



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA

PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PRPGP

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR - PPBM

LUÍS PEREIRA DE MORAIS

ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN (CIDREIRA) E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATAS WISTAR.

CRATO – CE

2017

LUÍS PEREIRA DE MORAIS

ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWNE (CIDREIRA) E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATAS WISTAR.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Bioprospecção de produtos naturais

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Roseli Barbosa

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

CRATO-CE

2017

Catálogo na fonte

Cícero Antônio Gomes Silva – CRB-3 nº 008/1

M827a MORAIS, Luis Pereria de.

Atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia alba* (MILL.) N.E. Browne (Cidreira) e seus constituintes majoritários citral e limoneno em útero isolado de ratas wistar. / Luis Pereira de Moraes; Crato - CE, 2017. 92f.il.

Mestrado em Bioprospecção molecular.
Universidade Regional do Cariri – URCA,2017.
Orientadora: profa.Dra. Roseli Barbosa

1. *Lippia alba*. 2. Útero. 3. Efeito miorelaxante

CDD: 574

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, da Universidade Regional do Cariri, como requisito, para obtenção do título de mestre.
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 encontra-se a disposição da biblioteca setorial do referido programa.

Dissertação aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Roseli Barbosa (Orientadora)

Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof.^a. Dr.^a. Marta Regina Kerntopf (Membro Interno)

Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof.^o. Dr. José Henrique Leal-Cardoso (Membro Externo)

Universidade Estadual do Ceará-UECE

Prof.^o. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha (Suplente)

Universidade Regional do Cariri-URCA

CRATO-CE

2017

O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar, o luto, o desalento e a lamentação. E por isso, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento e enxergamos e ouvimos e sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas essas coisas nós temos de suportar do encéfalo quando não está sadio... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce o maior poder sobre o homem.

(Hipócrates, Sobre a doença Sagrada - Séc. IV a. C)

Dedicatória

Dedico à minha família, em especial aos meus pais, **Maria do Carmo pereira da Silva Moraes** e **José Alves de Moraes**. À minha irmã **Eliane Pereira de Moraes** e minha sobrinha **Ysadora de Moraes Silva**.

Agradecimentos

À **Deus**, pela vida, pela saúde e por ter me proporcionado desenvolver este trabalho, e por ter encontrado pessoas maravilhosas ao longo dessa jornada.

Aos **animais de experimentação** utilizados neste trabalho, todo o meu respeito e gratidão.

À minha **família**, em especial aos meus pais, **Maria do Carmo Pereira da Silva Moraes** e **José Alves de Moraes**, pela educação que eles me ofereceram durante minha existência, pois foi por meio deles que me tornei o ser humano que sou hoje.

À minha orientadora, **Dra. Roseli Barbosa** por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa, pelos constantes ensinamentos, pela sua amizade durante esses últimos seis anos de minha vida e principalmente pela paciência que teve comigo e ter aceitado enfrentarmos juntos esse desafio de projeto.

Ao meu co-orientador, **Dr. Irwin Rose Alencar de Meneses**, pelos inúmeros ensinamentos e contribuições por sempre se colocar disponível à ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

À professora, **Dra. Marta Regina Kerntopf**, por todo apoio, amizade, ensinamentos e por sempre ter sido solícita todas as vezes que à procurei. Grato.

Aos professores, **Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha**, **Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho**, **Dr. Lécio Leone de Almeida**, **Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga** pelos ensinamentos, incentivos e contribuições.

Ao professor **Dr. José Henrique Leal Cardoso** do Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará – UECE, pelas inúmeras substâncias cedidas, e por sempre esta disposto a contribuir com este trabalho.

Ao técnico **Pedro Militão** do Laboratório de Eletrofisiologia da Universidade Estadual do Ceará – UECE, pelos ajuda prestada durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao obstetra **Dr. Carlyle Aquino Sátiro Oliveira** pelos ensinamentos e explicativas a cerca deste trabalho e por sempre ter sido solícito todas as vezes que o procurei.

À doutoranda **Paula Benvindo Ferreira** da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, por ter disponibilizado parte do seu tempo para me repassar a técnica de se trabalhar com útero de rata.

Ao atual coordenador do mestrado **Dr. Robson Waldemar Ávila** e as secretárias **Manuella Fernandes** e **Maria Andeciele Rolim de Brito**, por estarem smp dispostos a nos ajudar.

Às minhas colegas de mestrado e amigas **Adressa de Alencar Silva**, **Cicera Datiane de Moraes Oliveira**, **Enaide Soares Santos**, **Janete de Souza Bezerra**, **Jeane Dantas**

Souza e Renata Evaristo Rodrigues da Silva pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração nesses últimos anos.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis **Carla Mikevely de Sena Bastos, Cícero André Ferreira Macêdo Cristina Rodrigues dos Santos, Cicera Georgia Brito Milfont, Maria Franciele Lima Gomes, Murilo Rocha Pereira Junior, Nayane de Sousa Almeida, Thais de Souza Amorim, Tiago Feitosa Ribeiro**, pelo tempo dedicado a me ajudar nos experimentos desta pesquisa.

Aos Amigos **Cicero Pedro da Silva Junior, Lucas Alves Lima, Isaac Moura Araújo, Saulo Relinson Tintino**, pelos inúmeros momentos alegres que passamos e dessa forma tornando mais leve esse processo.

Aos meus colegas da residência multiprofissional em Saúde Coletiva em especial aos quatro que fazem parte do grupo verde, **Ana Ravene Bezerra Amorrin, Antônia Vanessa Vieira de Queiroz, Ícaro Amâncio Freitas Vidal e Lívia Monteiro Rodrigues**, pelos momentos de alegrias e incentivo nesses últimos meses.

À todos do **Laboratório de Farmacologia e Química Molecular – LFQM, Laboratório de Farmacologia dos Produtos Naturais – LFPN, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular – LMBM e Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN**, obrigado.

À todos os funcionários da **Universidade Regional do Cariri – URCA**, minha sincera gratidão.

À **FUNCAP, CNPq e CAPES** pelo apoio financeiro.

RESUMO

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro. Popularmente chamada de erva cidreira, erva-cidreira-brasileira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, sálvia, entre outras sinónímias. Tem seu uso popular devido suas propriedades sedativas, carminativas, analgésicas, espasmolítica e emenagoga. Sabe-se que a contração da musculatura lisa uterina antes de completar as 37 semanas de gestação desencadeia o parto prematuro, uma vez que não há relatos na literatura a respeito da ação da *L. alba* sobre a musculatura lisa do útero. O objetivo desse estudo é investigar a ação do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e seus constituintes citral e limoneno sobre a contração da musculatura lisa uterina de ratas e avaliar seus possíveis mecanismos de ação. Para desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados ratas da linhagem Wistar, com massa corpórea entre 180-250 g. Após eutanásia, o útero foi removido, em seguida foi feito um corte vertical em cada um dos cornos para obtenção de tiras de 2 cm de comprimento, os quais foram mantidos em Tyrode modificado aerado, pH 7,4, a 32°C, para registro isométrico das contrações musculares. Para avaliar o efeito do OELa, citral e limoneno, foram administradas concentrações cumulativas (OELa e citral 1-600 µg/mL, e limoneno 1-1200 µg/mL) em tiras de útero, sob tensão de 1 g. OELa, citral e limoneno relaxaram de forma dependente da concentração as preparações de miometrio pré-contraídas por KCl (60 mM) (IC₅₀: 37,96 ± 2,41, 130,90 ± 2,82 e 316,47 ± 3,12 µg/mL, respectivamente), ou previamente contraídas por ocitocina (10⁻² UI/mL) (IC₅₀: 44,96 ± 4,26, 52,48 ± 2,32 e 186,83 ± 2,69 µg/mL, respectivamente). Avaliou-se também o envolvimento de outras vias que promovem a contração da musculatura lisa uterina como a 5-HT e ACh. Verificou-se que as três substâncias em estudo também foram capazes de relaxar a musculatura uterina pré-contraídas por 5-HT 10 µM ou ACh 10 µM. Estes dados demonstram que o OELa, o citral e o limoneno provocam relaxamento da musculatura lisa uterina sendo o OELa e o citral mais potentes que o limoneno. Para avaliar o envolvimento do influxo de cálcio pelos canais para cálcio do tipo L. Realizou-se experimentos com contrações induzidas pelo BaCl (0,1-30 mM) onde o OELa e o citral foram capazes de inibir a contração, cujo comportamento foi similar nas preparações pré-incubadas com a nifedipina (1µM) um bloqueador de canais para cálcio do tipo-L. Foi comparado o efeito das substâncias em estudo com o bloqueador da Rho quinase, Y27632. As substâncias em estudo produziram efeito inibitório similar ao Y27632. Foi observado o efeito do OELa sobre três bloqueadores específicos para potássio: os sensíveis ao cálcio (BK_{Ca}), sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e sensíveis a voltagem (K_V), neste protocolo não apresentou resultados estatisticamente significante. Outro mecanismo analisado foi o efeito do OELa sobre a cicloxigenase bloqueada pela indometacina, onde mais uma vez não foi visto resultado estatisticamente significante. Diante disso observou-se que o OELa, o citral e o limoneno apresentaram efeito antiespasmódico em útero isolado de ratas, revelando assim que este efeito pode ser mediado por mecanismos intracelulares, os quais envolvem a regulação da sensibilidade ao Ca⁺² do sistema contrátil do músculo liso uterino.

Palavras-chave: *Lippia alba*, útero, efeito miorrelaxante.

ABSTRACT

The species *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown belongs to the family Verbenaceae and is very abundant and grows spontaneously throughout the Brazilian territory. Popularly known as the erva cidreira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, sálvia, among other synonyms. It has its popular use due to its sedative, carminative, analgesic, spasmolytic and emmenagogic properties. It is known that the contraction of the uterine smooth muscle before completing 37 weeks of gestation triggers a premature labor, once there are no reports in the literature concerning to the action of *L. alba* over the smooth muscle of the uterus. The purpose of this study is to investigate the action of the essential oil of *L. alba* (OELa) and its citral and limonene constituents, its possible mechanisms of action over an isolated uterus of a female mouse. For the development of this research were used female mice of the Wistar lineage, with body mass between 180-250g. After euthanasia, the uterus was removed, then a vertical cut was performed on each of the horns to obtain strips of 2 cm in length, which were kept in an aerated modified Tyrode, pH 7.4, at 32°C, for isometric recording of muscle contractions. To evaluate the effect of OELa, citral and l-limonene, cumulative concentrations were administered (OELa 1-600 µg / mL, citral 1-600 µM and l-limonene 1-1200 µM) in strips of the uterus, under tension of 1g. OELa, citral, and l-limonene relaxed in a dependent manner of the concentration of the preparation of pre-contracted myometrial KCl (60 mM) (IC₅₀: 37.96 ± 2.41 µg / mL, 130.90 ± 2.82, 316, 47 ± 3,12 µM, respectively), or previously contracted by oxytocin (10⁻² UI/mL) (IC₅₀: 44,96 ± 4,26 µg/mL, 52,48 ± 2,32 e 186,83 ± 2,69 µM, respectively). It was also evaluated the involvement of other pathways that promote contraction of the uterine smooth muscle as 5-HT and ACh. It was verified that the three test substances of this study were also able to relax the pre-contracted uterine muscles by 10 µM 5-HT or 10 µM ACh. These data demonstrate that OELa, citral and l-limonene cause the relaxation of the uterine smooth muscle, with OELa and citral being more potent than limonene. To evaluate the involvement of the calcium influx by the L-type calcium channels, experiments with induced contractions were performed with BaCl (0.1-30 mM) where OELa and citral were able to inhibit the contraction, whose behavior was similar. In the preparations preincubated with nifedipine (1µM) an L-type calcium channel blocker. The effect of the substances under study was compared with the Rho kinase blocker, Y27632. The substances under study produced a similar inhibitory effect to Y27632. The effect of OELa over three specific potassium blockers was observed: the sensitive to calcium (BKca), the sensitive to ATP (KATP) and the sensitive to voltage (KV), in this protocol did not present statistically significant results. Another mechanism analyzed was the effect of OELa on cyclooxygenase blocked by indomethacin, where once again no statistically significant result was seen. It was observed that OELa, citral and l-limonene had an antispasmodic effect in utero isolated from female mice, thus revealing that this effect can be mediated by intracellular mechanisms, that probably involves the regulation of sensitivity to Ca⁺² uterine smooth muscle contractile system.

Key words: *Lippia alba*, uterus, myorelaxant effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia das folhas da espécie de <i>L. alba</i>	24
Figura 2	Estrutura química do citral e seus isômeros.....	25
Figura 3	Estrutura química dos enantiômeros do limoneno.....	27
Figura 4	Útero de rata wistar.....	28
Figura 5	Representação esquemática da contração e do relaxamento do músculo liso uterino no acoplamento farmacomecânico.....	32
Figura 6	Esquema ilustrativo do sistema utilizado para registro das contrações...	42
Figura 7	Esquema ilustrativo do protocolo 1, via eletromecânica.....	43
Figura 8	Esquema ilustrativo do protocolo 2, via farmacomecânica.....	43
Figura 9	Esquema ilustrativo do protocolo 3, via da serotonina.....	44
Figura 10	Esquema ilustrativo do protocolo 4, via da acetilcolina.....	44
Figura 11	Esquema ilustrativo do protocolo 5, envolvimento dos VOCCs.....	45
Figura 12	Esquema ilustrativo do protocolo 6, bloqueadores para canais de potássio.....	46
Figura 13	Esquema ilustrativo do protocolo 7, via da Rho cinase.....	47
Figura 14	Esquema ilustrativo do protocolo 8, via das cicloxigenase.....	47
Figura 15	A. Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em preparações de tecido miometrial de rata contraído com K^+ (60 mM). B. Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em preparações de tecido miometrial de rata contraído com Ocitocina 10^{-2} UI/mL. C. Gráfico do efeito do OELa, citral, e limoneno sobre o componente contrátil gráfico do efeito do OELa, citral, e limoneno sobre o componente contrátil da ACh. As concentrações utilizadas foram: 600 μ g/mL de OELa e citral ou 1000 μ g/mL de limoneno.....	55
Figura 16	A. Efeito do OELa, citral (600 μ g/mL), e limoneno (1000 μ g/mL) em contrações evocadas por Ba^{2+} exógeno, Nifedipina (1 μ M) foi usado como controle positivo. B. Envolvimento dos canais para potássio no relaxamento uterino promovido pelo OELa em contrações promovidas por Ocitocina 10^{-2} UI/mL.....	57
Figura 17	A: Gráfico do efeito relaxante do Y27632 (1 μ M), OELa e citral (600	

µg/mL) e limoneno (1000 µg/mL) sobre o platô de contração em tiras miométriais isoladas de rata induzida KCl 80 µM. **B:** Avaliação do envolvimento das cicloxigenases por meio do seu bloqueio pela indometacina (100 µM) no relaxamento promovido pelo OELa (600 µg/mL).....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Lista de plantas do gênero <i>Lippia</i> com efeito antiespasmódico comprovado.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

4-AP - 4-aminopiridina

5-HT - Serotonina

[Ca²⁺]_i - Concentração intracelular de cálcio

0Ca²⁺ - Solução de Tyrode isenta de cálcio

AE - Agente em estudo

ACh - Cloridrato de Acetilcolina

ANOVA - Análise de variância

Bloq - Bloqueador

BK_{Ca} - Canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca²⁺

CaM - Calmodulina

CEUA - Comissão de Ética e Uso de Animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DAG - Diacilglicerol

EGTA - Ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético

GTP - Guanosina trifosfato

IP3 - Trifosfato de inositol

IC₅₀ - Concentração de uma substância que inibe 50% do efeito máximo produzido por um agonista

K_{ATP} - Canais para potássio sensíveis ao ATP

K_V - Canais para potássio abertos por voltagem

M - Molar

mM - Milimolar

MLCK - Cinase da cadeia leve da miosina

MP - miosina fosfatase

MS - Ministério da saúde

nM - nanomolar

OELa - Óleo essencial de *Lippia alba*

OT - Ocitocina

PADETEC - Parque de Desenvolvimento Tecnológico

PIP2 - Bifosfato de fosfatidilinositol

PKC - Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

PMCA - Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática

RhoK - Rho cinase

ROCCs - Canais de cálcio operados por receptores

RS - Retículo Sarcoplasmático

SOCCs - Canais de cálcio operados por estoque

SUS- Sistema único de saúde

TM - Tyrode modificado

TEA⁺ - Íon tetraetilamônio

UI - Unidade Internacional

μM - Micromolar

μg - Micrograma

VOCCs - Canais de cálcio operados por voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Gênero <i>Lippia</i>	23
2.2 Espécie <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	24
2.3 Citral	26
2.4 Limoneno	27
2.5 Musculatura lisa do útero de ratas	29
2.6 Mecanismo de contração da musculatura lisa.....	30
2.7 Mecanismo de contração e relaxamento uterino.....	31
2.8 Prematuridade	33
3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO	36
4 OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo geral	38
4.2 Objetivos específicos	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 Materiais	40
5.1.1 Sais e fármacos	40
5.1.2 Óleo essencial de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	40
5.1.3 Soluções	41
5.1.4 Animais experimentais	41
5.2 Métodos	42
5.2.1 Preparação do tecido.....	42
5.2.2 Medidas da atividade contrátil do útero.....	42
5.2.3 Protocolos experimentais	43
5.2.3.1 Protocolo 1: Efeito tocolítico do OELa, citral e limoneno sobre contração induzida por K ⁺ em útero isolado de rata.....	44
5.2.3.2 Protocolo 2: Efeito tocolítico do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas e sustentadas por ocitocina em útero isolado de rata.....	44
5.2.3.3 Protocolo 3: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por serotonina (5-HT).....	45
5.2.3.4 Protocolo 4: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh).	45

5.2.3.5 Protocolo 5: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por BaCl ₂	45
5.2.3.6 Protocolo 6: Efeito do OELa sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na presença e na ausência de tetraetilamônio (TEA ⁺), 4-aminopiridina (4-AP) ou glibenclamida.	46
5.2.3.7 Protocolo 7: Efeito comparativo do OELa, citral e limoneno com a via da proteína Rho cinase (RhoK), em miométrio de rata.	47
5.2.3.8 Protocolo 8: Efeito do OELa sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na presença e na ausência de indometacina.	48
5.3 Análise estatística	48
6 RESULTADOS	51
6.1 Artigo	51
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÕES	74
9 REFERÊNCIAS	76
10 PRUDUÇÃO CIENTÍFICA	90
11 ANEXOS	93

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação está organizada sob forma de artigo. A Introdução traz inicialmente uma breve abordagem sobre o uso de plantas medicinais e fitoterápicos, logo em seguida uma revisão sobre a espécie *L. alba*, onde esta descrito alguns de seus usos na medicina popular e atividades biológicas comprovadas na literatura. Na revisão ainda aborda o citral, limoneno, musculatura uterina, mecanismo de contração da musculatura lisa, contração e relaxamento uterino e prematuridade. Logo após apresenta-se a justificativa, problematização, objetivos do estudo e os materiais e métodos utilizados para que o trabalho fosse desenvolvido.

