



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA BIOLÓGICA – PPQB**

**DÉBORA DE MENEZES DANTAS**

**SCREENING FARMACOLÓGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO *Lippia*,  
COMPOSTOS TERPÊNICOS E FENILPROPANÓIDES E SEUS EFEITOS  
VASODILATADORES EM ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA**

CRATO - CE  
2021

**DÉBORA DE MENEZES DANTAS**

**SCREENING FARMACOLÓGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO *Lippia*,  
COMPOSTOS TERPÊNICOS E FENILPROPANÓIDES E SEUS EFEITOS  
VASODILATADORES EM ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Roseli Barbosa

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA  
UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA**

DANTAS, Débora Menezes

**Screening farmacológico dos óleos essenciais do gênero  
*Lippia*, compostos terpênicos e fenilpropanóides e seus efeitos  
vasodilatadores em artéria umbilical humana**

68 pag.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Regional do Cariri –  
Centro de Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de  
Química Biológica.

1. Produto natural; 2. Artéria umbilical humana; 3.  
Vasorrelaxante. I. Universidade Regional do Cariri – Centro de  
Ciências Biológica e da Saúde – Departamento de Química  
Biológica.

## Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação abaixo identificada, autorizo à Universidade Regional do Cariri – URCA, a disponibilizar por tempo indeterminado ao alcance do público a obra abaixo citada, através do site <http://bdtd.ibict.br/bdtd/>, bem como da rede mundial de computadores – Internet, sem pagamento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, conforme permissões assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data, atendendo à Portaria Nº 13 de 15/02/2006 da CAPES.

Identificação do Material Bibliográfico:	<input checked="" type="checkbox"/> Dissertação	<input type="checkbox"/> Tese
Autor: Débora de Menezes Dantas		
CPF: 05207787314	RG: 20072680878	
Nacionalidade: Brasileira	Estado Civil: Solteira	
Endereço Completo		
CEP: 63119130	Cidade: Crato	Estado: Ceará
Fone/Celular: (88) 99909-6700	E-mail: debora_fdj@hotmail.com	
Título: Screening farmacológico dos óleos essenciais do gênero <i>Lippia</i> , compostos terpênicos e fenilpropanóides e seus efeitos vasodilatadores em artéria umbilical humana		
Orientador: Profa. Dra. Roseli Barbosa		
Coorientador:		
Membros da Banca: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho		
Prof. Dr. Emanuel Kennedy Feitosa		
Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga		
Profa. Dra. Renata Evaristo Rodrigues da Silva		
Data da Defesa: 28/10/21	Curso: Química Biológica	
Área do Conhecimento: Atividade de produtos naturais		
Palavras-Chave: Produto natural; Artéria umbilical humana; Vasorrelaxante		
3. Agência de Fomento: CAPES		
Informações de Acesso ao Documento: para publicação	<input checked="" type="checkbox"/> Acesso Total	<input type="checkbox"/> Acesso Parcial
Em caso de publicação parcial, especifique o(s) arquivo(s) e/ou capítulo(s) restrito(s):		


Crato, 04 de janeiro de 2022

Havendo concordância com a publicação eletrônica enviamos o(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação gerada a partir da versão final corrigida e aprovada pelo Orientador. A restrição (parcial ou total) poderá ser mantida por até dois anos a partir da data de autorização da publicação sob responsabilidade do Programa. A extensão deste prazo demandará justificativa formal apresentada será comunicada à CAPES

Assinatura do Autor:

*Débora de Menezes Danton*

Assinatura do Orientador:



**DÉBORA DE MENEZES DANTAS**

**SCREENING FARMACOLÓGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DO GÊNERO *Lippia*,  
COMPOSTOS TERPÊNICOS E FENILPROPANÓIDES E SEUS EFEITOS  
VASODILATADORES EM ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química Biológica.

**BANCA EXAMINADORA:**

**Roseli Barbosa / Orientadora**

Professora Titular da Universidade Regional do Cariri

**Henrique Douglas Melo Coutinho / Membro Titular**

Professor Titular da Universidade Regional do Cariri

**Emanuel Kennedy Feitosa / Membro Titular**

Professor Titular da Universidade Federal Rural do Semi-Árido

**Profa. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga / Membro Suplente**

Professora Titular da Universidade Regional do Cariri

**Renata Evaristo Rodrigues da Silva / Membro Suplente**

Professora Titular da Unileão Centro Universitário

**Aos meus pais, José Irismar e Maria Albenisa,  
bases da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, pela vida e por todas as bênçãos!

Agradeço imensamente a minha família, em especial aos meus pais, **José Irismar** e **Maria Albenisa**, por todo amor, educação e ensinamentos, pelo incentivo aos estudos e todo apoio. A minha tia **Francisca** (tia Chica) por todo amor e dedicação. As minhas irmãs, **Denise Dantas** que sempre foi um grande exemplo, agradeço por toda ajuda e incentivo e a caçula **Daisy Dantas** por está sempre comigo, pelo apoio e companheirismo.

A minha querida orientadora **Dra. Roseli Barbosa**, professora cuja trajetória de vida e profissional me inspira, gratidão por ter me acolhido no grupo de pesquisa, por transmitir sua grande experiência profissional, por todas as orientações, paciência e apoio.

A toda equipe do Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis: **Nayane, Júnior, Franciele, Geórgia, Guilherme, Isaac, Thais e Paulo, Renata**, por estarem presentes no cotidiano das atividades experimentais, sendo fundamentais para realização desta pesquisa. Em especial as minhas amigas **Carla** e **Gabriela** que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando em coletas e longas horas de teste, gratidão pelas risadas, amizade e cumplicidade. Aos meus amigos **Me. Luís Pereira** e **Me. Andressa de Alencar** que me acompanharam em cada etapa e não mediram esforços para apoiar meu trabalho, dando contribuições fundamentais e decisivas para a sua conclusão.

Aos professores **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, Dr. Emanuel Kennedy Feitosa e Dra. Renata Evaristo Rodrigues da Silva**, por aceitarem participar da banca examinadora e pelas valiosas colaborações e sugestões.

A **URCA** e ao **Programa de Pós-Graduação em Química Biológica** pela oportunidade de me qualificar profissionalmente nesta instituição. Gratidão a todos os professores que compõem o corpo docente do programa, por todos os ensinamentos repassados.

Aos colegas da turma pela amizade construída e pelos conhecimentos compartilhados.

As minhas queridas amigas biólogas **Isabel Alcântara** e **Ana Maria** que sempre estiveram comigo durante essa trajetória, gratidão pelas longas conversas, ajuda e amizade.

As minhas primas **Leopoldina Dantas** e **Jessianny Lima** por todo apoio, suporte e companheirismo durante o mestrado.



A todos os demais familiares e amigos que sempre torceram por mim e tornaram essa caminhada mais leve.

A toda equipe de profissionais do **Hospital e Maternidade São Francisco** e a todas as **parturientes** que disponibilizaram porções de seus cordões umbilicais para realização da pesquisa.

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

Sou grata a todos.

Bem sei eu que tudo podes, e que nenhum dos  
teus propósitos pode ser impedido.

Jó 42:2

## RESUMO

A prospecção de produtos naturais com propriedades vasoativas caracteriza-se como uma ferramenta promissora para descobertas de novas substâncias com potencial terapêutico frente a doenças com alterações vasculares, como as síndromes hipertensivas gestacionais. Os óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia sidoides*) apresentam dentre as caracterizações farmacológicas um efeito vasorrelaxante bem como atividade relaxante em outros órgãos que contém músculo liso; comumente constituintes químicos que compõem a mistura dos óleos essenciais de diversas plantas (principalmente compostos terpênicos e fenilpropanóides) estão relacionadas a sua atividade biológica. Os terpenos como citral, limoneno, álcool perílico e fenilpropanóides como eugenol e metil eugenol possuem atividade vasorrelaxante bem descrita na literatura. Os animais de laboratório roedores (ratos, cobaias, camundongos) tem sido o principal modelo para investigação do potencial bioativo de diversas substâncias naturais, adicionalmente a artéria umbilical humana apresenta-se como um modelo fisiológico vascular alternativo para avaliar moléculas naturais potencialmente promissoras e seu uso facilita as pesquisas clinicas, uma vez que, o tecido utilizado é humano. O presente trabalho tem como objetivo realizar um screening farmacológico dos óleos essenciais de *Lippia alba* (OELa) e *Lippia sidoides* (OELs), dos terpenos: citral, limoneno e álcool perílico e dos fenilpropanóides eugenol e metil eugenol em artéria umbilical humana. As preparações de artéria umbilical humana foram submetidas a contrações evocadas por KCl (60 mM) em aparelho de banho de órgãos em presença de concentrações crescentes e cumulativas (1-5000 µg/mL e µM) de OELa, OELs, citral, limoneno, álcool perílico, eugenol e metil eugenol – em experimentos distintos. O relaxamento correspondeu a 100% da contração inicial, exceto as preparações que foram submetidas a concentrações de limoneno. Os valores de CE<sub>50</sub> foram respectivamente: 424,3 µg/mL (OELa); 468,7 ± 6,7 µg/mL (OELs); 264,2 ± 8,2 µM (citral); 677,8±5,4 µM (limoneno); 186,3±6,4 µM (álcool perílico); 986,4±7,9 µM (eugenol); e 279,1±4,4 µM (metil-eugenol). Observa-se um efeito vasorrelaxante para todas as substâncias avaliadas, os óleos essenciais apresentam potência farmacológica estatisticamente semelhante e os constituintes álcool perílico, citral e metil-eugenol demonstraram potência farmacológica maior do que o limoneno e eugenol. Esses resultados propõem um potencial efeito vasorrelaxante de substâncias vegetais em artérias umbilicais humanas abrindo caminho para futuras investigações dos mecanismos de ação envolvidos nesse efeito e futuramente descrevendo possíveis substâncias que possam atuar em doenças relacionadas a estes vasos, tais como a pré-eclâmpsia.

