenha papel crucial na regulação da pressão sanguínea e distribuição do fluxo, mediante os processos essenciais de contração e relaxamento da túnica média. Uma das complicações resultantes de uma alteração no tônus vascular é o aumento na tensão aórtica que tem causado problemas como: aterosclerose e vários fatores de risco como hipertensão, diabete, hiperlipidemia (SALOMAA et al., 1995; SEIDELMANN; LIGHTHOUSE; GREIF, 2014).

Dessa forma é possível afirmar que essa regulação é um fator importante para controle da hipertensão, sendo o endotélio o responsável por este comando e componente da camada de células epiteliais que recobrem a túnica interna. O contato direto do endotélio com a corrente sanguínea permite a detecção de estímulos mecânicos e hormonais responsáveis por desencadear no endotélio a produção e secreção de várias substâncias vasodilatadoras e inflamatórias, dentre elas o óxido nítrico (NO), as prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (ZAGO; ZANESCO, 2006).

Há ainda a produção de substâncias vasoconstritoras, a exemplo: endotelina-1, angiotensina II, o tromboxano A<sub>2</sub> e espécies reativas de oxigênio. O endotélio desempenha além das funções citadas importante participações em processos tais como angiogênese, no equilíbrio dos fluidos e permeabilidade vascular (YASUNAGA et al., 2014). Para tanto é evidente a importância do endotélio nos processos contráteis dos vasos, em exemplo temos a produção de NO que ocorre mediante a presença de endotélio e desempenha função modulatória dos

processos de contração e relaxamento do músculo liso vascular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A função fisiológica do NO é por sua vez, modulado pela NO sintase (NOS) a qual quando diminuída facilita o aumento do tônus miogênico ou mesmo a ação de agentes vasoconstritores. A função relaxante do NO está relacionada diretamente a estimulação da enzima guanilil ciclase solúvel, bem como ao aumento da produção de GMPc, o qual responde estimulando a quinase dependente de GMPc (PKG), a qual por meio de inúmeros mecanismos promove relaxamento da vasculatura. A PKG pode como uma das respostas de ativação, acarretar uma hiperpolarização, uma vez que pode ativar os canais de  $K^+$ , ou mesmo ocasionar um efluxo de  $Ca^{2+}$  intracelular, gerando vasodilatação. Sendo complexa a atividade da PKG a mesma poderá diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao  $Ca^{2+}$ , e reduzir a contração muscular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; RAPOPORT; DRAZNIN; MURAD, 1983).

Dentre as substâncias já mencionadas o endotélio produz: PGI<sub>2</sub>, a qual é formada pelo ácido araquidônico e catalisada pela PGI<sub>2</sub> sintase, tendo sua atividade mediada por meio da ativação da adenilato ciclase, e consequente aumento do AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA); uma substância de identidade química desconhecida, mas resistente a inibidores da NOS e da cicloxigenase (COX); e o EDHF, o qual envolve em seu mecanismo de ativação os canais para  $K^+$  e/ou através da ativação das junções comunicantes entre as células endoteliais, o que levará o vasorrelaxamento, que por sua vez, pode ser evitado pelo uso de inibidores da  $Na^+/K^+$ -ATPase, do bário ou ainda a remoção do endotélio. Estudos demonstram que o EDHF é evidentemente um vasodilatador mais potente que o NO (DONG et al., 1997; MYERS et al., 1990; ZAGO; ZANESCO, 2006).

### **2.4.3 Musculatura lisa do útero**

O músculo liso uterino desempenha no organismo função essencial correlacionada a processos que envolvem a fisiologia contrátil tais como manutenção da contração durante o parto, complicações antecedentes ao parto ou as 36 semanas de desenvolvimento embrionário, descamação do endométrio durante o período menstrual que causa desconforto por meio de cólicas menstruais, a dismenorreia, processos estes que se correlacionam a camada muscular uterina intimamente ligada a aspectos da reprodução feminina (AIRES, 2012; SILVERTHORN et al., 2010).

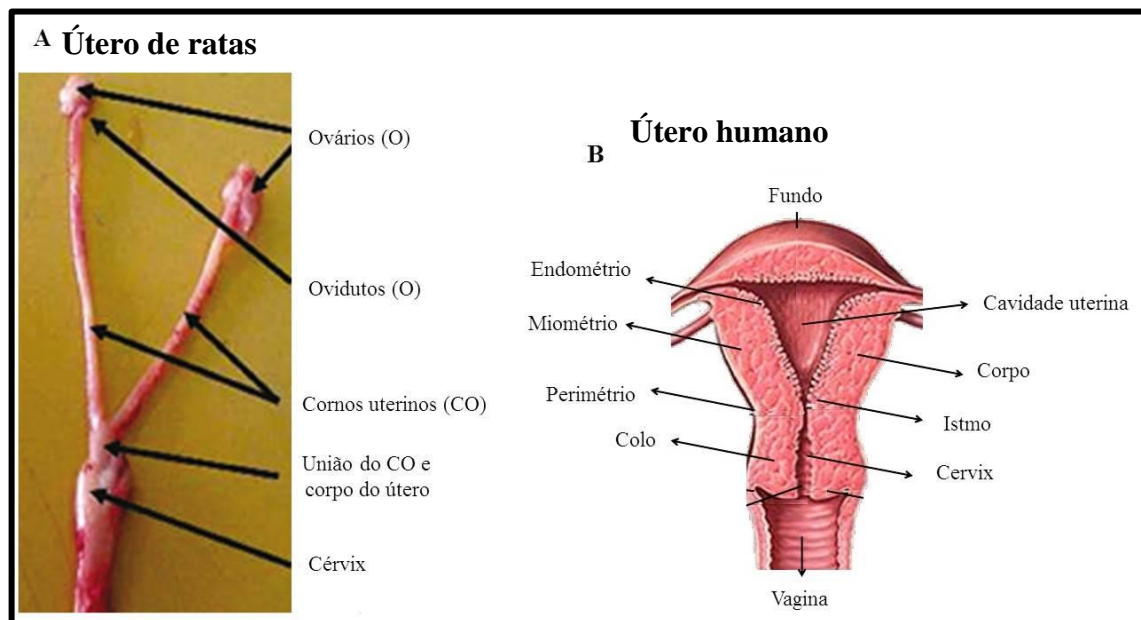
O útero humano possui camadas longitudinal e circular de músculo liso, que se organizam perpendicularmente umas às outras. As fibras musculares se arranjam em forma de folhetos ou feixes e suas membranas celulares estão aderidas entre si em múltiplos pontos, logo, as contrações geradas em uma fibra é passada para a outra facilmente. A camada longitudinal externa é constituída de uma rede de células musculares lisas que como propõe a nomenclatura se orientam no eixo longitudinal do órgão, a camada circular interna, por sua vez, apresenta-se organizada concentricamente em torno do eixo longitudinal do órgão. Ambas as camadas sofrem contração, a camada longitudinal quando contraída é responsável pela dilatação e encurtamento, enquanto que a contração da camada circular causa no órgão um alongamento que resulta em redução do diâmetro e do comprimento (WEBB, 2003; YOUNG, 2007). Ambas as camadas também são verificadas em útero de roedores.

Anatomicamente a musculatura lisa uterina está presente como camada intermediária do útero tanto em humanos como em roedores. O útero morfológicamente é um órgão oco, que se encontra revestido de musculatura lisa bem diferenciada, possuindo três camadas: endométrio (mucosa que recobre a parte interna), miométrio (camada muscular lisa espessa) e serosa (camada externa) (CHIBBAR; MILLER; MITCHELL, 1993; MITCHELL et al., 2013a). Anatomicamente este órgão diferencia-se entre humanos e roedores. Em roedores o útero caracteriza-se por um conjunto de ductos sexuais (oviduto, corno uterino, sendo esses em pares) (Figura 5), os quais desempenham a função de transportar os oocistos, proteger o embrião durante o desenvolvimento, em caso de fertilização, e a saída dos fetos durante o parto (MARTINS et al., 2011).

Os aspectos diferenciais para a anatomia uterina humana e de roedores tem-se que principalmente no fato de que o útero nos roedores consiste em tubos pares que partem dos ovários onde são separados por curtas tubas uterinas e se abrem ainda distintamente na vagina, sendo denominado útero duplo ou bifurcado, tais características são facilmente observadas em ratas de laboratório (*Rattus norvegicus*). Nestes animais o útero duplo é contínuo contendo dois canais cervicais distintos que desembocam em uma vagina simples (MARTINS, 2009; MITCHELL et al., 2013b).



**Figura 5** – Imagem comparativa dos principais aspectos anatômicos de útero de ratas e útero humano.



A) útero de ratas destacando as principais estruturas que compõe o órgão reprodutivo onde observa-se: **O**-ovários que encontram-se superiormente ao **O**-oviduto, responsável por realizar a ligação dos ovários ao par de **CO**- cornos uterinos responsáveis por transportar oocitos, abrigar os embriões e expulsar o feto, o CO encontra-se ligado ao corpo do útero por uma porção de **U**-união deste ao cérvix; em **B**) útero humano destacando estruturas que compõe o órgão reprodutivo, no qual observa-se principalmente **fundo** porção superior às entradas das tubas uterinas; na porção mais interna observa-se a **cavidade uterina** na qual abriga-se o embrião; **corpo** que é responsável por formar quase todo o útero; **istmo** uma porção curta e estreitada da parte final inferior do corpo uterino; **cervix** porção cilíndrica, mais baixa do útero, sendo que sua extremidade superior possui continuidade com o istmo; **colo** que se estende para o interior da **vagina**; e as camadas teciduais **endométrio** a camada mucosa do útero; o **miométrio** camada espessa e parte muscular, que possui três camadas, é denominada; e o **perimétrio** a camada de tecido conjuntivo e a serosa.

**Fonte:** Adaptado de Morais, 2016.

Em aspectos experimentais sabe-se que muitos estudos, incluindo aqueles relacionados ao período gestacional, visando à saúde humana geralmente são realizado em animais de laboratório. Os animais utilizados, que são em sua maioria roedores, servem como modelo devido a sua fácil obtenção, ciclo reprodutivo curto, custo e facilidade de criação além de possuírem uma fisiologia semelhante a do homem. Embora existam diferenças entre o cérebro humano e o de roedores, podem ser identificadas estruturas análogas que se correlaciona a alguns comportamentos (CASTRO, 2006).

Neste sentido o aspecto em comum que se destaca de similar interesse é o miométrio por ser esta a camada de interesse em diversos processos fisiológicos como citado anteriormente, os quais envolvem o processo contrátil, para o qual algumas características são intrínsecas do miométrio. Na atividade uterotrópica a ocitocina (OT) é o agonista uterino considerado

caracteristicamente mais potente. A OT é um hormônio produzido no hipotálamo e armazenado na neurohipófise, sendo este talvez o mais potente para o parto, sendo produzido também na decídua materna, que se encontra adjacente ao músculo liso uterino. A endotelina-1 e prostaglandina F2a (PGF2a) também são considerados agonistas potentes que são, assim como OT, produzidos na decídua materna. Ambos os agonistas tem seu mecanismo desencadeado ao interagir com os são os GPCRs, receptores específicos da membrana que ativam vias de sinalização por meio de pequenas proteínas GTPases (KOTANI et al., 2000; MITCHELL et al., 2013a).

Acredita-se ainda que uma via potencial para contratilidade uterina é mediada por  $G\alpha_i$  (subunidade  $\alpha$  inibitória da proteína G), que embora não pareça ser um regulador principal do processo contrátil, pode estar envolvida na transdução de sinais provenientes da isoforma do receptor PGE2, P3 e OT (KOTANI et al., 2000). Por outro lado nos miócitos uterinos a isoforma  $G\alpha_s$  (subunidade  $\alpha$  estimuladora de adenilato ciclase da proteína G é a forma predominante que desencadeia o relaxamento. A ativação da  $G\alpha_s$  resulta em maior atividade da adenilil ciclase da membrana (Ac), que converte o fosfato de adenosina (ATP) para o monofosfato de adenosina cíclica-5 (cAMP) e, por sua vez, ativa a proteína (PKA). Esta via é usualmente estimulada por agonistas  $\beta$ -adrenérgicos endógenos e exógenos para causar relaxamento uterino (MITCHELL et al., 2013a; SOMLYO; SOMLYO, 2000).

Em geral assume que os receptores presentes na musculatura uterina assemelham-se em partes aos encontrados no músculo liso em geral. Detalhadamente temos que a principal porta de entrada para o  $Ca^{2+}$  que vem do meio extracelular são os canais para cálcio abertos por voltagem (CaV); os canais de  $K^+$  que se subdividem em: canais para  $K^+$  abertos por voltagem (Kv); canais para potássio de grande condutância ativados por cálcio (BKCa); canais para  $K^+$  de pequena condutância ativados por  $Ca^{2+}$  (SKCa); canais para  $K^+$  retificadores de entrada (KIR); canais para  $K^+$  sensíveis ao ATP (KATP), entre outros que são verificados em ensaios experimentais com a utilização de bloqueadores específicos desses canais (THORNELOE; NELSON, 2005; TRAVASSOS, 2010).

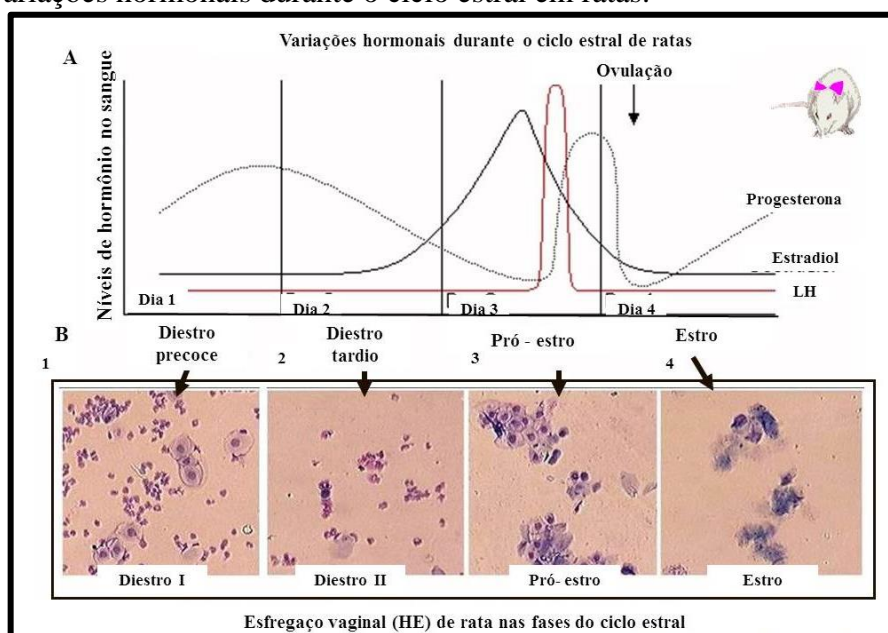
É possível citar, não especificamente receptores, mas agonistas como ocitocina, serotonina, carbacol e histamina que se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, geralmente através da proteína Gq/11 mediando a produção de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3), que estimulam a liberação de  $Ca^{2+}$  do RS (FUKATA; KAIBUCHI; AMANO, 2001).

Embora vias comuns aos demais órgãos, no que se refere a atividade muscular lisa, já venham sendo estudadas, sabe-se que o útero é um órgão de função vital em processos como

implantação do embrião e manifestação de distúrbios como a dismenorreia, sendo de fundamental importância estudos que venham auxiliar na compreensão dos processos tocolíticos e uterotrópicos.

Em roedores, algo que deve ser destacado quanto à fisiologia uterina trata-se da fase reprodutiva do animal, caracterizada por quatro diferentes fases distinguidas principalmente pela predominância de tipos celulares, que podem ser diferenciadas em lavados vaginais em microscopia de luz. Observam-se (Figura 6): células epiteliais nucleadas (proestro), fase proliferativa onde está sendo produzido estrógeno e dura de 4-5 dias; células epiteliais queratinizadas (estro), relacionada ao período reprodutivo e dura cerca de, 21 horas; células queratinizadas e nucleadas e leucócitos (metaestro) fase que corresponde à atividade secretória; leucócitos e muco (diestro) correspondente a regressão do corpo lúteo durando 57 horas. Uma permanência do animal nessa fase pode indicar imaturidade ou infecção (MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. AND TANNO, 2002; MARCONDES, 1995).

**Figura 6** – Variações hormonais durante o ciclo estral em ratas.



A) Gráfico representativo das variações hormonais que ocorrem no decorrer do ciclo estral de ratas no intervalo de 4 dias, para o qual tem-se que: a linha azul representa as variações de progesterona, a linha preta são as variações de estradiol e a linha vermelha as variações de LH (hormônio luteinizante); B) representação histológica das variações celulares que ocorrem durante as fases do ciclo estral em ratas. 1- Diestro I ou metaestro início da fase secretória com baixas do nível sérico de estradiol, predomínio de leucócitos com presença de células cornificadas e células epiteliais; 2- Diestro II ocorre regressão do corpo lúteo predomínio de leucócitos; 3- Proestro: observa-se a fase proliferativa com produção de estrógeno, predomínio de células epiteliais nucleadas; 4- Estro: predomínio de células cornificadas.

**Fonte:** Adaptado de Morais, 2016.

Uma vez que, o músculo liso responde a estímulos tais como a presença de hormônios, a verificação do ciclo reprodutivo do animal, ao se trabalhar com o modelo experimental de

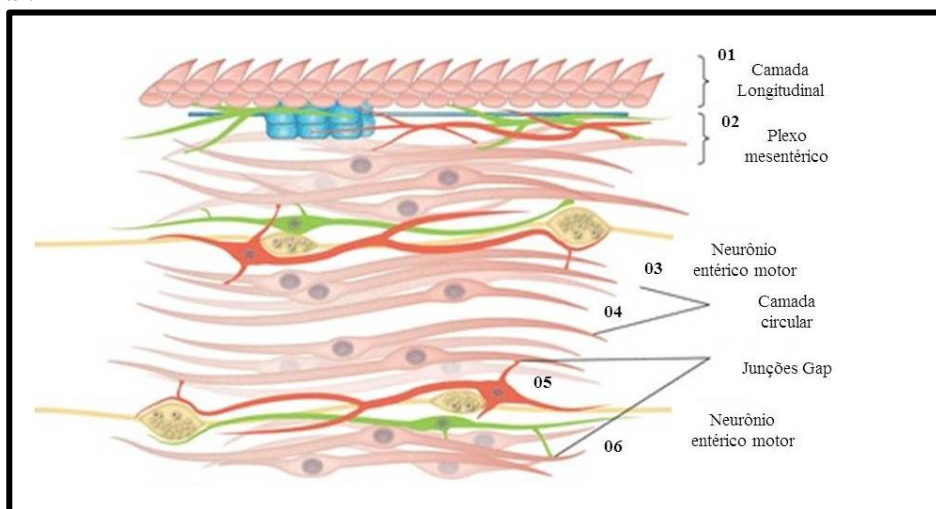
musculatura uterina, faz-se de grande importância para evitar fatores que possam influenciar na contratilidade dos miócitos uterinos, embora não haja uma relação direta da fase estro com a atividade estudada, exceto a possível influência hormonal (VANDERLEI et al., 1996).