Os resultados encontra-se em formato de artigo completo intitulado “Atividade tocolítica do óleo essencial de *L. alba* (mill.) n. e. brown (cidreira) e seus constituintes majoritários citral e limoneno em útero isolado de ratas wistar”.

A discussão e a conclusão são apresentadas em uma visão geral do trabalho, logo após o artigo. As referências dos trabalhos que foram utilizados na revisão e discussão apresentam-se ao final da dissertação.

INTRODUÇÃO



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade as plantas possuem inúmeras finalidades seja na culinária, no artesanato, na construção de abrigos, com fins medicinais, entre outros. No Brasil os tratamentos de doenças por meio da utilização de plantas medicinais foram introduzidos através dos nativos que tinham o conhecimento primário como os nomes populares dos vegetais e suas utilidades para fins terapêuticos em rituais de cura (ARAÚJO, 1977).

O uso de fitoterápicos, ou seja, o tratamento de algumas enfermidades utilizando plantas, é uma prática muito antiga, evidências arqueológicas mostram que 3.000 a.C., já existiam na farmacopeia. Atualmente a fitoterapia ainda é muito exercida e vem ganhando espaço na pesquisa onde foi comprovada cientificamente a eficácia dos princípios ativos das plantas no tratamento de patologias (REZENDE et al., 2002).

Muitas comunidades e grupos étnicos tinham o conhecimento das plantas medicinais como o único recurso terapêutico. Diversos órgãos desses vegetais eram utilizados, como: folhas, flores, cascas, raízes, frutos e o caule. Assim como de diferentes formas, exemplos: Chás, macerados, infusões, decocção e outros, para as mais diversas patologias. Nos dias atuais em regiões pobres ou mesmo nas grandes cidades do Brasil e do mundo, plantas medicinais são cultivadas nos quintais residenciais e comercializadas em feiras ou mercados (MACIEL et al., 2002).

Logo após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil na década de 80 houve uma atenção especial voltada para a medicina popular. Mais tarde, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, instituída pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971, de 03 de maio de 2006, essa política foi criada para ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, dentre estas políticas, foi observado nas plantas medicinais, uma garantia de acesso aos fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade na atenção à saúde. Adicionando-se a isso, o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, instituído em 2007, tem como objetivo “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BADKE et al., 2012).

O óleo essencial de uma planta é composto por um conjunto de substâncias voláteis que produz o aroma da planta, por isso é comum ouvir dizer que quanto mais

aroma uma planta libera maior é sua produção de óleo essencial. Na composição desses óleos encontramos diferentes grupos dentre eles são encontrados terpenos e fenilpropanoides. Os óleos essenciais ganharam amplo espaço na indústria, onde são mais comumente encontrados na indústria de cosméticos, na composição de perfumes e na indústria farmacêutica com ação analgésica, antisséptica, sedativa, expectorante entre outros (GONÇALVES et al., 2003). Sendo que para finalidades terapêuticas eles podem ser administrados pela via oral, inalatória, uso tópico e na superfície do corpo acompanhado de massagens. As moléculas dos componentes ativos dos óleos essenciais têm servido como modelos de estudos de relação entre estrutura química e ação farmacológica, a partir do qual se desenvolvem novos fármacos com maior eficácia e seletividade (SCHENKEL et al., 2000).

Por apresentarem algumas vantagens sobre os fármacos sintéticos como: a maioria dos produtos naturais apresentam uma baixa toxicidade e baixo custo, cada vez mais se tem investido na busca de princípios ativos provenientes dos vegetais. Sendo assim, atualmente os óleos essenciais, são os principais alvos de estudo dos pesquisadores, pois são em sua maioria, constituídos de grupos químicos que agem no organismo curando diversas enfermidades (TUROLLA, 2004).

Dentre os produtos naturais a espécie *L. alba* é bastante estudada por ser muito utilizada na medicina popular, assim, por não haver na literatura estudos descrevendo seus efeitos na musculatura lisa de útero de ratas e o gênero *Lippia* apontar relevantes propriedades em outros órgãos constituídos de músculo liso, viu-se a importância de se estudar a ação do óleo essencial da *L. alba* e seus constituintes sobre a musculatura lisa de útero de ratas, uma vez mostrando que esses produtos possuem atividade tocolítica, pode ser um potencial fármaco para o uso em gestantes, sendo que neste período as mulheres tem que fazer uso de substâncias o menos tóxico possível e com menos efeitos adversos.

REVISÃO DE LITERATURA



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* inclui aproximadamente 200 espécies, é o segundo maior da família Verbenaceae, incluindo espécies e variedades que estão amplamente distribuídas nos neotrópicos apresentando-se na forma de ervas, arbustos ou pequenas árvores. Descrições dadas por vários autores, entre 1849 a 1969, apontavam para uma estimativa de 400 espécies para o gênero *Lippia*. Por outro lado, sabe-se que esta estimativa incluía espécies de vários outros gêneros que atualmente foram descritos e visto que não faziam parte do gênero *Lippia*, tais como *Acantholippia*, *Aloysia* e *Phyla* (MOLDENKE, 1973).

Inúmeras espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular de diversas formas, por exemplo: as infusões das folhas, parte aérea e flores são tradicionalmente utilizadas como loção tópica para tratamentos de pele, transtornos respiratórios e gastrointestinais (MATOS, 2000).

O gênero *Lippia* está distribuído nas regiões tropicais da África, América do Sul e Central (MATOS, 2000). Os principais centros de diversidade específica do gênero estão localizados no Brasil e no México. No Brasil, o maior número de espécies se encontra na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (SALIMENA-PIRES, 1998).

Este gênero possui inúmeras espécies que já foram estudadas e evidenciadas várias atividades farmacológicas, dentre elas a atividade antiespasmódica, como podemos ver no quadro 1.

Quadro 1: Lista de plantas do gênero *Lippia* com efeito antiespasmódico comprovado.

ESPÉCIE	ÓRGÃO E ANIMAIS	AUTOR E ANO
<i>Lippia alba</i>	Duodeno e íleo de rato	BLANCO, et al., (2013)
<i>Lippia citriodora</i>	Jejuno de rato	MAMADOU, et al., (2011)
<i>Lippia dulcis</i>	Brônquios de porco	GÖRNEMANN, et al., (2008)
<i>Lippia integrifolia</i>	Jejuno de rato	GORZALCZANY, et al., (2008)
<i>Lippia microphylla</i>	Útero de rata	SILVA, et al., (2013);
	Íleo de cobaia	OLIVEIRA, et al., (2013)
<i>Lippia sidoides</i>	Traqueia de rato	TEÓFILO, et al., (2012)
<i>Lippia thymoides</i>	Aorta torácica de rato	SILVA, et al., (2016)

2.2 Espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A espécie brasileira *L. alba* (Mill.) N. E. Brown é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro, podendo ocorrer em terras arenosas, nos leitos de rios e à margem de lagos, em áreas onde predomina o clima tropical e subtropical. Ela é popularmente conhecida por erva cidreira, erva-cidreira-brasileira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, sálvia, entre outras sinonímias (MATOS, 2000; PASCUAL et al., 2001). Na medicina popular por apresentar diversas propriedades farmacológicas esta planta é utilizada como: sedativo, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, nas desordens intestinais, doenças hepáticas, cólicas menstruais e antiespasmódico (MATTOS et al., 2007).

Apresenta-se na natureza como um arbusto, de tamanho variável podendo alcançar até um metro e meio de altura, as vezes com ramos pendentes, esbranquiçados e quebradiços folhas ásperas e ovaladas, com bordas serradas e ápice agudo. Apresentam inflorescências de cor lilás na base das folhas, todavia as partes aéreas são as mais utilizadas para fins terapêuticos, preparadas por infusão ou decocção, administradas por via oral (MATOS, 2001).

O óleo essencial da *Lippia alba* (OELa) possui variações nos seus componentes, então, foi sugerido a nomenclatura de seus quimiotipos, sendo: I, II e III, separados de acordo com seus elementos que predominam no óleo essencial: citral, a

carvona e o limoneno (ALMEIDA, 1993; MATOS et al., 1996). Matos et al., (1996) relataram a existência, no Nordeste de três tipos de *L. alba*, caracterizados pelos constituintes químicos de seus óleos essenciais, sendo os de elevado teor de citral e mirceno, o tipo 1; de citral e limoneno, o tipo 2 e de carvona e limoneno, o tipo 3.

A presença dos compostos nos óleos essenciais da *L. alba* podem variar tanto qualitativa quanto quantitativamente, podendo assim variar o quimiotipo da espécie, e isso se deve a influência de vários fatores, climáticos e geográficos, como: as estações do ano, a época de floração, solo, índice pluviométrico, partes da planta e a fase que ela se encontra podem influenciar em conjunto na síntese destes metabólitos (OLIVEIRA et al., 2006; CAMÉLO et al., 2011). (Figura 1).



Figura 1: Aspectos morfológicos das folhas e inflorescência da espécie *L. alba* Fonte: (SILVA, R.E.R, 2016)

Podemos encontrar na literatura, algumas ações biológicas do OELa que já foram comprovadas cientificamente, como: atividade antimicrobiana, citotóxica antiespasmódica (ARANGO et al., 2009; VIANA et al., 1998; TAMPIERE et al., 2005; HENNEBELLE et al., 2008; CARVALHO, 2014). Em outros estudos foi demonstrado que o OELa possui ação sobre o sistema nervoso, como: anestésico, ansiolítico, anticonvulsivante, sedativo e antinociceptivo (CUNHA et al., 2010; HATANO et al., 2012; VIANA et al., 1998). Em um recente estudo realizado pelo nosso grupo verificou-se que o OELa e seu constituinte majoritário citral, agem como bloqueador da excitabilidade neural (SOUSA et al., 2015).

Também foram descritas várias atividades biológicas de extratos e/ou frações polares da espécie *L. alba*, através de estudos *in vitro* que constataram: atividade antioxidante, que preserva o DNA de um possível estresse oxidativo (RAMOS et al., 2003); atividade antimicrobiana evidenciada contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*), causadoras de infecções respiratórias (CÁCERES et al., 1991). Utilizando o extrato hidroalcoólico à 90% de teor alcoólico não foi possível observar atividade antimicrobiana, porém evidenciou-se que o mesmo apresentou atividade antifúngica moderada contra *Candida Krusei* (HOLETZ et al., 2002). Testando o extrato etanólico da raiz de *L. alba* evidenciou-se atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e contra *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Sacrina lutea*, *Xanthomonas campestris* e *Escherichia coli* (MAMUN-OR-RASHID et al., 2012).

O aprofundamento nos estudos acerca das propriedades farmacológicas da *L. alba* adquire importância, para a utilização como agentes terapêuticos, tendo em vista a riqueza de seus constituintes, devendo ser analisados segundo os métodos científicos de ensaios pré-clínicos e clínicos disponíveis, com intuito de fornecer a sociedade melhorias nos tratamentos de diversas patologias relacionadas com a musculatura lisa.

2.3 Citral

O citral, ou 3,7-dimetil-2,6-octadienal, é um monoterpreno de cadeia aberta. O citral do ponto de vista molecular é formado pela junção de dois compostos isômeros, o trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, também conhecido por citral A – geranial e citral B – neral, ambos possuem fórmula molecular igual $C_{10}H_{16}O$, porém possuem estrutura molecular desigual (Figura 2), apresentando-se na constituição dos óleos essenciais de muitos vegetais (OPDYKE, 1979; ARANEDA et al., 2004; MATOS, 2000).

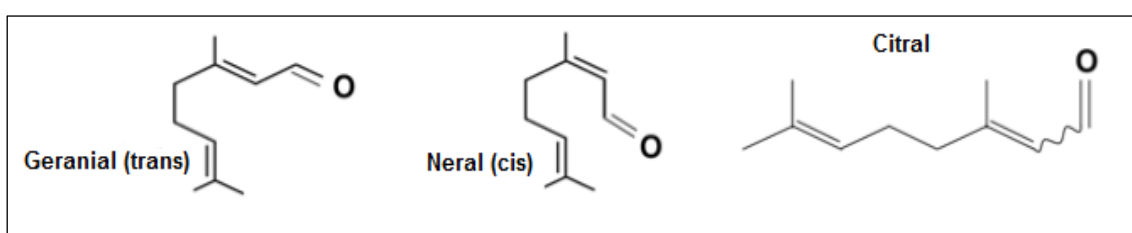


Figura 2: Representação da estrutura química dos trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, estruturas que compõem o citral. **Fonte:** Adaptado (STOTZ, S.C, et al., 2008).

O citral possui um odor bastante intenso e característico, que se compara ao aroma de limão, por possuir esse forte cheiro ele é bastante utilizado pelas indústrias de perfumarias, de produtos de limpeza e ainda na alimentícia, presente em especial na cozinha do Sudeste Asiático (DUDAI et al., 2005; LALKO et al., 2006).

Esse monoterpene é encontrado na composição química de vários óleos essenciais e é possível encontrar o citral na constituição dos óleos essenciais de diversas plantas das quais muitas são utilizadas na medicina popular, as plantas cítricas costumam apresentar o citral na composição dos seus óleos, entre as mais conhecidas com grande teor de citral temos: o capim limão (*Cymbopogon citratus*), a verbena (*Verbena officinalis*), a melissa (*Melissa officinalis*) e nas variadas espécies do gênero *Lippia* como é o caso da *L. alba* (DUDAI et al., 2005).

Em alguns quimiotipos da espécie *L. alba*, em que o citral é seu composto majoritário, foi possível observar algumas atividades biológicas estas podendo estarem atribuídas a esse composto e que se assemelham as citadas para o capim limão, tais como: calmante, antiespasmódica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica e antibacteriana (SILVA et al., 2012; SENA FILHO, et al., 2006).

O citral possui algumas atividades farmacológicas comprovadas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, sedativa, inseticida, desodorizante, expectorante, indutora do apetite, espasmódica e diurética (CARLINI et al., 1986; CARBAJAL et al., 1989; RICE e COATS, 1994; VALE et al., 1999; DO VALE et al., 2002; FISHER e PHILLIPS, 2006; KIM et al., 2006; SANTORO et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2008). Este monoterpene coíbe a gênese de óxido nítrico em lipopolissacarídeo (LIN et al., 2008). Se utilizado em altas concentrações ele possui efeito no retardamento do efeito ansiogênico (DO VALE et al., 2002). Foi demonstrado ainda ação anti-inflamatória e antinociceptiva (LIN et al., 2008; ORTIZ et al., 2010). Estudos apontam que ele possui efeito sobre o sistema nervoso bloqueando o potencial de ação composto (SOUSA et al., 2015).

2.4 Limoneno

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno (Figura 3) com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$ é um monoterpene monocíclico podendo ser encontrado na composição dos óleos essenciais de diversas espécies de plantas sendo muitas dessas

medicinais, das quais, encontram-se a *L. alba* e *Artemisia dracuncululus*, além de ser encontrado nos óleos essenciais de plantas cítrica como limão, laranja e tangerina (AMARAL, et al., 2007). Por possuir aroma cítrico, o limoneno é muito utilizado como fragrância pelas perfumarias, sabonetes, alimentos e bebidas (SUN, 2007).

Esse monoterpene é uma molécula quiral e pode ser abundantemente encontrado na natureza na forma de dois enantiômeros. S-(-)-limoneno ou L-limoneno é o composto encontrado principalmente em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, já o R-(+)-limoneno ou D-limoneno é o constituinte majoritário dos óleos das cascas de laranja e limão, tendo como funções naturais principais nas plantas prevenção contra desidratação e inibição de crescimento microbiano (DEMYTTENAERE et al., 2004).

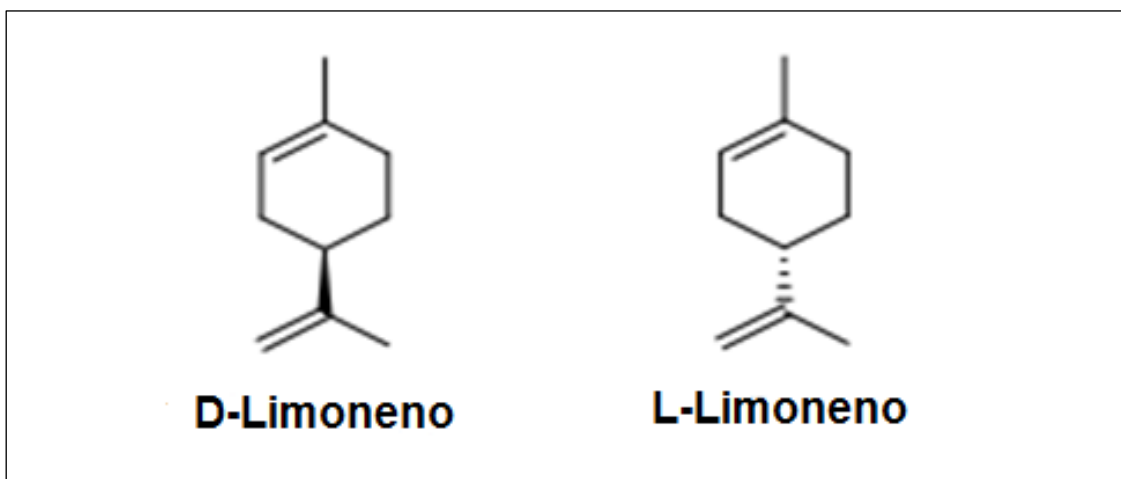


Figura 3. Estrutura química dos enantiômeros do limoneno, o (R)-limoneno e o (S)- limoneno, respectivamente. **Fonte:** Adaptado (LEAL, L.H.Q, 2011).

Vários estudos foram realizados com o intuito de demonstrar alguns efeitos desse monoterpene. Hirota et al., (2010) sugeriram que o limoneno pode ser eficaz no tratamento da asma brônquica, uma vez que ele possui efeito anti-inflamatório que, provavelmente, ocorre pela inibição de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inativação da migração de eosinófilos. Rozza et al., (2011) demonstraram que esse composto possui atividade gastroprotetora em modelos de úlcera gástrica induzidos por indometacina e etanol. O limoneno apresenta também atividade quimiopreventiva para câncer de mama, pulmão, pele e fígado (CROWELL et al., 1997).

O limoneno tem apresentado diversas atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana do óxido de limoneno, (KIM et al., 1995; ARRUDA et al.,

2006), atividade antifúngica do análogo sintético, do óxido de limoneno (BELETTI et al., 2004), atividade antitumoral do limoneno, do óxido e de seus derivados (AGGARWAL et al., 2006; UEDO et al., 1999; CROWEL, 1999), atividade acaricida e inseticida (IBRAHIM et al., 2001; PRATES et al., 2002; JAENSON et al., 2005) e atividade antiparasitária (RATES et al., 2001; ROSA et al., 2003; ANTHONY et al., 2005).