**Palavras-chave:** Produtos naturais; Artéria umbilical humana; Vasorrelaxante.

## ABSTRACT

The prospection of natural products with vasoactive properties is characterized as a promising tool for discovering new substances with therapeutic potential against diseases with vascular alterations, such as gestational hypertensive syndromes. Essential oils from species of the genus *Lippia* (*Lippia alba* and *Lippia sidoides*) have among their pharmacological characterizations a vasorelaxant effect as well as a relaxing activity in other organs that contain smooth muscle; commonly chemical constituents that make up the mixture of essential oils from various plants (mainly terpenic compounds and phenylpropanoids) are related to their biological activity. Terpenes such as citral, limonene, peryl alcohol and phenylpropanoids such as eugenol and methyl eugenol have vasorelaxant activity well described in the literature. Rodent laboratory animals (rats, guinea pigs, mice) have been the main model for investigating the bioactive potential of several natural substances, in addition the human umbilical artery presents itself as an alternative vascular physiological model to evaluate potentially promising natural molecules and their use facilitates clinical research, since the tissue used is human. The present aims to carry out a screening screening of essential oils from *Lippia alba* (OELa) and *Lippia sidoides* (OELs), citral terpenes, limonene and peryl alcohol and the phenylpropanoids eugenol and methyl eugenol in human umbilical artery. Human umbilical artery preparations were subjected to KCl-evoked contractions (60 mM) in an organ bath apparatus in the presence of increasing and cumulative concentrations (1-5000 µg/mL and µM) of OELa, OELs, citral, limonene, alcohol peryl, eugenol and methyl eugenol – in separate experiments. Relaxation corresponded to 100% of the initial contraction, except for preparations that were subjected to limonene concentrations. EC50 values were respectively: 424.3 µg/ml (OELa); 468.7 ± 6.7 µg/ml (OELs); 264.2 ± 8.2 µM (citral); 677.8±5.4 µM (limonene); 186.3±6.4 µM (peryl alcohol); 986.4±7.9 µM (eugenol); and 279.1±4.4 µM (methyl-eugenol). There is a vasorelaxant effect for all substances evaluated, essential oils have statistically similar pharmacological potency and the constituents peryl alcohol, citral and methyl-eugenol demonstrated greater pharmacological potency than limonene and eugenol. These results propose a potential vasorelaxant effect of plant substances on human umbilical arteries, opening the way for future investigations of the mechanisms of action involved in this effect and, in the future, describing possible substances that can act in diseases related to these vessels, such as pre-eclampsia.

**Keywords:** Natural products; Human umbilical artery; Vasorelaxant.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do Citral. ....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do Limoneno .....	19
<b>Figura 3:</b> Estrutura química do Álcool perfílico .....	20
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do Eugenol. ....	21
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do Metil eugenol. ....	23
<b>Figura 6:</b> Estrutura anatômica do cordão umbilical, mostrando a disposição das artérias e da veia umbilical.....	25
<b>Figura 7:</b> Representação mostrando os mecanismos de contração das células do músculo liso da artéria umbilical humana. ....	27
<b>Figura 8:</b> Representação mostrando os mecanismos de relaxamento das células do músculo liso da artéria umbilical humana. ....	29

### CAPÍTULO II

<b>Figure 1:</b> Effect of the essential oils of <i>Lippia alba</i> and <i>L. sidoides</i> on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA).. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figure 2:</b> Effect of the citral, limonene and peryl alcohol terpenes on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA).. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Figure 3:</b> Effect of phenylpropanoids eugenol and methyl eugenol on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA).. ....	<b>Erro! Indicador não definido.6</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Íon cálcio
<b>[Ca<sup>2+</sup>]<sup>i</sup></b>	Concentração intracelular de cálcio
<b>4Ca<sup>2+</sup>CaM</b>	Complexo Cálcio Calmodulina
<b>5-HT</b>	5-hidroxitriptamina (serotonina)
<b>AMPc</b>	Adenosina Monofosfato Cíclico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AUH</b>	Artéria Umbilical Humana
<b>Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>	Proteína Cálcio ATPase
<b>CCOV</b>	Canais para cálcio operados por voltagem
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentração de uma substância que inibe 50% do efeito produzido por um agonista
<b>DGA</b>	Diacilglicerol
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>GMPc</b>	Guanosina Monofosfato Cíclico
<b>HEPES</b>	Ácido 4-2-idrossietil-1-piparazinil-etansolfônico
<b>IP3</b>	Inositol Trifosfato
<b>IP3R</b>	Receptores de Inositol Trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>LTCC</b>	Canais de Cálcio tipo L
<b>MLCK</b>	Kinase de Cadeia Leve de Miosina
<b>MLCP</b>	Fosfatase de Cadeia Leve de Miosina
<b>N</b>	Número de experimentos realizados
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></b>	Bomba de Sódio e Potássio
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>OELa</b>	Óleo essencial de <i>Lippia alba</i>
<b>OELs</b>	Óleo essencial de <i>Lippia sidoides</i>
<b>PKA</b>	Proteína Cinase A
<b>PKC</b>	Proteína Cinase C

<b>PKG</b>	Proteína Cinase G dependente de GMPc
<b>RS</b>	Retículo Sarcoplasmático
<b>RYr</b>	Receptores de Rianodina
<b>SOCC</b>	Canal de Cálcio Operado por Estoque
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TRP</b>	Receptores de Potencial Transiente
<b>VOCCs</b>	Canais de Cálcio Dependente de Voltagem
<b>PLC</b>	Fosfolipase C
<b>μM</b>	Micromolar
<b>Mg</b>	Micrograma

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS.....	10
1.2 ESTRATÉGIA DA PESQUISA .....	12
1.3 ESTRUTURA DO RELATÓRIO DE QUALIFICAÇÃO.....	14
<b>CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
1.1 PRODUTOS NATURAIS E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS .....	15
1.1.1 Gênero <i>Lippia</i> e as espécies: <i>Lippia alba</i> e <i>Lippia sdoides</i> .....	16
1.2 TERPENOS: CITRAL, LIMONENO E ÁLCOOL PERÍLICO .....	17
1.2.1 Citral .....	18
1.2.2 Limoneno .....	19
1.2.3 Álcool perílico .....	20
1.3 FENILPROPANÓIDES: EUGENOL E METIL EUGENOL .....	21
1.3.1 Eugenol .....	21
1.3.2 Metil Eugenol.....	23
1.4 MORFOLOGIA DO CORDÃO E DA ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA.....	24
1.5 MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA DA AUH.....	25
REFERENCIAS .....	30
<b>CAPÍTULO 2: PHARMACOLOGICAL SCREENING OF SPECIES OF THE GENUS <i>Lippia</i>, TERPENES AND PHENYLPROPANOIDS AND THEIR VASORELAXING EFFECTS ON HUMAN UMBILICAL ARTERY.</b> .....	41
<b>CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	56
3.1 Conclusões gerais.....	56
3.2 Perspectivas de Investigações Futuras .....	56
<b>ANEXOS</b> .....	57



## INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 OBJETIVOS E QUESTIONAMENTOS

O tecido muscular liso faz parte dos diversos órgãos e sistemas dos mamíferos. Vários processos biológicos dependem da contractilidade das células desse músculo, tais como, a manutenção do tônus vascular e da pressão sanguínea, desencadeamento do trabalho de parto, condução do bolo fecal pelo movimento peristáltico, entre outros. Desta forma, o mau funcionamento do músculo liso está associado a diversas patologias (MURPHY, 1999), como a exemplo as síndromes hipertensivas gestacionais.

Este grupo de doenças e condições inclui a pré-eclâmpsia (PE), eclâmpsia, hipertensão gestacional e a hipertensão crônica (STEEGERS et al., 2010), que ainda retratam um problema de saúde pública, afetando cerca de cinco a dez por cento das mulheres grávidas em todo o mundo (JANANI F, CHANGAEE F, 2017), sendo causa importante de morbidade aguda grave e morte entre mães e bebês (DULEY L, 2009). Se tratando do feto são inúmeras as complicações decorrentes, como restrição do crescimento fetal, líquido amniótico reduzido, oxigenação anormal, uma vez que essas síndromes ocasionam um aumento da resistência vascular periférica e vasoconstrição geral (MOHAUPT, 2007), levando a resistência vascular da circulação umbilical e um fluxo sanguíneo insuficiente para o feto.

Existem substâncias vasodilatadoras que são utilizadas em algumas patologias (BANIK;BERGER, 2015), no entanto, muitas possuem restrições quando utilizadas durante a gestação. Além disso, ainda que existam algumas opções de tratamento medicamentoso, cabe ressaltar que a reatividade vascular das circulações fetal e materna não são idênticas. Sabe-se que o sistema arterial umbilical responde precariamente a alguns agentes relaxantes, como acetilcolina, nitrito de sódio e adenosina, que são agentes eficazes em vasos sistêmicos (Leung et al., 2006). Verificou-se a necessidade de se buscar por novas substâncias que apresentem vasoatividade nos vasos umbilicais, permitindo detectar possíveis alvos terapêuticos para o tratamento de distúrbios desses vasos. Os produtos naturais têm se mostrado promissores, para a descoberta de novos fármacos, devido à diversidade químico-estrutural que esses compostos apresentam (LAHLOU, 2013).