#### **2.4.4 Musculatura lisa intestinal**

O músculo liso intestinal desempenha no organismo função primordial na propulsão, mistura do conteúdo luminal e controle do fluxo do bolo alimentar, sendo essa função dependente da motilidade intestinal. A motilidade intestinal diferencia-se quanto ao seu padrão de atividade, o qual está caracterizado na dependência da localização. Com o músculo liso da região proximal do estômago e esfíncteres responsáveis por uma contração tônica sustentada harmonizada e a musculatura da região distal do estômago, intestino delgado e cólon por uma contração rítmica desenvolvida por ondas lentas, caracterizadas por ciclos de despolarização e repolarização da membrana (MURTHY, 2006).

A musculatura intestinal anatomicamente está organizada em feixes de fibras e apresentam duas camadas com direções opostas, uma longitudinal e uma circular. As junções abertas que se localizam no intermédio dessas camadas, permitem a comunicação entre a camada longitudinal e a circular e por consequência ocorre o movimento de íons de uma célula para outra. O eixo longitudinal do músculo liso intestinal é o principal responsável por formar a tensão, muito embora essa seja desenvolvida nas três dimensões (BLAIR et al., 2014; SANDERS; WARD; KOH, 2014). Além disso, as células de cajal, próprias do interstício intestinal, possuem propriedades de fibroblastos e também estão em comunicação com as camadas musculares lisas, longitudinal e circular por meio de junções gap ou “Gap junctions” (SANDERS; WARD; KOH, 2014) (Figura 7). Estas junções intercelulares são formadas por canais transmembrana, as conexinas, que permitem a passagem de íons, metabolitos e pequenas moléculas (> 1000 Da), incluindo os segundos mensageiros AMPc e IP3

**Figura 7** – Representação das principais camadas e estruturas observadas na organização intestinal.



01) camada longitudinal; 02 plexo mesentérico; 03 neurônio entérico motor; 04 camada circular; 05 junções Gap; 06 neurônio entérico motor.

Fonte: Adaptado de Sanders; Ward; Koh, 2014.

As ondas de contração no músculo intestinal dão origem aos movimentos de peristaltismo responsáveis pelo estiramento das paredes intestinais, envolvendo mecanismos coordenados da camada circular e longitudinal. Neste aspecto contrátil existem diferenças quanto à mobilização dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  para a contração das camadas. No músculo liso circular destaca-se principalmente a ocorrência de quebra do PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) e consequente formação do PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato). O músculo liso longitudinal por outro lado possui pequenas quantidades de PIP2 e com isso pouco IP3 é sintetizado. Os receptores presentes no retículo sarcoplasmático do músculo longitudinal não possuem alta afinidade pelo IP3, no entanto apresentam RYr de alta afinidade e sensibilidade pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e ADP- Ribose Cíclica (MURTHY, 2006; SOMLYO, 1985).

O trato gastrintestinal conta ainda com uma regulação nervosa que lhe é própria: o sistema nervoso entérico (SNE) o qual atua juntamente com o sistema nervoso autônomo por meio do simpático e parassimpático. Na sua formação o SNE conta com dois plexos, o mioentérico ou de Auerbach e o submucoso ou de Meissner. O plexo mioentérico, encontrado entre as camadas musculares longitudinais e circulares, controla o movimento gastrintestinal e o submucoso controla as secreções gastrintestinais e o fluxo sanguíneo local (FURNESS et al., 2014).

Sabe-se que uma variedade de receptores e seus subtipos foram identificados como responsáveis por mediar a contração muscular lisa. No músculo liso intestinal, os ligantes para estes receptores são provenientes principalmente de neurônios entéricos excitatórios, como a

acetilcolina e as taquicininas; a partir de células do próprio músculo liso, como a esfingosina-1-fosfato (S1P), o ácido lisofosfatídico (LPA) e endocanabinóides; e, em menor grau, a partir de células adventícias, bem como via circulação sistêmica (BLAIR et al., 2014; MURTHY, 2006).

Além destes, já foram identificados receptores de outros peptídios, como a endotelina e a motilina; de aminas, como a histamina e a 5-hidroxitriptamina (5-HT); de purinas, como o ATP; aminoácidos, como o gama-aminobutírico (GABA), e peptídeos, como o intestinal vasoativo (VIP) (MURTHY, 2006).

Os receptores de histamina estão sendo avaliados, para os quais já foram verificados os subtipos H1, H2 e H4 que em estudo foram expressos em níveis semelhantes no tecido do cólon símio, enquanto apenas o transcrito do receptor H2 foi detectado no tecido do cólon murino. A atividade desses receptores correlaciona-se a despolarização pelos canais de cátions não seletivos ativados por histamina quando avaliado em células musculares lisas de colón de símios. Em contrapartida a histamina causa hiperpolarização inibindo as contrações do cólon murino. A hiperpolarização foi inibida pelo bloqueador do canal KATP, a glibenclamida. As correntes de K<sup>+</sup> ativadas por histamina também foram inibidas pela glibenclamida em SMC colônica murina. Relata-se aqui a diversidade de resposta em decorrência do animal (KIM et al., 2012).

Quanto a resposta fisiológica da serotonina, sabe-se que, cerca de 95%, da 5-HT é produzida no trato gastrointestinal pelas células enteroendócrinas ou enterocromafins, no intestino, e pelos neurônios serotoninérgicos do sistema nervoso entérico (BROWNING; TRAVAGLI; SCIENCES, 2016). Quando secretada pelas células enteroendócrinas a 5-HT pode estimular tanto neurônios aferentes primários (sensorial) intrínsecos e extrínsecos, através de pelo menos três diferentes receptores serotoninérgicos, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>1P</sub> (VEDOVATO et al., 2014; ZHU et al., 2001). No mais tem-se que os receptores de serotonina conhecidos por atuarem na função motora do intestino são os que pertencem aos subtipos 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (SIKANDER; RANA; PRASAD, 2009).

Na motilidade intestinal a serotonina pode fazer a contração ou relaxamento intestinal, dependendo das condições existentes. Assim, essa substância estimula neurônios colinérgicos, o que resulta na contração do músculo liso intestinal, ou, através da ativação de neurônios inibitórios nitrérgicos, estimula o relaxamento do musculo liso (SIKANDER; RANA; PRASAD, 2009). Algumas pesquisas quanto a produção de medicamentos que atuem frente a disfunções da motilidade intestinal tem focado nos receptores serotoninérgicos (ÖHMAN; SIMRÉN, 2007).

Como alvos da acetilcolina, em resposta colinérgica, os subtipos de receptores muscarínicos predominantes são os receptores M<sub>2</sub> e M<sub>3</sub>, sendo o receptor M<sub>3</sub> o principal responsável por mediar a contração muscular lisa intestinal (MURTHY, 2006).

Por sua vez, os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  encontrados no músculo liso intestinal e responsáveis pela contração sustentada são os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, os quais podem ser bloqueados tipicamente quando expostos a drogas tais como: verapamil ou nifedipina (SOMLYO, 1985).

No total, cerca de 20 tipos de neurotransmissores ocorrem no TGI. Agentes excitatórios, como acetilcolina (ACh) e taquicinininas (substância P), elevam o  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e/ou inibem a formação dos nucleotídeos cíclicos. Agentes inibitórios, como VIP e NO, em geral elevam os níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos, AMPc ou GMPc respectivamente. Estímulos mais potentes liberam peptídeos de efeitos mais prolongados em geral. Já opióides e norepinefrina agem de modo indireto, modulando a liberação de neurotransmissores ou hormônios (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; FURNESS et al., 2014).

*Justificativa*

---



### 3. JUSTIFICATIVA

Produtos de origem vegetal, utilizados empiricamente para tratar sintomas de algumas enfermidades a exemplo doenças relacionadas a musculatura lisa, ganham um papel fundamental, bem como as moléculas isoladas de tais produtos naturais ou seus derivados. (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010). No entanto, são necessários mais estudos para descrever a diversidade de moléculas existentes na natureza.

Algumas dessas moléculas são largamente encontradas na natureza, a exemplo os compostos fenólicos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, que podem ser encontrados em diversos vegetais. Dentre esses compostos estão o ácido cafeico e rutina. O ácido cafeico é um ácido cinâmico frequentemente encontrado no café, pêra, maçã, uva etc. (SHI et al., 2003; SOARES, 2002) e aparentemente é bastante estudado devido a sua larga distribuição, no entanto é importante ressaltar que algumas das atividades farmacológicas citadas estão relacionadas ao seu derivado éster fenetil do ácido cafeico tais como: vasorrelaxante (CICALA et al., 2003), anti-inflamatória (WANG et al., 2013), anticancerígena (CHUU et al., 2012). A rutina, um glicosídeo, considerado vital na composição dos alimentos, possui tal qual o ácido cafeico muitas atribuições na literatura de suas propriedades farmacológicas (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017), dentre as quais a atividade antitumoral (ALONSO-CASTRO; DOMÍNGUEZ; GARCÍA-CARRANCÁ, 2013) e antiinflamatória (ARJUMAND; SETH; SULTANA, 2011).

Neste aspecto evidências têm correlacionado algumas doenças à alteração da contração da musculatura lisa, responsável pelo funcionamento fisiológico de diversos órgãos. Dentre as doenças é possível citar, a hipertensão arterial, asma brônquica, a disfunção erétil, cólicas menstruais intensas, abortos e a diarreia, as quais possuem grande interesse de estudo, devido às implicações desencadeadas nestes processos, que alteram a homeostase do organismo.

É importante destacar que a musculatura lisa apresenta particularidades de funcionamento contrátil de acordo com sua localização (órgão), ou seja, a resposta contrátil em presença a uma determinada substância ou mesmo produto natural, pode ocorrer de maneira diferenciada. Isso ocorre por fatores tais como: a disposição das fibras, o tipo de acoplamento elétrico (unitário ou multiunitário), o padrão de atividade (fásico ou tônico), a morfogenética e função fisiológica de receptores. A resposta diferenciada de uma mesma molécula em sistemas, ou mesmo em receptores com localizações distintas é alvo de estudos farmacológicos durante o processo de estudo de uma substância com propriedades farmacológicas e bioativas.

Haja vista que, não há estudos quanto às propriedades farmacológicas do ácido cafeico e rutina em músculo liso, este estudo tem como proposta descrever a ação e mecanismos envolvidos no efeito desses compostos fenólicos nos diferentes órgãos. Ressalta-se a importância do desenvolvimento desta pesquisa devido ambos os compostos serem bastantes presentes na natureza sendo, portanto, facilmente consumido, fato este que intensifica a relevância de enriquecer informações a cerca de suas propriedades farmacológicas. Além disso, o presente estudo pode vir a contribuir para caracterização de possíveis atividades terapêuticas de diversas espécies vegetais que apresentam estas moléculas em sua composição.

# *Objetivos*

---

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito dos compostos fenólicos: ácido cafeico e rutina em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolados de ratos wistar.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina em tónus intrínseco de musculatura lisa de aorta isolada de ratos.
- ✓ Investigar a participação do endotélio vascular no efeito vasorrelaxante do ácido cafeico em aorta isolada de rato.
- ✓ Elucidar os mecanismos de ação envolvidos na atividade do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico e farmacomecânico da contração muscular lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos.
- ✓ Compreender o envolvimento de receptores serotoninérgicos e colinérgicos no efeito do ácido cafeico em útero e íleo isolado de ratos.
- ✓ Avaliar o envolvimento do efeito do ácido cafeico com os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L em aorta, útero e íleo isolado de ratos.

# ***Materiais e Métodos***

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAIS

#### 5.1.1 Sais e Fármacos

As drogas e reagentes que foram utilizadas possuem grau e pureza analítica, e foram obtidos em sua maioria da companhia *Sigma Chemical Corporation* (St. Louis, (Missouri, USA), sendo mantidas sob condições indicadas pelo fabricante.

**Quadro 4** – Substâncias utilizadas para realização dos experimentos, e seu fornecedores.

SUBSTÂNCIAS	FORNECEDORES
Ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA)	<i>Sigma Aldrich</i>
Acetilcolina (ACh)	
Ácido cafeico (3,4-Dihydroxybenzeneacrylic acid)	
Carbacol (CCh)	
Carbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	
Cloreto de bário (BaCl <sub>2</sub> )	
Cloreto de cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	
Cloreto de magnésio (MgCl <sub>2</sub> )	
Cloreto de potássio (KCl)	
Cloreto de sódio (NaCl)	
Cloridrato de acetilcolina (ACh)	
Cloridrato de serotonina (5-HT)	
Diethylstilbestrol	
Fosfato de sódio (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
Glicose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	
Ocitocina	
Rutina (3, 3', 4', 5, 7 -pentahidroxiflavona-3-rhamnoglucósido)	

#### 5.1.2 Soluções

A solução nutritora de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) utilizada possui a seguinte composição em mM: NaCl=136; KCl=5,0; MgCl<sub>2</sub>=0,98; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=0,36; NaHCO<sub>3</sub>=11,9; CaCl<sub>2</sub>=2,0 e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>=5,5. A solução nutritiva foi mantida com aeração constante, à

temperatura de  $32^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  (útero ver em CARREIRO et al., 2017) e  $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  (aorta e íleo) e o pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH 1M.

O ácido cafeico e a rutina foram diluído em água destilada em uma solução hipertônica de 0,1 M, da qual foram retiradas concentrações de 0,2-7 mM (para íleo e aorta) e 0,03 - 7,0 mM (para útero), administradas de maneira cumulativa nas cubetas de banho de órgãos com capacidade de 10 mL.

As administrações do ácido cafeico e rutina foram realizadas de modo hipertônica, dos quais foram administrados volumes específicos diretamente nas câmaras do banho de órgãos para atingir as concentrações finais desejadas nas câmaras do banho.

### 5.1.3 Animais experimentais

Os animais utilizados para o experimento (*Rattus norvegicus*) foram de ambos os sexos. Alguns parâmetros sofreram mudanças de acordo com o órgão. A massa corpórea variou entre 180-250 gramas – para os experimentos de musculatura lisa uterina e vascular – e 250-350 gramas – para os animais que foram utilizados nos experimentos com músculo liso intestinal (íleo) (MONTEIRO, 2009).

Os animais foram provenientes do Biotério de Contenção Central da Universidade Regional do Cariri-URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de  $23 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , em ciclo claro/escuro de doze horas, e mantidos com acesso a água e ração, “*ad libitum*”. Os animais foram tratados seguindo as recomendações de manuseio bioético do Guia Internacional de Princípios para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, Suíça, e do livro “Princípios éticos na experimentação animal” do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil. Cada animal foi utilizado para a dissecação de um órgão estudado, haja vista a indisponibilidade de equipamento para reutilização do mesmo animal em outro experimento. A amostragem utilizada para os experimentos foi de seis (n=6) animais para cada protocolo.

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri – CEUA-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00147/2017.2. A pesquisa realizada é de cunho experimental randomizada e quantitativa. Modelos animais foram os veículos para a aquisição de informações relativas à ação farmacológica das substâncias examinadas.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Preparação do tecido

Todos os órgãos depois de feita a dissecação e conseguinte limpeza (ver itens seguintes 4.2.1.1 – 4.2.1.3) limpeza e foram montados em banho de órgãos isolados com capacidade de 10 mL em meio a solução nutritora Tyrode modificado à uma temperatura de 37°C (aorta e íleo) e 32 °C (útero). Para estabilização das preparações, estas foram mantidas em repouso por  $\pm$  40 minutos à 1 hora antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g.

O tecido muscular utilizado dos diferentes órgãos (aorta, útero e íleo) obedeceu a metodologia padrão quanto ao pH utilizado, o qual foi de 7,4, ao meio nutritivo utilizado o qual foi o Tyrode modificado. As sucessivas lavagens durante o período de estabilização foram realizadas em intervalos de 15 min.

Após o período de estabilização, em todos os órgãos foram evocadas duas curvas do tipo concentração-resposta com KCl (60 mM), com intervalos de lavagem entre elas. A terceira curva foi evocada com diferentes agentes contracturantes de acordo com a via e o órgão a ser trabalhado.

#### 5.2.1.1 Preparação da musculatura lisa vascular

Os animais utilizados foram eutanasiados por decapitação ou por câmara de CO<sub>2</sub>. Posteriormente foi promovida a abertura da face ventral do tórax, seguida da remoção do coração e pulmões para exposição da artéria aorta. A aorta foi, então, removida e colocada numa placa de Petri contendo Tyrode, para o manuseio do órgão e consequente limpeza com a retirada dos tecidos anexos. Consequentemente realizou-se a secção de segmentos transversos circulares de 4-5 mm de comprimento, os quais foram montados em banho de órgãos.

#### 5.2.1.2 Preparação da musculatura lisa uterina

Os animais utilizados para experimentos da musculatura lisa uterina foram tratados, 24h:00min antes do início dos experimentos, com Dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Como descrito anteriormente a variação do período hormonal influi em alteração celular do endométrio bem como altera a probabilidade de resposta a determinadas moléculas. No estro, fase identificada pela administração do Dietilestilbestrol encontra-se células epiteliais



queratinizadas essa fase está relacionada ao período reprodutivo e dura cerca de 21 horas. A utilização de Dietilestilbestrol facilita à identificação do estro e evita a necessidade de fazer o esfregaço do lavado vaginal.

Decorrido as 24h:00min, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Após a abertura da cavidade abdominal, foi feita a dissecação do útero, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Tyrode modificado. Em seguida, os dois cornos uterinos foram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro em banho de órgãos isolado.

### 5.2.1.3 Preparação da musculatura lisa intestinal

Nos experimentos da musculatura lisa intestinal, os animais passaram por períodos de jejum de 11 horas antecedentes ao procedimento. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>, posteriormente a cavidade abdominal foi aberta e conseguintemente, foi feita a dissecação do íleo, colocando-o em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Tyrode modificado. Em seguida, foi realizada a limpeza do órgão com retirada dos tecidos anexos e posterior lavagem com Tyrode, e retirada do material interno com auxílio de acesso venosos, e seringa de 10 mL, conseguintemente segmentos de 2-3 cm do íleo foram seccionados e suspensos (com auxílio de linhas) verticalmente em cubas de vidro em banho de órgão isolado.

## 5.2.2 Medida da resposta mecânica do músculo liso

As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas através de uma haste conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), e este a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), com entrada para uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA) (Figura 8).

**Figura 8** – Imagem ilustrativa do equipamento utilizado para medir a resposta mecânica do músculo liso.



**01:** Banho de órgão isolado com capacidade de 10 mL (acondiciona o tecido nas condições fisiológicas ideais para o desenvolvimento do experimento); **02:** amplificador do sinal (converte o sinal analógico em sinal digital); **03:** computador- responsável por receber os dados coletados em traçados digitais e armazená-los em arquivos através do software WINDAQ.