2.5 Musculatura lisa do útero de ratas

O sistema reprodutor de ratas é composto pela vagina, um par de ovários e um conjunto de ductos sexuais (oviduto, cornos uterinos sendo esses em pares) (Figura 4), os quais tem a função de transportar os oocistos, proteger o embrião durante o desenvolvimento em caso de fertilização e a saída dos fetos durante o parto (ANDERSEN, 2004).

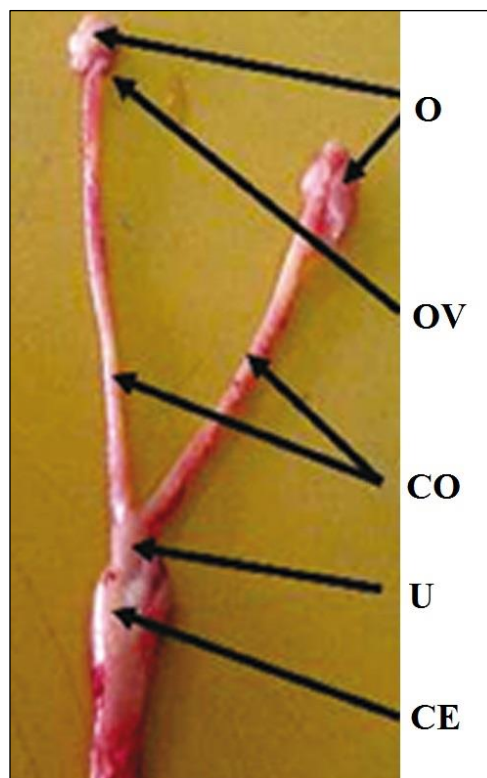


Figura 4: Representação anatômica de útero de rata wistar. Onde é possível observar: (O) Ovário, (OV) Oviduto, (CO) Cornos, (U) Corpo uterino e (CE) Cervix. **Fonte:** Adaptado (AKINLOYE, A.K, et al., 2010).

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, e é

denominado útero duplo ou bifurcado. Em ratas de laboratório (*Rattus norvegicus*) esse órgão é duplo, contínuo contendo dois canais cervicais distintos que desembocam em uma vagina simples (MARTINS et al., 2011) havendo uma importante camada muscular longitudinal em cada corno uterino, a qual se torna transversa caudalmente na junção dos dois cornos uterinos sendo essa camada o miométrio (MARTINS et al., 2009). Em ratas assim como em outras espécies, o miométrio é constituído por duas camadas distintas, a longitudinal exterior e uma camada interna circular com origem, estrutura, função e padrões de contração diferentes. Em animais com um útero bifurcado, por exemplo, na rata, o músculo circular interior e longitudinal exterior, existe uma maior facilidade de separação do que em útero de humano (VEALE et al., 2000; AGUILAR; MITCHELL, 2010).

2.6 Mecanismo de contração da musculatura lisa

Essa musculatura está presente em vários órgãos importantes como vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, útero, vias respiratórias, entre outros (WEBB, 2003).

Existem dois tipos de contração na musculatura lisa, a eletromecânica, que é mediada pelos cátions K^+ ou Na^+ , que promovem uma despolarização na membrana e abrem canais para Ca^{2+} . Outra forma de contração é a farmacomecânica, essa por sua vez é mediada por agonistas como hormônios, que se ligam aos seus receptores e desencadeia o processo de abertura dos canais de Ca^{++} que pode estar na membrana ou no retículo-sarcoplasmático (RS).

O tipo de contração mais comum na musculatura lisa é conduzida principalmente pela promoção de potenciais de ação através da membrana plasmática, ou potenciais de membrana (V_m), que resulta de um aumento transitório da concentração do cálcio $[Ca^{2+}]$ citosólico livre. Esse mecanismo pode ser desencadeado de duas formas, pela liberação dos estoques de cálcio intracelulares $[Ca^{2+}]_i$, que provem principalmente do retículo sarcoplasmático (RS) muito importante nesse tipo de músculo, ou pela sua entrada através de canais para Ca^{2+} na membrana plasmática sendo esses processos denominados farmacomecânico ou eletromecânico. (SOMLYO et al., 1994; RANG, 2007; GRUBER et al., 2011).

2.7 Mecanismo de contração e relaxamento uterino

Um aumento transiente na $[Ca^{2+}]$ no citoplasma é o disparador principal para uma contração do músculo do útero (SHMYGOL et al., 2007). A contração do miométrio é sempre precedida por um aumento na $[Ca^{2+}]$ intracelular. A concentração de cálcio intracelular é relativamente muito baixa (50 – 100 nM) em comparação com a concentração extracelular (2 mM). No entanto, a contração das células musculares lisas, incluindo o miométrio depende principalmente no aumento da $[Ca^{2+}]$ i e de fato isto pode ocorrer por meio das vias do influxo de cálcio a partir do espaço extracelular para dentro da célula e/ou liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (RS). O cálcio pode entrar na célula através de diferentes portas de membrana incluindo canais de cálcio operados por voltagem (VOCCs) em particular do canal de cálcio do tipo L, de cálcio operados por estoque (SOCCs), e/ou através de canais de cálcio operados por receptores (ROCCs). (MCFADZEAN et al., 2002, ALBERT et al., 2003).

Assim como nos outros tipos de musculo liso a contração no miométrio pode ocorrer através de dois mecanismos principais; o eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico. No acoplamento eletromecânico, a unidade principal para o aumento do cálcio intracelular é a despolarização da membrana plasmática. Basicamente, alterando a permeabilidade iônica da membrana celular uterina que leva a geração de um potencial de ação, que, por conseguinte, despolariza a membrana celular e abre os canais de cálcio (Canais de cálcio operados por voltagem (VOCC) / canais de cálcio tipo-L), resultando num influxo de cálcio significativo e a ligação do cálcio à calmodulina (CaM). O complexo cálcio-CaM, em seguida, ativa a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) que irá fosforilar em seguida, a serina 19 na cadeia leve reguladora da miosina (MLC20), permitindo ciclismo ponte cruzada actina-miosina e interação, a hidrólise do Mg-ATP, e a produção de contração (TAGGART et al., 2001).

Durante o acoplamento farmacomecânico, o aumento da $[Ca^{2+}]$ i é provocado pela ligação de um agonista de receptor em vez de despolarização da membrana (embora possam ocorrer mudanças no potencial da membrana). Quando agonistas, como a ocitocina ou prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ligam-se ao seu receptor específico na membrana plasmática, que pode fazer com que a pequena monomérica proteínas-G se ligue a GTP e ativam a fosfolipase C (PLC). Este posteriormente cliva fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) na membrana celular e produz o inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol

(DAG) segundos mensageiros. O IP₃, em seguida, se liga ao seu receptor específico na superfície do retículo sarcoplasmático (RS) e aumentando assim a [Ca²⁺] i e o DAG por sua vez, ativa proteína quinase C (PKC) (OTAIBI, 2014) (Figura 5).

Para que ocorra o relaxamento na musculatura uterina é necessário que haja uma queda na [Ca²⁺] i que se dissocia gradualmente da calmodulina e, eventualmente, diminuindo a ativação do MLCK. O cálcio é retirado do citosol por bombas de cálcio que movem o cálcio contra o seu gradiente de concentração através da membrana plasmática ou retículo sarcoplasmático. A remoção de cálcio se dá através de proteínas específicas; estas são Ca²⁺-ATPase na membrana plasmática (PMCA), e Na⁺ / Ca²⁺ (sodium-calcium exchanger-NCX), e SERCA no retículo sarcoplasmático. O PMCA transporta o cálcio do citoplasma para o espaço extracelular à custo de hidrólise de ATP. NCX permite uma troca de íons de cálcio para o meio extracelular em troca com três íons do sódio para o meio intracelular. Além disso, as bombas SERCA, permite a entrada do cálcio que está no citoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático usando ATP, o papel da SERCA no sequestro do cálcio para o RS foi investigado em miométrio ratas grávidas (SHMIGOL et al., 1999, TAGGART et al., 1998) (Figura 5).

Além das vias de contração existentes no músculo liso, existem vias de modulação desta contração, como é o caso da Rho cinase (ROK). A inibição da miosina fosfatase (MP) fundamenta o fenômeno de sensibilização ao Ca²⁺, que ocorre em resposta à ativação da cascata de sinalização RhoA da proteína G monomérica. A RhoA ativa a Rho cinase, que, por sua vez, inibe a MP por mecanismos direto e indireto. A inibição direta da MP pela ROK ativada envolve a fosforilação da ROK da subunidade da MP de ligação à miosina (MBS). A inibição indireta da MP pela ROK ativada abrange a fosforilação do CPI-17, proteína endógena de 17 kDa, que, então, inibe a MP.

Os hormônios/agonistas, como as catecolaminas (atuando nos receptores α 1-adrenérgicos), a vasopressina, a endotelina, a angiotensina e os agonistas muscarínicos, aumentam a sensibilidade da contração do músculo liso ao Ca⁺⁺, por meio da sinalização RhoA/ ROK. A ROK também pode ser ativada pelo ácido araquidônico e inibida pelo Y-27632, inibidor altamente específico. 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 G-acoplados 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. A hiperatividade da cascata de

sinalização RhoA/ ROK tem sido implicada em várias condições patológicas, como a hipertensão e o vasospasmo (BERNE & LEVY, 2009).

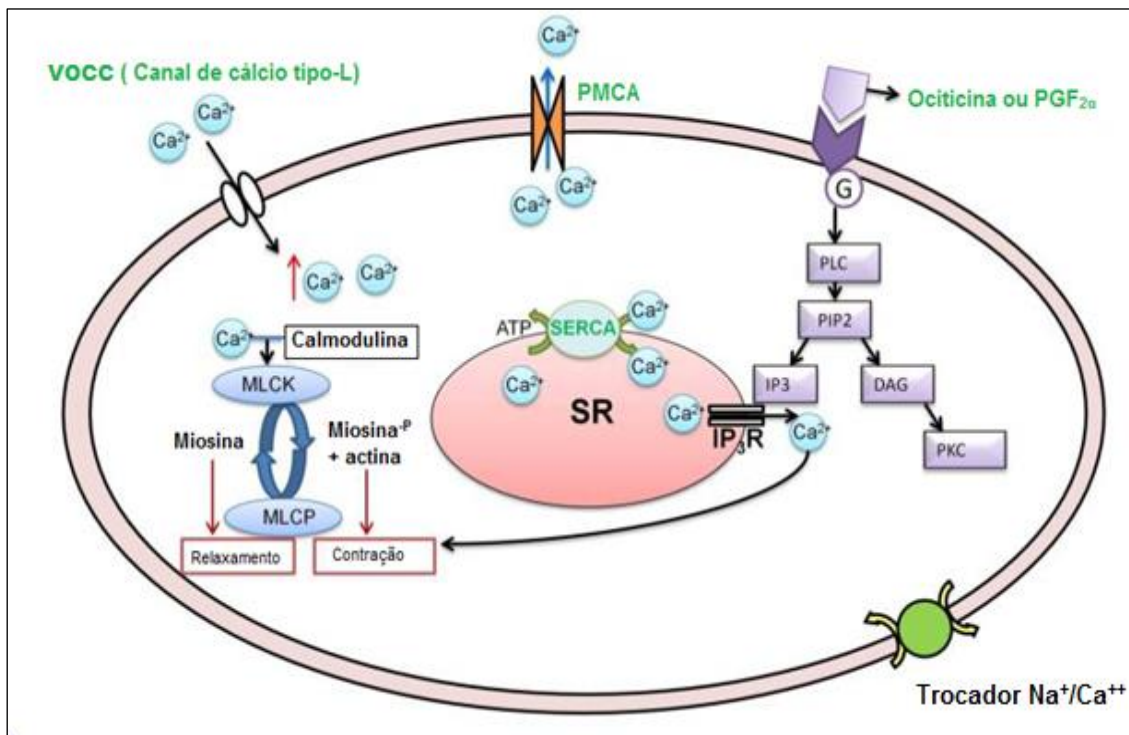


Figura 5: Representação mostrando a entrada de cálcio e o início da contração do músculo liso uterino. A despolarização da membrana plasmática abre os VOCC do tipo-L resultando em um influxo de Ca^{2+} para a célula. O cálcio, em seguida, forma um complexo de proteína com calmodulina e ativa a miosina-quinase de cadeia leve que, em seguida fosforila a cadeia leve da miosina (P). Miosina fosforilada se liga com a actina e inicia ciclisto ponte cruzada levando a contração uterina. Por outro lado, o relaxamento é provocado pela desfosforilação da cadeia leve de miosina por fosfatase da cadeia leve de miosina e extrusão de cálcio para o exterior da célula através de um transporte ativo de cálcio através da Ca^{2+} -ATPase na membrana plasmática e/ou sequestro para o RS por bombas de SERCA e/ou de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$. Ocitocina e outros estimulantes uterinos aumentam a contração através da ligação ao seu receptor específico na membrana da célula e ativa a proteína G, que por sua vez liga-se a GTP monoméricos e promove a ativação da PLC, que subsequentemente cliva o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) na membrana celular e gera trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) segundos mensageiros. IP₃, em seguida, liga-se ao seu receptor específico na superfície do RS e, assim, aumenta a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. DAG ativa PKC. **Fonte:** Adaptado (OTAIBI, M.A.L, 2014).

2.8 Prematuridade

A prematuridade se dá pela interrupção da gravidez antes de completar as 37 semanas de gestação, podendo ser classificada como eletiva ou espontânea dependendo da evolução clínica, porém se essa interrupção se der no primeiro trimestre denomina-se aborto. A musculatura uterina é vista por ser uma estrutura que é responsável pelo desencadeamento do parto prematuro provocado por suas contrações antes de completar 37 semanas de gestação.

No caso da prematuridade eletiva, a gestação é interrompida por motivos de complicações maternas (por exemplo, doença hipertensiva, descolamento prematuro de placenta, placenta prévia etc.) e/ou fetais (por exemplo, restrição do crescimento fetal ou sofrimento fetal), em que o fator de risco é geralmente conhecido e corresponde a 25%, podendo chegar a 35,2% quando gestações múltiplas são incluídas (BITTAR et al., 2009; RADES et al., 2004). Enquanto que os casos de prematuridade espontânea correspondem a 75% e decorre do trabalho de parto prematuro. Como nesse caso, a etiologia é complexa e multifatorial ou desconhecida. Tornando-se mais difícil a implementação a prevenção primária, restando apenas, a prevenção secundária ou terciária. Com a melhora na detecção de alguns casos clínicos como, modificações do colo uterino e/ou as reações bioquímicas, torna-se possível adotar medidas preventivas secundárias e também terciárias, tais como repouso, cerclagem do colo uterino, uso da progesterona, tocólise, corticoterapia antenatal e transferência da gestante para uma maternidade de atendimento terciário (BITTAR et al., 2009).

A principal causa de morbidade e mortalidade neonatal é a prematuridade, sendo responsável por 75% das mortes neonatais, sendo que a morbidade está diretamente relacionada aos distúrbios respiratórios e às complicações infecciosas e neurológicas (RADES et al., 2004).

Neste sentido, o uso dos tocolíticos betamiméticos, pode ser citado como um dos principais métodos utilizados na área da obstetrícia para reverter o trabalho de parto prematuro, conseqüentemente reduz a morbi-mortalidade neonatal relacionada a este evento (KEIRSE, 1984; KEIRSE et al., 1993,).

JUSTIFICATIVA



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

3 JUSTIFICATIVA E PROBLEMATIZAÇÃO

Nos levantamentos de estudos científicos tem mostrado que do ponto de vista farmacológico, a *L. alba* é, provavelmente, a espécie mais estudada do gênero *Lippia* (HENNEBELLE et al., 2008). Como visto anteriormente, diversos efeitos foram comprovados, como: antiviral, antifúngica, antioxidante, sedativa, anticonvulsivante e antiespasmódica intestinal (MONTEIRO et al., 2007), também foi demonstrado a sua ação antiespasmódica em traqueia isolada de ratos (CARVALHO, 2014).

O útero possui em sua estrutura uma musculatura lisa cuja sua contração antes de completar 37 semanas de gestação pode provocar o parto prematuro. Sendo que a prematuridade vem crescendo nos últimos anos e ainda são escassos os fitoterápicos com ação tocolítica. Tendo em vista a importância de elucidar este efeito em fitoterápicos com o intuito de minimizar os efeitos colaterais uma vez que os sintéticos atuais apresentam inúmeros destes efeitos como: hiperglicemia, hipocalcemia, hipotensão, insuficiência cardíaca, arritmias, taquicardias, isquemia miocárdica e edema pulmonar.

Entretanto até o momento não há relatos na literatura que demonstre o efeito do OELa sobre a musculatura lisa uterina. Com base nestes dados, faz-se necessário elucidar seus efeitos e de seus constituintes citral e limoneno em miométrio. Acredita-se que este estudo dará uma melhor compreensão do mecanismo de ação do OELa e seus compostos citral e limoneno sobre musculatura lisa uterina, e assim caracterizar suas atividades terapêuticas.

OBJETIVOS



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a atividade tocolítica do óleo essencial de *L. alba* e seus constituintes majoritários citral e limoneno, caracterizando seus mecanismos de ação sobre o útero isolado de ratas wistar.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito do OELa e seus constituintes majoritários citral e limoneno sobre contrações do miométrio induzidas por KCl;
- Avaliar o efeito do OELa, citral e limoneno nas vias da ocitocina, acetilcolina e serotonina;
- Verificar a ação do OELa, citral e limoneno sobre os canais para Ca^+ utilizando o BaCl_2 e o inibidor da Rho quinase.
- Investigar o efeito do OELa sobre os canais para potássio;
- Avaliar o efeito do OELa sobre a cicloxigenase.

METODOLOGIA



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

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 das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, (Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) e Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantidas sob condições indicadas pelo fabricante.

Para preparação das soluções foram utilizadas as seguintes substâncias: cloreto de potássio (KCl), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), glicose ($C_6H_{12}O_6$), fosfato de sódio (NaH_2PO_4), carbonato de sódio ($NaHCO_3$) cloridrato de acetilcolina (Ach), ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), Tween. As concentrações foram expressas em milimol/litro (mM).

Foram utilizados fármacos de acordo com os fins destinados, tendo controle do seu uso e armazenamento, tais como: Ocitocina, dietilestilbestrol, serotonina (5-HT), nifedipina e Y27632.

5.1.2 Óleo essencial de *L. alba* (Mill.) N. E. Brown

O óleo essencial de *L. alba* (Mill.) N. E. Brown que utilizamos foi fornecido pelo Dr. Sergio Horta (Fazenda experimental da UFC) e analisado no Laboratório de Produtos Naturais e do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará. Os componentes identificados como majoritários na amostra de OELa, o citral 61,65% [geranial (35,84%) e neral (25,81%)] e o limoneno (15,69%), foram adquiridos da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). O acompanhamento dos constituintes presentes no OELa foi realizado através de técnicas cromatográficas, analisados no PADETEC.