O interesse na investigação de produtos naturais com propriedade relaxante relaciona-se ao fato dessas substâncias possuírem uma vasta aplicação em vários processos fisiopatológicos. Dentre os produtos naturais, o uso de plantas se destaca. Seus efeitos biológicos são devido a grande diversidade de compostos bioativos produzidos através de seu

metabolismo secundário (PEREIRA, 2006). Os óleos essenciais (OEs), são complexo aromático que contém uma mistura de diversas moléculas orgânicas, apresentam importantes propriedades biológicas exercidas sobre plantas, animais e seres humanos (BASER, BUCHBAUER, 2010), sendo esse perfil, um reflexo da sua rica composição química, os quais são constituídos principalmente de terpenos e fenilpropanóides (BAKKALI, et al., 2008).

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* (*Lippia alba* e *Lippia sidoides*) apresentam dentre as caracterizações farmacológicas um efeito vasorrelaxante (DA SILVA et al., 2018) bem como atividade relaxante em outros órgãos que contém músculo liso como útero (PEREIRA-DE-MORAES et al., 2019) e traqueia (CARVALHO et al., 2018); comumente constituintes químicos que compõem a mistura dos óleos essenciais de diversas plantas estão relacionadas a sua atividade biológica. As duas principais classes químicas encontradas nos óleos essenciais (CASTRO et al., 2004) que são os terpenos (como exemplo o citral, limoneno, álcool perílico) e fenilpropanóides (como exemplo o eugenol e metil eugenol) possuem atividades vasorrelaxante bem descrita na literatura (DA SILVA et al., 2018; PEREIRA-DE-MORAES et al., 2019; CARDOSO-TEIXEIRA et.al., 2018; PEIXOTO-NEVES et al., 2015; LAHLOU et al., 2004).

Os animais de laboratórios roedores (ratos, cobaias, camundongos) tem sido o principal modelo para investigação do potencial vasoativo de diversas substâncias naturais tais como os óleos e constituintes que os compõem. No entanto, é importante destacar que podem ocorrer diferenças entre as respostas de substâncias vasodilatadoras em vasos de animais experimentais (roedores) e humanos (FEI et al., 2008). Alternativamente, o cordão umbilical é um material biológico humano prontamente disponível, descartado após o parto, fonte abundante de tecido vascular humano, que pode ser excelente modelo para investigação de substâncias vasoativas. Seu uso facilita assim as pesquisas clínicas, uma vez que, o tecido utilizado é humano (DANTAS et al., 2019). Adicionalmente, os aspectos éticos da utilização de animais em experimentos estimulam a adoção de métodos alternativos sempre que possível e o uso desses seres vivos em situações de absoluta imprescindibilidade (BRASIL, 2008).

Levando em consideração de que há muitos estudos sobre a atividade relaxante das substâncias citadas, verificou-se que não existem relatos sobre o efeito vasodilatador em vasos umbilicais humanos. Sendo assim, o presente estudo realizou, com substância já estudadas em vasos animais de roedores, um screening farmacológico dos óleos essenciais de *Lippia alba* (OELa) e *Lippia sidoides* (OELs), dos terpenos citral, limoneno e álcool perílico, e dos

fenilpropanóides eugenol e metil eugenol como agentes envolvidos na regulação da musculatura lisa vascular da artéria umbilical.

## 1.2 ESTRATÉGIA DA PESQUISA

Fundamentados nos questionamentos e objetivos da pesquisa, buscamos desenvolver uma pesquisa científica em laboratório, de natureza aplicada, com abordagem quantitativa, procedimento experimental e com objetivo de estudo explicativo.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Regional do Cariri-URCA (nº parecer 3.832.881).

As amostras de cordões umbilicais foram coletados no Hospital e Maternidade São Francisco, situada no bairro Pimenta, em Crato-CE. Esta maternidade é vinculada ao Sistema Único de Saúde (SUS), sendo considerada como referência para região do Cariri. Optou-se por este local de coleta, devido à quantidade de partos que ocorrem diariamente e pela sua proximidade física com o Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis (LFCE) da URCA. Utilizamos segmentos de cordão umbilical de aproximadamente 10 cm de comprimento, sendo coletada apenas das porções que seriam destinadas ao descarte biológico. A amostra foi escolhida de forma aleatória, colhidos com o consentimento prévio das parturientes submetidas ao parto normal ou cesáreo. Elas poderiam participar da pesquisa mediante a assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1). Posteriormente, as amostras de cordão umbilical foram imersas em solução nutritiva de Krebs modificado (LEREIS et al., 2006), refrigerados de 4 a 8 °C em caixa térmica, e transportados para o LFCE. Os segmentos de cordões foram armazenados na geladeira, e foram utilizados em até 48 h após a coleta ter sido realizada (MILDENBERGER et al., 2003).

Os efeitos vasorrelaxantes dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, dos terpenos citral, limoneno e álcool perfílico e dos fenilpropanóides eugenol e metil eugenol, foram avaliados empregando a técnica de contração isométrica em banho de órgão isolado, a qual produz condições fisiológicas *in vitro*, no qual é possível verificar a ação de substâncias em condições fisiológicas (aeração, temperaturas e nutrientes) para o estudo dos eventos relacionados aos mecanismos de contração e relaxamento do músculo liso (MUSIAL & DA SILVA JUNIOR, 2015). Esta técnica é composta de um conjunto de aparelhos, sendo uma cuba de vidro contendo no seu interior cubetas de vidro, com capacidade de 10 mL, conectada a uma serpentina helicoidal, por onde ocorre a passagem do líquido nutritivo. Esta serpentina se mantém banhada por água aquecida, 37 °C, impulsionada por uma bomba de circulação presente em um banho-maria equipado de termostato.

Para obtenção de contrações isométricas, o tecido é mantido dentro da câmara, e uma de suas extremidades suspensas através de uma haste metálica conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain) o qual permitiu captar a medida de tensão isométrica produzida pelos anéis, sendo transformadas em sinais elétricos. O transdutor foi conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), e este à entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados serão convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para análise posterior.

A técnica de banho de órgão isolado possui diversas vantagens, pois através de preparações relativamente simples, permite estimulação química através da exposição direta de tecidos aos agentes contraturantes, relaxantes ou bloqueadores, o que permite muitas vezes, quantificar de forma precisa estas respostas de fenômenos reflexos e investigar propriedades contráteis (FRY, 2004).

Historicamente a utilização do banho de órgão isolado em experimentos *in vitro*, para avaliar a fisiologia e a farmacologia de tecidos, é feita com preparações de várias espécies, como rato, coelho, camundongo e humano. Para tanto, são utilizados tecidos ou órgãos para os estudos, como: anéis de artéria ou veia, traqueia, intestino (duodeno, jejuno e íleo), tiras de útero, bexiga, átrio, ventrículo, vesícula seminal, entre outros (TAHA et al., 2010; DA SILVA et al., 2018; PEREIRA-DE-MORAIS et al., 2019).

Esta técnica é empregada numa série de descobertas farmacológicas importantes, como o Prêmio Nobel de 1998, na área de Fisiologia e Medicina, quando os cientistas Ferid Murad, Robert F. Furchgott e Louis Ignarro revelaram as propriedades sinalizadoras do óxido nítrico. Mesmo com o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas, ou que buscam respostas moleculares, o banho de órgão continua sendo uma metodologia muito utilizada e com o avanço de outras tecnologias, vem se aliando e se combinando com outras ferramentas e metodologias farmacológicas, com a finalidade de buscar ainda mais consistência nos resultados.

Como estratégia metodológica, buscamos avaliar qual dos produtos naturais (óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, dos terpenos citral, limoneno e álcool perfílico e dos fenilpropanóides eugenol e metil eugenol), apresenta um maior efeito relaxante em artéria umbilical humana. Como protocolo experimental foi investigado a via eletromecânica, em que nesses experimentos a célula é exposta a alta quantidade de potássio, promovendo uma despolarização do potencial transmembrana e consequente abertura de canais iônicos, como os de cálcio dependentes de voltagem, permitindo um influxo desse íon através da membrana

plasmática, suscitando a contração muscular (WEBB, 2003). Dessa forma, é possível investigar se os efeitos relaxantes dessas substâncias envolvem a participação de canais iônicos dependente de voltagem, e através desse estudo dar base para futuras pesquisas mais detalhadas com a substância que se obteve o resultado mais promissor.

Estes resultados abrem caminhos para futuras investigações de produtos naturais que possam atuar em doenças relacionadas a esses vasos como a pré-eclâmpsia.

### 1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Nossa pesquisa relata pela primeira vez os efeitos vasodilatadores dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, dos terpenos citral, limoneno e álcool perfílico e dos fenilpropanóides eugenol e metil eugenol, em artéria umbilical humana. Estes resultados foram organizados em três capítulos: o capítulo I trata-se de uma fundamentação teórica realizada da nossa pesquisa, o capítulo II apresentamos nossos resultados em formato de artigo, e no capítulo III descrevemos de forma preliminar nossas conclusões obtidas.

No capítulo I a fundamentação teórica apresentada está dividida em tópicos que nos direcionaram a tratar nosso problema, analisar dados, comparar com outros trabalhos e discutir nossos resultados. De acordo com Mello (2006, p. 87) “os dados apresentados devem ser interpretados à luz das teorias existentes”. Destacamos como pontos principais: Produtos naturais e o uso de plantas medicinais, Gênero *Lippia* e as espécies *Lippia alba* e *Lippia sidoides*, terpenos, citral, limoneno, álcool perfílico, fenilpropanóides, eugenol, metil eugenol, morfologia do cordão e da artéria umbilical humana, e mecanismos de contração e relaxamento da artéria umbilical. As referências da introdução e da fundamentação teórica encontram-se ao final deste capítulo.