**Fonte:** Silva, 2017.

### 5.2.3 Protocolos experimentais

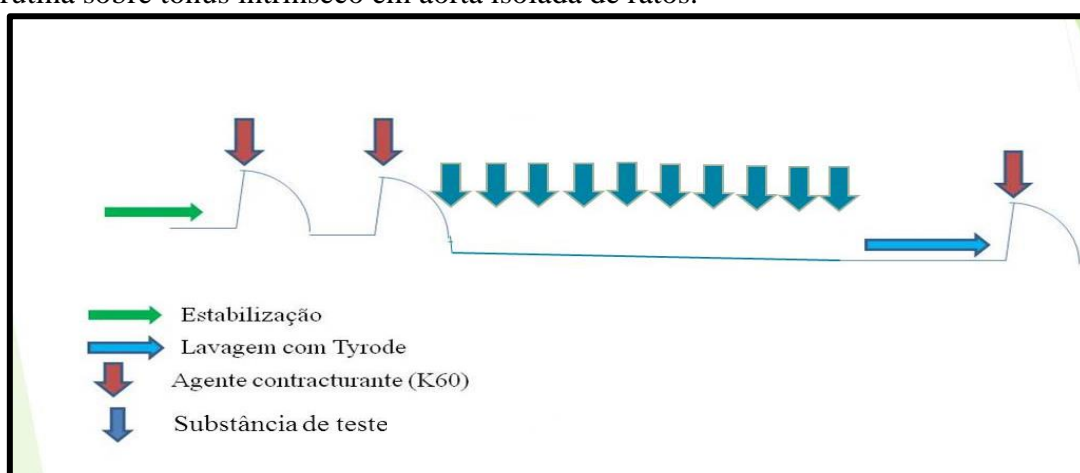
Decorrido o tempo de estabilização todos os protocolos iniciaram com duas contrações subsequentes, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60), de modo hipertônico, administrados nas preparações do tecido com intervalo de lavagem entre elas. Esta manobra teve a finalidade de avaliar a viabilidade da preparação e a capacidade contrátil do órgão isolado. Após a contração induzida pelo K60 atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima da tira ou anel. Apenas os experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para as séries experimentais.

Todos os experimentos foram realizados com a existência de uma preparação controle experimental, a qual foi submetida às mesmas situações e aos mesmos protocolos experimentais. As preparações controle receberam somente a solução de Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais. Mostrando assim que a contração se mantém até o final do experimento.

### 5.2.3.1 Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina sobre o tônus intrínseco da aorta isolada de rato.

Com a finalidade de avaliar os efeitos do ácido cafeico e rutina sobre o tônus muscular espontâneo da aorta em presença do endotélio, foram administradas concentrações crescentes e cumulativas do ácido cafeico e rutina (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,5; 7,0 mM) ao banho de órgão isolado (Figura 9).

**Figura 9** – Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do ácido cafeico e rutina sobre tônus intrínseco em aorta isolada de ratos.



Na imagem estão ilustrados os eventos realizados para avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina sob tônus intrínseco de aorta. A viabilidade realizou-se pelas administrações do agente contracturante, o cloreto de potássio (**K60**), e das lavagens com a solução nutritiva **tyrode**, conseguinte da administração das substâncias teste (ácido cafeico e rutina) na presença do tônus basal do vaso. Ao final do experimento foi realizada a reversão com o **tyrode** e administração de **K60**.

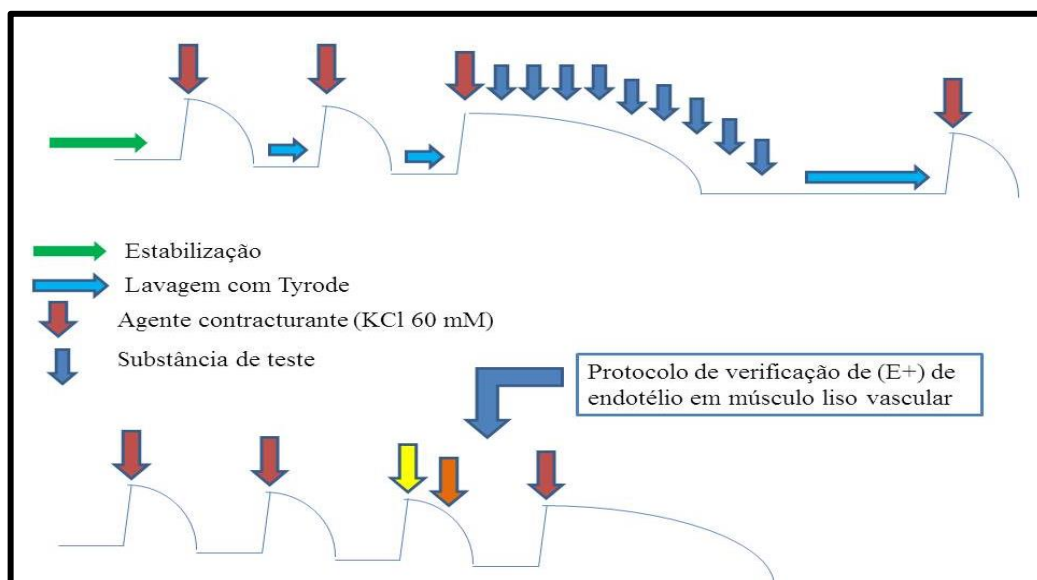
**Fonte:** Silva, 2017.

### 5.2.3.2 Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico da contração evocadas por KCl (60 mM) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos.

Para avaliar o efeito relaxante, foram administradas doses crescentes e cumulativas do ácido cafeico e rutina (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,5; 7,0 mM para aorta e íleo e 0,03; 0,12; 0,27; 0,54; 1,14; 2,0; 3,0; 4,20; 5,40 e 7,0 mM para útero) após a exposição da aorta, útero e íleo a concentrações submáximas, KCl (60 mM) (Figura 10). Em tecido vascular a presença de endotélio foi verificada pela adição de ACh (10  $\mu$ M) em preparações já incubadas com FE (0,1

$\mu\text{M}$ ), a resposta relaxante nesse processo foi interpretada como indicativo de presença de endotélio

**Figura 10** – Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em aorta, útero e íleo isolados de ratos.



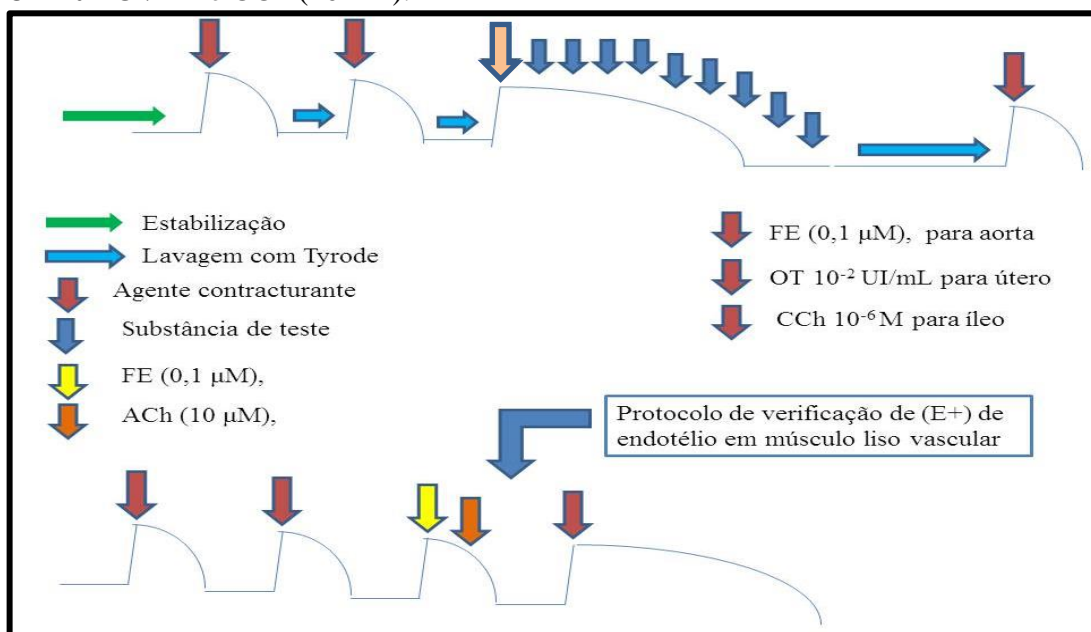
Na imagem estão ilustrados os eventos realizados para avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina sob contrações evocadas por cloreto de potássio (**K60**), de aorta, útero e íleo de ratos. A viabilidade realizou-se pelas administrações (**K60**) e das lavagens com a solução nutritora **tyrode**, conseguinte da administração das substâncias teste (ácido cafeico e rutina) na presença do (**K60**). Ao final do experimento foi realizada a reversão com o **tyrode** e administração de **K60**. Para a verificação da integridade do endotélio (**E+**) em aorta administrou-se a acetilcolina (**ACh**) e a fenilefrina (**FE**).

**Fonte:** Silva, 2017.

5.2.3.3 Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, FE (0,1  $\mu\text{M}$ ), OT  $10^{-2}$  UI/mL, e CCh ( $10^{-6}$  M) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo, respectivamente, isolados de ratos.

Para avaliar o efeito relaxante do ácido cafeico e rutina, foram administradas doses crescentes e cumulativas do ácido cafeico e rutina (0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,5; 7,0 mM aorta e íleo e 0,03; 0,12; 0,27; 0,54; 1,14; 2,0; 3,0; 4,20; 5,40 e 7,0 mM para útero) após a exposição da aorta útero e íleo a concentrações submáximas dos diferentes agentes contracturantes, FE (0,1  $\mu\text{M}$ ), em aorta na presença e ausência de endotélio (descrito no item 5.2.3.2), OT  $10^{-2}$  UI/mL em útero e CCh ( $10^{-6}$  M) em íleo (Figura 11).

**Figura 11** – Esquema ilustrativo dos eventos realizados no protocolo de avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por diferentes agentes contracturantes FE (0,1  $\mu\text{M}$ ), OT  $10^{-2}$  UI/mL e CCh ( $10^{-6}$  M).



Na imagem estão ilustrados os eventos realizados para avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por diferentes agonistas contracturantes. Para aorta utilizou-se a fenilefrina (FE), para útero utilizou-se a ocitocina (OT) e para íleo utilizou-se o carbacol (CCh) de ratos. A viabilidade realizou-se pelas administrações de cloreto de potássio (K60) e pelas lavagens com a solução nutritora tyrode. Ao final do experimento foi realizada a reversão com o tyrode e administração de K60. Para a verificação da integridade do endotélio (E+) em aorta administrou-se a acetilcolina (ACh) e a fenilefrina (FE).

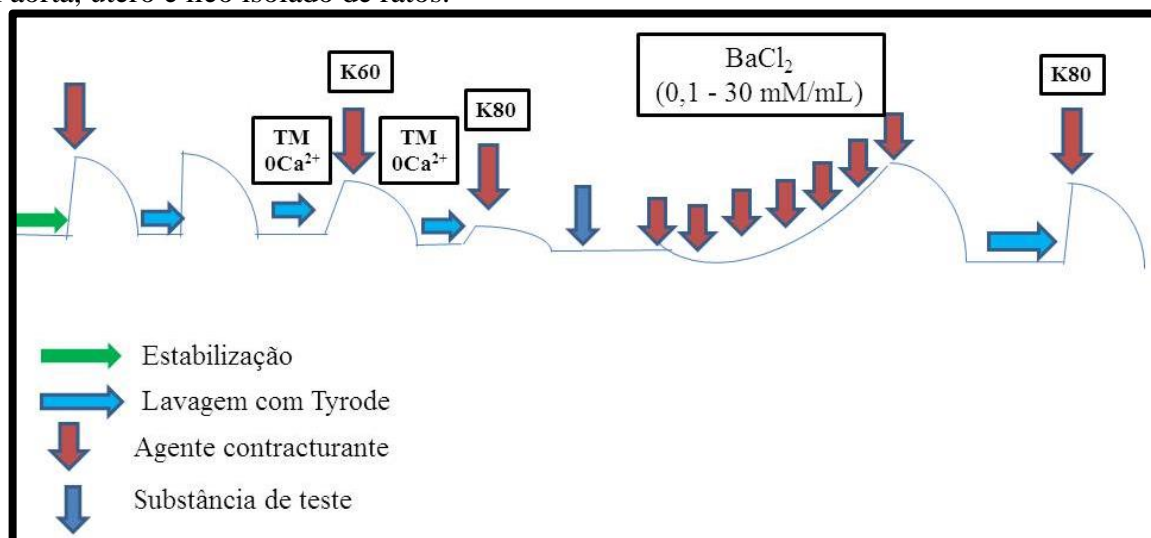
**Fonte:** Silva, 2017.

#### 5.2.3.4 Avaliação do envolvimento de receptores serotoninérgicos e colinérgicos no efeito do ácido cafeico em útero e íleo isolado de ratos na presença de ACh (10 $\mu\text{M}$ ) e 5-HT (10 $\mu\text{M}$ ).

Buscando avaliar o envolvimento dos canais colinérgicos e serotoninérgicos no efeito do ácido cafeico em tecido miométrial e intestinal de ratos foram evocadas contrações na presença de ACh (10  $\mu\text{M}$ ), e 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ), em útero e íleo sobre as quais foram administradas concentração máxima de 7 mM/mL, do ácido cafeico buscando avaliar o possível efeito bloqueador desse composto na presença dos agentes contracturantes citados (Figura 12).



**Figura 13** – Avaliação do envolvimento do efeito do ácido cafeico com os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L em aorta, útero e íleo isolado de ratos.



Na imagem estão ilustrados os eventos realizados para avaliar o envolvimento do ácido cafeico com os canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), utilizando o agonista contracturante cloreto de bário (**BaCl<sub>2</sub>**) em aorta, útero e íleo de ratos. A viabilidade realizou-se pelas administrações de cloreto de potássio (**K60 e K80**) e pelas lavagens com a solução nutritora **tyrode**. Para a lavagem que antecede a administração da substância teste utilizou-se uma solução nutritora isenta de (**TM  $0\text{Ca}^{2+}$** ). Ao final do experimento foi realizado a reversão com o **tyrode** e administração de **K80**.

**Fonte:** Silva, 2017.

#### 5.2.4 Análise Estatística

Os resultados dos dados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n), onde n representa o número de experimentos e E.P.M. é o erro padrão da média, e foram considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ). As  $\text{IC}_{50}$  foram calculadas por interpolação semilogarítmica e ajuste sigmóide, sendo consideradas neste trabalho como a concentração da substância que foi capaz de produzir 50% do efeito inibitório máximo. Os gráficos foram produzidos através do *software Sigma Plot 11.0* para análise estatística. Para comparação de dois grupos foi realizado o *teste t* pareado ou não pareado; para mais de dois grupos experimentais, ANOVA seguido de técnica de contraste (testes paramétricos ou não paramétricos), conforme apropriado.

## ***Resultados e Discussão***

---



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ARTIGO

#### EFEITO MIORRELAXANTE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO E RUTINA EM MUSCULATURA LISA DE AORTA, ÚTERO E ÍLEO DE RATOS WISTAR.

SILVA, A.A.<sup>1</sup>; MORAIS, L.P.<sup>1</sup>; SILVA, R.E.R.<sup>1</sup>; AMORIM, T. S.<sup>1</sup>; PEREIRA, N.A.<sup>1</sup>; SENA, C.M.<sup>1</sup>; KERNTOPF, M. R.<sup>2</sup>; MENEZES, I.R.A.<sup>3</sup>; BARBOSA, R<sup>1\*</sup>.

#### RESUMO

O estudo se propôs investigar comparativamente o efeito farmacológico do ácido cafeico e rutina em musculatura lisa de aorta, íleo e útero isolados de ratos Wistar. Foram utilizados animais de ambos os sexos, para os experimentos com aorta, útero e íleo isolados de ratos. Os órgãos foram mantidos em meio a solução nutritora Tyrode modificado à 37 °C (aorta e íleo) e 32 °C (útero) com pH ajustado de 7.4 e montados em banho de órgãos para registro isométrico das contrações musculares. Observou-se para o ácido cafeico um efeito miorelaxante de forma dependente da concentração (0,2 - 7,0 mM/mL aorta e íleo e 0,03 - 7,0 mM/mL útero) em preparações de aorta E- (IC<sub>50</sub>: 3,52 ± 0,9 mM/mL) e na E+ (IC<sub>50</sub> 3,54 ± 0,5 mM/mL) de endotélio vascular, preparações de útero (IC<sub>50</sub>: 5,2 ± 0,5 mM/mL) e de íleo (IC<sub>50</sub>: 1,98 ± 0,1 mM/mL) sobre as contrações evocadas por KCl (60 mM). Também foi verificado relaxamento promovido pelo ácido cafeico para todos os órgãos em presença de diferentes agentes contracturantes: aorta (FE 0,1 μM) na E- (IC<sub>50</sub>: 2,41 ± 0,2 mM/mL) e E+ (IC<sub>50</sub>: 1,54 ± 0,1 mM/mL) de endotélio, em útero (OT 10<sup>-2</sup> UI/mL) com IC<sub>50</sub>: 2,48 ± 0,6 mM/mL e em íleo (CCh 10<sup>-6</sup> M) com IC<sub>50</sub>: 1,66 ± 0,28 mM/mL. Na presença de ACh e 5-HT (10 μM) verificou-se o efeito inibitório do ácido cafeico em útero bem como em íleo na presença da ACh (10 μM). O ácido cafeico inibiu parcialmente os canais de Ca<sup>2+</sup> na presença de contrações induzidas pelo Ba<sup>2+</sup> (0,1-30 mM). A rutina não apresentou efeito miorelaxante. O ácido cafeico apresenta para tanto promissor efeito clínico e potência em vias farmacológicas sendo necessárias futuras investigações para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito do ácido cafeico.