5.1.3 Soluções

A solução nutritiva de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) possui a seguinte composição em mM: NaCl=136; KCl=5,0; MgCl₂=0,98; NaH₂PO₄=0,36; NaHCO₃=11,9; CaCl₂=2,0 e C₆H₁₂O₆=5,5. A solução nutritiva foi mantida com aeração constante, à temperatura de 32° ± 1 °C e o pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH 1M.

O OELa, citral e limoneno foram diluídos diretamente em Tyrode e tween (0,02%) seguido de agitação em aparelho, vórtex agitador. A serotonina, acetilcolina e BaCl₂ foram dissolvidos em água destilada, já a nifedipina foi diluída em etanol. Todas as soluções estoques foram armazenadas a -4 °C para posterior utilização.

As administrações do OELa, citral e limoneno, bem como do KCl e ocitocina, foram realizadas de modo hipertônica, dos quais foram administrados volumes específicos diretamente nas câmaras do banho para atingir as concentrações finais desejadas nas câmaras do banho de órgão isolado.

A solução isenta de cálcio ou “zero cálcio” (0Ca²⁺) foi produzida com a omissão do CaCl₂ da solução de Tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA.

5.1.4 Animais experimentais

Os animais utilizados foram ratas da espécie *Rattus norvegicus* albinos (virgens) da variedade wistar, pesando entre 180-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri - URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de 23 ± 2 °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.

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA, registrado sob o número de protocolo: 00158/2015.2 (Anexo 1). 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

Os animais foram tratados 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, foram eutanasiados em câmara de CO₂. 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 (10 mL) em temperatura de 32 ± 1 °C. Para estabilização da preparação, esta foi mantida em repouso por ± 1 h antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g, efetuando, neste período, a renovação da solução nutritiva a cada 10 min. Após o período de estabilização, foram evocadas duas curvas consecutivas e do tipo concentração-resposta cumulativas similares ao KCl ou ocitocina com intervalos de lavagem entre eles.

5.2.2 Medidas da atividade contrátil do útero

As tiras uterinas foram montadas, cada uma por vez, no banho de órgão. As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas fixando duas hastes metálicas em cada uma das extremidades das tiras uterinas, sendo: uma haste fixa do equipamento, e outra haste, móvel, conectada, verticalmente, a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), o qual permitia captar a medida de tensão isométrica produzida pelo miométrio, sendo transformadas em sinais elétricos. O transdutor estava conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA) e esse à entrada de 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 análise posterior (Figura 6).

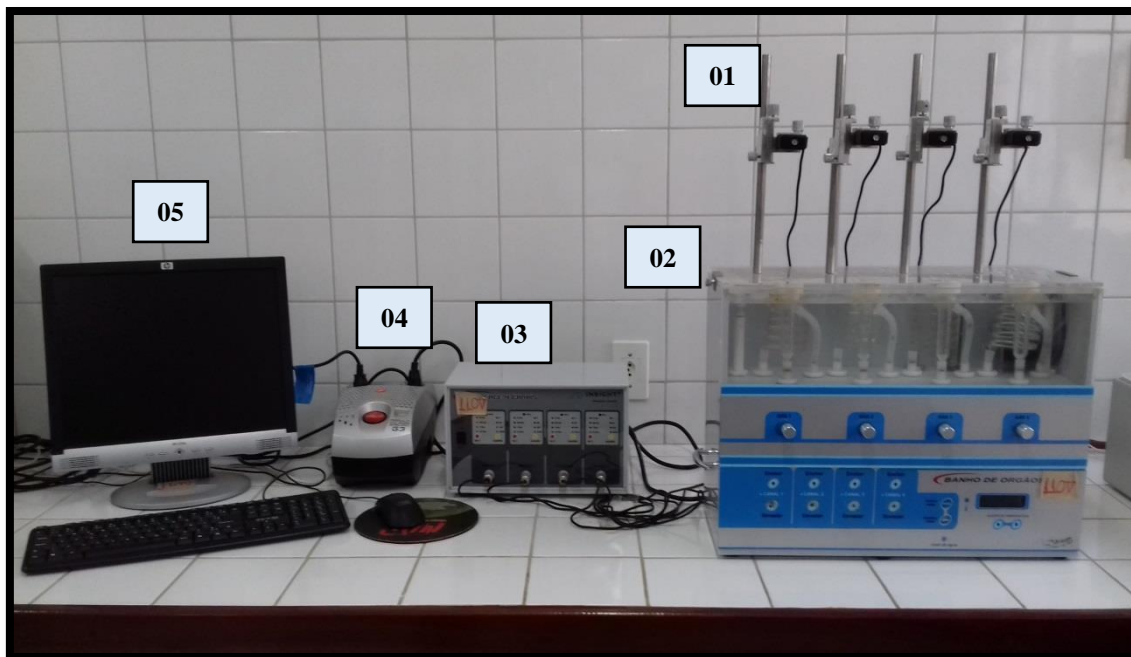


Figura 6: Imagem do equipamento utilizado para medir a resposta mecânica do músculo liso. 01: Transdutores de força mecânica acoplados a hastes fixas de sustentação; 02: Banho de órgãos de quatro cubetas com capacidade para 10 mL; 03: Interface de 4 canais conversora de sinal mecânico em sinal analógico digital; 04: Módulo isolador estabilizado; e 05: Monitor responsável por abrigar software WINDAQ. **Fonte:** Autor (Morais, L.P, 2017).

5.2.3 Protocolos experimentais

Decorrido o tempo de estabilização todos os protocolos iniciaram com duas contrações subseqüentes, com intervalo de 30 minutos, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60), de modo hipertônico, administrados em tiras do miométrio com intervalo de lavagem entre elas. Esta manobra teve a finalidade de avaliar a viabilidade da preparação e a capacidade contrátil do mioétrio isolado. Após a contração induzida pelo K60 atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima da tira. 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 veículo, Tween, diluído em solução de Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais. Mostrando assim que as contrações se matem até o final do experimento, e também que o diluente não está alterando estas contrações.

5.2.3.1 Protocolo 1: Efeito tocolítico do OELa, citral e limoneno sobre contração induzida por K^+ em útero isolado de rata.

Para avaliar o efeito relaxante na contração do músculo liso que ocorre pelo acoplamento eletromecânico, foram administradas concentrações crescentes e cumulativas do OELa e citral (1, 2, 3, 10, 30, 100, 200, 300 e 600 $\mu\text{g/mL}$) e do limoneno (1, 2, 3, 10, 30, 100, 200, 300, 600 e 1200 $\mu\text{g/mL}$), em preparações de tiras miometriais isoladas, sobre o platô da contração uterina estável induzida por K60.

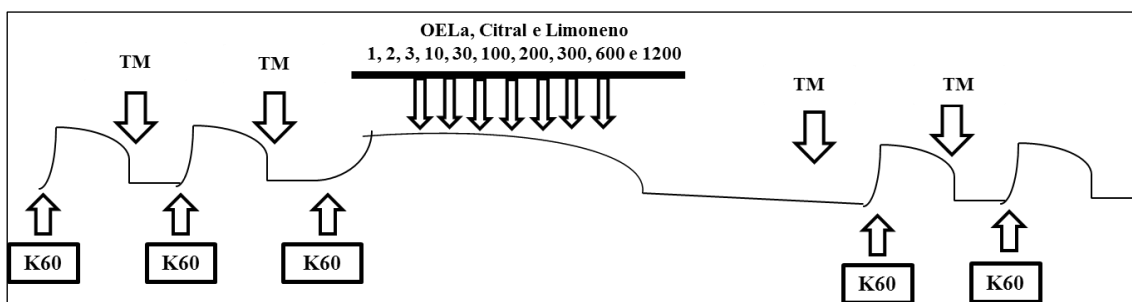


Figura 7: Esquema ilustrativo do protocolo 1, via eletromecânica. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.2 Protocolo 2: Efeito tocolítico do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas e sustentadas por ocitocina em útero isolado de rata.

Para testar o efeito do OELa, citral e limoneno sobre o acoplamento farmacomecânico, essas substâncias foram administradas cumulativamente (1-600 $\mu\text{g/mL}$ para o OELa, e citral e de 1-1200 $\mu\text{g/mL}$ para o limoneno) sobre o platô da contração estável induzida por ocitocina (10^{-2}UI/mL) em tiras miometriais de rata.

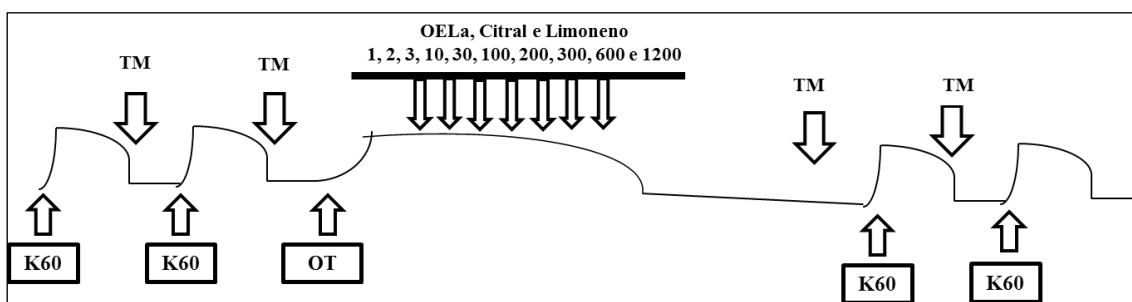


Figura 8: Esquema ilustrativo do protocolo 2, via farmacomecânica. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **OT** – Contrações promovidas por 10^{-2}UI/mL de ocitocina; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.3 Protocolo 3: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por serotonina (5-HT).

Para testar o efeito do OELa, citral e limoneno sobre a via da serotonina, essas substâncias foram administradas o OELa e citral (600 µg/mL) e limoneno (1000 µg/mL), sobre o platô da contração estável induzida por 5-HT (10 µM) em tiras miométriais de rata.

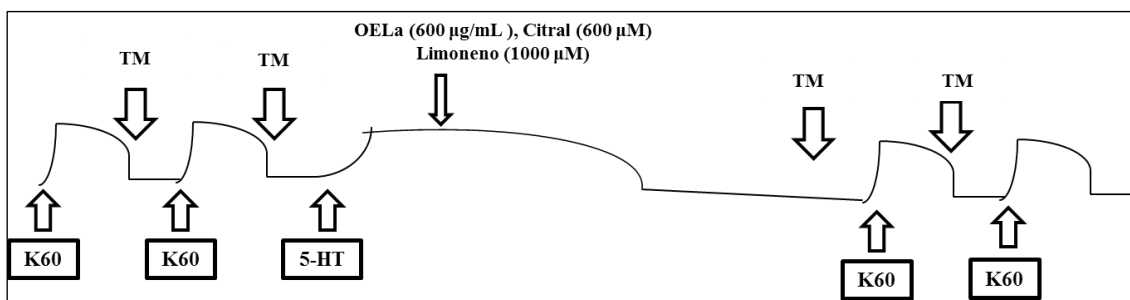


Figura 9: Esquema ilustrativo do protocolo 5, via da serotonina. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **5-HT** – Contrações promovidas por serotonina; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.4 Protocolo 4: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por acetilcolina (ACh).

Para testar o efeito do OELa, citral e limoneno sobre a via colinérgica, essas substâncias foram administradas o OELa e citral (600 µg/mL) e limoneno (1000 µg/mL), sobre o platô da contração estável induzida por ACh (10 µM) em tiras miométriais de rata.

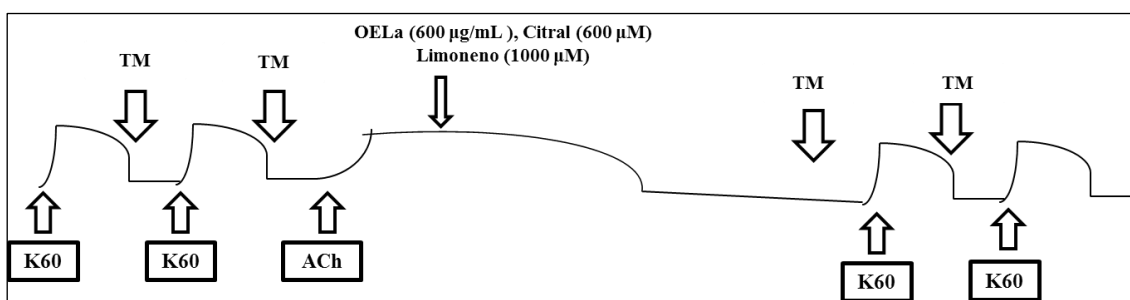


Figura 10: Esquema ilustrativo do protocolo 6, via da acetilcolina. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **ACh** – Contrações promovidas por acetilcolina; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.5 Protocolo 5: Efeito inibitório do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por BaCl₂.

Neste protocolo foi avaliado o efeito inibitório do OELa, do citral e do limoneno em contrações induzidas pelo íon Ba^{2+} , nas preparações de tiras miometriais, despolarizados por potássio (K80 mM) em solução livre de Ca^{2+} . Logo após verificar a viabilidade do tecido, a preparação foi mantida em solução de Tyrode livre de cálcio ($0Ca^{2+}$) na presença de alta concentração de potássio (K80 mM) e EGTA (1 mM), afim de reduzir o cálcio extracelular.

Em seguida, o OELa e citral (600 $\mu\text{g/mL}$) e limoneno (1000 $\mu\text{g/mL}$), ou apenas o controle, foram adicionados a preparação, e seus efeitos expressos em curvas cumulativas concentração-resposta de $BaCl_2$ (0,1-30 mM) foi avaliada. Também foi incluído na curva a nifedipina (1 μM), um bloqueador de canais de diidropiridina, como controle positivo, sendo adicionada no lugar do veículo e depois de 10 min, sendo realizada curva cumulativa concentração-resposta de $BaCl_2$.

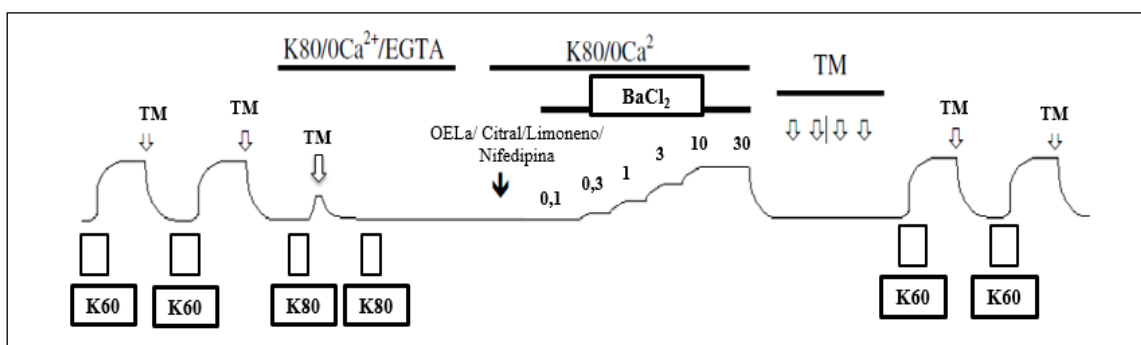


Figura 11: Esquema ilustrativo do protocolo 3, envolvimento dos VOCCs. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **K80** – Contrações promovidas por 80 mM de KCl; **TM** – Lavagem com tyrode modificado; **0Ca²⁺** - Lavagem com tyrode isento de cálcio.

5.2.3.6 Protocolo 6: Efeito do OELa sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na presença e na ausência de tetraetilamônio (TEA^+), 4-aminopiridina (4-AP) ou glibenclamida.

O útero era montado como descrito no item 5.2.2. O tecido permanecia em repouso por 1 h em contato com a solução de Tyrode modificado. Após este período era feita a viabilidade e induzido uma contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o platô da contração era adicionado o OELa (1-600 $\mu\text{g/mL}$) de forma cumulativa. Em outro experimento, era adicionado a outra cubeta por 20 min 1 mM de tetraetilamônio (TEA^+), que nessa concentração é um bloqueador seletivo dos canais para potássio de grande condutância ativados pelo Ca^{2+} (BK_{Ca}) (HUANG, 1998,

MURRAY et al., 1991), 3 mM de 4-AP, um bloqueador dos canais para potássio abertos por voltagem (K_V) (AARONSON et al., 2006), 3×10^{-5} M de glibenclâmida, um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997). Após esse período uma nova contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina era induzida na presença desses bloqueadores. Ao atingir o platô da contração o OELa era adicionado cumulativamente à cubeta, em preparações diferentes.

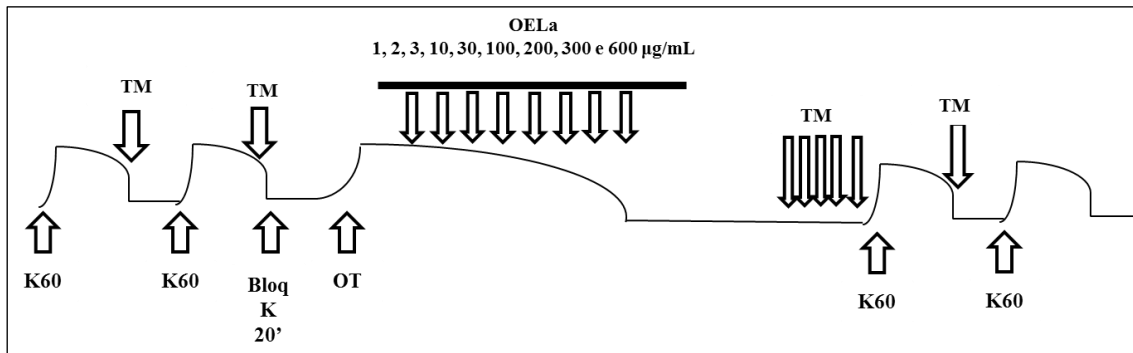


Figura 12: Esquema ilustrativo do protocolo 7, efeito do OELa sobre bloqueadores para canais de potássio. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **OT** – Contrações promovidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina; **Bloq K 20'** – Adicionado bloqueadores de canais para potássio 20 minutos antes da ocitocina; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.7 Protocolo 7: Efeito comparativo do OELa, citral e limoneno com a via da proteína Rho cinase (RhoK), em miométrio de rata.

Com a finalidade de avaliar a atuação do OELa, do citral e do limoneno pela via da RhoK, foi promovida uma contração sustentada por uma solução isotônica de KCl (K80), e sobre este platô de contração, administrou-se o Y27632 (1 µM), um inibidor da Rho cinase. Em experimentos similares, foram administrados o OELa e citral (600 µg/mL) ou o limoneno (1200 µg/mL) sobre o platô da contração por K80, afim de comparar com o efeito do Y27632.