O capítulo II refere-se ao artigo intitulado “Pharmacological screening of species of the genus *Lippia*, terpenes and phenylpropanoids and their vasorelaxing effects on human umbilical artery”, esse trabalho demonstrou a ação vasorrelaxante dos óleos essenciais de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, dos terpenos citral, limoneno e álcool perfílico e dos fenilpropanóides eugenol e metil eugenol em artéria isolada de cordão umbilical humano. Foi submetido para possível publicação na revista (Current Pharmaceutical Design).

Por fim, o capítulo III trata-se das considerações finais do nosso estudo, onde trazemos um conjunto de evidências e os principais achados farmacológicos das substâncias estudadas em tecido vascular umbilical. Acrescentamos ainda as perspectivas e investigações futuras dos nossos estudos envolvendo a participação destes produtos naturais.

## CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 1.1 PRODUTOS NATURAIS E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de produtos naturais para fins terapêuticos é uma prática muito antiga. Sendo por um longo tempo os minerais, plantas e produtos animais as principais fontes de drogas (BAJPAI et al., 2008; SCREMIN et al., 2016).

A eficácia para o uso desses produtos é atribuída a observações populares, que contribuem para divulgação terapêutica de novos compostos biologicamente ativos. Dessa forma, diante da abundância de suas moléculas quimicamente promissoras, o interesse por drogas derivadas de produtos naturais aumentou expressivamente, tanto é que atualmente 87% das enfermidades humanas podem ser tratadas por fármacos produzidos através de produtos naturais, podendo ser utilizados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, anticancerígenos, entre outros (BRANDÃO, et al., 2010).

Dentre os produtos naturais, o uso de plantas se destaca na busca para o desenvolvimento de novos fármacos. Como exemplos podemos citar a digoxina, um glicosídeo cardiotônico isolada de *Digitalis lanata* e usada no tratamento de problemas cardíacos. A vincristina e vimblastina, alcaloides extraídos de *Catharanthus roseus*, identificados como anticancerígenos. A quinina e quinidina de *Cinchona* spp. que possui propriedades antitérmicas, antimalárica e analgésica, a atropina de *Atropa belladonna* e a morfina e a codeína de *Papaver somniferum* (RATES, 2001).

Os diversos efeitos farmacológicos encontrados nesses seres são devido à diversidade químico-estrutural oriundos do seu metabolismo secundário, que fornece uma fonte abundante para a descoberta de moléculas bioativas (PEREIRA, 2006). Em meio aos agentes terapêuticos provenientes de plantas, com o uso medicinal popular e científico, destacam-se os óleos essenciais (OEs). Esses óleos são complexos aromáticos que contém uma mistura de substâncias orgânicas voláteis, presentes nos diversos órgãos dos vegetais (raízes, cascas, folhas, flores e frutos). Apresentam importantes propriedades biológicas exercidas sobre animais, plantas e seres humanos (BASER, BUCHBAUER, 2010), sendo esse perfil, um reflexo da sua rica composição química. Podem conter de 20 a 60 componentes diferentes em concentrações variáveis, apresentando dois ou três desses componentes uma concentração mais elevada (20-70%). Essas substâncias que se encontram em maior quantidade, são denominadas constituintes majoritários.

Entre as classes de compostos presentes nos OEs os terpenos e os fenilpropenos são as mais comumente encontradas (CASTRO et al., 2004; BAKKALI, et al., 2008).

### 1.1.1 Gênero *Lippia* e as espécies: *Lippia alba* e *Lippia sidoides*

O gênero *Lippia* pertence a família Verbenaceae, incluindo aproximadamente 200 espécies. É o segundo maior da família Verbenaceae, possui espécies e variedades que estão amplamente distribuídas nos neotrópicos apresentando-se na forma de ervas, arbustos ou pequenas árvores (MATOS, 2000).

Infusões das folhas, parte aérea e flores são tradicionalmente utilizadas na medicina popular como loção tópica para tratamentos de pele, transtornos respiratórios e gastrointestinais (MATOS, 2000). Além disso, inúmeras espécies desse gênero foram estudadas, e apresentam uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo atividade relaxante como, por exemplo, as espécies de *Lippia alba*, *Lippia sidoides*, *Lippia thymoides*, *Lippia citriodora* (BLANCO, et al., 2013; TEÓFILO, et al., 2012; SILVA, et al., 2016; MAMADOU, et al., 2011).

A espécie brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é conhecida popularmente por erva cidreira, erva-cidreira-brasileira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, sálvia, entre outras sinônimas (MATOS, 2000; PASCUAL et al., 2001). É amplamente distribuída em todo o território brasileiro, apresenta-se na natureza como um arbusto, podendo alcançar até um metro e meio de altura, as vezes com ramos pendentes, esbranquiçados e quebradiços folhas ásperas e ovaladas, com bordas serreadas 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).

Alguns fatores climáticos e geográficos, como: as estações do ano, a época de floração, solo, índice pluviométrico, partes da planta, podem influenciar em conjunto na síntese dos metabólitos que compõem o óleo essencial de *Lippia alba* (OELa) (OLIVEIRA et al., 2006; CAMÊLO et al., 2011). Devido essa variação, foi sugerida a nomenclatura de seus quimiotipos, sendo: I, II e III, separados de acordo com seus elementos que predominam no óleo essencial, sendo o tipo 1 os de elevado teor de citral e mircenos; tipo 2 de citral e limoneno e de tipo 3, com teor elevado de carvona e limoneno (ALMEIDA, 1993; MATOS et al., 1996).

Dentre as atividades biológicas do OELa comprovadas na literatura, podemos citar: atividade antimicrobiana, citotóxica, anestésico, ansiolítico, anticonvulsivante, sedativo e antinociceptivo (ARANGO et al., 2009; VIANA et al., 1998; TAMPIERE et al., 2005; HENNEBELLE et al., 2008; CUNHA et al., 2010; HATANO et al., 2012; VIANA et al.,

1998). Sousa et al., (2015) demonstraram que OELa e seu constituinte majoritário citral, bloquearam a excitabilidade neural.

Se tratando dos efeitos do OELa sob a musculatura lisa, já foi comprovado sua ação relaxante em traqueia de ratos (CARVALHO, 2018), efeito tocolítico em útero de ratas (PEREIRA-DE-MORAES et al., 2019), bem como seu efeito vasodilatador em aorta isolada de ratos (SILVA et al., 2018).

A espécie *L. sidoides*, conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é um vegetal arbustivo, encontrada em abundância no sertão nordestino, sendo mais comumente encontrada nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (TEÓFILO, 2012).

É uma planta bastante utilizada na medicina popular, como antisséptico (LACOSTE et al., 1996), suas folhas podem ser utilizadas de forma tópica como no tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo, como também na aromoterápico, para rinite alérgica e no tratamento das infecções vaginais, boca e garganta (MATOS; OLIVEIRA, 1998).

Dentre as atividades biológicas dessa espécie comprovadas na literatura, podemos destacar: antibacteriana perante as bactérias de alimentos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BERTINI et al., 2005); antiparasitária (SOARES et al., 2017); antidepressiva (PARENTE et al., 2018); inibidora da excitabilidade neuronal (BARBOSA et al., 2017); e antiespasmódica (TEÓFILO, 2012).

## **1.2 TERPENOS: CITRAL, LIMONENO E ÁLCOOL PERÍLICO**

Os terpenos são compostos produzidos e secretados por tecidos vegetais especializados, sintetizados a partir de duas rotas biossintéticas diferentes, a rota AMV (ácido mevalônico) e a rota MEP (metileritritol fosfato), constituindo a principal e mais abundante classe de compostos dos óleos essenciais (DEWICK, 1997).

São formados por unidades de isopreno (C 5) e são classificados de acordo com número dessas unidades. A junção de duas unidades isopreno formam os monoterpenos (C10), três unidades isopreno formam os sesquiterpenos (C15), quatro unidades formam os diterpenos (C20), cinco unidades formam sesterpenos (C25), seis unidades os triterpenos (C30) e sete unidades os tetraterpenos (C40).

São diversas as atividades biológicas comprovadas na literatura atribuídas aos terpenos, tais como: antifúngica (ZORE et al, 2011), anti-inflamatória (PASSOS et al., 2006; SANTOS; RAO, 1998), antinociceptiva (MELO et al., 2010), neuroprotetora (CHANG; KIM; CHUN, 2007) e vasorelaxante (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

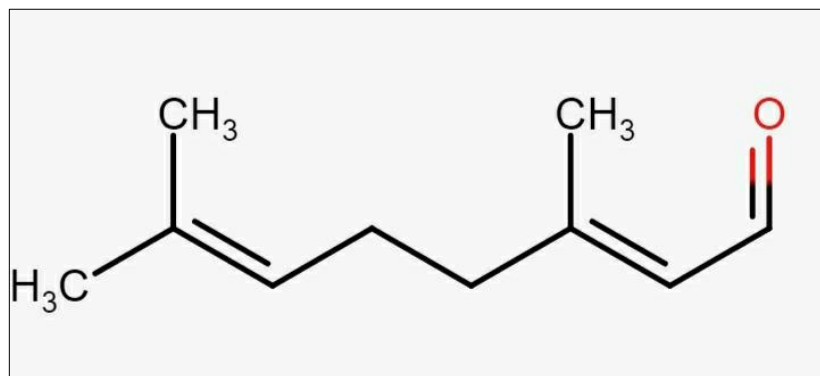


Esses compostos podem apresentar variados grupamentos químicos diferentes associados, incluindo aldeído (como o citral e citronelal), álcool (como o álcool perfílico, linalol e carveol), hidrocarboneto (limoneno, cimeno, pineno, e felandreno), fenol (timol e carvacrol), cetona (carvona e cânfora) e grupos éter (eucaliptol) (DEWICK, 2009).