**Palavras chave:** compostos fenólicos – ácido cafeico – rutina – musculo liso.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the pharmacological effect of caffeic acid and rutin on smooth muscle of the aorta, ileum and uterus isolated from Wistar rats. Animals of both sexes were used for the aorta, uterus and ileum experiments isolated from rats. The organs were maintained in a Tyrode's modified nutrient solution, at 37 ° C (aorta and ileum) and 32 ° C (uterus) at a pH adjusted to 7.4 and fitted in an organ bath for isometric recording of muscle contractions. A concentration-dependent myorelaxing effect (0,2 - 7,0 mM/mL aorta and ileum e 0,03 - 7,0 mM/mL uterus) was observed for caffeic acid in preparations of aorta E- (IC<sub>50</sub>: 3,52 ± 0,9 mM/mL) and E+ (IC<sub>50</sub> 3,54 ± 0,5mM/mL) of vascular endothelium, uterus preparations (IC<sub>50</sub>: 5,2 ± 0,5 mM/mL) and ileum (IC<sub>50</sub>: 1,98 ± 0,1 mM/mL) on KCl-evoked contractions (60 mM). In the presence of different agents: aorta (0.1 μM EF) at E- (IC<sub>50</sub>: 2,41 ± 0,2 mM/mL) and E+ (IC<sub>50</sub>: 1,54 ± 0,1 mM/mL) of endothelium, in uterus (OT 10<sup>-2</sup> UI/mL) with IC<sub>50</sub>: 2,48 ± 0,6 mM/mL and in ileum (CCh 10<sup>-6</sup> M) with IC<sub>50</sub>: 1,66 ± 0,28 mM/mL. In the presence of ACh and 5-HT (10 μM), the inhibitory effect of caffeic acid in utero as well as ileum, was observed in the presence of ACh (10 μM). The caffeic acid partially inhibited Ca<sup>2+</sup> channels in the presence of Ba<sup>2+</sup> (0.1-30 mM) induced contractions. The rutin, on the other hand, did not present a myorelaxant effect. Caffeic acid has a promising clinical effect and potency in pharmacological pathways and future research is needed to better understand the mechanisms involved in the caffeic acid effect.

**Key words:** phenolic compounds - caffeic acid - rutin - smooth muscle.

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais possuem metabólitos secundários que são produtos de origem vegetal que auxiliam nos processos de defesa e tem papel fundamental em muitos processos metabólicos da planta (WURTELE et al., 2012). Sabe-se que, dentre os metabólitos secundários estão os compostos fenólicos que podem estar presente na forma livre ou ligada a açúcares e proteínas (SOARES, 2002) à exemplo temos o ácido cafeíco e rutina.

O ácido cafeíco (Ácido 3,4-dihidroxibenzenoacrílico) é um composto fenólico classificado como um ácido cinâmico largamente encontrado na natureza, é produzido pelo metabolismo secundário das plantas e frequentemente encontrado no café, pêra, maçã, uva, entre outros (SHI et al., 2003; SOARES, 2002), é facilmente ingerido na dieta, no entanto sua

absorção e metabolização bem como seus efeitos bioativos não são bastante estudados (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Uma variedade de estudos já demonstraram propriedades farmacológicas para o ácido cafeíco, muito embora algumas destas estejam relacionadas ao seu derivado éster fenetil do ácido cafeíco, tais como atividade antioxidante (AMORATI et al., 2006; GÜLÇIN, 2006), antimicrobiana (MATEJCZYK et al., 2017) anti-inflamatória, anticancerígena (MATEJCZYK et al., 2017), antiasmática (CORRÊA; DE MELO; COSTA, 2008; MA et al., 2016) e miorelaxante (AVIELLO et al., 2010; FUKUDA et al., 2015).

A rutina (3, 3', 4', 5, 7 -pentahidroxi-flavona-3-rhamnoglucósido), também é um composto fenólico, sendo quimicamente definido como um glicosídeo. É encontrada abundantemente na natureza em vegetais como: trigo mourisco, chá e maçã sendo considerado um componente nutricional vital nos alimentos. Estudos farmacológicos atribuem para a rutina atividades como: antioxidante (DA SILVA OLIVEIRA, 2015), cardioprotetora (ALI; MUDAGAL; GOLI, 2009). Além disso, também foi demonstrado em um trabalho recente (FUENTES; CÉSPEDES; SEPULVEDA, 2015), que a rutina evita a disfunção endotelial, quando esse tecido é exposto ao estresse oxidativo.

A atividade miorelaxante dos produtos naturais é de grande interesse clínico, uma vez que o tecido muscular liso ocupa papel importante no funcionamento e homeostase de muitos órgãos. Processos patológicos cuja alteração da contração da musculatura lisa está envolvida tais como: a hipertensão arterial, asma brônquica, a disfunção erétil, complicações durante o parto e a diarreia, possui grande interesse de estudo, devido as implicações desencadeadas nestes processos que alteram a homeostase do organismo. Por não haver relatos específicos da ação do ácido cafeíco e da rutina em músculo liso de aorta, íleo e útero, assim como dos mecanismos envolvidos na atividade miorelaxante dos compostos em músculo liso. O presente trabalho propõe investigar o efeito dos compostos fenólicos: ácido cafeíco e rutina em musculatura lisa de aorta, íleo e útero isolados de ratos Wistar.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Soluções e drogas**

A solução fisiológica utilizada de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) apresenta a seguinte composição em mM: 136,0 NaCl; 5,0 KCl; 0,98 MgCl<sub>2</sub>; 0,36 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 11,9 NaHCO<sub>3</sub>; 2,0 CaCl<sub>2</sub> e 5,5 Glicose, mantida à temperatura de 32° C (para experimentos com útero) e 37° C (para experimentos com aorta e íleo) e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH (1M). O ácido cafeíco e a rutina foram preparados na forma de solução mãe de 0,1

M, diluídos em água destilada, a nifedipina foi diluída em etanol, e os demais fármacos e seus estoques foram diluídos em água destilada. A solução de Tyrode isenta de cálcio ou “zero cálcio” ( $0\text{Ca}^{2+}$ ) foi produzida com a omissão do  $\text{CaCl}_2$  e adição de 0,2 mM de EGTA. Todos os sais e reagentes utilizados foram de grau e pureza analítica, obtidos da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

### **Animais**

Foram utilizados ratos, de ambos os sexos, Wistar (*Rattus norvegicus*) com massa corpórea entre 180-350 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri- URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ , em ciclo claro/escuro de doze horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, tratados de acordo-Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil. Aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00158/2015.2.

### **Preparação para isolamento do tecido**

Os órgãos utilizados foram, aorta, útero e íleo. Os animais utilizados nos experimentos com músculo liso vascular foram eutanasiados por decapitação com intuito de manter a integridade vascular. O material vascular foi obtido após uma incisura torácica e consequente dissecação da aorta torácica do animal, a qual, depois de retirada os tecidos anexos, foi seccionada em anéis de 3-4 cm de comprimento.

Na preparação dos animais utilizados em experimentos com musculatura lisa uterina os mesmos foram tratados 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol, hormônio (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, as ratas foram eutanasiadas em câmara de  $\text{CO}_2$ . Conseqüentemente realizou-se a abertura da cavidade abdominal, com posterior dissecação do útero e separação dos cornos uterinos medindo entre 1,5-2 cm de comprimento, que em seguida foram abertos longitudinalmente.

Os animais utilizados para musculatura lisa intestinal tiveram massa corpórea superior aos demais animais ( $> 300\text{g}$ ) e foram mantidos em jejum em 12 horas que antecedeu os experimentos. Decorrido o tempo os ratos foram eutanasiados em câmara de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente fora realizada a abertura da cavidade abdominal conseqüentemente a dissecação da porção ileal do intestino, a qual foi seccionada em segmentos de 2-3 cm de comprimento sendo suspensas verticalmente, com auxílio de linha de algodão, em banho de órgãos.

Ambos os órgãos foram mantidos em câmara de banho de órgãos isolado com capacidade para 10 mL em meio a solução nutritiva Tyrode, sob contínua aeração por borbulhamento de ar, temperatura de 32°C (útero) e 37° (aorta e íleo) e pH 7,4.

As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas através de uma haste conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), e este a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), com entrada para uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA).

Para estabilização da preparação, o tecido foi mantido em repouso por  $\pm 1$  hora sob tensão de 1g. Todos os protocolos iniciaram com duas contrações subsequentes, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60), de modo hipertônico nas tiras miométrias estudadas, e após atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do tecido. Apenas os experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para as séries experimentais.

Todos os experimentos foram realizados sempre com a existência de uma preparação controle e experimental, a qual foi submetida às mesmas situações e aos mesmos protocolos experimentais. As preparações controle receberam somente o Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais.

### **Análise estatística**

Os dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. Para análises estatísticas e produção dos gráficos utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Os resultados considerados estatisticamente significantes apresentaram probabilidade de hipótese nula menor que 5% ( $p < 0,05$ ). Foram utilizados os testes t de Student e análise de variância (one ou two-way ANOVA) seguidas do teste de t de Bonferroni e método Holm-Sidak de comparações múltiplas, quando apropriado. Para cálculo da  $IC_{50}$  foi realizado interpolação logarítmica, sendo considerado como a concentração da substância a qual é capaz de produzir 50% da sua inibição ou do seu efeito máximo, sendo os cálculos realizados para cada experimento, e quando não possível foi realizado a relação linear entre dois pontos da  $IC_{50}$ .

## RESULTADOS

### Avaliação do efeito do ácido cafeíco e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico da contração evocadas por KCl (60 mM) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos.

Nos resultados obtidos observou-se que o ácido cafeíco e a rutina, exceto na última concentração, não alteraram o tônus vascular em preparações exposta a concentrações cumulativas (0,2 - 7 mM/mL) deste composto. Verifica-se que o ácido cafeíco promove um relaxamento na musculatura lisa de aorta, útero e íleo em contrações evocada pelo KCl (60 mM), o efeito obtido é concentração-dependente (0,2 - 7 mM/mL para aorta e íleo e 0,03 - 7 mM/mL para útero), os valores da concentração responsável por desencadear o relaxamento em valores de 50% do valor total de contração estão organizados na tabela 1.

A Rutina diferentemente do ácido cafeíco não promoveu um relaxamento total da musculatura lisa em contrações induzidas por KCl (60 mM), observou-se apenas uma redução parcial da contração, na concentração de 7 mM/mL. Concentrações superiores a essas não foram avaliadas.

**Tabela 1:** Valores da concentração do ácido cafeíco capaz de desencadear 50% da resposta relaxante (IC<sub>50</sub>) nos diferentes órgãos estudados (aorta, útero e íleo) na presença de diferentes agentes contracturantes (AC).

Órgãos	AC	Acoplamento eletromecânico	AC	Acoplamento farmacomecânico
Aorta	KCl (60 mM)	(E-) 3,5 ± 0,9 mM/mL	FE (0,1 µM)	(E-) 2,4 ± 0,2 mM/ MI
	KCl (60 mM)	(E+) 3,5 ± 0,5 mM/mL	FE (0,1 µM)	(E+) 1,5 ± 0,1 mM/MI
Útero	KCl (60 mM)	5,2 ± 0,5 mM/mL	OT (10 <sup>-2</sup> UI/mL)	2,4 ± 0,6 mM/mL
Íleo	KCl (60 mM)	1,9 ± 0,1 mM/mL	CCh (10 <sup>-6</sup> M)	1,6 ± 0,2 mM/MI

Na tabela estão listadas as IC<sub>50</sub> do ácido cafeíco nos diferentes órgãos e os agentes contracturantes (AC) utilizados para avaliação do envolvimento do composto fenólico sobre o acoplamento eletromecânico (cloreto de potássio **KCl** 60 mM) e farmacomecânico (Fenilefrina **FE** 0,1 µM em aorta; ocitocina **OT** 10<sup>-2</sup> UI/mL em útero; e carbacol **CCh** 10<sup>-6</sup> M em íleo). O efeito do ácido cafeíco em tecido vascular está descrito quanto a ausência (**E-**) e presença (**E+**) de endotélio vascular.

Nesse trabalho também avaliou-se o efeito do ácido cafeíco sobre o musculatura lisa da aorta na presença e na ausência do endotélio, uma vez que este libera mediadores que promovem o relaxamento da musculatura lisa, como prostaglandina, óxido nítrico e endotelina. Verificou-

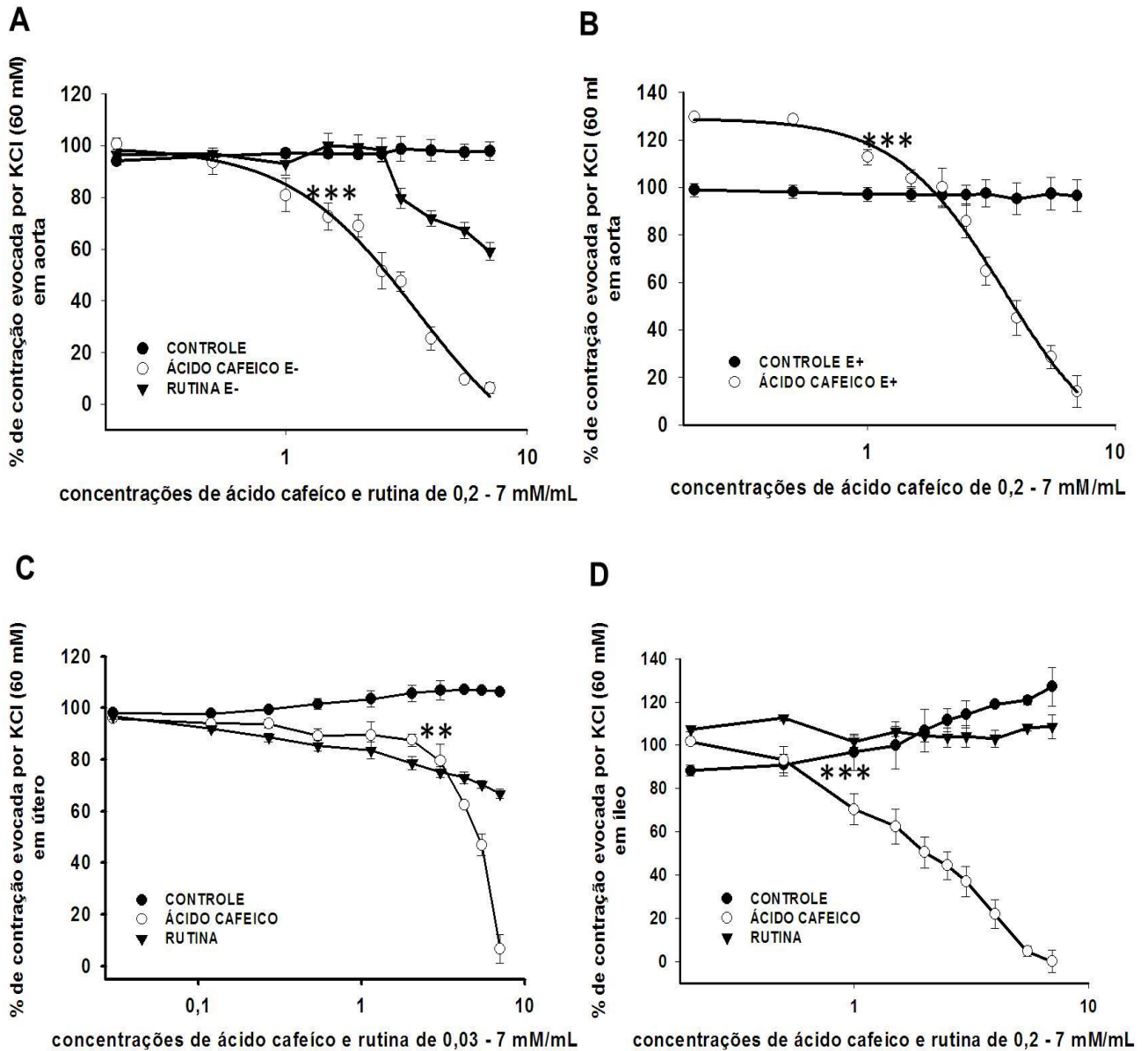
se que concentrações de 0,2 - 7,0 mM em preparações de tecido vascular na ausência ( $E^-$ ) e presença ( $E^+$ ) de endotélio o ácido cafeíco foi capaz de alterar significativamente a contração evocada pelo agonista  $K^+$  (KCl 60 mM). Observa-se que as concentrações utilizadas promoveram relaxamento em torno de  $93,7 \pm 2,1$  e  $93,3 \pm 5,5$  % ( $E^-$  e  $E^+$  respectivamente) da musculatura lisa vascular, sendo estatisticamente significativa a partir da concentração de 1,5 mM/mL ( $p < 0,001$  *one way ANOVA*). Entretanto observa-se que não houve diferença estatística quando se compara as  $IC_{50}$  (ver tabela 1). Demonstrando assim, que os mediadores liberados pelo endotélio não participa do relaxamento da musculatura lisa da aorta, (Figura: 1A  $E^-$  e 1B  $E^+$ ).

A rutina (0,2 - 7,0 mM) em preparações de aorta sem endotélio pré-contraída com KCl 60 mM foi capaz de reduzir a contração para valores de:  $64,3 \pm 3,4$  %, não obtendo relaxamento total do tecido vascular ( $p < 0,05$  *one way ANOVA*) (Figura 1A).

Os valores de rutina evidenciam uma potência e uma eficácia farmacológica menor, comparada com o ácido cafeíco. Esses resultados demonstram que não há necessidade da continuidade de investigações com a rutina, assim como o seu efeito e envolvimento com o endotélio vascular.

Nos resultados obtidos com tecido miometrial pré-contraído com KCl (60 mM) para o ácido cafeíco e rutina, observou-se que o ácido cafeíco (0,03 - 7,0 mM) foi capaz de produzir relaxamento de  $93,2 \pm 5,5$  % sobre as contrações evocadas por KCl (60 mM), com  $IC_{50}$ , como demonstrado na tabela 1, superior aos valores encontrados para demais órgãos estudados ( $p < 0,001$  *one way ANOVA*). Sendo estatisticamente significativa a partir da concentração de 3,0 mM ( $p < 0,05$  *one way ANOVA*) (Figura 1C). A rutina (0,03 - 7,0 mM) foi capaz de reduzir a contração em valores de  $33,1 \pm 1,7$  % mas não obteve relaxamento estatisticamente significativo, diferentemente do ácido cafeíco ( $p < 0,05$  *one way ANOVA*).

Nas preparações com musculatura lisa de íleo pré-contraída com KCl (60 mM) na presença do ácido cafeíco e da rutina, observa-se que o ácido cafeíco (0,2 - 7,0 mM) foi capaz de alterar significativamente a contração evocada pelo KCl (60 mM) ( $IC_{50}$  na tabela 1 com  $p < 0,001$  *one way ANOVA*), Verificou-se que as concentrações utilizadas promoveram relaxamento total da musculatura lisa intestinal, sendo estatisticamente significativa a partir de concentrações 1,0 mM ( $p < 0,001$  *one way ANOVA*) (Figura 1D). A rutina (0,2 - 7,0 mM) em íleo, diferentemente do ácido cafeíco, não foi capaz de reduzir a contração para valores estatisticamente significantes (Figura 1D), apesar de ter alterado para valores acima de 100% a contração total ( $p < 0,05$  *one way ANOVA*).



**Figura 1:** Efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico da contração evocadas por KCl (60 mM) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo isolado de ratos. **1A:** Concentração-resposta do ácido cafeico e da Rutina-sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em aorta isolado de ratos sem endotélio (E-); **1B:** Concentração-resposta do ácido cafeico sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em aorta isolado de ratos com endotélio (E+). **1C:** Concentração-resposta do ácido cafeico e da Rutina sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em útero isolado de ratas; **1D:** Concentração-resposta do efeito do ácido cafeico e rutina sobre contrações evocadas por KCl (60 mM) em íleo isolado de ratos. A amostragem experimental para todos os experimentos foi n=6. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.; ( $p < 0,05$ , *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).



**Efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, FE (0,1  $\mu$ M), OT  $10^{-2}$  UI/mL, CCh ( $10^{-6}$  M) sobre a musculatura lisa de aorta, útero e íleo, isolados de ratos.**

Para avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina nos parâmetros do acoplamento farmacomecânico de aorta útero e íleo, os órgãos foram expostos a FE (0,1  $\mu$ M) e OT  $10^{-2}$  UI/mL, e CCh ( $10^{-6}$  M) respectivamente. Em musculatura lisa de aorta e íleo o ácido cafeico e rutina foram administradas em concentrações crescentes e cumulativas de 0,2 - 7,0 mM/mL sobre contrações evocadas por FE (0,1  $\mu$ M) e CCh ( $10^{-6}$  M) respectivamente. As preparações de útero previamente contraídas por OT  $10^{-2}$  UI/mL foram expostas ao ácido cafeico e rutina em concentrações cumulativas de 0,03 - 7 mM/mL. Para cada agonista foi avaliado o efeito do ácido cafeico em experimentos distintos.

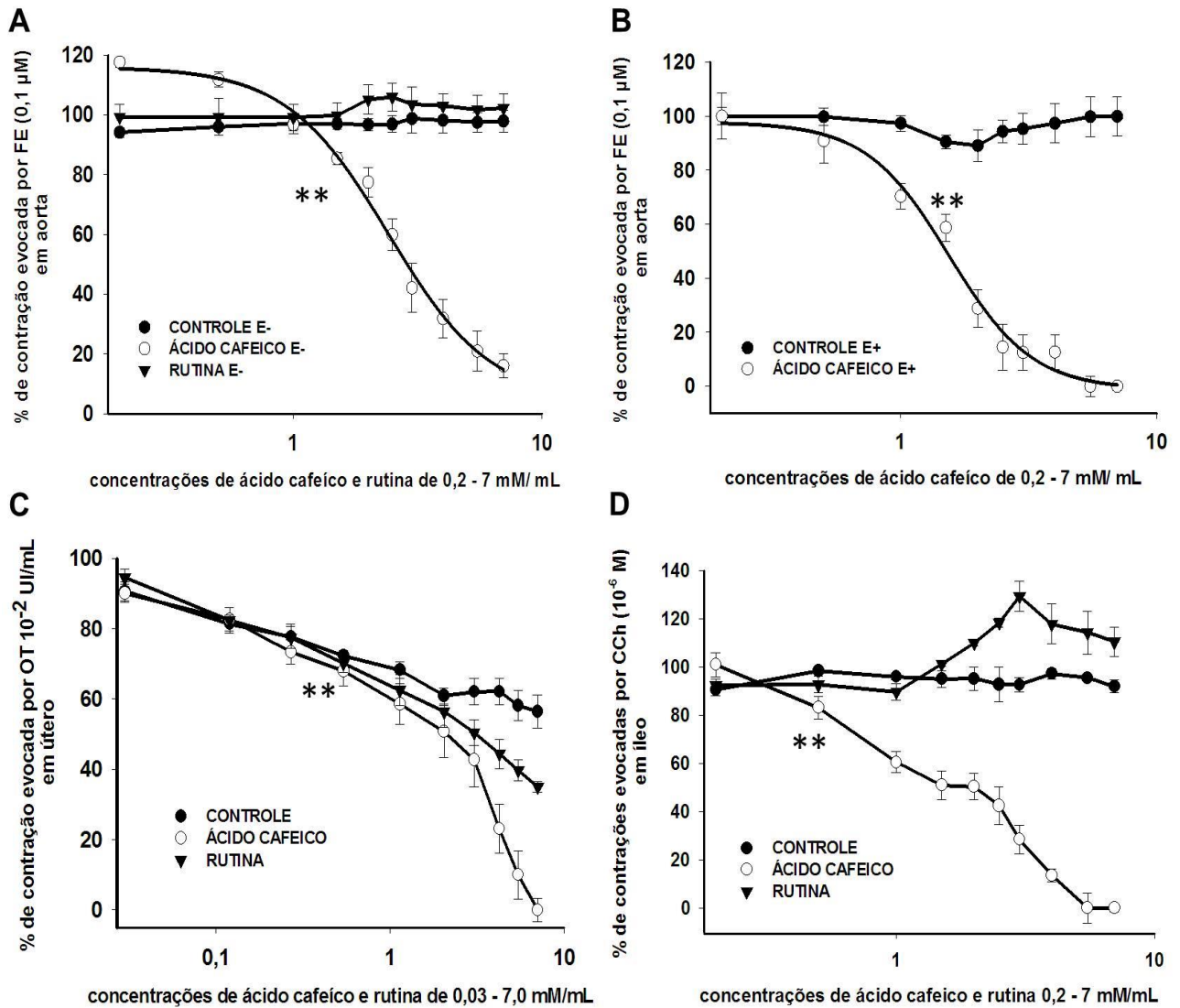
Para avaliar o efeito do ácido cafeico e rutina sobre a musculatura lisa de aorta na ausência (E-) e na presença (E+) do endotélio. Os anéis de aorta foram pré-contraídos com FE (0,1  $\mu$ M), e adicionado ácido cafeico (0,2 - 7,0 mM) e a rutina nas concentrações de 0,2 - 7,0 mM. O ácido cafeico (E-) foi capaz de alterar significativamente a contração, obtendo relaxamento  $83,98 \pm 4,0$  % (valores de  $IC_{50}$  verificar na tabela 1,  $p < 0,001$  *one way* ANOVA). Observa-se que a concentração com efeito relaxante estatisticamente significativa foi a partir de 1,5 mM/mL ( $p < 0,05$  *one way* ANOVA) (Figura 2A). A rutina por sua vez, não foi capaz de reduzir a contração para valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$  *one way* ANOVA) (Figura 2A).

Em presença de endotélio vascular o ácido cafeico apresentou efeito vasorrelaxante em valores de  $100 \pm 5,5$  % ( $p < 0,001$  *one way* ANOVA). Observa-se na figura 2B e tabela 1 que ao comparar a  $IC_{50}$  do ácido cafeico na (E+) de endotélio vascular sobre contrações evocadas por FE com a  $IC_{50}$  na (E-) de endotélio a potência farmacológica do ácido é maior na (E+) de endotélio por apresentar uma  $IC_{50}$  menor, no entanto ao se comparar com a concentração estatisticamente significativa, que foi de 1,5 mM/mL ( $p < 0,05$  *one way* ANOVA) para ambos observa-se que não houve diferença estatística quanto ao efeito do ácido cafeico (E<sup>+</sup>) e na (E-) de endotélio vascular.

Em preparações de tiras miométriais, o ácido cafeico nas concentrações avaliadas (0,03 - 7 mM), em presença de OT ( $10^{-2}$  UI/mL) foi capaz de desencadear relaxamento estatisticamente significativo correspondente a  $100 \pm 3,2$  % ( $IC_{50}$  na tabela 1). A concentração estatisticamente significativa correspondeu a 0,5 mM/mL ( $p < 0,05$  *one way* ANOVA). A rutina também foi capaz

de desencadear relaxamento em valores de  $64,95 \pm 1,5$  % ( $p < 0,001$  ANOVA), apesar de não ter demonstrado relaxamento total da musculatura uterina. Esse efeito pode está relacionado a rápida degradação da ocitocina como observado no controle.

Em músculo liso intestinal na presença de contrações evocadas por CCh ( $10^{-6}$  M) o ácido cafeico promoveu relaxamento em valores de  $100 \pm 1,6$ %, com uma concentração estatisticamente significante correspondente a 0,5 mM/mL, sendo está e a de útero a menor concentração estatisticamente significante encontrada, também é possível verificar, mediante o exposto na tabela 1, que a  $IC_{50}$  pode ser avaliada como uma das menores encontradas neste estudo o que leva a afirmar que o ácido cafeico apresenta uma potência farmacológica maior em fibras musculares intestinais quanto ao músculo liso vascular e uterino. A Rutina em presença de CCh ( $10^{-6}$  M), não foi capaz de desencadear resposta relaxante, no entanto ao verificar a figura 2D é observado leve deslocamento da curva de contração para valores que alteram o 100% da contração evocada pelo CCh.



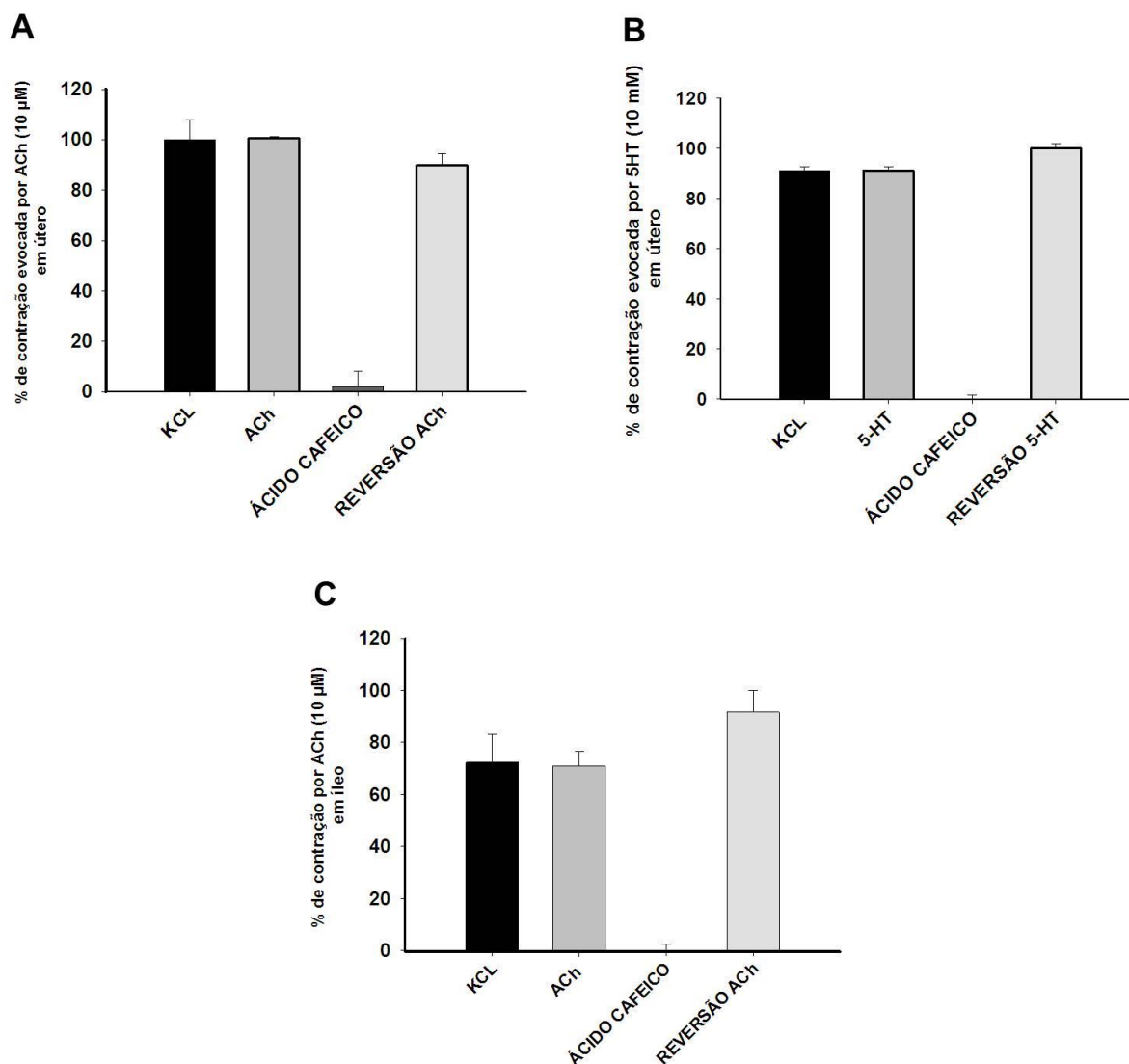
**Figura 2:** Avaliação do efeito do ácido cafeico e rutina, nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, FE (0,1  $\mu\text{M}$ ), OT  $10^{-2}$  UI/mL, ACh (10  $\mu\text{M}$ ) e 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ) em musculatura lisa de aorta, útero e íleo, isolados de ratos. **A:** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico e rutina em preparações de tecido vascular contraído com FE (0,1  $\mu\text{M}$ ) na E-; **B:** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico em preparações de tecido vascular contraído com FE (0,1  $\mu\text{M}$ ) na E+; **C:** Gráfico concentração-resposta de ácido cafeico e rutina em tecido miométrial na presença de OT  $10^{-2}$  UI/mL; **D:** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico e rutina na presença de contração evocada por CCh ( $10^{-6}$  M) em íleo de ratos. A amostragem experimental para todos os experimentos foi n=6. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.; ( $p < 0,05$ , *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

### **Efeito inibitório do ácido cafeico (7 mM) em receptores serotoninérgicos e colinérgicos em útero e íleo isolado de ratos na presença de ACh (10 $\mu$ M) e 5-HT (10 $\mu$ M).**

Algumas substâncias tais como a ACh e 5-HT apresentam rápida degradação. Neste estudo observou-se rápida degradação de ambas as substâncias motivo que nos fez optar por verificar efeito bloqueador do ácido cafeico em concentração máxima (7 mM) frente as contrações evocadas por ACh (10  $\mu$ M) e 5-HT (10  $\mu$ M). Esse protocolo experimental buscou avaliar o envolvimento do efeito relaxante do ácido cafeico com receptores colinérgicos e serotoninérgicos em útero e íleo.

O ácido cafeico (7 mM) em presença de ACh (10  $\mu$ M) e 5-HT (10  $\mu$ M), inibiu a contração miométrial  $97,8 \pm 6,1$  % e  $100 \pm 1,6$  % respectivamente ( $p < 0,001$ ) efeito observado na figura 3A e 3B respectivamente. Ao final de cada experimento realizou-se reversão com consecutivas lavagens e uma curva-resposta de contração evocada pelo agente contracturante utilizado inicialmente, demonstrando viabilidade do tecido posteriormente a exposição ao ácido cafeico.

Em musculatura lisa intestinal também foi possível observar efeito inibitório do ácido cafeico sobre contrações evocadas por ACh (10  $\mu$ M) em valores de 100% ( $p < 0,001$ ), efeito revertido ao final do experimento devido a lavagens consecutivas do tecido exposto tanto as condições de controle quanto a presença do ácido cafeico (Figura 3C).

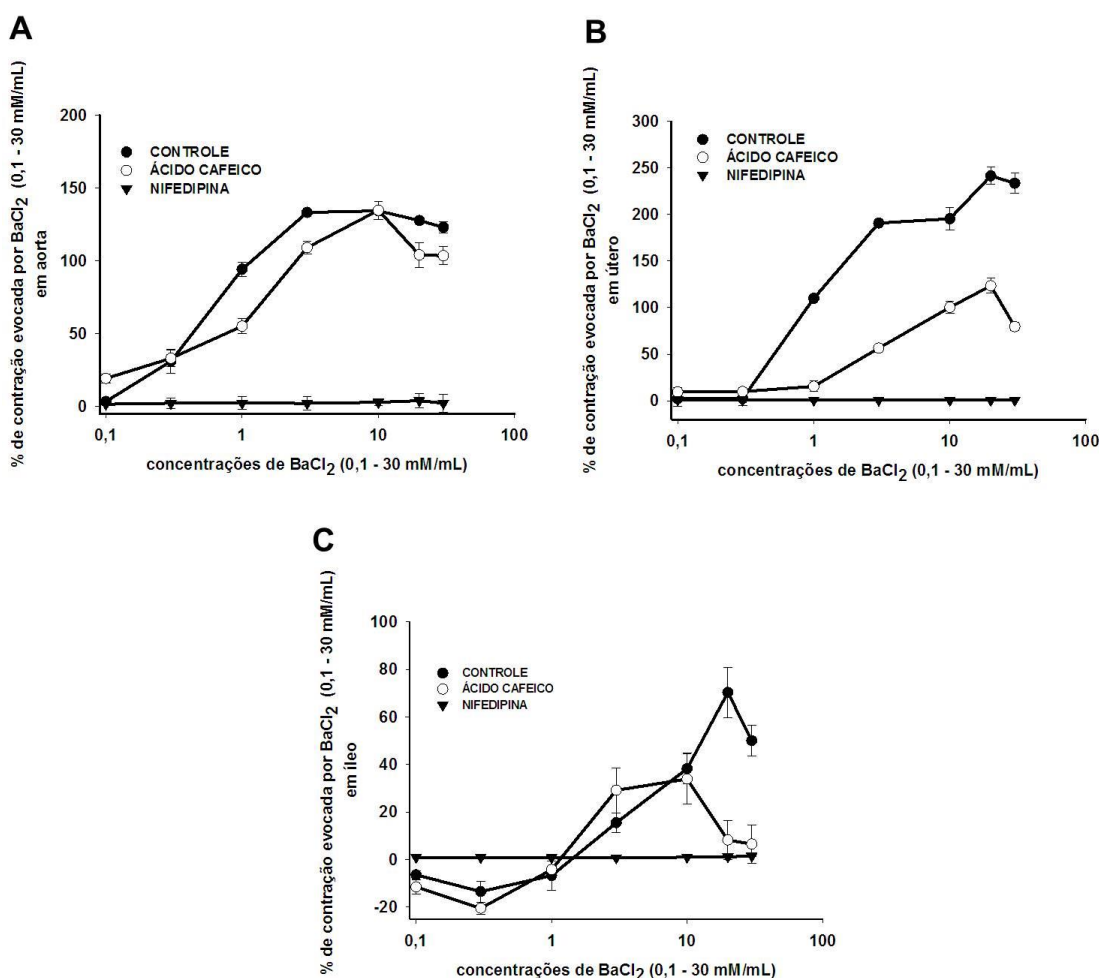


**Figura 3:** Efeito inibitório do ácido cafeico nos parâmetros contráteis do acoplamento farmacomecânico da contração evocada por diferentes agentes contracturantes, ACh (10 μM) e 5-HT (10 μM) sobre a musculatura lisa de útero e íleo, isolados de ratos. **A e B:** Gráfico do efeito inibitório do ácido cafeico sobre contrações evocadas por ACh 5-HT em útero isolados de ratos; **C:** Gráfico do efeito inibitório do ácido cafeico sobre contrações evocadas por ACh em íleo isolado de ratos. A amostragem experimental para todos os experimentos foi n=6. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. ( $p < 0,05$ , *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

### Efeito do envolvimento do ácido cafeico com os canais de $Ca^{2+}$ tipo L em aorta, útero e íleo isolado de ratos.

Ao avaliar o efeito inibitório do ácido cafeico (7 mM/mL) quando exposto à contrações induzidas pelo íon  $Ba^{2+}$  ( $BaCl_2$  0,1-30 mM/mL), nas preparações de anéis aórticos, tiras miométriais e intestinais, despolarizados por potássio (K80 mM) em solução livre de  $Ca^{2+}$ , observou-se que em todos os órgãos o ácido cafeico apresenta efeito que envolve parcialmente os canais de  $Ca^{2+}$  tipo L. O efeito parcial é devido o fato de mesmo sendo possível observar um relaxamento promovido pelo ácido cafeico em aorta, útero e íleo quando em resposta ao agente

contrátil  $\text{BaCl}_2$  (0,1-30 mM/mL), esses valores não igualaram-se a resposta das preparações controle ( $p < 0,001$  one way ANOVA, seguido de Holm-Sidak). O efeito inibitório parcial do ácido cafeico em canais de  $\text{Ca}^{2+}$  é mais evidente em tiras miometriais e intestinais, para os quais os valores de contração foram estatisticamente menores em relação ao controle, mesmo em presença de 30 mM de  $\text{BaCl}_2$ :  $79,2 \pm 4,2\%$  e  $6,5 \pm 8,0$  ( $p < 0,001$  one way ANOVA, seguido de Holm-Sidak) em útero e íleo respectivamente (Figura 4B e 4C).