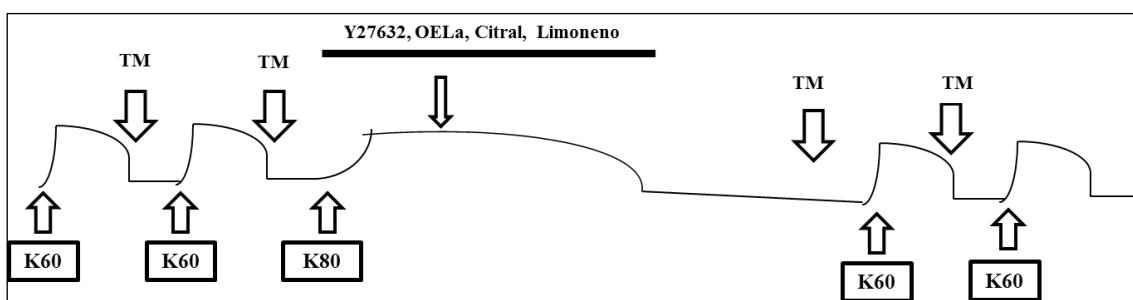


Figura 13: Esquema ilustrativo do protocolo 4, via da Rho cinase. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **K80** – Contrações promovidas por 80 mM de KCl; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.2.3.8 Protocolo 8: Efeito do OELa sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, na presença e na ausência de indometacina.

O útero era montado como descrito no item 5.2.2. O tecido permanecia em repouso por 1 h em contato com a solução de Tyrode modificado. Após este período era feita a viabilidade e induzido uma contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o platô da contração era adicionado o OELa na concentração máxima utilizada no protocolo 2. Em outro experimento, era adicionada a outra cubeta por 20 min 100 μ M de indometacina, bloqueador não seletivo das ciclooxigenases. Após esse período uma nova contração pela adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina era induzida na presença desses bloqueadores. Ao atingir o platô da contração o OELa era adicionado à cubeta, em preparações diferentes.

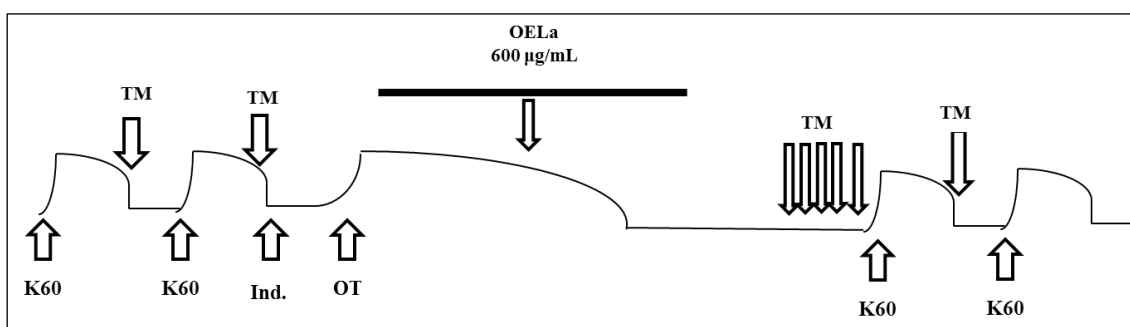


Figura 14: Esquema ilustrativo do protocolo 8, efeito do OELa sobre a ciclooxigenase. **K60** – Contrações promovidas por 60 mM de KCl; **OT** – Contrações promovidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina; **Ind.** – Adicionado indometacina 20 minutos antes da ocitocina; **TM** – Lavagem com tyrode modificado.

5.3 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. Os gráficos foram produzidos através do software Sigma Plot 10.0 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. Em todas as análises

estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e considerados estatisticamente significantes os resultados que apresentarem probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$). As IC_{50} foram calculadas por interpolação semilogarítmica e ajuste sigmoide através do software Sigma Plot 10.0, sendo consideradas neste trabalho como a concentração da substância que é capaz de produzir 50% do efeito inibitório máximo.

RESULTADOS



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

6 RESULTADOS

Artigo

Atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia alba* (cidreira) e seus constituintes majoritários citral e limoneno em útero isolado de ratas wistar.

L.P. de Moraes^a, R.E.S. da Silva^a, C.R. dos Santos^a, I. R. A. Menezes^a, M. R. Kerntopf^a, José Henrique Leal Cardoso^b, R. Barbosa^a

^a Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil.

^b Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará - UECE

Resumo:

A espécie brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro. Popularmente chamada de erva cidreira, tem seu uso popular devido suas propriedades sedativas, carminativas e analgésicas. O objetivo deste estudo foi investigar a ação do óleo essencial de *L. alba* e seus constituintes e caracterizar o seu mecanismo de ação sobre o útero isolado de rata. Para desenvolvimento desta pesquisa foram utilizados ratas Wistar, com massa corpórea entre 180-250 g. Após eutanásia, o útero foi removido, em seguida feito um corte vertical em cada um dos cornos para obtenção de tiras de 2 cm de comprimento, os quais foram mantidos em Tyrode modificado aerado, pH 7,4, a 32°C, para registro isométrico das contrações musculares. Para avaliar o efeito do OELa, citral e limoneno, foram administradas concentrações cumulativas (OELa e citral 1-600 µg/mL, limoneno 1-1200 µg/mL) em tiras de útero, sob tensão de 1 g. OELa, citral e limoneno relaxaram de forma dependente da concentração preparações de miométrio pré-contraídas por KCl (60 mM) ($IC_{50} = 37,96 \pm 2,41, 130,90 \pm 2,82, 316,47 \pm 3,12$ µg/mL, respectivamente), ou previamente contraídas por ocitocina (10^{-2} UI/mL) ($IC_{50} = 44,96 \pm 4,26, 52,48 \pm 2,32$ e $186,83 \pm 2,69$ µg/mL, respectivamente). Estes dados demonstram que o OELa, o citral e o limoneno provocam relaxamento da musculatura lisa uterina sendo o OELa e o citral mais potentes que o limoneno. As três substâncias em estudo também foram capazes de relaxar a musculatura uterina pré-contraídas por 5-HT (10 µM), e ACh (10 µM). O OELa o citral inibiram os canais para cálcio do tipo L, uma vez que essas substâncias inibiram contrações induzidas pelo Ba^{2+} (0,1-30 mM) cujo comportamento similar foi observado nas preparações pré-incubadas com nifedipina (1 µM), já o limoneno não inibiu de forma significativa estas contrações. Verificamos que as três substâncias agem via Rho cinase, uma vez que utilizou-se um bloqueador específico da via o Y27632 (1 µM), as três substâncias apresentaram resposta semelhante ao bloqueador, podendo esta ser uma das vias utilizadas. Diante disso observou-se que o OELa, o citral e o limoneno apresentaram efeito antiespasmódico em útero isolado de ratas, revelando assim que este efeito pode ser mediado por mecanismos intracelulares, os quais provavelmente envolvem a regulação da sensibilidade ao Ca^{+2} do sistema contrátil do músculo liso uterino.

Palavras-chaves: *Lippia alba*, efeito relaxante, citral, limoneno, útero, músculo liso.

Introdução

A espécie brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertencente à família Verbenaceae é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro. Ela é popularmente conhecida por erva cidreira, erva-cidreira-brasileira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, sálvia, entre outras sinonímias [1,2]. Na medicina popular por apresentar diversas propriedades farmacológicas essa planta é utilizada como: sedativo, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, desordens intestinais, doenças hepáticas, cólicas menstruais e antiespasmódico [3].

O citral constituinte majoritário do óleo essencial da *L. alba* (OELa), do ponto de vista molecular é formado pela junção de dois compostos isômeros, o trans-isomero geranial e o cis-isômero neral, [1]. O citral possui algumas atividades farmacológicas comprovadas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, sedativa e expectorante, espasmódica e diurética [4,5,6,7,8].

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno com fórmula molecular C₁₀H₁₆, é um monoterpene monocíclico [9]. Por possuir aroma cítrico, o limoneno é muito utilizado como fragrância pelas perfumarias, sabonetes, alimentos e bebidas [10]. O limoneno tem apresentado diversas e interessantes atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana [11,12], atividade antifúngica [13], atividade antitumoral [14] e atividade antiparasitária [15].

Sabe-se que ainda são raros os fitoterápicos com ação tocolítica e que a prematuridade vem crescendo nos últimos anos. Tendo em vista que a contração da musculatura lisa uterina antes de completar as 37 semanas de gestação desencadeia o parto prematuro e que há escassez os estudos nessa área, se faz necessário elucidar os efeitos da *L. alba* e seus constituintes citral e limoneno em miométrio uterino. Acredita-se que este estudo nos dará uma melhor compreensão do mecanismo de ação do óleo essencial da *L. alba* e seus constituintes citral e limoneno sobre musculatura lisa uterina e assim caracterizar suas atividades terapêuticas.

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 MgCl₂; 0,36 NaH₂PO₄; 11,9 NaHCO₃; 2,0 CaCl₂ e 5,5 Glicose, mantida à temperatura de 37° C e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1 M e/ou NaOH (1 M). O OELa, o citral e o limoneno foram preparados na forma de solução, diluídos diretamente em Tyrode e tween, a nifedipina foi diluída em etanol, e os demais fármacos e seus estoques foram diluídos em água destilada. A solução isenta de cálcio ou “zero cálcio” (0Ca²⁺) foi produzida com a omissão do CaCl₂ da solução de Tyrode 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 utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 180-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri - URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de 23 ± 2 °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 pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) - URCA, registrado sob o número de protocolo: 00158/2015.2 (Anexo 1).

- Preparação para isolamento do tecido

Os animais foram tratados 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, foram eutanasiados em câmara de CO₂. Após a abertura da cavidade abdominal, foi feita a dissecação do útero e separação dos cornos medindo entre 1,5-2 cm de comprimento, que em seguida foram abertos longitudinalmente. Estes foram mantidos em câmara de banho de órgãos isolado com capacidade para 10 mL da solução nutritiva Tyrode, mantidos sob contínua aeração por borbulhamento de ar, temperatura de 32 °C 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 ± 1 h 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 miométriais estudadas, e após atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. 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 veículo, Tween, diluído em solução de 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 t, 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

Efeito relaxante do OELa, citral e limoneno sobre as contrações induzidas e sustentadas por K⁺ (60 mM), OT (10⁻² UI/mL), 5-HT (10 μM) e ACh (10 μM) em útero isolado de rata.

Para avaliar a influência do OELa, citral e limoneno sobre contrações induzidas por K⁺, OT, 5-HT e ACh foi administrada concentrações crescentes e cumulativas de OELa e citral (1-600 μg/mL) ou limoneno (1-1200 μg/mL), previamente contraídos por KCl (60 mM) ou Ocitocina (10⁻² UI/mL). Já sobre as contrações evocadas por 5-HT (10 μM) e ACh (10 μM) foi administrada a concentração máxima de cada substância em estudo.

Nos estudos realizados com KCl, verificamos que OELa, citral e limoneno foram capazes de relaxar 100% a contração promovida por K60 de forma concentração dependente quando comparado com o controle (Figura 15 A). Observou-se que, para o OELa e o limoneno esse efeito ocorreu de forma estatisticamente significativa a partir da concentração de 10 μg/mL. Já para o citral, essa resposta apresentou-se significativa a partir da concentração de 30 μg/mL (P < 0,001, ANOVA, método Holm-Sidak). Os valores de IC₅₀ obtidos foram os seguintes, para OELa, citral e limoneno, respectivamente: 37,96 ± 2,41, 130,90 ± 2,82, 316,47 ± 3,12 μg/mL e apresentaram diferença estatística significativa entre si (P < 0,05, ANOVA, método Bonferroni), destacando-se o OELa com o menor valor de IC₅₀.

Ao avaliar as contrações promovidas pela Ocitocina 10⁻² UI/mL, verificou-se que também o OELa, citral e limoneno foram capazes de inibir 100% das contrações de forma dependente da concentração (Figura 15 B). O relaxamento promovido pelo OELa e o citral, foram estatisticamente significantes a partir da concentração de 30 μg/mL. Enquanto que o limoneno inibiu significativamente as contrações a partir de 10 μg/mL (P < 0,001, ANOVA, método Holm-Sidak). (Figura 13B). Os valores das IC₅₀, para o OELa, citral e limoneno, são respectivamente: 44,96 ± 4,26, 52,48 ± 2,32 e 186,83 ± 2,69 μg/mL. Foi observado, que o valor da IC₅₀ para o limoneno apresentou diferença estatística em relação aos valores obtidos para o OELa e citral sendo estes por sua vez mais potentes que o limoneno.

Nos estudos onde a contração da musculatura lisa uterina foi evocada por 5-HT (10 μM), o OELa e citral (600 μg/mL) e limoneno (1000 μg/mL), também promoveram

um relaxamento que foi estatisticamente significativo $96,20 \pm 1,82$, $99,47 \pm 2,75$ e $91,33 \pm 2,75\%$ respectivamente comparando com o controle, ($P < 0,001$, ANOVA, Holm-sidak) (Figura 15 C).

As concentrações de $600 \mu\text{g/mL}$ de OELa, citral e $1000 \mu\text{g/mL}$ de limoneno, foram capazes de reverter as contrações evocadas por ACh em, $97,68 \pm 0,74$, $100,00 \pm 6,12$ e $79,26 \pm 2,01\%$ respectivamente, sendo assim estatisticamente significativa ($P < 0,001$, ANOVA, Holm-sidak) (Figura 15 D). Ao final foram feitas lavagens consecutivas durante 30 minutos para contração posterior com KCl mostrando reversão e viabilidade do tecido depois do experimento.

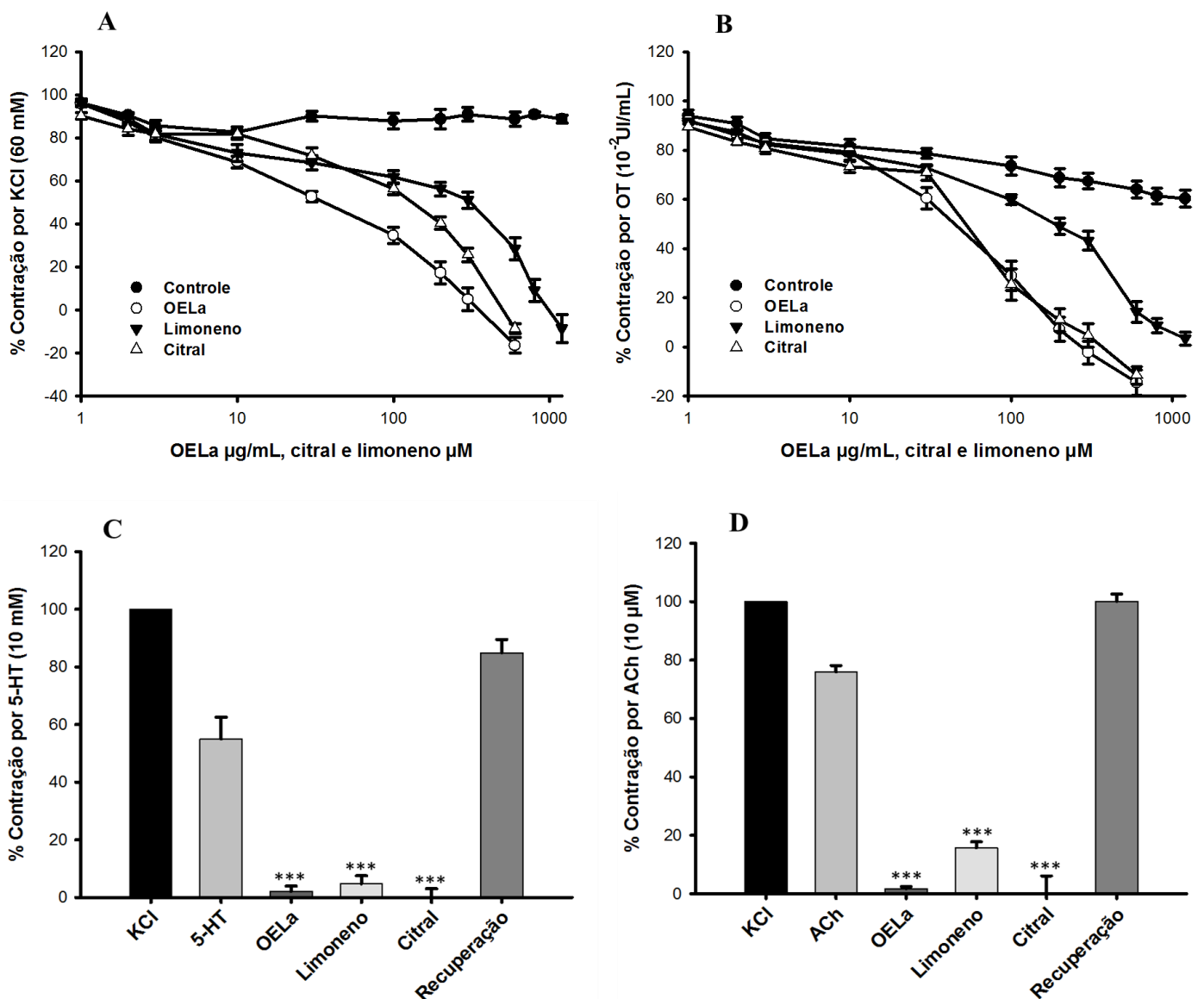


Figura 15: A: Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em preparações de tecido miometrial de rata contraído com K^+ (60 mM). B: Gráfico concentração-resposta do relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em preparações de tecido miometrial de rata contraído com Ocitocina 10^{-2} UI/mL. C: Gráfico do efeito do OELa, citral, e limoneno sobre o

componente contrátil da 5-HT. As concentrações utilizadas foram: 600 µg/mL de OELa, citral e 1000 µg/mL de limoneno. **D:** Gráfico do efeito do OELa, citral, e limoneno sobre o componente contrátil da ACh. As concentrações utilizadas foram: 600 µg/mL de OELa, citral e 1000 µg/mL de limoneno. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; * representa os efeitos significantes ($p < 0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

Avaliação da participação dos canais de cálcio tipo L no relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno; envolvimento dos canais para potássio no relaxamento promovido pelo OELa em útero isolado de rata.

Em experimentos onde o tecido uterino foi mantido despolarizado em meio livre do íon cálcio e com $[K^+]$ 80 mM, com a adição de concentrações cumulativas de Ba^{+2} induzem contrações de forma concentração dependente. Estas contrações atingiram valor máximo na concentração de 30 mM de $BaCl_2$, e nas preparações pré-incubadas com 600 µg/mL de OELa, citral e 1000 µg/mL de limoneno, não foi observada contração significativa para OELa enquanto que o citral apresentou uma baixa significância nas duas últimas concentrações, comportamento este de ambos similar ao da nifedipina (1 µM), um bloqueador de canal de cálcio dependente de voltagem, tipo L. Porém, nas preparações pré-incubadas com 1000 µg/mL de limoneno, a adição de $BaCl_2$ nas preparações induziram contrações de forma concentração-dependente, ($p > 0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak) (Figura 16 A). Mostrando assim que o limoneno utiliza-se de outra via para promover o relaxamento da musculatura uterina.