### 1.2.1 Citral

O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) é uma junção de dois monoterpenos aldeídos acíclicos isômeros geométricos – geranial (trans-citral) e neral (cis-citral) (figura 1) (SADDIQ, KHAYYAT, 2010).

**Figura 1:** Estrutura química do Citral.



**Fonte:** DANTAS, 2021.

Esse monoterpeno ocorre naturalmente como constituinte dos óleos de diversas plantas aromáticas, empregadas na medicina popular como as espécies de *Melissa officinalis* (MENEZES et al., 2015), *Lippia alba* (STASHENKO et al., 2014), *Zingiber officinale* (FASS et al., 2014) *Cymbopogon citratus* (PASSOS et al., 2012).

O citral tem sido alvo de muitas pesquisas, atribuindo-se uma variedade de atividades terapêuticas relatadas na literatura, tais como: atividades antimicrobianas, contra *Escherichia coli* (SOMOLINOS et al., 2009) e *Candida ssp.* (FERREIRA et al., 2009; SOUSA et al., 2016), atividade anti-parasitária (CARDOSO, SOARES, 2010; MACHADO et al., 2012), anti-inflamatória (LIN et al., 2008), antinociceptiva (ORTIZ et al., 2010). Estudos apontam seu efeito sobre o sistema nervoso bloqueando o potencial de ação composto (SOUSA et al., 2015).

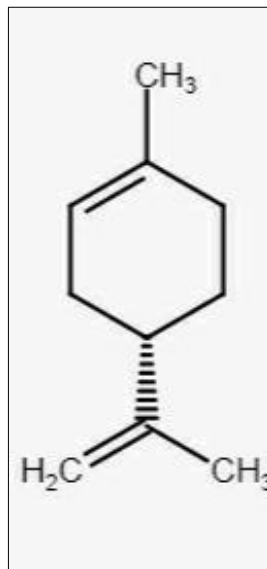
Pesquisas realizados com a espécie *C. citratus*, comprovaram que sua ação calmante e espasmolítica são atribuídas ao citral, principal constituinte do seu óleo essencial (OE), podendo este contribuir para seu efeito anti-hipertensivo (PASSOS et al., 2012).

Alguns estudos comprovam sua ação na musculatura lisa de alguns órgãos, como traqueia (CARVALHO et al., 2018), útero (PEREIRA-DE-MORAIS et al., 2019) e aorta (DA SILVA et al., 2018) de ratos, demonstrando o efeito relaxante desse monoterpreno.

### 1.2.2 Limoneno

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno (figura 2), é um hidrocarboneto com fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ . Este monoterpreno monocíclico é comumente encontrado na natureza, sendo o principal constituinte químico dos vários OEs do gênero *Citrus* (limão, laranja, tangerina, lima e pomelo) (BURDOCK, 1995; BICAS; PASTORE, 2007).

**Figura 2:** Estrutura química do Limoneno



**Fonte:** DANTAS, 2021.

O limoneno possui centro quiral, apresentando isomeria óptica, na forma de duas moléculas D-Limoneno e L-Limoneno. A IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) preconiza como nomenclatura correta para os isômeros R-Limoneno e S-Limoneno, embora os prefixos “D” e “L” sejam mais comumente empregados (PAKIDELA, 2001).

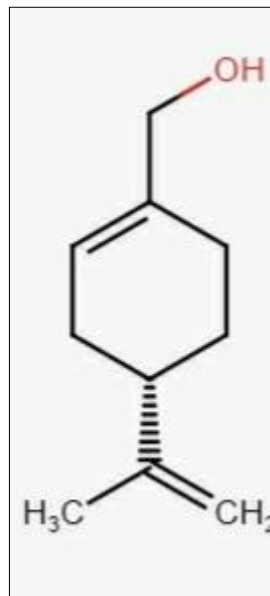
É bastante utilizado como fragrância em sabonetes, perfumes, alimentos e bebidas, pelas indústrias, devido seu odor cítrico (SUN, 2007). Além disso, muitos estudos comprovam suas atividades biológicas, dentre essas podemos citar atividade anti-nociceptiva (AMARAL, et al., 2007), anti-hiperglicêmica (MURALI; SARAVANAN, 2012), gastroprotetora (DE SOUZA et al., 2019), anti-inflamatório (YOON *et al.*, 2010) e ansiolítico (LIMA et al., 2013). Em estudos realizados por Pereira-De-Morais et al., (2019), verificou-se

o efeito miorreaxante do óleo essencial de *Lippia alba*, demonstraram que tanto o óleo quanto o limoneno foram capazes de relaxar o tecido uterino de ratas.

### 1.2.3 Álcool perfílico

O álcool perfílico (p-mentha-1,8-diene-7-ol) é um monoterpenóide de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}O$  (Figura 3), comumente encontrado nos vegetais dos gêneros *Lavandula*, *Cymbopogon* e *Mentha*. Esse monoterpeno é amplamente utilizado no meio das indústrias de cosméticos, limpeza e alimentícia, devido ao seu aroma agradável (GARCIA et al., 2010; BHATIA et al., 2008b).

**Figura 3:** Estrutura química do álcool perfílico



**Fonte:** DANTAS, 2021.

Pesquisas realizadas por Khan, Nafees e Sultana (2011), demonstraram que o álcool perfílico foi capaz de prevenir a toxicidade hepática induzida por etanol, por uma possível inibição de citocinas inflamatória. Também já foi comprovada a sua capacidade de inibir a atividade da  $Na^+/K^+$  ATPase de extratos de rim e porquinho da índia e de uma linhagem de glioblastoma humano (GARCIA et al., 2010). Outros estudos revelaram que o álcool perfílico combinado com alguns medicamentos quimioterápicos, inibe o crescimento de células cancerígenas e aumentam o efeito pró-apoptótico (JUNG et al., 2012).

Com relação a ação desse monoterpeno sob a musculatura lisa, já foi demonstrado que o álcool perfílico possui a capacidade de relaxar vasos de aorta isoladas de ratos

(CARDOSO-TEIXEIRA et al., 2018), porém não existem relatos do efeito vasodilatador dessa substância em vasos humanos.

### 1.3 FENILPROPANÓIDES: EUGENOL E METIL EUGENOL

Os fenilpropenos são moléculas hidrofóbicas, de baixo peso molecular, amplamente distribuído nos óleos essenciais dos vegetais (STEINEGGER; HANSEL, 1992). São biossintetizados a partir da fenilalanina e constituídos por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos, podendo ser subdivididos em alilfenóis e propenilfenóis, com base na posição da ligação dupla entre C8 e C9 ou C7 e C8 do lado cadeia (VASSÃO et al., 2010).

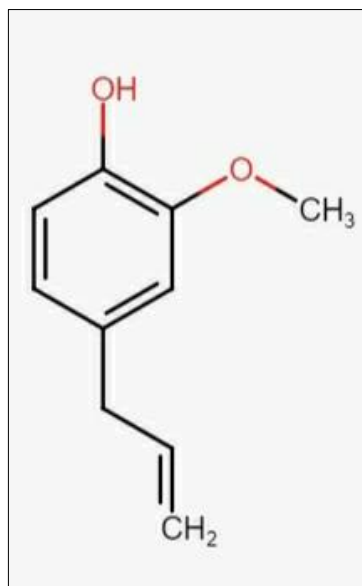
Esses compostos desempenham funções importantes nas plantas como defesa e comunicação entre as espécies. Podem também servir para atrair insetos polinizadores (TAN E NISHIDA, 2012). Além disso, devido seu agradável aroma e sabor são amplamente utilizados nas indústrias de perfumarias e antissépticos (PICHERSKY et al., 2006). Os fenilpropanóides apresentam atividades biológicas bem descritas na literatura tais como: antioxidante (JIA et al., 2018), antimicrobiano (KEPA et al., 2018), antiviral (CUI et al., 2020) anti-inflamatória e antinociceptiva (SALDANHA et al., 2021).

Temos como exemplo de fenilpropenos o Eugenol e o Metil Eugenol (KOEDUKA, 2014), que são encontrados como componentes principais nos óleos essenciais de muitas plantas aromáticas, como cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*) e manjerição (*Ocimum sanctum*) (LAZARO-FILHO, 2000).

#### 1.3.1 Eugenol

O eugenol (figura 4) possui fórmula molecular ( $C_{10}H_{12}O_2$ ), é quimicamente designado como 4-alil-2-metóxi-fenol (SILVA, 1998). É uma molécula pertencente a classe dos fenilpropanóides (BRUNETON, 1995).

**Figura 4:** Estrutura química do Eugenol.



**Fonte:** DANTAS, 2021.

Pode ser obtido do fracionamento de óleos essenciais, os quais são extraídos de diversas plantas aromáticas, como as espécies de *Discipelum cariophyllatum* Ness., conhecido popularmente como “craveiro do Maranhão ou cravinho”; *Pimenta dioica* (L.) Merrill; *Croton zehntneri* Pax et Hoffm, a “canela-de-cunhã”, *Ocimum gratissimum* L., conhecida como a “alfavaca-cravo” (CRAVEIRO et al., 1981). Sendo a fonte mais conhecida e utilizada é a *Eugenia caryophyllata*, onde seu óleo é retirado das folhas secas, mais conhecido como - cravos (LAZARO-FILHO, 2000).