**Figura 4:** Efeito do ácido cafeico (7 mM/mL) em contrações evocadas por  $\text{Ba}^{2+}$  exógeno, em aorta, útero e íleo de ratos, com a curva-resposta de bloqueio da nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ) utilizado como controle positivo. **A:** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico em preparações de tecido vascular contraído com concentrações cumulativas de  $\text{BaCl}_2$ ; **B:** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico em preparações de tecido miometrial contraído com concentrações cumulativas de  $\text{BaCl}_2$ ; **C** Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo ácido cafeico em preparações de tecido intestinal contraído com concentrações cumulativas de  $\text{BaCl}_2$ . A amostragem experimental para todos os experimentos foi  $n=6$ . Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.; ( $p < 0,05$ , one-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

## DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos, em destaque o ácido cafeíco, utilizado no presente estudo demonstrou atividade relaxante tanto no envolvimento com o acoplamento eletromecânico (contrações induzidas por  $K^+$ ) quanto no acoplamento farmacomecânico (contrações induzidas por, fenilefrina, ocitocina, serotonina, acetilcolina), para o qual a resposta observada em todos os órgãos estudados: aorta, íleo e útero foi mais potente. Ressalta-se o efeito relaxante do ácido sobre a via colinérgica e serotoninérgica além das vias clássicas já estudadas na presença de fenilefrina (aorta) e ocitocina (útero). A rotina apresentou baixa relevância estatística, ou nenhuma, nas vias avaliadas.

A avaliação do ácido cafeíco em diferentes órgãos contendo musculatura lisa agrega importante característica farmacológica a este composto fenólico, tanto ao que concerne a vasta distribuição e presença desse composto em alimentos, bem como o fato desses órgãos desempenharem no organismo diversas atividades essenciais a homeostase fisiológica, em exemplo o tônus vascular, o peristaltismo intestinal, a regulação dos processos de pré-parto e pós-parto (WEBB, 2003).

Compreende-se neste estudo a atividade do ácido cafeíco e rotina em diferentes órgãos com musculatura lisa para verificar a diferença de comportamento destes compostos em relação ao órgão estudado bem como aos diferentes mecanismos envolvidos no efeito relaxante do ácido cafeíco.

Nos resultados obtidos com o ácido cafeíco em aorta isolada de ratos evidencia a atividade vasorrelaxante desse composto tanto sobre contração induzida por  $K^+$ , como contração induzida pelo agonista FE. Verificou-se que na presença do agente contraturante KCl (60 mM) o ácido cafeíco promoveu o relaxamento, mas independente de endotélio evidenciado pelos valores de  $IC_{50}$ :  $IC_{50}$ :  $3,54 \pm 0,5$  mM/mL e  $IC_{50}$ :  $3,52 \pm 0,9$  mM/mL ( $E^+$  e  $E^-$  respectivamente). O endotélio vascular desempenha papel importante nos processos contráteis dos miócitos vasculares uma vez que, detecta estímulos mecânicos e hormonais que o leva a produzir e secretar várias substâncias vasodilatadoras e inflamatórias como, por exemplo, óxido nítrico (NO), as prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (ZAGO; ZANESCO, 2006) ou mesmo substâncias vasoconstritoras, a exemplo: endotelina-1, angiotensina II, o tromboxano A<sub>2</sub> e espécies reativas de oxigênio (YASUNAGA et al., 2014). Sabe-se que algumas outras substâncias provenientes do metabolismo secundário também dos vegetais apresentaram efeito relaxante. O ácido gálico, por exemplo, possui efeito vasorrelaxante dependente de endotélio e apresenta dentre os mecanismos envolvidos a abertura do canal  $K^+$  que causa hiperpolarização da membrana no músculo liso vascular (DE OLIVEIRA et al., 2016).

Os resultados obtidos com ácido cafeico em anéis aórticos com E<sup>-</sup> e E<sup>+</sup> de endotélio sobre de contrações evocadas por KCl (60 mM) não apresentaram diferença estatística nos valores de IC<sub>50</sub> e percentagem de relaxamento, o que sustenta a afirmação de que o endotélio vascular não apresenta significativa participação de seus fatores relaxantes que podem ser liberados tais como: prostaciclina e óxido nítrico, nem mesmo os fatores constritores como o potente peptídeo vasoconstritor endotelina-1 (PEARSON, 2000). Em estudo com extrato etanólico de *Angelica decursiva* observa-se efeito vasorrelaxante em anéis aórticos com endotélio intacto e desnudado sobre contrações evocadas por KCl, dados esses que corroboram com os encontrados para o ácido cafeico (KIM et al., 2017).

Os resultados obtidos com rutina em aorta na presença de KCl (60 mM) demonstraram que não há necessidade de uma avaliação dos possíveis mecanismos de ação envolvido no efeito vasorrelaxante da rutina, embora na literatura existam uma forte correlação da atividade antioxidante da rutina com suas possíveis atividades no sistema cardiovascular, (FILIPSKÝ et al., 2017; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017).

Em útero isolado de ratas os resultados obtidos apresentaram um efeito tocolítico do ácido cafeico na presença de KCl (60 mM), dados que corroboram com estudos com os flavonóides: genisteína, kaempferol e quercetina em útero isolado de ratas que relataram efeito relaxante sobre contrações tônicas evocadas por KCl, o qual foi relacionado ao cAMP que contribui para os efeitos relaxantes da quercetina e do kaempferol, bem como um efeito antagonista do Ca<sup>2+</sup> (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997). O efeito parcial de antagonismo ao Ca<sup>2+</sup> também pode ser verificado neste estudo para o ácido cafeico em tiras miometriais.

Dentre as IC<sub>50</sub> encontradas verifica-se que o valores do ácido cafeico em musculatura lisa uterina (5,2 ± 0,5 mM/mL), bem como de concentração estatisticamente significativa (3,0 mM) na presença de KCl, é superior aos valores encontrados nos demais órgãos estudados o que caracteriza uma menor potencia farmacológica desse composto em contrações uterinas em parâmetros que envolva o acoplamento eletromecânico. No entanto o relaxamento final assemelha-se ao encontrado para os demais órgãos quando em presença de KCl.

Na musculatura lisa intestinal observou-se que a IC<sub>50</sub> encontrada para o ácido cafeico em contrações evocadas por KCl foi a menor encontrada dentre os órgãos estudados (IC<sub>50</sub>: 1,98 ± 0,1 mM/mL), bem como o efeito concentração-dependente do ácido cafeico foi capaz de realizar relaxamento de 100% na musculatura intestinal diferentemente dos demais órgãos, muito embora seja observada uma concentração estatisticamente efetiva superior as observadas em experimentos com músculo liso vascular.



Compostos tais como o éster fenetil do ácido cafeico demonstrou atividade relaxante em contrações miogênicas de íleo de ratos com mecanismo que envolve pelo menos em parte os canais  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (AVIELLO et al., 2010); a isoliquiritigenina apresentou atividade antiespasmódica em musculatura intestinal (SATO et al., 2007); a retusina e me-retusina isoladas também de *Solanum paludosum* Moric., em íleo de cobaia, obteve efeito antiespasmódico para o qual o mecanismo de ação de retusina envolve a participação da enzima sintase do óxido nítrico (NOS), e o de me-retusina envolve a participação da via dos nucleotídeos cíclicos-PDEs (SANTOS, 2007).

Esses estudos similarmente ao desenvolvido com ácido cafeico confirmam o efeito relaxante dos flavonóides em musculatura lisa intestinal, e corrobora com o envolvimento parcial dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L encontrado ao avaliar o efeito do ácido cafeico nesse mecanismo no presente estudo. No entanto são necessárias maiores investigações desses mecanismos no efeito do ácido cafeico.

Nas vias farmacológicas avaliadas na presença de diferentes agentes contracturantes para ambos os órgãos o ácido cafeico também demonstrou efeito relaxante e a rutina não apresentou efeitos estatisticamente significantes nas concentrações utilizadas. Destaca-se que a potência farmacológica do ácido em todos os órgãos avaliados, foi maior em presença de agonistas que envolvem o acoplamento farmacomecânico (ver tabela 1). Também é possível caracterizar uma potência farmacológica maior para o ácido em musculatura intestinal, nas quais observa-se os menores valores de  $\text{IC}_{50}$  assim como em presença de tecido vascular sobre contrações evocadas por FE (tabela 1).

No tecido vascular na presença de FE (0,1  $\mu\text{M}$ ) o AC demonstrou efeito vasorrelaxante, para o qual esse efeito na presença de FE (0,1  $\mu\text{M}$ ) e KCl (60 mM) apresentaram valores de concentração iniciais que foram estatisticamente significantes (1,5 mM/mL) iguais. Entretanto na  $\text{IC}_{50}$  há uma alteração, demonstrando uma potência farmacológica maior para o ácido cafeico na presença da FE.

O envolvimento do endotélio não foi evidenciado neste estudo assim como o efeito da quercetina, que também é um composto fenólico, e em artéria cerebral basilar demonstrou efeito vasodilatador parcialmente dependente de endotélio, uma vez que, nos anéis (E-) de endotélio, seu o efeito vasodilatador não foi influenciado pelos inibidores do canal de  $\text{K}^+$  (YUAN et al., 2018). Esses resultados propõe a investigação da possível participação do endotélio no efeito do ácido cafeico quando em presença de agentes farmacológicos que envolva a ativação de segundos mensageiros.

Em preparações de tiras miométriais o ácido cafeico apresentou ação relaxante em diferentes vias farmacológica dentre elas na presença de ocitocina, acetilcolina e serotonina. As quais não diferiram em eficácia nem em potência farmacológica ( $100 \pm 3,6 \%$ ;  $97,8 \pm 6,1 \%$  e  $100 \pm 1,6 \%$  na presença de ocitocina, acetilcolina e serotonina respectivamente).

As respostas contráteis na presença de 5-HT e OT em útero caracteriza um importante processo de regulação nas contrações desenvolvidas principalmente durante o período gestacional. A 5-HT liga-se aos receptores 5-HT nos músculos lisos vasculares e em demais músculos lisos, em específico correlacionam a atividade contrátil da 5-HT aos receptores 5-HT<sub>2A</sub> (CHIBBAR; MILLER; MITCHELL, 1993; MINOSYAN et al., 2007). A via colinérgica também desempenha papel importante nas contrações uterinas, esse mecanismo é evidenciado em estudos que buscam avaliar o envolvimento dessa via no efeito de alguns produtos incluindo produtos naturais (MONDAL et al., 2018; SADRAEI; ASGHARI; ALINEJAD, 2016).

Ao observar o efeito relaxante do ácido cafeico sobre as três vias farmacológicas estudadas mediante as contrações evocadas na presença de ocitocina, serotonina e acetilcolina sugere um antagonismo do ácido cafeico aos receptores desses agonistas que ocorreu com semelhante eficácia farmacológica. Em todas as vias houve reversão das contrações após exposição ao ácido cafeico.

O efeito do ácido cafeico na musculatura lisa intestinal em presença da via colinérgica, tanto em curva-resposta de concentrações cumulativas (0,2 – 7,0 mM/mL) na presença de contrações evocadas por CCh ( $10^{-6}$  M) quanto em concentração única (7, 0 mM/mL) sobre contração evocada por ACh (10  $\mu$ M) demonstrou efeito relaxante com inibição de receptores colinérgicos. Esses resultados destacam-se dos demais por apresentar a menor concentração estatisticamente significativa e uma das menores IC<sub>50</sub>, sugerindo futuras investigações mais detalhadas dos mecanismos envolvidos nesse efeito. Alguns extratos de espécies vegetais apresentam atividade relaxante sobre contrações evocadas por CCh à exemplo *Equisetum debile* Roxb (ALI et al., 2017), o extrato de *Pycnocycla spinosa* e seu composto fenólico ácido 6-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hexanônico que possui efeito antiespasmódico em contrações evocadas por ACh e 5-HT em musculatura lisa intestinal de camundongos (SADRAEI et al., 2014). Esses dados intensificam a atividade antiespasmódica de produtos vegetais em especial compostos fenólicos e corroboram com os achados do presente estudo. A rotina é descartada quanto ao efeito antiespasmódico.

O envolvimento do Ca<sup>2+</sup> no processo contrátil é um fator limitante em todas as fibras musculares lisas. Neste aspecto a avaliação do efeito do ácido cafeico e seu envolvimento com os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem (VOCCs) tanto em músculo liso vascular, uterino

quanto em músculo intestinal demonstra, mediante a contração evocada por  $\text{BaCl}_2$  que o relaxamento causado nos órgãos avaliados depende parcialmente dos VOCCs, ao verificar que somente nas concentrações acima de 10 mM de  $\text{BaCl}_2$  é que este obteve resposta contrátil em preparações expostas ao ácido. Demonstra-se que em musculatura lisa intestinal o envolvimento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  é mais evidente uma vez que o  $\text{BaCl}_2$  não foi capaz de evocar valores superiores a 30% de contração (AVIELLO et al., 2010).

Ao comparar com a nifedipina, um bloqueador seletivo de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, verifica-se que o ácido não foi capaz de bloquear totalmente as contrações evocadas por concentrações cumulativas (0,1 - 30 mM) em curva resposta de  $\text{BaCl}_2$ , no entanto não descarta-se o envolvimento desses canais no mecanismo do composto avaliado. Ressalta-se que o envolvimento dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L é diferenciado em aorta, útero e íleo, pois a resposta do bloqueio do ácido é claramente diminuída em aorta e mais eficaz em útero e íleo. Outros canais também podem estar envolvidos no efeito miorelaxante do ácido cafeico tais como os SOCCs e ROCCs.

Nesse estudo verificou-se efeito miorelaxante do ácido cafeico em todos os órgãos estudados: aorta, útero e íleo, por outro lado a rutina não apresentou efeito relaxante estatisticamente significativo. O ácido cafeico apresenta uma potência farmacológica maior na via farmacomecânica inclusive na presença de agentes contraturantes ACh e 5-HT em útero e íleo, assim como nas vias clássicas na presença de FE, OT e CCh (aorta, útero e íleo), em comparação com a estimulação eletromecânica pelo KCl.

A potência farmacológica do ácido cafeico foi maior em musculatura lisa intestinal e vascular. A eficácia farmacológica é destacada em todos os órgãos, uma vez que este relaxou totalmente o tecido vascular, uterino e intestinal para o qual esse efeito é em partes mediado pelos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Entretanto são necessários estudos mais detalhados dos mecanismos envolvidos no efeito relaxante do ácido cafeico nos diferentes órgãos: aorta, útero e íleo, contendo musculatura lisa.

## CONCLUSÃO

O ácido cafeico apresentou efeito miorelaxante com destacada potência farmacológica em acoplamento farmacomecânico evidenciado pelos valores de  $\text{IC}_{50}$  e efeito envolvido parcialmente com os canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo mais evidente esse efeito em músculo liso uterino. A rutina não foi caracterizada estatisticamente como um composto fenólico miorelaxante. Os resultados demonstram, que o ácido cafeico é um composto fenólico que pode ser utilizado como um agente terapêutico promissor frente a desordens que envolvam a contratilidade muscular lisa.

## REFERÊNCIAS

- ALI, M.; MUDAGAL, M. P.; GOLI, D. Cardioprotective effect of tetrahydrocurcumin and rutin on lipid peroxides and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in rats. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 2, p. 132–136, 2009.
- ALI, S. et al. A pharmacological evidence for the presence of antihistaminic and anticholinergic activities in *Equisetum debile* Roxb. **Indian journal of pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 98, 2017.
- AMORATI, R. et al. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2932–2937, 2006.
- AVIELLO, G. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility. **European Journal of Pharmacology**, v. 640, n. 1–3, p. 163–167, 2010.
- CHIBBAR, R.; MILLER, F. D.; MITCHELL, B. F. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 1, p. 185–192, 1993.
- CORRÊA, M. F. P.; DE MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. SUPPL., p. 785–797, 2008.
- DA SILVA OLIVEIRA, G. L. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Ciências Farmacéuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 461–466, 2015.
- DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- DE OLIVEIRA, L. M. et al. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**, v. 81, p. 69–74, jun. 2016.
- FILIPSKÝ, T. et al. Intravenous rutin in rat exacerbates isoprenaline-induced cardiotoxicity likely due to intracellular oxidative stress. **Redox Report**, v. 22, n. 2, p. 78–90, 2017.
- FUENTES, O.; CÉSPEDES, C.; SEPULVEDA, R. *Aristotelia chilensis*, rutin and quercetin ameliorates acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta exposed to oxidative stress. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 1, p. 11–20, 2015.
- FUKUDA, T. et al. Augmentation of ferulic acid-induced vasorelaxation with aging and its structure importance in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 10, p. 1113–1117, 2015.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.

217, n. 2–3, p. 213–220, 2006.

ITTHIPANICHPONG, C. et al. Antispasmodic effects of curcuminoids on isolated guinea-pig ileum and rat uterus. **Journal of the Medical Association of Thailand= Chotmaihet thangphaet**, v. 86, p. S299-309, 2003.

KIM, B. et al. Vasorelaxant effects of *Angelica decursiva* root on isolated rat aortic rings. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.

MA, Y. et al. Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway. **Free radical biology & medicine**, v. 101, n. August, p. 163–175, 2016.

MATEJCZYK, M. et al. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 14, 2017.

MINOSYAN, T. Y. et al. Increased 5-HT contractile response in late pregnant rat myometrium is associated with a higher density of 5-HT<sub>2A</sub> receptors. **Journal of Physiology**, v. 581, n. 1, p. 91–97, 2007.

MONDAL, M. et al. Monosodium glutamate impairs the contraction of uterine visceral smooth muscle ex vivo of rat through augmentation of acetylcholine and nitric oxide signaling pathways. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 1, p. 83–93, 2018.

MORADI, M. et al. Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 10, n. 6, p. 499–503, 2013.

PEARSON, J. D. Normal endothelial cell function. **Lupus**, v. 9, n. 3, p. 183–188, 2000.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl<sub>2</sub>. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 5, p. 847–857, 1997.