O OELa (1-600 µg/mL) relaxou o útero isolado de rata pré-contraído com ocitocina na ausência ($0,0 \pm 5,21$) ou na presença ($0,0 \pm 4,83$, $0,0 \pm 1,99$, $1,12 \pm 0,65$ respectivamente) de 1 mM de tetraetilamônio, um bloqueador seletivo dos canais para potássio grande condutância sensíveis ao cálcio (BK_{ca}), 3×10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e 3 mM de 4-aminopiridina, um bloqueador seletivo dos canais para potássio sensíveis a voltagem (K_V), portanto por não haver diferença estatisticamente significativa do efeito miorelaxante do OELa na presença ou ausência dos bloqueadores dos canais para K^+ , pode-se dizer que este óleo utiliza-se de outra via para promover o relaxamento (Figura 16 B).

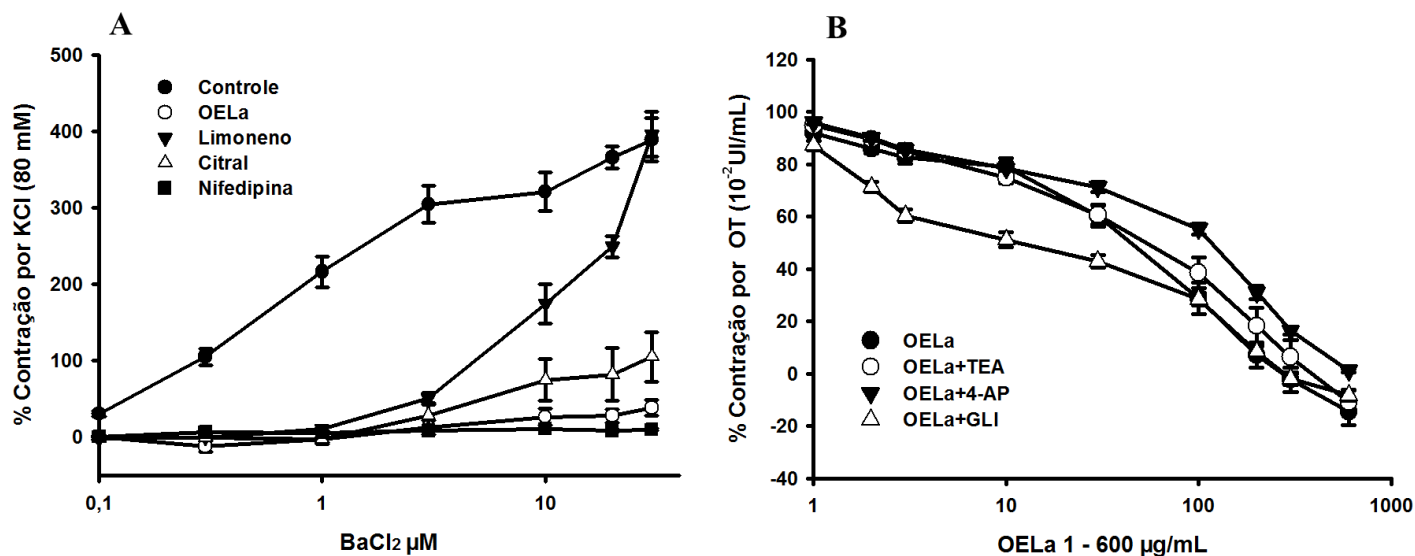


Figura 16: **A:** Efeito do OELA, citral (600 μg/mL), e limoneno (1000 μg/mL) em contrações evocadas por Ba²⁺ exógeno, Nifedipina (1 μM) foi usado como controle positivo. Eixo x: concentrações do agente contraturante em μM; * representa os efeitos significantes (p < 0,05, one-way ANOVA seguido de Holm-Sidak). **B:** Envolvimento dos canais para potássio no relaxamento uterino promovido pelo OELA em contrações promovidas por Ocitocina 10⁻² UI/mL. Eixo x: Agentes em estudo; Eixo y: média percentual da contração. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. ***p < 0,001; Y27632, OELA, citral ou limoneno vc. KCl 80 mM (teste t de Student não pareado).

Avaliação da participação da via Rho cinase no relaxamento produzido pelo OELA, citral e limoneno; envolvimento das cicloxigenases no relaxamento promovido pelo OELA em útero isolado de rata.

Para a comparação do OELA e seus constituintes sobre a proteína Rho cinase adicionou-se às preparações o inibidor da Rho cinase, o composto Y27632 (1 μM, n=6), e este relaxou as preparações de tiras miométriais isoladas de ratas, submetidas a uma contração evocada de KCl (80 mM), com uma porcentagem de relaxamento de 97,88 ± 2,94%, de forma estatisticamente significante (p < 0,001, teste t de Student pareado). Nas preparações onde ocorreu a adição de OELA, citral e limoneno, nas concentrações de 600 μg/mL e 1000 μg/mL de limoneno sobre o platô da contração produzida por KCl (80 mM), também verificou-se relaxamento na porcentagem de 91,57 ± 1,88 %, 100,00 ± 4,68 % e 89,71 ± 1,71 % do controle, respectivamente (Figura 17 A). Foi verificado que houve redução significante por todos os compostos sendo o citral mais potente que o composto Y27632 (p > 0,05, teste t de Student não pareado). Ao final de todos os experimentos foram feitas lavagens consecutivas durante 30 minutos para contração posterior com KCl mostrando reversão e viabilidade do tecido depois do experimento.

Nas preparações pré-incubadas com indometacina, o OELa na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ relaxou ($0,57 \pm 2,3$) o útero isolado de rata, onde não houve relevância significativa ao expor o tecido à indometacina, mostrando que o OELa não utiliza a via das cicloxigenases para promover o relaxamento ($p < 0,05$, one way ANOVA, seguido de Holm-Sidak) (Figura 17 B).

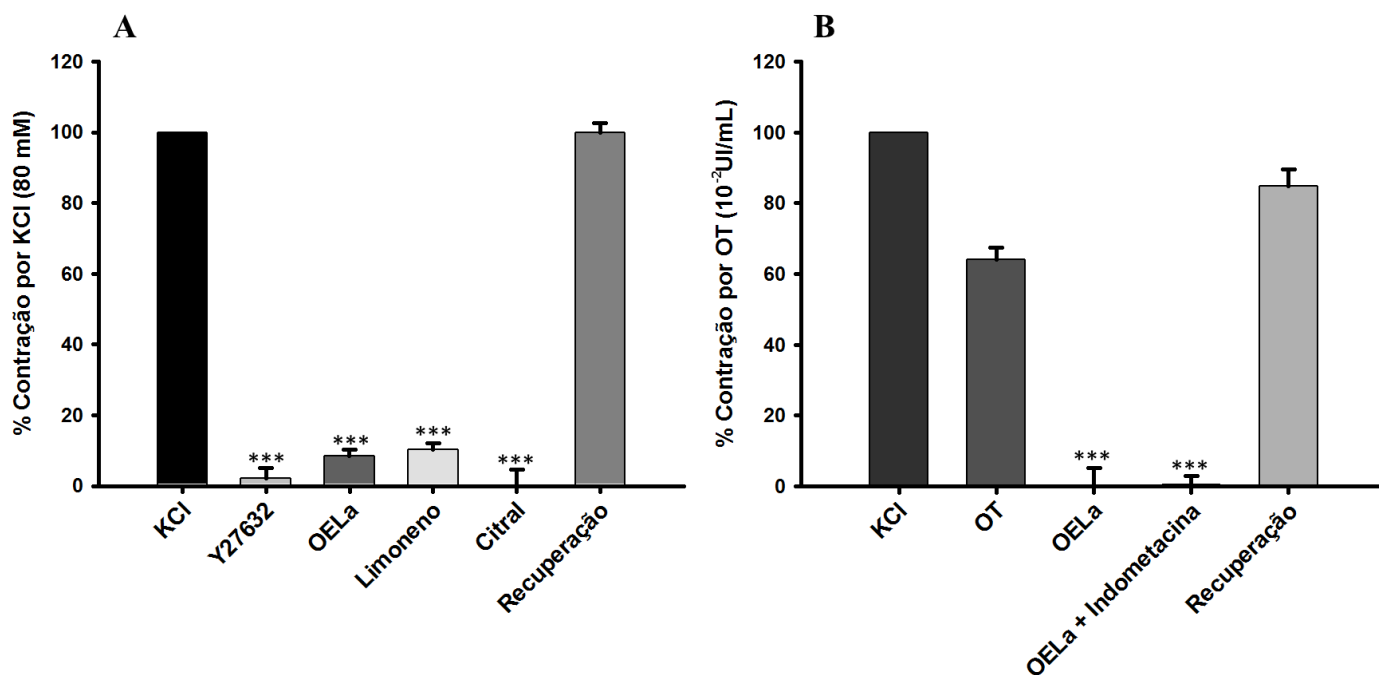


Figura 17: **A:** Gráfico do efeito relaxante do Y27632 (1 μM), OELa e citral (600 $\mu\text{g/mL}$) e limoneno (1000 $\mu\text{g/mL}$) sobre o platô de contração em tiras miometriais isoladas de rata induzida KCl 80 μM . **B:** Avaliação do envolvimento das cicloxigenases por meio do seu bloqueio pela indometacina (100 μM) no relaxamento promovido pelo OELa (600 $\mu\text{g/mL}$). Eixo x: Agentes em estudo; Eixo y: média percentual da contração. Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$; Y27632, OELa, citral ou limoneno. KCl 80 mM (teste t de Student não pareado).

Discussão

Este estudo demonstra que o OELa e seus constituintes majoritários citral e limoneno bloqueia as contrações induzidas por potássio (via eletromecânica), ocitocina serotonina e acetilcolina (via farmacomecânica), com eficácia máxima, revertendo totalmente a contração do músculo liso uterino. Observou-se também que há uma forte evidência que o OELa e o citral estejam agindo pelos VOCCs tipo-L, visto que na presença dos agentes em estudo (AE), houve uma inibição da contração promovida pelo Ba_{2+} , assemelhando-se ao efeito da nifedipina bloqueador dos VOCCs tipo-L. Já o limoneno não foi capaz de inibir as contrações neste experimento indicando que ele

utiliza outra via para promover o relaxamento, podendo ser pelos diferentes canais de potássio ou mesmo por outras vias de sinalização de cálcio.

Foi possível observar, que, a concentração de 600 µg/mL do OELa e do citral promove o relaxamento total da contração induzida por K60, por outro lado, o limoneno necessita de uma concentração de 1200 µg/mL para obter o mesmo efeito. Assim, verificou-se que, devido ao efeito antiespasmódico do citral ser bem similar ao efeito do OELa podemos sugerir que a ação desse óleo essencial é predominantemente pelo citral que é seu composto majoritário.

Sabe-se que na via eletromecânica as células da musculatura lisa sofrem despolarização pela presença de potássio, e observa-se que por essa via ocorre ativação dos canais de cálcio operados por voltagem (CCOV), e a abertura destes culmina influxo de cálcio através da membrana, resultando no aumento da $[Ca^{2+}]$ no meio intracelular, levando assim a contração muscular (SOMLYO; SOMLYO, 1968; BOLTON et al., 1999). Por outro lado, para que ocorra contração pelas vias farmacológicas um agonista externo liga-se ao receptor de membrana acoplado a uma proteína G possuindo a capacidade de modificar a atividade de certos canais iônicos como canais de Na^+ e K^+ , cátions capazes de despolarizar a membrana plasmática abrindo os canais para Ca^{2+} para que ocorra uma contração. No presente trabalho foi observado que, o OELa, o citral e o limoneno apresentam seu efeito miorrelaxante sob as contrações induzidas por vários agentes contracturantes. Demonstrado que tanto no acoplamento eletromecânico pela via do K^+ , como no farmacomecânico pelas vias da ocitocina, serotonina e acetilcolina, os agentes em estudo apresentaram a mesma eficácia, ou seja, nos dois acoplamentos necessitaram da mesma concentração para reverter a contração. Porém analisando o parâmetro das IC_{50} , pode-se afirmar que há diferença na potência dos AE para os acoplamentos.

O OELa mostra um valor de IC_{50} mais baixo na via do potássio do que na via da ocitocina com os valores de $37,96 \pm 2,41$ µg/mL e $44,96 \pm 4,26$ µg/mL, respectivamente, porém essa diferença não é estatisticamente significativa. Enquanto que para o citral os valores são de $130,90 \pm 2,82$ µg/mL e $52,48 \pm 2,32$ µg/mL e o limoneno $316,47 \pm 3,12$ µg/mL e $186,83 \pm 2,69$ µg/mL para o potássio e ocitocina respectivamente. Demonstrando assim, que os monoterpenos citral e limoneno apresentam maior potência no acoplamento farmacomecânico. Como visto o OELa possui valores de IC_{50} menores que os valores dos compostos, indicando assim que

outros compostos que aparecem em menor porcentagem na composição deste óleo essencial podem estar agindo e possivelmente contribuindo para o efeito miorelaxante.

Silva et al., (2012), demonstrou que, os óleos essenciais de *L. thymoides* coletada nas diferentes estações do ano, relaxaram o útero de rata pré-contraído com solução despolarizante de KCl 60 mM, de maneira dependente da concentração. O óleo de *L. thymoides* que foi coletada na primavera teve IC_{50} de $74,3 \pm 39,2 \mu\text{g/mL}$, o autor deste trabalho ainda relata que, este valor de IC_{50} é o mais baixo dentre os óleos essenciais, podendo assim ser observado que a IC_{50} do OELa ($37,96 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$) na via do potássio ainda é mais baixa, tornando o OELa mais potente que o óleo da *L. thymoides*.

Corroborando com nossos resultados Sadraei et al., (2003), verificou que nas duas vias farmacológicas serotoninérgica e colinérgica e a via do potássio, o óleo essencial de *Melissa officinalis* assim como o OELa também possui o citral como constituinte principal, inibiram as contrações do íleo de rato induzidas por KCl 80 mM, ACh e 5-HT.

Neste trabalho foi demonstrado que o OELa, o citral e o limoneno inibiu as contrações evocadas por 5-HT, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os agentes em estudo. Demonstrando assim, que os AE estão provocando um antagonismo nos receptores 5-HT com a mesma eficácia. Nas mesmas concentrações também promovem um relaxamento da musculatura lisa do miométrio contração promovida por ACh, sendo que o limoneno foi menos eficaz que o óleo e o citral. Tanto na via serotoninérgica (5-HT) como colinérgica (ACh) houve reversão das contrações. Com isso vimos que além das substâncias em estudo agirem na via clássica da ocitocina, eles ainda têm ação sobre outras vias farmacológicas como a da serotonina e da acetilcolina.

Nos estudos realizados avaliando a via serotoninérgica na musculatura da traqueia isolada de ratos, as contrações induzidas por 5-HT ($10 \mu\text{M}$) foram inibidas de forma concentração-dependente pelo OELa com um IC_{50} de $200 \mu\text{g/mL}$. As contrações evocadas por 5-HT em íleo de cobaia foram também inibidas pelo OELa com IC_{50} de $20 \mu\text{g/mL}$. Em ambos, traqueia de rato e íleo de cobaia, obtiveram recuperação das contrações que foram obtidas após consecutivas lavagens. Estes resultados mostram que OELa que tem um elevado teor de citral inibe contrações do músculo liso na traqueia e íleo, contrações estas evocadas por 5-HT (JARVIS et al., 2016). Esses estudos

fortalecem nossos achados no útero, pois demonstramos que o OELa age nos receptores 5-HT.

Corroborando com os dados deste estudo Moreira et al., (2013) indica que o citral age através do bloqueio dos VOCCs tipo L sensíveis a dihidropiridina, uma vez que o citral foi capaz de inibir significativamente contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica, assemelhando-se assim com a ação da nifedipina que já é um bloqueador seletivo dos VOCCs tipo L. Como descrito acima no protocolo com o BaCl_2 foi visto que tanto o OELa como o citral assemelham-se com o efeito produzido pela nifedipina.

A análise do envolvimento das substâncias com os canais para K^+ é importante para o entendimento do seu mecanismo de ação. Uma vez que estes canais fazem parte da fisiologia de células excitáveis, principalmente aquelas que fazem parte do sistema nervoso, músculo esquelético e musculo liso. Estes canais se apresentam em diferentes tipos celulares, portanto exercem diferentes efeitos biológicos. Um exemplo é a regulação do potencial de membrana do músculo liso. O bloqueio destes canais despolariza a membrana, enquanto que sua ativação a hiperpolariza. Inibindo a contração, uma vez que ocorre redução da concentração intracelular de cálcio (Brayden, 1996; Okada et al., 1993).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que não houve envolvimento dos canais para potássio no relaxamento da musculatura lisa uterina pelo OELa. Corroborando com os nossos achados, Travassos (2010) demonstrou que ao analisar o efeito relaxante do ácido 8,(17),12E,14-labdatrieno-18-óico, na presença dos bloqueadores de canais para potássio K_v e K_{ATP} não houve a participação dos mesmos, verificando que seu composto estava modulando os canais reduziam o influxo de cálcio, assim também verificamos no nosso estudos.

Ao avaliar o envolvimento da Rho cinase no relaxamento promovido pelo OELa, citral e limoneno comparou-se o efeito relaxante das substâncias ao bloqueador específico da Rho-quinase, o Y27632, sendo possível observar que ambos foram capaz de relaxar a musculatura lisa uterina: $97,88 \pm 2,94\%$, $91,57 \pm 1,88\%$, $100,45 \pm 4,68\%$ e $89,71 \pm 1,71\%$ (Y27632, OELa, o citral e o limoneno respectivamente). Destaca-se ainda que não houve diferença estatisticamente significante quando comparou-se a porcentagem de relaxamento entre as substâncias em estudo. Uma vez que, a Rho cinase é uma via moduladora da contração e é ativada pela elevação da $[\text{Ca}^+]$ intracelular, pode-se sugerir novamente que os AE estão envolvidos no mecanismo do cálcio.

Em outro resultado adquirido nesse estudo, onde avaliou-se o efeito do OELa na via das cicloxigenase. Verificou-se que quando as tiras miometriais foram expostas a indometacina (100 μM) por 20 minutos antes de serem contraídas por OT, não se observou diferença estatística no relaxamento promovido pelo OELa na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ a contração de 100% chegou a $0,57 \pm 2,3$. Similar a estes resultados Ribeiro (2012), demonstrou que, o pré-tratamento com indometacina 10 μM , em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN (10 μM) isolados de animais hipertensos ou normotensos, não foi alterado o vasorrelaxamento induzido por concentrações crescentes de α -terpineol. Vasconcelos (2013), em uma série de experimentos, com anéis de traqueia previamente tratados com indometacina (10 μM) por 5 minutos para serem, então, contraídos com ACh (5 μM). Tal tratamento também não alterou o perfil da curva concentração-efeito para o efeito miorelaxante do β -citronelol, comparando-se assim mais uma vez com os resultados deste trabalho.