Em temperatura ambiente o eugenol apresenta-se no estado líquido, de cor amarelada e com aspecto oleoso (BASKARAN et al., 2010). Devido a sua lipossolubilidade, esse composto é capaz de penetrar as membranas biológicas e atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias (USTA et al., 2002), ou penetrar com rapidez a bainha de mielina de uma fibra ou de um feixe nervoso (GURNEY, 1965).

O eugenol é amplamente utilizado como agente aromatizante, antioxidante e flavorizante em uma variedade de cosméticos e produtos alimentares (MAGALHÃES et al., 2010). Tem grande aplicação dentro da odontologia sendo utilizado juntamente com o óxido de zinco, estando presente em formulações como cimentos e agentes restauradores intermediários. Essas formulações são possuidoras de ação sedativa, capazes de inibir a degradação de enzimas por ação de radicais livres e ação antibacteriana (LAZARO-FILHO, 2000; MARKOWITZ et al., 1992).

Vários estudos demonstram os efeitos biológicos do eugenol. Este possui propriedades antioxidante (MAHAPATRA et al, 2009), anti-inflamatória (MAGALHÃES et

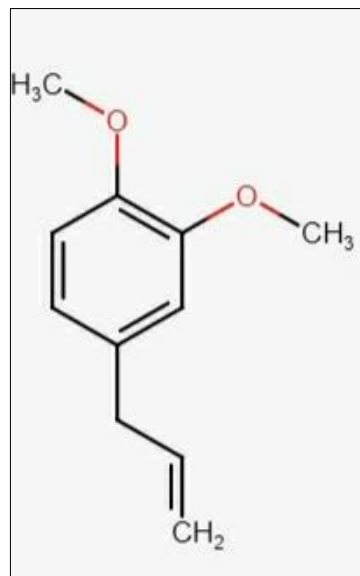
al., 2010) antimicrobiana (DEVI, et al. 2010), antifúngica (PINTO et al, 2009) e antiviral (HUSSEIN et al, 2000).

Leal-Cardoso et al., (1994), demonstraram que em músculo esquelético o eugenol diminui a liberação de  $\text{Ca}^+$  intracelular e em concentrações em torno de 8 mM promove liberação de  $\text{Ca}^+$  do retículo sarcoplasmático induzindo a contração. Com relação a suas ações cardiovasculares, este composto mostrou ter efeitos hipotensores e bradicárdicos quando administrado por via intravenosa (i.v.) em ratos (LAHLOU et al., 2004). Na musculatura lisa vascular foi comprovado efeito relaxante em aorta torácica de coelhos (NISHIJIMA et. al 1999) em leito vascular mesentérico de rato (CRIDDLE et al., 2003; PEIXOTO-NEVES et al., 2015), aorta torácica de ratos, em artéria pulmonar e artérias cerebrais (DAMIANI et al., 2003; COSTA, 2012; PEIXOTO-NEVES et al., 2014).

### 1.3.2 Metil Eugenol

O metil eugenol (figura 5) é um análogo do composto eugenol. Pertence a classe dos fenilpropanóides, possuindo fórmula molecular ( $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$ ).

**Figura 5:** Estrutura química do Metil eugenol.



**Fonte:** DANTAS, 2021.

Relatos na literatura demonstram que o metil eugenol possui atividade anestésica e antinociceptiva (SELL; CARLINI, 1976; YANO et al., 2006), sendo comprovado que esses efeitos resultam da ação inibitória pelo metil eugenol dos canais periféricos de  $\text{Na}^+$  (WANG

et al., 2015), além disso também já foi elucidada uma atividade antidepressiva desse composto (NORTE; COSENTINO; LAZARINI, 2005).

Suas ações sob a musculatura lisa de animais também já foram investigadas, sendo comprovado seu efeito miorrelaxante em íleo (MAGALHÃES et al., 1998; LIMA et al., 2000), traqueia (ARRIETA et al., 2018) e corpos cavernosos de ratos (CABRAL et al., 2014).

Lahlou et al., (2004) demonstram que o tratamento intravenoso com metil eugenol em ratos anestesiados e conscientes reduz a pressão sanguínea, provavelmente por meio de um relaxamento vascular ativo, uma vez que quando testado em aorta isolada de rato, o metil eugenol foi capaz de inibir a contração induzida por potássio. No entanto mostra-se necessário uma maior investigação sobre seus efeitos vasodilatadores, além de não existirem relatos sobre da ação dessa substância em vasos humanos.

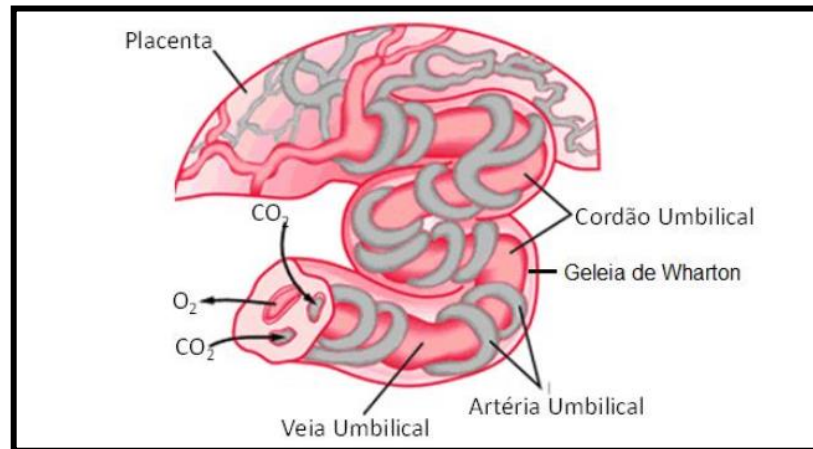
#### **1.4 MORFOLOGIA DO CORDÃO E DA ARTÉRIA UMBILICAL HUMANA**

O cordão umbilical é um anexo exclusivo dos mamíferos e é responsável pela conexão entre o feto e a placenta, sendo uma estrutura vital para o crescimento e bem estar do feto. É formado por volta da quinta semana do desenvolvimento fetal e possui cerca de 50 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, podendo apresentar variações. Esta estrutura é composta pela geleia de Wharton, uma substância gelatinosa que envolve os vasos umbilicais e é envolvida por uma membrana, que constitui o estojo do cordão e se continua com a pele do ventre do feto (Figura 6). Os vasos umbilicais são compostos por duas artérias e uma veia, que tem por função garantir as trocas gasosas e são responsáveis pela nutrição do feto. As duas artérias umbilicais levam o sangue venoso do embrião para a placenta, enquanto que a única veia transporta o sangue arterial da placenta para o embrião. (MALHEIROS, 2016).

A geleia de *Wharton* (tecido mucóide) é composta por um baixo número de fibroblastos, elevadas quantidades de fibras de colagénio, substância fundamental, ácido hialurónico e sulfatos de glicosaminoglicanos (ZANG SX, 1999).

As artérias umbilicais apresentam-se rodeadas por uma camada de células epiteliais, não contêm nenhuma camada subendotelial ou lâmina elástica interna. O endotélio encontra-se adjacente às camadas musculares, sendo estas compostas por uma camada longitudinal interna (de lúmen irregular), sem nervos nem “*vasa vasorum*”, e uma camada circular externa que tem continuação na geleia de Wharton (ZANG SX, 1999).

**Figura 6:** Estrutura anatômica do cordão umbilical, mostrando a disposição das artérias e da veia umbilical.



**Fonte:** Adaptado (FERNANDES, 2015).

### 1.5 MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA DA AUH

Como os vasos sanguíneos umbilicais não são inervados, o controle do fluxo sanguíneo umbilical depende de substâncias vasoativas liberadas localmente ou existentes na circulação (LORIGO et al., 2018).

Em geral, a contração do músculo liso ocorre devido a um estímulo que aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio intracelular. O cálcio necessário para contração é oriundo do meio externo (extracelular), e/ou do meio interno (intracelular), sendo este oriundo de estoques intracelulares como o retículo sarcoplasmático (REMBOLD, 1992; MCFADZEAN; GIBSON, 2002).

A alteração do potencial transmembrana pelo disparo de potencial de ação ou por ativação de canais iônicos dependentes de estiramento torna o potencial transmembrana das células do músculo liso menos negativo, ocasionando um processo de despolarização. Conseqüentemente, ocorre um aumento na probabilidade de abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  permitindo um influxo desse íon através da membrana plasmática, desencadeando o processo de contração muscular. Esse acoplamento é denominado eletromecânico (HAEUSLER, 1985). Diferentes tipos de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  estão envolvidos no controle da contratilidade do músculo liso, porém os canais de cálcio tipo L (LTCC) é o principal caminho para a entrada desse íon e desencadeamento das contrações da HUA (SANTOS-SILVA et al., 2010).