SADRAEI, H. et al. Antispasmodic and antidiarrhoeal activities of 6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hexanoic acid from *Pycnocycla spinosa* Decne. exBoiss. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 4, p. 279, 2014.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G.; ALINEJAD, M. Comparison of antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. in rat uterus and ileum. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 4, p. 284, 2016.

SATO, Y. et al. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza uralensis* roots, acts in the lower part of intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145–149, 2007.

SHI, J. et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **Journal of medicinal food**, v. 6, n. 4, p. 291–299, 2003.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

TESTAI, L. et al. Vasorelaxant effects of the chloroformic crude extract of *Bupleurum fruticosum* L.(Umbelliferae) roots on rat thoracic aorta. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 1–2, p. 93–97, 2005.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201–206, 2003.

WURTELE, E. et al. Medicinal Plants: A Public Resource for Metabolomics and Hypothesis Development. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 1031–1059, 2012.

YASUNAGA, T. et al. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. **International heart journal**, v. 55, n. 2, p. 160–164, 2014.

YUAN, T.-Y. et al. Vasorelaxant effect of quercetin on cerebral basilar artery in vitro and the underlying mechanisms study. **Journal of Asian natural products research**, v. 20, n. 5, p. 477–487, 2018.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264–e270, 2006.

*Conclusão*

---

## 7. CONCLUSÃO

1. O ácido cafeico não alterou o tônus muscular da aorta, diferentemente da RT que eleva o tônus vascular na última concentração.
2. O ácido cafeico demonstrou atividade relaxante concentração-dependente em musculatura lisa de aorta, útero e íleo no acoplamento eletromecânico e farmacomecânico, para os quais a potência farmacológica do ácido cafeico foi maior no acoplamento farmacomecânico.
3. O efeito vasorrelaxante do ácido cafeico não demonstrou dependência do endotélio vascular.
4. A rotina diferentemente do ácido cafeico não apresentou efeito relaxante estatisticamente significativo, demonstrando assim a necessidade da descontinuidade dos estudos nas vias farmacológicas em busca de seu mecanismo de ação.
5. O ácido cafeico apresenta efeito parcialmente dependente dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L em aorta, útero e íleo. Esses resultados diferentemente da RT demonstra necessidade da continuidade das investigações, sobre os mecanismos envolvidos no efeito miorelaxante.



## *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L. DE O. **Derivados Dos Ácidos Clorogênico, Cafeico E Cinâmico: Obtenção, Avaliação Da Atividade Antimicrobiana E De Inibição Enzimática.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, 2015.

AIRES, M. DE M. **Fisiologia.** [s.l.] Guanabara Koogan, 2012.

ALBUQUERQUE, U. P. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico : fragilidades e perspectivas . Rev Bras Farmacogn Divulgação As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v. 16, p. 678–689, 2006.

ALI, M.; MUDAGAL, M. P.; GOLI, D. Cardioprotective effect of tetrahydrocurcumin and rutin on lipid peroxides and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in rats. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, n. 2, p. 132–136, 2009.

ALI, S. et al. A pharmacological evidence for the presence of antihistaminic and anticholinergic activities in *Equisetum debile* Roxb. **Indian journal of pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 98, 2017.

ALMAJANO, M. P. et al. Effect of pH on the Antimicrobial Activity and Oxidative Stability of Oil-in-Water Emulsions Containing Caffeic Acid. **Journal of food science**, v. 72, n. 5, 2007.

ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. **Archives of medical research**, v. 44, n. 5, p. 346–351, 2013.

AMORATI, R. et al. Solvent and pH effects on the antioxidant activity of caffeic and other phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2932–2937, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ARJUMAND, W.; SETH, A.; SULTANA, S. Rutin attenuates cisplatin induced renal inflammation and apoptosis by reducing NFκB, TNF-α and caspase-3 expression in wistar rats. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2013–2021, 2011.

AVIELLO, G. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility. **European Journal of Pharmacology**, v. 640, n. 1–3, p. 163–167, 2010.

AYTEKIN, A. O.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Synthesis of chitosan-caffeic acid derivatives and evaluation of their antioxidant activities. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 212–216, 2011.

BAUMANN, F. et al. Increasing evidence of mechanical force as a functional regulator in smooth muscle myosin light chain kinase. **eLife**, v. 6, p. 1–16, 2017.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. DE O. Rutina – Estrutura , Metabolismo E Potencial. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, p. 21–25, 2009.

BLAIR, P. J. et al. The significance of interstitial cells in neurogastroenterology. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 20, n. 3, p. 294, 2014.

BROWNING, K. N.; TRAVAGLI, R. A.; SCIENCES, B. HHS Public Access. v. 4, n. 4, p. 1339–1368, 2016.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. [s.l.] AMGH Editora, 2012.

CARREIRO, J. DA N. et al. Tocolytic action and underlying mechanism of galetin 3,6-dimethyl ether on rat uterus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.

CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.

CASTRO, V. L. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos e Agroquímicos. **Embrapa**, p. 1–7, 2006.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a003947, 2011.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Nitric oxide. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, n. 6, p. 417–423, 2002.

CHEN, Y.-F.; TSAI, H.-Y.; WU, T.-S. Anti-inflammatory and analgesic activities from roots of *Angelica pubescens*. **Planta medica**, v. 61, n. 1, p. 2–8, 1995.

CHIBBAR, R.; MILLER, F. D.; MITCHELL, B. F. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 1, p. 185–192, 1993.

CHUU, C.-P. et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. **Cancer Prevention Research**, v. 5, n. 5, p. 788–797, 2012.

CICALA, C. et al. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 73–80, 2003.

CORRÊA, M. F. P.; DE MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. SUPPL., p. 785–797, 2008.

DA SILVA OLIVEIRA, G. L. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 36, n. 3, p. 461–466, 2015.

- DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.
- DE OLIVEIRA, F. C. et al. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta botânica brasileira**, v. 23, p. 590–605, 2009.
- DE OLIVEIRA, L. M. et al. The vasorelaxant effect of gallic acid involves endothelium-dependent and -independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**, v. 81, p. 69–74, jun. 2016.
- DONG, H. et al. NO/PGI<sub>2</sub>-independent vasorelaxation and the cytochrome P450 pathway in rabbit carotid artery. **British journal of pharmacology**, v. 120, n. 4, p. 695–701, 1997.
- FERNÁNDEZ, S. P. et al. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. **European journal of pharmacology**, v. 539, n. 3, p. 168–176, 2006.
- FILIPSKÝ, T. et al. Intravenous rutin in rat exacerbates isoprenaline-induced cardiotoxicity likely due to intracellular oxidative stress. **Redox Report**, v. 22, n. 2, p. 78–90, 2017.
- FIRMO, W. D. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa**, v. 18, n. n. especial, p. 90–95, 2011.
- FRUET, A. C. **Avaliação do efeito fotoprotetor de compostos fenólicos sobre culturas de células da pele irradiadas por UVA e UVB**, Universidade de São Paulo, , 2015.
- FUENTES, O.; CÉSPEDES, C.; SEPULVEDA, R. *Aristotelia chilensis*, rutin and quercetin ameliorates acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta exposed to oxidative stress. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 1, p. 11–20, 2015.
- FUKATA, Y.; KAIBUCHI, K.; AMANO, M. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 1, p. 32–39, 2001.
- FUKUDA, T. et al. Augmentation of ferulic acid-induced vasorelaxation with aging and its structure importance in thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 10, p. 1113–1117, 2015.
- FURNESS, J. B. et al. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. In: **Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease**. [s.l.] Springer, 2014. p. 39–71.
- GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human Figure 1 . Basic structure of flavonoids . **Journal of medicinal plants research**, v. 5, n. 31, p. 6697–6703, 2011.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, n. 2–3, p. 213–220, 2006.

HAMILTON, A. et al. **The purposes and teaching of applied ethnobotany**. [s.l.] United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), 2003.

HEIZMANN, C. W.; HUNZLKER, W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. **Trends in biochemical sciences**, v. 16, p. 98–103, 1991.

HOEFFEL, J. L. M. et al. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APAS'S Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista vitas**, p. 1–25, 2011.

HONG, F. et al. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, n. 2, p. 135–146, 2011.

JOHN, J. E. Natural products as lead-structures: a role for biotechnology. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 11–12, p. 409–410, jun. 2010.

KABAŁA-DZIK, A. et al. Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1144, 2017.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1091–1098, 2006.

KHAN, M. M. et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain research**, v. 1292, p. 123–135, 2009.

KIM, B. et al. Vasorelaxant effects of *Angelica decursiva* root on isolated rat aortic rings. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2017.

KIM, D. W. et al. Germinated buckwheat extract decreases blood pressure and nitrotyrosine immunoreactivity in aortic endothelial cells in spontaneously hypertensive rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 7, p. 993–998, 2009.

KIM, H. et al. Identification of histamine receptors and effects of histamine on murine and simian colonic excitability. **Neurogastroenterology & Motility** v. 23, n. 10, p. 1–18, 2012.

KOMORI, T. et al. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. **Neuroimmunomodulation**, v. 2, n. 3, p. 174–180, 1995.

KOTANI, M. et al. Multiple signal transduction pathways through two prostaglandin E receptor EP3 subtype isoforms expressed in human uterus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 4315–4322, 2000.

KREFT, S.; KNAPP, M.; KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 11, p. 4649–4652, 1999.

KUNASEGARAN, T. et al. Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats.

**European Journal of Pharmacology**, v. 799, n. February, p. 160–170, 2017.

LAGO, J. H. G. et al. Exudates used as medicine by the “caboclos river-dwellers” of the Unini River, AM, Brazil – Classification based in their chemical composition. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 3, p. 379–384, maio 2016.

LANNOY, M.; SLOVE, S.; JACOB, M.-P. The function of elastic fibers in the arteries: beyond elasticity. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 79–83, 2014.

LEE, Y.-T. et al. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. **Cancer letters**, v. 223, n. 1, p. 19–25, 2005.

LEONTI, M.; VERPOORTE, R. Traditional Mediterranean and European herbal medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, n. November 2016, p. 161–167, 2017.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Principles of Physiology**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2009.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19–27, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J.; FRANCISCO, J. M. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.: s.n.].

LOVASZ, N. et al. ATP-sensitive potassium channels modulate in vitro tocolytic effects of  $\beta$ 2-AR agonists on uterine muscle rings in rats in early but not in late pregnancy. **Croatian Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 114–118, 2015.

MA, Y. et al. Caffeic acid phenethyl ester alleviates asthma by regulating the airway microenvironment via the ROS-responsive MAPK/Akt pathway. **Free radical biology & medicine**, v. 101, n. August, p. 163–175, 2016.

MACÊDO, M. S.; RIBEIRO, D. A.; SOUZA, M. M. D. A. Uso De Plantas Mediciniais Cultivadas Em Uma Área De Caatinga Em Assaré - Ceará. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 12, n. 1, p. 36–57, 2013.

MADY, F. T. M. **Metabólitos secundários**. In: [s.l.: s.n.]. p. 17.

MAGNANI, C. et al. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Analytical Methods**, v. 6, n. 10, p. 3203, 2014.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, ET AL. Bioavailability, Polyphenols: Food sources and. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727–747, 2004.

MARCONDES, F. K., BIANCHI, F. J. AND TANNO, A. P. DETERMINATION OF THE ESTROUS CYCLE PHASES OF RATS : SOME HELPFUL CONSIDERATIONS. **Brazilian Journal of Biology. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002.

MARCONDES, F. K. Influence of gender and estrous cycle phases on the stress reaction in rats. **Masters degree dissertation, state university of Compinas, Compinas, Sao Paulo, Brazil**,

1995.

MARTINS, L. L. Ovarios salpingohisterectomia em cutias: técnicas anestésica e cirúrgica, análise morfológica uterina e microbiológica da vagina e do útero (*Dasyprocta azarae*, Lichtenstein, 1823). 2009.

MARTINS, L. L. et al. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 326–332, 2011.

MATEJCZYK, M. et al. Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. **Advances in medical sciences**, v. 63, n. 1, p. 14, 2017.

MEDHORA, M. et al. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: recent approaches to assay the role of epoxyeicosatrienoic acids. **The Japanese journal of pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 369–375, 2001.

MENDES-JUNIOR, L. DAS G. et al. Oral supplementation with the rutin improves cardiovagal baroreflex sensitivity and vascular reactivity in hypertensive rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1099–1106, 2013.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Plant Cell**, v. 15, n. 4, p. 523–530, 2006.

MINOSYAN, T. Y. et al. Increased 5-HT contractile response in late pregnant rat myometrium is associated with a higher density of 5-HT<sub>2A</sub> receptors. **Journal of Physiology**, v. 581, n. 1, p. 91–97, 2007.

MITCHELL, B. F. et al. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. **Facts, views & vision in ObGyn**, v. 5, n. 1, p. 72–81, 2013a.

MITCHELL, B. F. et al. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. **Facts, views & vision in ObGyn**, v. 5, n. 1, p. 72, 2013b.

MOHAMMADIAN, M. A.; MOBRAMI, Z.; SAJEDI, R. H. Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperature. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 3, p. 203–208, 2011.

MONDAL, M. et al. Monosodium glutamate impairs the contraction of uterine visceral smooth muscle ex vivo of rat through augmentation of acetylcholine and nitric oxide signaling pathways. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 1, p. 83–93, 2018.

MONTEIRO, Á. B. **Determinação do perfil fitoquímico e do efeito antidepressivo-símile do extrato hidroetanólico das folhas da *Annona coriacea* mart . e ácido caféico em determinação do perfil fitoquímico e do efeito antidepressivo-símile do extrato hidroetanólico das folha.** [DISSERTAÇÃO], Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, 2016.

MONTEIRO, F. DE SOUZA. **Participação de receptores muscarínicos e da via do óxido nítrico no efeito espasmolítico da fração de alcalóides totais obtida de *Solanum paludosum***

**Moric. (SOLANACEAE).** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2009.

MORAIS, L. P. DE. **Atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia alba* constituintes majoritários citral e l-limoneno em útero isolado de ratas wistar . atividade tocolítica do óleo essencial de lippia alba citral e l-limoneno em útero isolado de ratas.** [Dissertação] Programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, 2016.

MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 68, p. 345–374, 2006.

MYERS, P. R. et al. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. **Nature**, v. 345, n. 6271, p. 161–163, 1990.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 5, p. 541–552, 1995.

NETO, F. R. G. et al. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 4, p. 856–865, 2014.

NIEOCZYM, D. et al. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 54, p. 50–58, 2014.

NIERO, E. L. O. **Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanoma humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta.** [Tese] Programa de Pós- graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, p. 39, 2010.

ÖHMAN, L.; SIMRÉN, M. New insights into the pathogenesis and pathophysiology of irritable bowel syndrome. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 3, p. 201–215, 2007.

OSOSKI, A. L. et al. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 285–298, 2002.

OZTURK, G. et al. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 15, p. 2064–2068, 2012.

PARASHAR, A.; MEHTA, V.; UDAYABANU, M. Rutin alleviates chronic unpredictable stress-induced behavioral alterations and hippocampal damage in mice. **Neuroscience Letters**, v. 656, p. 65–71, 2017.

PEARSON, J. D. Normal endothelial cell function. **Lupus**, v. 9, n. 3, p. 183–188, 2000.

PUGSLEY, M. K.; TABRIZCHI, R. The vascular system: An overview of structure and function. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 44, n. 2, p. 333–340,



2000.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. **Nature**, v. 306, n. 5939, p. 174–176, 1983.

REIS, C. D. F. **Efeitos vasculares do oleorresina de *Pterodon spp . Vogel ( Fabaceae ) e do seu diterpeno isolado ( 6  $\alpha$  -acetoxi-7  $\beta$  -hidroxivouacapano-17  $\beta$  -oato de metila.*** [Dissertação] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 2015.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129–137, 1992.

SILVA, R. E. R. **Atividade vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de rato.** [Dissertação], Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri - Urca, 2016.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl<sub>2</sub>. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 5, p. 847–857, 1997.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 251–259, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon,...** [s.l.] Dunod, 1968.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, p. 315–320, 2003.

RYLSKI, M.; DURIASZ-ROWIŃSKA, H.; REWERSKI, W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. **Acta Physiologica Polonica**, v. 30, n. 3, p. 385–388, 1979.

SADRAEI, H. et al. Antispasmodic and antidiarrhoeal activities of 6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hexanoic acid from *Pycnocycla spinosa* Decne. exBoiss. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 4, p. 279, 2014.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G.; ALINEJAD, M. Comparison of antispasmodic effect of hydroalcoholic extract of *Dracocephalum kotschy* Boiss. in rat uterus and ileum. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 11, n. 4, p. 284, 2016.

SALOMAA, V. et al. Non-insulin-dependent diabetes mellitus and fasting glucose and insulin concentrations are associated with arterial stiffness indexes. **Circulation**, v. 91, n. 5, p. 1432–1443, 1995.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M.; KOH, S. D. Interstitial cells: regulators of smooth muscle function. **Physiological reviews**, v. 94, n. 3, p. 859–907, 2014.

- SATO, Y. et al. Isoliquiritigenin, one of the antispasmodic principles of *Glycyrrhiza ularensis* roots, acts in the lower part of intestine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 145–149, 2007.
- SEIDELMANN, S. B.; LIGHTHOUSE, J. K.; GREIF, D. M. Development and pathologies of the arterial wall. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 11, p. 1977–1999, 2014.
- SELVARAJ, G. et al. Anti-nociceptive effect in mice of thillai flavonoid rutin. **Biomed Environ Sci**, v. 27, n. 4, p. 295–299, 2014.
- SHI, J. et al. Polyphenolics in grape seeds-biochemistry and functionality. **Journal of medicinal food**, v. 6, n. 4, p. 291–299, 2003.
- SIKANDER, A.; RANA, S. V.; PRASAD, K. K. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1–2, p. 47–55, 2009.
- SILVERTHORN, D. U. et al. **Human physiology: an integrated approach**. [s.l.] Pearson/Benjamin Cummings San Francisco, CA, USA:, 2010.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. [s.l.] Artmed Editora, 2016.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos Como Antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.
- SOMLYO, A. P. Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. **Circulation Research**, v. 57, n. 4, p. 497–507, 1985.
- SOMLYO, A. P. et al. Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases. In: **Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 134**. [s.l.] Springer, 1999. p. 201–234.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle. **Annual review of physiology**, v. 52, n. 1, p. 857–874, 1990.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231–236, 1994.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **The Journal of physiology**, v. 522, n. 2, p. 177–185, 2000.
- SOUZA, R. K. D. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of carrasco, northeastern Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 99–104, 2014.
- THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 83, n. 3, p. 215–242, 2005.

TRAVASSOS, R. D. A. Envolvimento De Canais Para Potássio E De Nucleotídeos Cíclicos No Mecanismo De Ação Tocolítico Do Ácido 8(17),12E,14-Labdatrieno-18-Óico (Labdano-302) Em Útero Isolado De Rata. v. 8, n. 17, p. 1–120, 2010.