Em todos os resultados obtidos neste trabalho, observamos o efeitos relaxantes mediados pelo OELa, citral e limoneno estes foram reversíveis com a lavagem, demonstrando assim sua baixa toxicidade.

Conclusão

Os resultados mostram que tanto o OELa quanto seus constituintes citral e limoneno, possuem efeito miorelaxante em tecido miometrial e que os mesmos possuem potencial para serem futuros agentes terapêuticos na prevenção contra alterações fisiológicas que envolvem contrações uterinas indevidas, como no caso do desencadeamento do parto prematuro.

Referências

- [1] MATOS, F.J.A. Medicinal Plants: Selection chart and employment plants used in phytotherapy in Northeast Brazil. 2 ed. Fortaleza-CE. **University Press**, 346p. 2000.
- [2] PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E. et al. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

- [3] MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. Medicinal and aromatic plants grown in Ceará: production technology and essential oils. Fortaleza: **Bank of Northeast Brazil**, p. 61-63, 2007.
- [4] CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; TOLON, Z. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v, 25, n. 1, p. 103 – 107, 1989.
- [5] DO VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS JR, J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709 – 714, 2002.
- [6] KIM, J. M.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J. A.; PRESTON III, J. F.; WEI, C. I. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. **Journal of food science**, v. 60, p. 1364 - 1368, 2006.
- [7] SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARAES, L. G.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, p. 1649 – 1656, 2007.
- [8] RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4559 – 4565, 2008.
- [9] AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; AQUINO-NETO, M. R.; TEIXEIRA-NETO, P. F.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V. de; ARAUJO, F. L. O. de; SOUSA, D. P. de; VASCONCELOS, P. F. de; VASCONCELOS, S. M. M. de; SOUSA, F. C. F. de. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.
- [10] SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007.

- [11] KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 43, p. 2839-2845, 1995.
- [12] ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian journal of pharmacognosy**. v16, p 307-313, 2006.
- [13] BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.
- [14] AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.
- [15] ANTHONY, J. P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components—a resource for antiparasitic agents?. **Trends in parasitology**, v. 21, n. 10, p. 462-468, 2005.
- [16] SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther** 159:129-145, 1968.
- [17] BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 85-115, 1999.
- [18] SILVA LR; PEREIRA RCA; BRAGA TR; BEZERRA FC; RODRIGUES THS. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte. **Horticultura Brasileira** 30: S6075-S6080. 2012.
- [19] SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 445-452, 2003.
- [20] JARVIS, G. E.; BARBOSA, R; THOMPSON, A. J. Noncompetitive Inhibition of 5 HT3 Receptors by Citral, Linalool, and Eucalyptol Revealed by Nonlinear Mixed-

Effects Modeling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 3, p. 549-562, 2016.

[21] MOREIRA, F. V. **Efeito cardiovascular do citral, monoterpene majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, em ratos.** (Pós-graduação Strico Senso em medicina), Universidade Federal de Sergipe. p 57. 2013

[22] BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23:1069-1076, 1996.

[23] OKADA, Y.; YANAGISAWA, T.; YAMAGISCHI, T.; TAIRA, N. channel-opening action and KRN2391-induced reduction of Ca^{2+} sensitivity of arterial smooth muscle. **Arch. Internat. Pharmacod. Ther.**, 326:33-51, 1993.

[24] TRAVASSOS, R. A. Envolvimento de canais para potássio e de nucleotídeo cíclico no mecanismo de ação tocolítico do ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico 9labdano-302) em útero isolado de rata. (Pós-graduação Strico Senso em Produtos naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba. 2010

[25] RIBEIRO, T.P. Mecanismos de sinalização endotelial envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol (Pós-graduação *Strico Senso* em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – UFPB. 2012

[26] VASCONCELOS, T.B. Efeitos antiespasmódico e miorelaxante do β -citronelol em músculo liso traqueal de ratos: potencial ação na hiperreatividade após desafio antigênico e elucidação do mecanismo de ação. (Pós-graduação *Strico Senso* em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará-UFC. 2013

DISCUSSÃO



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

7. DISCUSSÃO

Os estudos a cerca da atividade farmacológica de muitos óleos essenciais tem ganhado bastante notoriedade no meio científico, sendo numerosos os trabalhos que evidenciam atividade antiespasmódica para óleos essenciais e seus compostos, incluindo diversas espécies do genero *Lippia* como podemos observar no quando 1. Tais estudos proporcionam o enriquecimento do entendimento a cerca de produtos naturais e auxiliam a crescer o conhecimento empírico e tradicional desenvolvido desde tempos antigos.

Nos protocolos experimentais do presente estudo foi demonstrado que o OELa e seus constituintes majoritários citral e limoneno bloqueiam as contrações induzidas por potássio (via eletromecânica), ocitocina serotonina e acetilcolina (via farmacomecânica), com eficácia máxima, revertendo totalmente a contração do músculo liso uterino. A concentração de 600 µg/mL do OELa e citral promovem o relaxamento total da contração induzida por K60, por outro lado, o limoneno necessita de uma concentração de 1200 µg/mL para obter o mesmo efeito. Dessa forma, ao verificar que, o efeito antiespasmódico do citral foi bem similar ao efeito do OELa pode-se sugerir que, a ação desse óleo essencial é possivelmente pelo citral que compõe 61,65% do óleo sendo seu composto majoritário.

Foi possível observar também que tanto no acoplamento eletromecânico pela via do potássio, como no farmacomecânico pelas vias da ocitocina, serotonina e acetilcolina, os agentes em estudo apresentaram a mesma eficácia, ou seja, nos dois acoplamentos necessitaram da mesma concentração para reverter a contração. Porém analisando o parâmetro das IC₅₀, pode-se afirmar que há diferença na potência dos AE para os acoplamentos.

Estes dados corroboram com alguns estudos que tem se empenhado em evidenciar a atividade miorelaxante dos óleos essenciais e seus compostos, principalmente majoritários, em diferentes órgãos. Silva, (2013) verificou que o óleo essencial de *L. microphylla* relaxou de maneira significativa o útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl e com 10⁻² UI/mL de ocitocina. Em outro estudo, Sadraei (2003), verificou que nas duas vias farmacológicas serotoninérgica e colinérgica e a via do potássio, o óleo essencial de *Melissa officinalis* que assim como o OELa também possui

o citral como constituinte principal, inibiram as contrações do íleo de rato induzidas por KCl 80 mM, ACh e 5-HT.

O óleo essencial do *Zingiber officinale* (gingibre) e o seu composto majoritário citral, foram relatados com atividade antiespasmódica em traqueia de ratos wistar, com possível mecanismo a participação dos receptores β 2-adrenérgico (MANGPRAYOOL et al.,2013). Já em outro estudo foi demonstrado que o óleo essencial de *Dracocephalum kotschy* e um de seus compostos principais o limoneno foram capazes de relaxar contrações induzidas por KCl, e ACh em íleo isolado ratos, atingindo estados basais da contração (SADRAEI et al., 2015).

De acordo com Blanco et al., (2013), o óleo essencial dos químiotipos de *L. alba* "citral" e "linalool" reduziu a efeito máximo da contração promovida por ACh de uma forma dependente da concentração. Esses resultados sugerem que ambos induziram um antagonismo não competitivo sobre o receptor muscarínico mediadas pela ACh. Reforsando assim nossos dados, pois como vimos o OELa reduziu as contrações uterinas evocadas por ACh a níveis basais.

Para os valores de IC_{50} são observadas diferenças de potências entre os AE ao que se refere ao agonista contracturante utilizado. O OELa mostra um valor de IC_{50} mais baixo na via do potássio do que na via da ocitocina com os valores de $37,96 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$ e $44,96 \pm 4,26 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, porém essa diferença não é estatisticamente significativa. Enquanto que para o citral são verificados os valores de: $130,90 \pm 2,82$ e $52,48 \pm 2,32 \mu\text{g/mL}$ e o limoneno $316,47 \pm 3,12 \mu\text{g/mL}$ e $186,83 \pm 2,69 \mu\text{g/mL}$. Demonstrando assim, que os monoterpenos citral e limoneno apresentam maior potência no acoplamento farmacomecânico. Mediante esses dados e uma vez que, o OELa possui valores de IC_{50} menores que os valores dos compostos majoritários, é possível indicar que outros compostos que aparecem em menor porcentagem na composição deste óleo essencial podem estar agindo.

Corroborando com os achados deste trabalho, Silva (2012), demonstraram que, os óleos essenciais de *L.thymoides* coletada nas diferentes estações do ano, relaxaram o útero de rata pré-contraído com solução despolarizante de KCl 60 mM, de maneira dependente da concentração. O óleo de *L. thymoides* que foi coletada na primavera teve IC_{50} de $74,3 \pm 39,2 \mu\text{g/mL}$, o autor desse trabalho ainda relata que, este valor de IC_{50} é o mais baixo dentre os óleos essenciais, podendo assim ser observado que a IC_{50} do OELa ($37,96 \pm 2,41 \mu\text{g/mL}$) na via do potássio ainda é mais baixa, tornando o OELa mais potente que o óleo da *L. thymoides*.

Ainda nas vias farmacológicas este trabalho mostrou que o OELa, o citral e o limoneno inibiu as contrações evocadas por 5-HT, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os agentes em estudo, sendo possível afirmar um antagonismo nos receptores 5-HT pelos AE, com a mesma eficácia. Nas mesmas concentrações os AE também promovem um relaxamento da musculatura lisa do miométrio contração promovida por ACh, sendo que o limoneno foi menos eficaz que o OELa e o citral. Tanto na via serotoninérgica (5-HT) como colinérgica (ACh) houve reversão das contrações. Os dados evidenciam, portanto que as substâncias em estudo agem não somente na via clássica da ocitocina, mas também sobre outras vias farmacológicas como a da serotonina e da acetilcolina.

Neste sentido, ainda na via serotoninérgica estudos realizados com traqueia isolada de ratos, as contrações induzidas por 5-HT (10 μ M) foram inibidas de forma concentração-dependente pelo OELa com um IC_{50} de 200 μ g/mL. As contrações evocadas por 5-HT em íleo de cobaia foram também inibidas pelo OELa com IC_{50} de 20 μ g/mL. Tanto na traqueia de rato como íleo de cobaia, foi observada a recuperação das contrações que foram obtidas após consecutivas lavagens. Estes resultados mostram que OELa que tem um elevado teor de citral inibe contrações do músculo liso na traqueia e íleo, contrações estas evocadas por 5-HT (JARVIS et al., 2016). Esses estudos fortalecem nossos achados no útero, pois demonstramos que o OELa age nos receptores 5-HT.

Vimos também que há uma forte evidência que o OELa e o citral estejam agindo pelos VOCCs tipo-L, pois foi observado que na presença das agentes em estudo, houve uma inibição da contração promovida pelo Ba_{2+} , assemelhando-se ao efeito da nifedipina bloqueador dos VOCCs tipo-L. Segundo Maynard (2011) o OELa induz um vasorrelaxamento na artéria mesentérica de rato possivelmente devido a uma inibição do influxo de Ca^{2+} através dos VOCCs sensíveis a dihidropiridina. Por outro lado, o limoneno não foi capaz de inibir as contrações neste experimento indicando que ele utiliza outra via para promover o relaxamento, podendo ser pelos diferentes canais de potássio ou mesmo por outras vias de sinalização de cálcio.

Corroborando com este estudo Devi (2011), demonstrou pela primeira vez, que o citral é capaz de produzir atividade antiespasmolítica em íleo isolado de coelho. Esse relaxamento pode ser atribuído a via NO (óxido nítrico) bloqueio de canais de cálcio tipo VOCC e/ou canal de cálcio operado pelo receptor.

Sabe-se que na via eletromecânica as células da musculatura lisa sofrem despolarização pela presença de potássio, e observa-se que por essa via ocorre ativação dos canais de cálcio operados por voltagem (VOCC), e a abertura destes culmina no influxo de cálcio através da membrana, resultando no aumento da concentração de cálcio no meio intracelular, levando assim a contração muscular (SOMLYO; SOMLYO, 1968; BOLTON et al., 1999). Também sabe-se para que ocorra contração pelas vias farmacológicas um agonista liga-se ao receptor de membrana, esse receptor por sua vez encontra-se ligado a uma proteína G que possui a capacidade de modificar a atividade de certos canais iônicos como canais de Na^+ e K^+ que são íons positivos e são capazes de despolarizar a membrana plasmática abrindo os canais para Ca^{2+} para que ocorra uma contração.

Corroborando com nossos dados Moreira (2013) indica que o citral está agindo através do bloqueio dos VOCCs tipo L, sensíveis a dihidropiridina, uma vez que o citral foi capaz de inibir significativamente contrações induzidas por CaCl_2 em anéis de artéria mesentérica, assemelhando-se assim com a ação da nifedipina que já é um bloqueador seletivo dos VOCCs tipo L. Como descrito acima no protocolo com o BaCl_2 foi visto que tanto o OELa como o citral assemelham-se com o efeito produzido pela nifedipina.

A análise do envolvimento das substâncias com os canais para K^+ é importante para o entendimento do seu mecanismo de ação. Uma vez que estes canais fazem parte da fisiologia de células excitáveis, principalmente aquelas que fazem parte do sistema nervoso, músculo esquelético e músculo liso. Estes canais se apresentam em diferentes tipos celulares, portanto exercem diferentes efeitos biológicos. Um exemplo é a regulação do potencial de membrana do músculo liso. O bloqueio destes canais despolariza a membrana, enquanto que sua ativação a hiperpolariza. Inibindo a contração, uma vez que ocorre redução da concentração intracelular de cálcio (Brayden, 1996; Okada et al., 1993)

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que não houve envolvimento dos canais para potássio no relaxamento da musculatura lisa uterina pelo OELa.

Corroborando com os nossos achados, Travassos (2010) demonstrou que ao analisar o efeito relaxante do ácido 8,(17),12E,14-labdatrieno-18-óico, na presença dos bloqueadores de canais para potássio K_v e K_{ATP} não houve a participação dos mesmos, verificando que seu composto estava modulando os canais reduziam o influxo de cálcio, assim também verificamos no nosso estudos.

Ao avaliar o envolvimento da Rho cinase no relaxamento promovido pelo OELa, citral e limoneno comparou-se o efeito relaxante das substâncias ao bloqueador específico da Rho-quinase, o Y27632, sendo possível observar que ambos foram capazes de relaxar a musculatura lisa uterina: $97,88 \pm 2,94\%$, $91,57 \pm 1,88\%$, $100,45 \pm 4,68\%$ e $89,71 \pm 1,71\%$ (Y27632, OELa, o citral e o limoneno respectivamente). Destaca-se ainda que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparou-se a porcentagem de relaxamento entre as substâncias em estudo. Uma vez que, a Rho cinase é uma via moduladora da contração e é ativada pela elevação da $[Ca^{+}]$ intracelular, pode-se sugerir novamente que os AE estão envolvidos no mecanismo do cálcio.

Em outros resultados obtidos nesse trabalho, onde avaliou-se o efeito do OELa na via das cicloxigenase. Verificou-se que quando as tiras miométriais foram expostas a indometacina ($100 \mu\text{M}$) por 20 minutos antes de serem contraídas por OT, não se observou diferença estatística no relaxamento promovido pelo OELa na concentração de $600 \mu\text{g/mL}$ a contração de 100% chegou a $0,57 \pm 2,3$. Similar a estes resultados Ribeiro (2012), demonstrou que, o pré-tratamento com indometacina $10 \mu\text{M}$, em anéis de artéria mesentérica superior com endotélio intacto e pré-contraídos com FEN ($10 \mu\text{M}$) isolados de animais hipertensos ou normotensos não foi alterado o vasorrelaxamento induzido por concentrações crescentes de α -terpineol. Vasconcelos (2013), em uma série de experimentos, com anéis de traqueia tratados previamente com indometacina ($10 \mu\text{M}$) por 5 minutos para serem, então, contraídos com ACh ($5 \mu\text{M}$). Tal tratamento também não alterou o perfil da curva concentração-efeito para o efeito miorelaxante do β -citronelol, comparando-se assim mais uma vez com os resultados deste trabalho.

Em todos os resultados obtidos nesse estudo, observamos um efeitos relaxantes mediados pelo OELa, citral e limoneno, que por sua vez foram reversíveis com a lavagem, demonstrando assim sua baixa toxicidade.

CONCLUSÃO



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

8 CONCLUSÃO

- OELa, citral e limoneno possuem efeito miorelaxante no miométrio isolado de rata no acoplamento eletromecânico e farmacomecânico.
- O OELa e o citral foram capazes de inibir as contrações evocadas por BaCl₂ se comportando de forma similar ao efeito da nifedipina, sendo uma forte evidência que estes agentes estão agindo pelos VOCCs tipo-L.
- Tanto o OELa como o citral e o limoneno revertem as contrações evocadas por 5-HT e ACh.
- O OELa, o citral e o limoneno possui efeito similar ao Y27632, mostrando que uma das vias que podem estar sendo utilizadas pelo AE é a via da Rho cinase.
- O OELa não está promovendo o relaxamento pelos canais para K⁺ (BK_{ca}, K_{ATP} e K_v), pois quando expostos aos bloqueadores específicos o óleo continuou promovendo o relaxamento.
- O OELa não utiliza a via das cicloxigenases para relaxar o miométrio.

REFERÊNCIAS



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

9 REFERÊNCIAS

AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815-824, 2006.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1605-1621, 2006.

AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.

AKINLOYE, A. K.; OKE, B. O. Characterization of the Uterus and Mammary Glands of the Female African Giant Rats (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse) in Nigeria. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 1, 2010.

ALBERT, A.; LARGE, W. Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. **Cell calcium**, v. 33, p. 345-356, 2003.

ALMEIDA E. R. Plantas medicinais: conhecimentos populares e científicos. 1ª ed. São Paulo – SP: **Editora Hemus**, p. 342, 1993.

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; AQUINO-NETO, M. R.; TEIXEIRA-NETO, P. F.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V. de; ARAUJO, F. L. O. de; SOUSA, D. P. de; VASCONCELOS, P. F. de; VASCONCELOS, S. M. M. de; SOUSA, F. C. F. de. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.

and Food Science in Finland, v. 10, p. 243 – 259, 2001.

ANDERSEN, M. L. et al. Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação. Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, **Editora Cromosete**, p.167, 2004.

ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, p.462-468, 2005.