Quando o aumento de cálcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ocorre pela associação de agonistas a receptores de membrana sem alteração do potencial transmembrana da célula, o



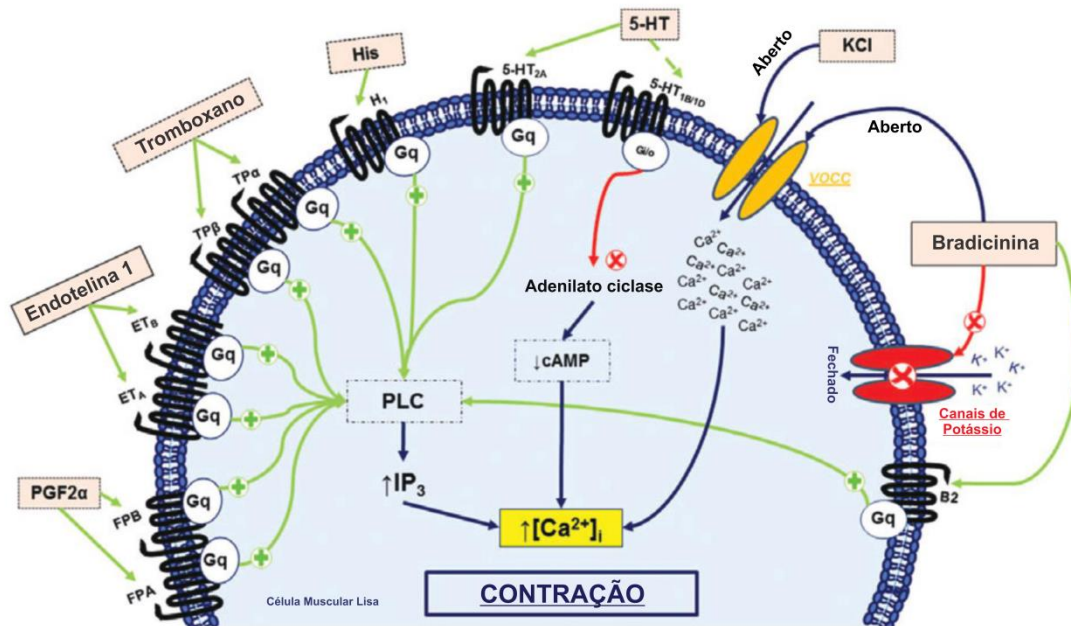
acoplamento excitação-contração do músculo liso é denominado farmacomecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1968). Certos agonistas, como a serotonina, se ligam aos receptores de membrana acoplados a proteína heterodimérica Gq, ativam a fosfolipase C e conseqüentemente promovem a hidrólise de 1,2,3 inositol bifosfato presentes na membrana produzindo o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). A liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, é principalmente decorrente da ativação de receptores 1,4,5, trifosfato de inositol (IP3R), que são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados pelo IP3, e também pelos receptores de ryanodina, que são canais de  $\text{Ca}^{2+}$  ativados pelo próprio  $\text{Ca}^{2+}$ . Ambos receptores permitem o aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  pela liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (WEBB, 2003; CHENG; LEDERER, 2008).

As principais substâncias vasoativas que induzem a contração da HUA são serotonina, histamina, tromboxano, bradicinina, endotelina 1 e prostaglandina  $\text{F2}\alpha$ , que estão ligadas à ativação das proteínas Gq e Gi/o. É importante destacar que o efeito de alguns dos agentes vasoativos na HUA é dependente do endotélio, como é o caso da endotelina 1 e bradicinina. Em relação à bradicinina, a indução da contração dessa artéria, é dependente da ativação do receptor B2, que parece estar relacionado à ativação dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem e à  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, bem como à inativação dos canais  $\text{K}^+$  (LORIGO et al., 2018) (FIGURA 7).

O agente vasoconstritor mais potente da HUA é o 5-HT, seus efeitos contráteis são causados pela ativação dos receptores 5-HT2A que é acoplado a proteína Gq, ativando a cascata de sinalização PLC/IP3, levando a um aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , e parcialmente pela ativação do 5-HT1B e 5-HT1D, que são acoplados a proteína Gi/o, na qual promove a contração da HUA pela inibição da adenil ciclases (SANTOS-SILVA et al., 2010; SANTOS-SILVA et al., 2009).

A contração mediada pela histamina ocorre devido à ativação dos receptores H1, que são também acoplados a uma proteína Gq. No entanto, as células musculares lisa da HUA também expressam outro receptor 5-HT (5-HT7) e dois outros receptores His (H2 e H3) que estão associados a uma proteína Gs. A ativação desses receptores estimula a adenil ciclase e leva à vasorrelaxamento.

**Figura 7:** Representação mostrando os mecanismos de contração das células do músculo liso da artéria umbilical humana.



**Fonte:** (LORIGO et al., 2018).

Independente da fonte, o  $\text{Ca}^{2+}$  quando presente em quantidades elevadas no meio intracelular liga-se a uma proteína reguladora chamada calmodulina, formando um complexo  $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$  que ativa a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK). O complexo  $[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM-MLCK}]$  tem por função fosforilar a cadeia leve de miosina (MLC), esta adição do grupo fosfato desencadeia o mecanismo de ciclização das pontes cruzadas entre os filamentos de actina e miosina favorecendo um deslizamento entre esses filamentos, conseqüentemente desencadeando a contração (SOMLYO, SOMLYO, 1994; SOMLYO, SOMLYO, 2003) (FIGURA 7).

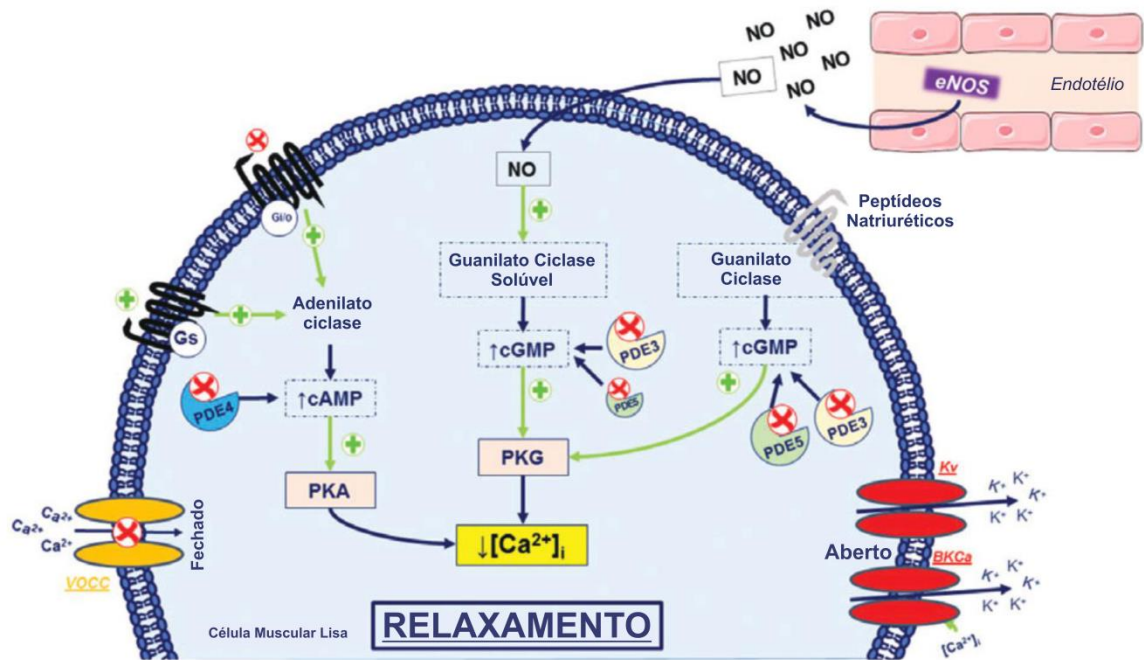
O processo de relaxamento da musculatura lisa em geral, se dá pelo retorno dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol aos níveis basais, que pode ocorrer por inúmeros fatores, como por exemplo, pela recaptação do  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático, mediante ação de um polipeptídeo chamado de SERCA. Esta molécula possui as funções de possibilitar o relaxamento muscular pela diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  e restaurar os estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  necessários para contração muscular (PERIASAMY, KALYANASUNDARAM, 2007). Outro mecanismo que causa a diminuição da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  é o efluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  pela membrana plasmática, através do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), de baixa afinidade e alta capacidade, como também pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (MPCA), uma bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática de alta afinidade e baixa capacidade (BRINI, CARAFOLI, 2011) (FIGURA 8).

A diminuição na  $[Ca^{2+}]_i$  pode ocorrer também pela repolarização ou hiperpolarização de membrana, no qual envolve a abertura de canais de  $K^+$  (WOODRUM, BROPHY, 2001). Estes canais conduzem íons  $K^+$  através da membrana plasmática a favor de seu gradiente eletroquímico, que constitui uma corrente de saída (positiva) no sentido do meio intracelular para o meio extracelular. Em AUH, a ativação dos canais de  $K^+$  parece ser o principal responsável pelo vasorrelaxamento, ocorrendo principalmente pela ativação dos canais de  $K^+$  dependentes de voltagem ( $K_v$ ), que podem regular o potencial da membrana em resposta à despolarização da membrana; enquanto os canais  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância (BKCa) respondem a alterações dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  (CAIRRAO et al., 2008; MARTIN et al., 2014) (FIGURA 8).

Também já foi demonstrado que o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc) causa vasorrelaxamento em AHU (SANTOS-SILVA et al., 2010) (FIGURA 8). A acumulação intracelular de AMPC e GMPc pode ser conseguida por estimulação de adenilato ou guanilato ciclase, respectivamente, ou por inibição de fosfodiesterases (PDE), enzimas que hidrolisam esses nucleotídeos. Santos-Silva et al. (2008), demonstraram em HUA, PDE4 e PDE5 são as principais enzimas envolvidas na regulação do relaxamento associado ao cAMP e cGMP, respectivamente.

Outro aspecto que contribui para desencadear tal evento é o aumento da atividade da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) pela desfosforilação da cadeia leve da miosina (WEBB, 2003).

**Figura 8:** Representação mostrando os mecanismos de relaxamento das células do músculo liso da artéria umbilical humana.



Fonte: (LORIGO et al., 2018).

## REFERENCIAS

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

AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; NETO, P. F. T. ; MOURA, B. A.; DE 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.. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(d)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.7, p. 1217-1220, 2007.

ARANGO, A. C. & RAMOS, 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.

ARRIETA, J., LORENZO, Y. L., PATIÑO, M. B. G., MENDOZA, Y. S. & MENDOZA, M. E. S. Relaxant effects of *Peperomia hispidula* (Sw.) A. Dietr. on isolated rat tracheal rings. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 17, n. 6, 2018.