UGUSMAN, A. et al. Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot-shock stress. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 670–678, 1996.

VEDOVATO, K. et al. O Eixo Intestino-Cérebro E O Papel Da Serotonina. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, p. 33–42, 2014.

WANG, P. et al. Mechanism of acute lung injury due to phosgene exposition and its protection by caffeic acid phenethyl ester in the rat. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 65, n. 3, p. 311–318, 2013.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in physiology education**, v. 27, n. 4, p. 201–206, 2003.

WURTELE, E. et al. Medicinal Plants: A Public Resource for Metabolomics and Hypothesis Development. **Metabolites**, v. 2, n. 4, p. 1031–1059, 2012.

YAMADA, J.; TOMITA, Y. Antimutagenic Activity of Caffeic Acid and Related Compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n. 2, p. 328–329, 1996.

YASUNAGA, T. et al. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. **International heart journal**, v. 55, n. 2, p. 160–164, 2014.

YAZBEK, P. B. et al. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 310–331, fev. 2016.

YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1101, n. 1, p. 72–84, 2007.

YUAN, T.-Y. et al. Vasorelaxant effect of quercetin on cerebral basilar artery in vitro and the underlying mechanisms study. **Journal of Asian natural products research**, v. 20, n. 5, p. 477–487, 2018.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 87, n. 6, p. e264–e270, 2006.

ZHU, J. X. et al. Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. **Journal of Physiology**, v. 530, n. 3, p. 431–442, 2001.

***Perspectivas Futuras***

---

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- ✓ Avaliar o envolvimento dos canais de  $K^+$  no efeito ácido cafeíco em musculatura lisa de aorta, útero e íleo de ratos wistar.
- ✓ Verificar a participação de receptores serotoninérgicos e histaminérgicos no efeito do ácido cafeico em aorta, útero e íleo de ratos.
- ✓ Investigar o possível envolvimento das cicloxigenases no efeito do ácido cafeico em útero e íleo de ratos.

# *Apêndices*

---

**APÊNDICE A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO NA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – CEUA/URCA**

---



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS**  
Rua Cel. Antonio Luís 1161, Pimenta  
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291  
CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil  
propp@urca.br - www.urca.br/ceua



**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS: ÁCIDO CAFEICO E RUTINA EM MUSCULATURA LISA DE AORTA, ÚTERO E ÍLEO DE RATOS WISTAR"**, Processo Nº 00147/2017.2, foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

*Marta Regina Kerntopf*

Dr.<sup>a</sup> Marta Regina Kerntopf  
Vice-Presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE  
2017

*Anexos*

---



## ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS NÃO VINCULADOS AO PROJETO

### ANEXO A (1) – Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats.



Short Communication

Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats

Poliana M.M. Carvalho<sup>a</sup>, Cícero A.F. Macêdo<sup>a</sup>, Tiago F. Ribeiro<sup>a</sup>, Andressa A. Silva<sup>a</sup>, Renata E.R. Da Silva<sup>a</sup>, Luís P. de Moraes<sup>a</sup>, Marta R. Kerntopf<sup>b</sup>, Irwin R.A. Menezes<sup>c</sup>, Roseli Barbosa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Physiopharmacology of Excitability Cell Laboratory, Department of Chemical Biology Regional University of Cariri, Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup> Pharmacology of Natural Products Laboratory, Regional University of Cariri-Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil

<sup>c</sup> Pharmacology and Molecular Chemistry Laboratory, Department of Chemical Biology, Regional University of Cariri-Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil

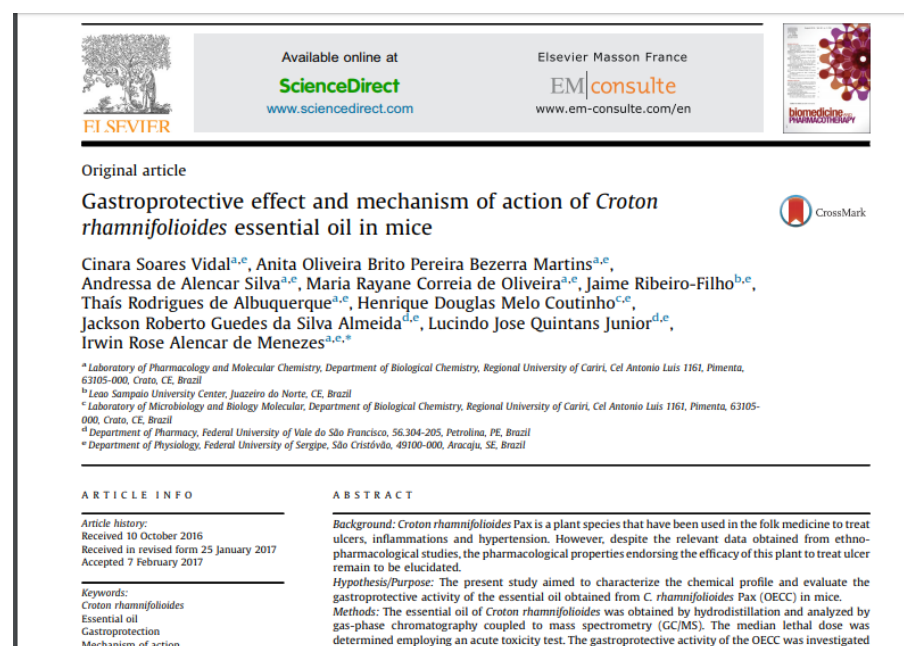
#### ARTICLE INFO

**Key-words:**  
*Lippia alba*  
 Essential oil  
 Citral  
 Smooth muscle  
 Limonene

#### ABSTRACT

The *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) species, has effects sedative, analgesic and spasmolytic properties. This study had as its main objective to evaluate the essential oil of *L. alba* (EOLa) effect and that of its main constituents, citral and limonene, over tracheal smooth muscle from Wistar rats. EOLa, citral and limonene promoted relaxation of tracheal smooth muscle in contractions induced by potassium (60 mM K<sup>+</sup>), presenting an EC<sub>50</sub> of 148 ± 7 µg/mL for the EOLa, 136 ± 7 µg/mL for citral and 581 ± 7 µg/mL for limonene. In contractions induced by Acetylcholine (ACh; 10 µM) the EC<sub>50</sub> for the EOLa and citral were of 731 ± 5 µg/mL and 795 ± 9 µg/mL, respectively. In preparations pre-incubated with 1000 µg/mL of the EOLa and citral, both agents were found to block the influx of BaCl<sub>2</sub> by VOCCs. This study demonstrated that the EOLa and its main component citral present antispasmodic effect over tracheal smooth muscle of rats.

### ANEXO A (2) – Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice.



Original article

Gastroprotective effect and mechanism of action of *Croton rhamnifolioides* essential oil in mice

Cinara Soares Vidal<sup>a,c</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>a,c</sup>, Andressa de Alencar Silva<sup>a,c</sup>, Maria Rayane Correia de Oliveira<sup>a,c</sup>, Jaime Ribeiro-Filho<sup>b,c</sup>, Thaís Rodrigues de Albuquerque<sup>a,c</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>c,e</sup>, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>d,e</sup>, Lucindo Jose Quintans Junior<sup>d,e</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Pharmacology and Molecular Chemistry, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Cel Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000, Crato, CE, Brazil

<sup>b</sup> Leão Sampaio University Center, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Microbiology and Biology Molecular, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Cel Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000, Crato, CE, Brazil

<sup>d</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Vale do São Francisco, 56.304-205, Petrolina, PE, Brazil

<sup>e</sup> Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, 49100-000, Aracaju, SE, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 10 October 2016  
 Received in revised form 25 January 2017  
 Accepted 7 February 2017

**Keywords:**  
*Croton rhamnifolioides*  
 Essential oil  
 Gastroprotection  
 Mechanism of action

#### ABSTRACT

**Background:** *Croton rhamnifolioides* Pax is a plant species that have been used in the folk medicine to treat ulcers, inflammations and hypertension. However, despite the relevant data obtained from ethnopharmacological studies, the pharmacological properties endorsing the efficacy of this plant to treat ulcer remain to be elucidated.  
**Hypothesis/Purpose:** The present study aimed to characterize the chemical profile and evaluate the gastroprotective activity of the essential oil obtained from *C. rhamnifolioides* Pax (OECC) in mice.  
**Methods:** The essential oil of *Croton rhamnifolioides* was obtained by hydrodistillation and analyzed by gas-phase chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS). The median lethal dose was determined employing an acute toxicity test. The gastroprotective activity of the OECC was investigated

## ANEXO A (3) – Preference analysis between the use of drugs and plants in pain management in a quilombola community of the state of Ceará, Brazil

academicJournals

Vol. x(xx), pp. xxx-xx, xxxxx, 2017  
 DOI:10.5897/JXXXX  
 Article Number: xxxxxxxxx  
 ISSN 1996-0875  
 Copyright © 2017  
 Author(s) retain the copyright of this article  
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

Journal of Medicinal Plants Research

*Full Length Research Paper*

### Preference analysis between the use of drugs and plants in pain management in a quilombola community of the state of Ceará, Brazil

Ádamo Xenofonte Brasil<sup>1</sup>, Maysa de Oliveira Barbosa<sup>1</sup>, Izabel Cristina Santiago Lemos<sup>1</sup>, Cícera Norma Fernandes Lima<sup>1</sup>, Gyllyandeson de Araujo Delmondes<sup>1</sup>, Giovana Mendes de Lacerda<sup>1</sup>, Álefe Brito Monteiro<sup>1</sup>, Diógenes de Queiroz Dias<sup>1</sup>, Andressa de Alencar Silva<sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>1</sup>, Henrique Douglas Melo Coutinho<sup>1</sup>, Cicero Francisco Bezerra Felipe<sup>2</sup>, Marta Regina Kerntopf<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Enfermagem, Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Brazil.

Received 4 October, 2017; Accepted 30 October, 2017

The objective of this study is to analyze the context of the management of people from traditional quilombola community, in relation to the use of plant species and allopathic drugs used in treatment of pain. Questionnaires were used to determine the socio-demographic profile and the interview-semi-structured method with participants adopted. The analysis of data was done by, statistics for the socio-demographic variables and the discourse of the collective subject to interpret the contents of the interview. There were 52 residents interviewed, predominantly (67%) by female. Most of the participants have low education level and the main occupational activity is agriculture. In the treatment of pain, herbal teas were considered the preferred method by the participants. Some of them use allopathic medicines, but they attribute to plants the meaning of greater effectiveness in therapy. It has also been noted that informants do not use concomitant drugs and plants by thinking of having to poison. It is concluded that there is a shortage of studies on the representations and meanings of the preference of inhabitants of traditional localities, considering plant species and industrialized drugs specific for pain, as well as for the treatment of diseases in general. Thus, it is expected that this work will arouse the interest of researchers in studying more about popular knowledge and health management.

**Key words:** Popular knowledge, pain, medicinal plants.

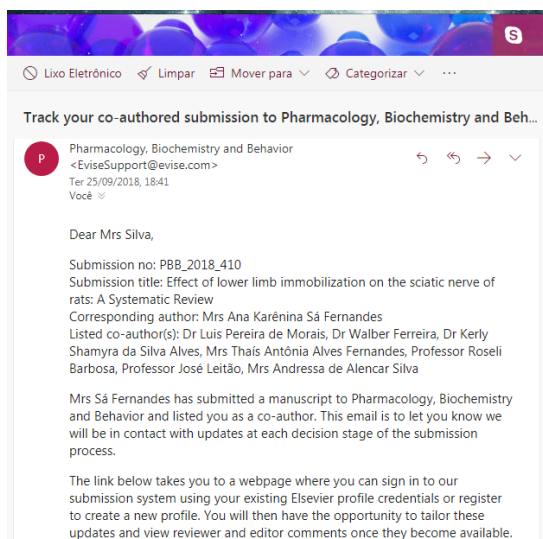
## ANEXO A (4) – Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta.



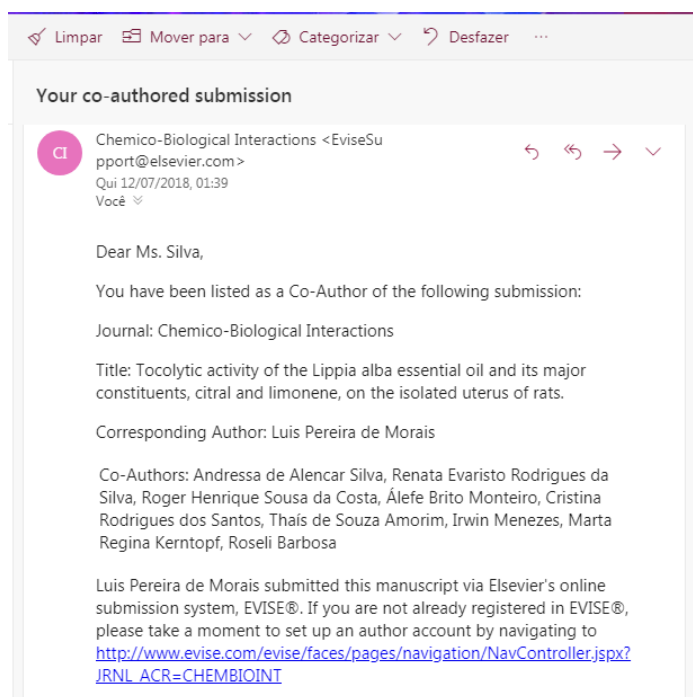
The image is a screenshot of an email notification from Elsevier. At the top, there is a navigation bar with icons for 'Lixo Eletrônico', 'Limpar', 'Mover para', 'Categorizar', and a menu icon. Below this, the text reads 'Share your article [BIOPHA\_7927] published in Biomedicine & Pharmacothe...'. The date and time are 'Sáb 22/09/2018, 09:20' and the recipient is 'Você'. The Elsevier logo is prominently displayed in orange, followed by the text 'Share your article!'. The recipient is addressed as 'Dear Mrs Silva,'. The main body of the email states: 'As co-author of the article *Vasorelaxant effect of the Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta, we are pleased to let you know that the final version – containing full bibliographic details – is now available online.' To the right of this text is a small graphic of a red flower-like molecule with the journal title 'biomedicine PHARMACOTHERAPY' below it. The final paragraph explains the 'Share Link' feature: 'To help you and the other authors access and share this work, we have created a Share Link – a personalized URL providing 50 days' free access to the article. Anyone clicking on this link before November 11, 2018 will be taken directly to the final version of your article on ScienceDirect, which they are welcome to read or download. No sign up, registration or fees are required.'

## ANEXO B – ARTIGOS SUBMETIDOS NÃO VINCULADOS AO PROJETO

### ANEXO B (1) – Effect of lower limb immobilization on the sciatic nerve of rats: A Systematic Review



### ANEXO B (2) - Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats.



## ANEXO C – RESUMOS APRESENTADOS E PUBLICADOS VINCULADOS AO PROJETO

AMORIM, T. S.; SILVA, R. E. R.; **SILVA, A. A.** ; MORAIS, L. P.; ALMEIDA, N. S. ; BASTOS, C. M. S.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R.; BARBOSA, ROSELI . Efeito miorelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seus constituintes majoritários citral e limoneno sobre aorta isolada de ratos. In: III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017, Fortaleza - CE. III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017.

ALMEIDA, N. S.; MORAIS, L. P.; BASTOS, C. M. S.; AMORIM, T. S.; **SILVA, A. A.**; FERNADES, A. K. S.; MENEZES, I. R. A.; BARBOSA, ROSELI . ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA ALBA (MILL.) N. E. BROWN E SEUS CONSTITUENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E L-LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATAS Wistar. In: III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017, Fortaleza - CE. III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017.

FERNADES, A. K. S.; MORAIS, L. P.; **SILVA, A. A.**; ALMEIDA, N. S.; AMORIM, T. S.; BASTOS, C. M. S. ; PEREIRA JUNIOR, M. R. ; MILFONT, C. G. B.; SANTOS, C. S. L.; BARBOSA, ROSELI . ESTUDOS FARMACOLÓGICOS DO OCIMUM BASILICUM E DO LINALOL SOBRE A MUSCULATURA LISA DE ÚTERO. In: III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017, Fortaleza - CE. III Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017.

AMORIM, T. S.; **SILVA, A. A.**; MORAIS, L. P.; ALMEIDA, N. S.; KERNTOPF, M.R.; ROSELI, BARBOSA. EFEITO MIORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO SOBRE AORTA ISOLADA DE RATOS. In: III Congresso Regional da Sociedade de Biofísica, 2017, Fortaleza. III Congresso Regional da Sociedade de Biofísica, 2017.

DÉBORA DE MENEZES DANTAS, LUÍS PEREIRA DE MORAIS, **ANDRESSA DE ALENCAR SILVA**, ISAAC MOURA ARAÚJO, MARTA REGINA KERNTOPF e ROSELI BARBOSA; Uso de artérias umbilical humana como método alternativo para uso de animais: avaliação do efeito miorelaxante do citral, VI Animal Lab ISCB/UECE 2018 - Encontro de Ciência de Animais de Laboratório, realizado no período de 4 a 31 de maio de 2018.

ISAAC MOURA ARAUJO, GYLLYANDESON DE ARAÚJO DELMONDES, LUÍS PEREIRA DE MORAIS, **ANDRESSA DE ALENCAR**, FRANCISCO RODOLPHO SOBREIRA DANTAS NÓBREGA DE FIGUEIREDO e MARTA REGINA KERNTOPF. Avaliação do efeito hipnótico/sedativo do óleo essencial de *Hyptis martiusii* benth foi apresentado no evento VI Animal Lab ISCB/UECE 2018 - Encontro de Ciência de Animais de Laboratório, realizado no período de 4 a 31 de maio de 2018.

LUIS PEREIRA DE MORAIS, **ANDRESSA DE ALENCAR SILVA**, DÉBORA DE MENEZES DANTAS, ISAAC MOURA ARAÚJO, RENATA EVARISTA RODRIGUES DA SILVA e ROSELI BARBOSA Envolvimento dos canais iônicos (ca<sup>++</sup> e k<sup>+</sup>) sobre a ação

tocolítica do óleo essencial de *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown e seus constituintes majoritários citral e limoneno em miométrio isolado de rata VI Animal Lab ISCB/UECE 2018 - Encontro de Ciência de Animais de Laboratório, realizado no período de 4 a 31 de maio de 2018.

**ANDRESSA DE ALENCAR SILVA, LUÍS PEREIRA DE MORAIS, ISAAC MOURA ARAÚJO, CARLA MIKEVELY DE SENA BASTOS, THAÍS DE SOUZA AMORIM e ROSELI BARBOSA;** Avaliação do efeito do ácido cafeíco e rutina sobre musculatura lisa de aorta isolada de ratos wistar. VI Animal Lab ISCB/UECE 2018 - Encontro de Ciência de Animais de Laboratório, realizado no período de 4 a 31 de maio de 2018.