ARANEDA, R. C.; PETERLIN Z, Z. X.; CHESLER, A.; FIRESTEIN, S. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. **The Journal of Physiology**, v. 555, n. 3, p. 743 – 756, 2004.

ARANGO, RAMOS, A. C. AND E. S., Quimiotipos citral e carvona a partir dos óleos essenciais de colombiano *Lippia alba* (Mill.) NE Brown: citotoxicidade, composição e atividade antifúngica: **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.104 n.6, 2009.

ARAÚJO, A. M. Medicina Rústica. 2ª ed. São Paulo, **Ed. Nacional**; Brasília, INL, p. 301, 1977.

ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA,D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian journal of pharmacognosy**. v.16, p 307-313, 2006.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; ALVIM, N. A. T.; ZANETTI, G. D.; HEISLER, E. V. Marcio Rossato et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto and Contexto Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363, 2012.

BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N., Fisiologia, editores Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton: tradução Adriana Pitella Sudré, et al. – Rio de Janeiro: **Elisevier**, 2009.

BITTAR, R. E.; ZUGAIB, M. Indicadores de risco para o parto prematuro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 4, p. 203-209, 2009

BLANCO, M A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803-809, 2013.

BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 85-115, 1999.

BRAYDEN, J.E. Potassium channels in vascular smooth muscle. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**, 23:1069-1076, 1996.

CÁCERES, A.; ALVAREZ, A.V.; OVANDO, A.E.O.; SAMAYOA, B.E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 31, p.193-208, 1991.

CAMÊLO, L. C. A. et al. Caracterização morfológica e agrônômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.

CARBAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; TOLON, Z. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v, 25, n. 1, p. 103 – 107, 1989.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. D. P.; SIVA-FILHO, A. R.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* stapf) effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 37 – 64, 1986.

CARVALHO, P.M.M. O efeito miorelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seu constituinte majoritário citral sobre a musculatura lisa da traqueia de ratos wistar. (Pós-graduação *Strico Senso* em Bioprospecção Molecular) Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Carri – URCA. 2014.

CROWEL, P. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **American Society for Nutritional Sciences**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

CROWELL, P. Monoterpenes in breast câncer chemoprevention. **Breast Cancer Research and treatment**, v. 46, p. 191-197, 1997.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B.

Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

DEMYTTENAERE, J. C.; VANOVERSCHELDE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)-and (S)-(-)-citronellol by *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., and the use of solid-phase microextraction for screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1, p. 137-146, 2004.

DEVI, R.C; SIM, S M; ISMAIL, Rosnah. Spasmolytic effect of citral and extracts of *Cymbopogon citratus* on isolated rabbit ileum. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 47, n. 5, p. 143-156, 2011.

DO VALE, T. G.; FURTADO, E. C.; SANTOS JR, J. G.; VIANA, G. S. B. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709 – 714, 2002.

DUDAI N.; WEINSTEIN Y.; KRUP M.; RABINSKI T.; OFIR R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. **Planta Med**, v. 71 p. 484-488, 2005.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria 79 monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1232 – 1240, 2006.

GONÇALVES, L. A., BARBOSA, L. C. A., AZEVEDO, A. A., CASALI, V. W. D., & NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 166-169, 2008.

GORZALCZANY, S et al. Choleric and antispasmodic effects of *Lippia integrifolia* aqueous extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 16-20, 2008.

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents. **Planta Medica**, v. 77, n°. 3, p.207-220, 2011.

HATANO, V.Y.; TORRICELLI, A.S.; GIASSI, A.C. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* end (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, n. 45, p. 238-243, 2012.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; GRESSIER, B. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v. 22 n. 2, p. 256-258, 2008.

HIROTA, R.; ROGER, N. N; I NAKAMURA, H.; SONG, H-S.; MASAYOSHI SAWAMURA, M.; SUGANUMA, N. Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 97, p. 1027-1031, 2002.

HUANG, Hydroxylamine-induced relaxation inhibited by K⁺ channel blockers in rat aortic rings. **European Journal of Pharmacology**, v. 349, n. 1, p. 53-60, 1998.

HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, m. Relaxin as a Relaxant of the Isolated Rat Uterus: Comparison with Its Mechanism of Action *In Vivo* **General Pharmacology**. v. 29, n. 5, p. 829-833. 1997.

IBRAHIM, M. A.; PIRJO, K.; AFLATUNI A.; TIILIKKALA K.; HOLOPAINEN J.K.; Insectidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. **Agricultural**

JAENSON, T.G.T.; PÅLSSON K.; BORG-KARLSON A.K. Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden. **Medical and Veterinay Etomology**. v.19 p. 345-352, 2005.

JARVIS, G. E.; BARBOSA, R; THOMPSON, A. J. Noncompetitive Inhibition of 5-HT₃ Receptors by Citral, Linalool, and Eucalyptol Revealed by Nonlinear Mixed-Effects Modeling. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 3, p. 549-562, 2016.

KEIRSE, M. J. N. C., A survey of tocolytic drug treatment in preterm labour. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 91 p. 424-430. 1984.

KEIRSE, M. J. N. C.; GRANT, A. & KING, F. J., Preterm labour. In: *Effective Care in Pregnancy and Childbirth* (I. Chalmers, M. Enkin & M. J. N. C. Keirse, eds.), New York: **Oxford University Press**, p. 694-745. 1993.

KIM, J. M.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J. A.; PRESTON III, J. F.; WEI, C. I. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *Journal of food science*, v. 60, p. 1364 - 1368, 2006.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. v. 43, p. 2839-2845, 1995.

LALKO, J.; A.P.I, A.M.. Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. *Food and Chemistry Toxicology*, v. 44, p. 739-746, 2006.

LEAL, L. H. Q. Ligantes Quirais via Arilação de Heck-Matsuda: Aplicação na Alquinilação Enantiosseletiva de Aldeídos Pró-Quirais e na Redução de Cetonas Pró-Quirais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2011.

LIN, C. T.; CHEN, C. J.; LIN, T. Y.; TUNG, J. C.; WANG, S. Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 8783 – 8787, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MAMADOU, G et al. Antispasmodic phytomedicine, from traditional utilization to rational formulation: functional approach. *Phytopharmacology*, v. 1, n. 3, p. 20-35, 2011.

MAMUN-OR-RASHID, A.N.M.; ISLAM, M.R.; DASH, B.K. In vitro Antibacterial Effect of Bushy Matgrass (*Lippia alba* Mill.) Extracts. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 6, p. 334-340, 2012.

MANGPRAYOOL, T; KUPITTAYANANT, S; CHUDAPONGSE, N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, v. 89, p. 68-73, 2013.

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

MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 326-332, 2011.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p.695–698, 1996.

MATOS, F.J.A. Medicinal Plants: Selection chart and employment plants used in phytotherapy in Northeast Brazil. 2 ed. Fortaleza-CE. **University Press**, p. 346, 2000.

MATOS, F.J.A. Farmácias vivas, Fortaleza, Edições UFC. 1994. MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais: Guia Fitoterápico**. 2. Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2001.

MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. Medicinal and aromatic plants grown in Ceará: production technology and essential oils. **Fortaleza: Bank of Northeast Brazil**, p. 61-63, 2007.

MAYNARD, Luana G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 694, 2011.

MCFADZEAN, I. & GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British journal of pharmacology**, v. 135, p.1-13. 2002.

MOLDENKE, H. N. Flora of Panama (Verbenaceae). **Acta Missouri Botanical Garden**, n. 60, p. 41-148, 1973.

MONTEIRO, M.V.; DE MELO LEITE, A.K.; BERTINI, L.M.; DE MORAIS, S.M.; NUNES-PINHEIRO, D.C. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Jornal Ethnopharmacol**, v. 111(2) p. 378-82, 2007.

MOREIRA, F. V. Efeito cardiovascular do citral, monoterpene majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, em ratos. (Pós-graduação Strico Senso em medicina), Universidade Federal de Sergipe. p 57, 2013.

MURRAY, M. A.; BERRY, J. L.; COOK, S. J.; FOSTER, R. W.; GREEN, K. A.; SMALL, R. C. Guinea-pig isolated trachealis: the effects of charybdotoxin on mechanical activity, membrane potential changes and the activity of plasmalemmal K(+)-channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 103, p. 1814-1818, 1991.

OKADA, Y.; YANAGISAWA, T.; YAMAGISCHI, T.; TAIRA, N. channel-opening action and KRN2391-induced reduction of Ca²⁺ sensitivity of arterial smooth muscle. *Arch. Internat. Pharmacod. Ther.*, 326:33-51, 1993.

OLIVEIRA, D. R.; LEITAO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; LEITAO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103–108, 2006.

OLIVEIRA, G.A. A Ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. (Pós-graduação *Strico Senso* em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – UFPB. 2013

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance rawmaterials. **Food Cosmet Toxicol**, v. 17, p. 241–275, 1979.

ORTIZ, M. I.; RAMIREZ-MONTIEL, M. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; PONCE-MONTER, H. A.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; CARIÑO-CORTÉS, R. The Combination of Naproxen and Citral Reduces Nociception and Gastric Damage in Rats. **Archives of Pharmacal research**, v. 33, p. 1691 - 1697, 2010.

OTAIBI, M.A.L. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. **Calcium Signaling**, v. 1 n. 2, 2014.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. p. 443-461. IN: LORINI, I.; MIIKE, L.H.; SENSSEL, V.M. (eds.), Armazenagem de grãos. Campinas: **Instituto Bio Geneziz**, p. 1000, 2002.

RADES, E.; BITTAR, R.; ZUGAIB, M. Determinantes diretos do parto prematuro eletivo e os resultados neonatais. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 26, n. 8, 2004.

RAMACHANDRAN, S.; FONTANILLE, P.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4559 – 4565, 2008.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, C.A.; RODRIGUEZ, A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241-246, 2003.

RANG, H. P. Farmacologia. 6. Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 829, 2007.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p.603-613, 2001.

REZENDE H.Á.; COCCO M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola de Enfermagem, USP**. v. 36(3) p. 282-8, 2002.

RIBEIRO, T.P. Mecanismos de sinalização endotelial envolvidos na atividade cardiovascular do α -terpineol (Pós-graduação *Strico Senso* em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – UFPB. 2012

RICE, P. J.; COATS, J. R.; Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **J. Econ. Entomol**, v. 87, p. 1172–1179, 1994.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.CH.C.L. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p. 1895–1901, 2003.

ROZZA, A. L.; MORAES, T. de M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M. O. M.; BAUAB, T. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and α -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions**, n. 189, p. 82–89, 2011.

SADRAEI, H.; ASGHARI, G.; KASIRI, F. Comparison of antispasmodic effects of *Dracocephalum kotschyi* essential oil, limonene and α -terpineol. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 2, p. 109, 2015

SADRAEI, H.; GHANNADI, A.; MALEKSHAHI, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. **Fitoterapia**, v. 74, n. 5, p. 445-452, 2003.

SALIMENA-PIRES, F. R. *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer, (Verbenaceae) do Brasil. In: **VII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BOTÂNICA**, 1998, Cidade do México. México. p. 299. Resumos. Sociedade Latinoamericana de Botânica, 1998.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARAES, L. G.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v. 134, p. 1649 – 1656, 2007.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SENA FILHO, J.G.; MELO, J.G.S.; SARAIVA, A.M. et al. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 16, p. 506-509, 2006.

SHMIGOL, A. V.; EISNER, D. A.; WRAY, S. The role of the sarcoplasmic reticulum as a Ca²⁺ sinks in rat uterine smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 520, p.153-163. 1999.

SHMYGOL. A.; BLANKS, A. M.; BRU-MERCIER, G.; GULLAM, J. E.; THORNTON, S. Control of uterine Ca²⁺ by membrane voltage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1101, p. 97-109, 2007.

SILVA LR; PEREIRA RCA; BRAGA TR; BEZERRA FC; RODRIGUES THS. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 30 p. S6075-S6080, 2012.

SILVA, F S et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 25-34, 2016.

SILVA, F. S. Estudo Fitoquímico e Farmacológico de *Lippia thymoides* mart. & schauer (verbenaceae). (Pós-graduação *Strico Senso* em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS. 2012

SILVA, M.C.C. Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata. (Graduação em Farmácia) Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba-UFPB. 2013.

SILVA, R.E.R. Atividade vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de rato. (Pós-graduação *Strico Senso* em Bioprospecção Molecular) Pró-reitoria de pós-graduação e pesquisa – PRPGP. Universidade Regional do Cariri – URCA. 2016

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

SOUSA D.G.; SOUSA S.D.; SILVA R.E.; SILVA-ALVES K.S.; FERREIRA-DA-SILVA F.W.; KERNTOPF MR.; MENEZES I.R.; LEAL-CARDOSO J.H.; BARBOSA R. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block excitability of rat sciatic nerve. **Braz J Med Biol Res.** v. 48(8), p. 697-702, 2015.

STOTZ, S. C.; VRIENS, J.; MARTYN, D.; CLARDY, J.; CLAPHAM, D. E., 2008. Citral sensing by TRANsient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. **PLoS One**, v. 3, 2008.

SUN, J. D-Limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, p. 259–264, 2007.

TAGGART, M. J. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? **Physiology**, v. 16, p. 61-65. 2001.

TAGGART, M. J.; WRAY, S. Contribution of sarcoplasmic reticular calcium to smooth muscle contractile activation: gestational dependence in isolated rat uterus. **The Journal of Physiology**, v. 511, p. 133-144. 1998.

TAMPIERE, M.P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components: **Mycopathologia**, v.159, p. 339-345, 2005.

TEÓFILO, T.M.N.G. Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides* Cham. e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos (Pós-graduação *Strico Senso* em Ciências Fisiológicas) Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará. 2012

TSAI, M. L.; CUMMINGS, K. C.; WEBB, R. C.; CARUSO, R. L. Acute Inhibition of Spontaneous Uterine Contractions by na Estrogenic Polychlorinated Biphenyl Is Associated with Disruption of Gap Junctional Communication. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p. 18-29. 1998.

TUROLLA, M.S.R. Avaliação dos Aspectos Toxicológicos dos Fitoterápicos: Um Estudo Comparativo. (Pós-graduação *Strico Senso* em Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP. 2004.

UEDO, N.; TATSUTA, M.; LISHI, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. Inhibition by d-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N0- nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Letters**, v. 137, p. 131-136, 1999.

VALE, T. G.; MATOS, F. J.; DE LIMA, T. C.; VIANA, G. S. B. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 127 – 133, 1999.

VASCONCELOS, T.B. Efeitos antiespasmódico e miorelaxante do β -citronelol em músculo liso traqueal de ratos: potencial ação na hiperreatividade após desafio antigênico e elucidação do mecanismo de ação. (Pós-graduação *Strico Senso* em Farmacologia). Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará-UFC. 2013

VEALE, D.J.H.; OLIVER, D.W.; HAVLIK, I. The effects of herbal oxytocics on the isolated “stripped” myometrium model. **Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1381-1388, 2000.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, n. 36, p. 347-351, 1998.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p.201-206, 2003.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

10 PRUDUÇÃO CIENTÍFICA

Artigo Puplicado

LIMA, V. N. ; Oliveira, C.D.M ; SANTOS, E. S. ; **MORAIS, L. P.** ; Tintino, S.R ; FREITAS, T. S. ; GERALDO, Y. S. ; PEREIRA, R. L. S. ; CRUZ, R. P. ; MENESES, I. R. A. ; COUTINHO, H. D. M. . Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, Caffeic acid and Pyrogallol. *Microbial Pathogenesis*, v. 99, p. 56-61, 2016.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

RIBEIRO, T.F ; MACÊDO, C.A.F ; SILVA, R.E.R ; **MORAIS, L. P.** ; BARBOSA, R. . AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LIMONENO SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA DE RATOS WISTAR. In: I Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Região do Cariri Cearense e XVIII Semana de Iniciação Científica da URCA, 2015, Crato-CE. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2015.

MACÊDO, C.A.F ; RIBEIRO, T.F ; SILVA, R.E.R ; **MORAIS, L. P.** ; BARBOSA, R. . EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS CONSTITUINTESMAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO.. In: I Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Região do Cariri Cearense e XVIII Semana de Iniciação Científica da URCA, 2015, Crato-CE. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2015.

ALMEIDA, N. S. ; **MORAIS, L. P.** ; SILVA, R.E.R ; RIBEIRO, T.F ; MACÊDO, C.A.F ; BARBOSA, R. . AÇÃO DO LIMONENO SOBRE O RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA EM ÚTEROS DE RATOS. In: I Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Região do Cariri Cearense e XVIII Semana de Iniciação Científica da URCA, 2015, Crato-CE. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2015.

AMORIM, T. S. ; MACÊDO, C.A.F ; **MORAIS, L. P.** ; RIBEIRO, T.F ; SILVA, R.E.R ; BARBOSA, R. . AÇÃO DO CITRAL SOBRE O RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA DE RATOS WISTAR. In: I Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Região do Cariri Cearense e XVIII Semana de Iniciação Científica da URCA, 2015, Crato-CE. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2015.

BASTOS, C. M. S. ; RIBEIRO, T.F ; MACÊDO, C.A.F ; SILVA, R.E.R ; **MORAIS, L. P.** ; BARBOSA, R. . AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓLEO ESSENCIA DE *Lippia alba* SOBRE A MUSCULATURA LISA TRAQUEAL DE RATOS WISTAR. In: I Semana Nacional de Ciência e Tecnologia da Região do Cariri Cearense e XVIII Semana de Iniciação Científica da URCA, 2015, Crato-CE. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2015.

MORAIS, L. P.; MACÊDO, C.A.F ; SILVA, A.A ; RIBEIRO, T.F ; ALMEIDA, N. S. ; BARBOSA, R. . EFEITO DO LIMONENO EM MIOMÉTRIO DE RATAS WISTAR. In: V ANAMAL LAB, 2015, FORTALEZA-CE. LIVRO DE RESUMOS, 2015.

Silva, R.E.R ; Silva, A.A ; Macêdo, C.A.F ; **MORAIS, L. P.** ; Ribeiro, T.F ; BARBOSA, R. . ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015, JUAZEIRO - BA. ANAIS DO X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015.

RIBEIRO, T.F ; MACÊDO, C.A.F ; **MORAIS, L. P.** ; SILVA, R.E.R ; SILVA, A.A ; BARBOSA, R. . AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E DO SEU CONSTITUINTE LIMONENO SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA DE RATOS WISTAR. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015, JUAZEIRO - BA. ANAIS DO X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 2015.




ANEXOS



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/767019380256453694/>

11 ANEXOS

Anexo 1

	<p>UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291 CEP 63105-000 – Crato - CE - Brasil propg@urca.br - www.urca.br/ceua</p>	
<h3>DECLARAÇÃO</h3>		
<p>Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia alba</i> (MILL.) N. E. BROWN E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATAS WISTAR", Processo Nº 00158/2015.2, foi APROVADO pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.</p>		
<p> Marta Regina Kerntopf Vice-presidente do CEUA/URCA</p>		