BAJPAI, V. K.; SGUKLA, S.; KANG, S. C. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. **Bioresource Technology**, v. 99, n.18, p. 8903-8908, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK D.; IDAOMAR M. Biological effects essential oils. **A review Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BANIK, Ratan K.; BERGER, Jay S. **Peripheral vasodilators. In: Essentials of Pharmacology for Anesthesia, Pain Medicine, and Critical Care**. Springer, New York, 2015.

BARBOSA, R. et al. Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 12, 2017.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: Science, technology, and applications**. Nova York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010.

BASKARAN, Y.; PERIYASAMY, V.; VENKATRAMAN, A. C. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamine-induced liver injury in rats. **Toxicology**, v. 268, p. 204-212, 2010.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3–4, p. 80–83, 2005.

BHATIA, S. P.; D. MCGINTY, D.; C. S. LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on carveol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46 p. 85–87, 2008a.

BICAS, J.L.; PASTORE, G.M. Isolation and screening of d-limonene resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**. 38:563-567, 2007.

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.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008- **Lei Arouca: Estabelece procedimentos para uso científicos de animais.**

BRINI, M.; CARAFOLI, E. The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 2, 2011.

BRUNETON, J. Terpenoids and steroids. In: **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**, ed. Bruneton, J., Paris, France, Technique & Documentation – Lavosier. 1995.

BURDOCK, G. A.; Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients, 3rd ed., CRC:Boca Raton, 1995.

CABRAL, P. H. B., CAMPOS, R. de M. , FONTELES, M. C., SANTOS, C. F., CARDOSO, J. H. L., & DO NASCIMENTO, N. R. F. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its major components, anethole and estragole, on the rat corpora cavernosa. **Life sciences**, v. 112, n. 1-2, p. 74-81, 2014.

CAIRRAO, E.; ALVAREZ E.; SANTOS-SILVA A.J.; VERDE I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 376, n. 5, p. 375, 2008.

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.

CARDOSO, J. H. L.; DE SOUZA, A. N. C.; SOUZA, I. T.; FIGUEIREDO, I. M. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** v. 327, p. 113-124, 1994.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026-1032, 2010.

CARDOSO-TEIXEIRA, A. C., FERREIRA-DA-SILVA, F. W., PEIXOTO-NEVES, D., OLIVEIRA-ABREU, K., PEREIRA-GONÇALVES, Á., COELHO-DE-SOUZA, A. N., & LEAL-CARDOSO, J. H. Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1430, 2018.

CARVALHO, P. M. M., MACÊDO, C. A. F., RIBEIRO, T. F., SILVA, A. A., DA SILVA, R. E. R., DE MORAIS, L. P., BARBOSA, R. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. **Biotechnology Reports**, v.17, , p. 31–34, 2017

CASTRO, H.; GUILHON D. E.; OLIVEIRA, L.; ORLANDO D. E.; DE BARBOSA, L.C.; FERREIRA, F, A.; SILVA, D. J HENRIQUES DE; MOSQUIN, P. R.; NASCIMENTO, E. A. teor de composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Quim. Nova**, v. 27, n.1, p. 55-57, 2004.

CHANG, H. J.; KIM, H. J.; CHUN, H. S. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Sciences**, v.80, n. 9, p. 835-841, 2007.

CHENG, H.; LEDERER, W. J. Calcium sparks. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1491-545, 2008.

COSTA, E. E. **Efeito do eugenol no mecanismo contrátil da artéria pulmonar em ratos**. Dissertação (Mestrado) Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2012.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES A. G.; ANDRADE, C. H.S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: Edições UFC, 1981.

CRIDDLE, David Neil; MADEIRA, Socorro Vanesca Frota; DE MOURA, Roberto Soares. Endothelium-dependent and-independent vasodilator effects of eugenol in the rat mesenteric vascular bed. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 359-365, 2003.

CUI, Q., DU, R., LIU, M., & RONG, L. Lignans and their derivatives from plants as antivirals. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 183, 2020.

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.

DA SILVA, R. E. R., DE MORAIS, L. P., SILVA, A. A., BASTOS, C. M. S., GONÇALVES, Á. P., KERNTOPF, M. R., BARBOSA, R. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 792–798, 2018.

DAMIANI, C. E. N.; ROSSONI, L. V.; VASSALLO, V. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta. **Vascular pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 59-66, 2003.

DANTAS, D. de M.; Júnior, C. P. S. da, BARBOSA, R., & DE MORAIS, L. P.. Implementação de método alternativo para substituição do uso de animais em estudos com músculo liso. **Ci. Anim.**, p. 148–154, 2019.

DE MORAIS, L. P., SILVA, A. DE A., DA SILVA, R. E. R., DA COSTA, R. H. S., MONTEIRO, Á. B., BARBOSA, C. R. DOS S., BARBOSA, R. (2019). Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 297, p.155–159, 2018.

DE SOUZA, M. C. et al. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression. **Phytomedicine**, v. 53, p. 37–42, 2019.

DEVI, K. P., Nisha, S. A., Sakthivel, R., & Pandian, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DEWICK, P. M. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2009.

DEWICK, Paul M.; **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. England: John Wiley & Sons Ltda, 1997

DULEY L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. **Seminars in Perinatology**. Jun 1; v. 33, p. 130–7, 2009.

FASS, L.; FELDER, M.; PATANKAR, M. S.; KAPUR, A. K. Citral is the major component of ginger-derived terpenes to mediate p53-dependent apoptosis in cancer cells. **Cancer Research**, v.74, p. 19, abstract nr 3211, 2014.

FEI, J. Q., ZHOU, H. BIN, SHEN, Y. L., CHEN, Z., & WANG, L. L.. A comparison study on the responses of umbilical arteries and thoracic aorts to the adrenergic receptor agonists. **Cell Biology International**, v. 32, 2008.

FERNANDES, M. C. A. **Caracterização do feito Vasodilatador dos Nitratos Orgânicos GTN, NTHF, NCOE E BIS-NTHF em Artéria e Veia Isoladas ee Cordão Umbilical Humano**. Porto Alegre: UFPB, 2015. Tese (Doutorado) – Programa de Pós- Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

FERREIRA, T. M.; SILVA, F. S. TEODORO, G. R.; COSTA, A. C. B. P.; MARIA, A.; BELTRAME JÚNIOR, M.; KHOURI, S. Citral antifungal activity against *Candida* genus yeasts isolated from hospitalized patients. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 118-125, 2009.

FILHO, M. L. **Efeito do eugenol sobre o endurecimento de resinas acrílicas ativadas quimicamente e efeitos de possíveis tratamentos paliativos**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. 2000.

FRY, C. H. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 49, n. 3, p. 201-210, 2004.

GARCIA, D. G.; AMORIM, L. M. F.; FARIA, M. V. de C.; FREIRE, A. S.; SANTELLI, R. E.; FONSECA, C. O. da; QUIRICO-SANTOS, T.; BURTH, P. The anticancer drug perillyl alcohol is a Na/K-ATPase inhibitor. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, p. 29–34, 2010.

GURNEY, B.F. Eugenol: utility versus toxicity. **Oral Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 74 – 82, 1965.

HAEUSLER, G. Contraction of Vascular Muscle as Related to Membrane Potential and Calcium Fluxes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 7, p.S3-S8, 1985.

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 Tmaze. **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.

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, H.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inibitory effect of Sudanese medical plant extracts on hepatitis C virus (HCV) protease. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 510-516, 2000.



JANANI F, CHANGAEE F. Seasonal variation in the prevalence of preeclampsia. **J Family Med Prim Care**. v. 6, n. 4, p. 766–769, 2017.

JIA, YUAN; HE, YING; LU, FACHUANG. The structure-antioxidant activity relationship of dehydrodiferulates. **Food chemistry**, v. 269, p. 480-485, 2018.

JUNG, Hyun Joo et al. Calcium blockers decrease the bortezomib resistance in mantle cell lymphoma via manipulation of tissue transglutaminase activities. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 119, n. 11, p. 2568-2578, 2012.

KEPA, M., MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M., WOJTYCZKA, R. D., IDZIK, D., KORZENIOWSKI, K., SMOLEŃ-DZIRBA, J., & WĄSIK, T. J. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

KHAN, A. Q.; NAFEES, S.; SULTANA, S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFκ-B activation and proinflammatory cytokine production. **Toxicology**, v. 279, n. 1-3, p. 108–14, 2011.

KOEDUKA, T.. The phenylpropene synthase pathway and its applications in the engineering of volatile phenylpropanoids in plants. **Plant Biotechnol**, v. 31, p. 401–407. 2014

LACOSTE, E., CHAUMONT, J. P., MANDIN, D., PLUMEL, M. M., & MATOS, F. J. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Application to the cutaneous microflora. **Annales pharmaceutiques francaises**. v. 54, n. 5, p. 228-230, 1996.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4 n. 3A, p. 17-31, 2013.

LAHLOU, S., FIGUEIREDO, A. F., MAGALHÃES, P. J. C., LEAL-CARDOSO, J. H., & GLORIA, P. D. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sciences**, v.74, p. 2401–2412, 2004.

LAHLOU, S., INTERAMINENSE, L. F. L., MAGALHÃES, P. J. C., CARDOSO, J. H. L., & DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of eugenol, a phenolic compound present in many plant essential oils, in normotensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 250-257, 2004.

LEUNG, S. W., QUAN, A., LAO, T. T., & MAN, R. Y. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. **Early human development**, v. 82, n. 7, p. 457-462, 2006.

LIMA, C. C., CRIDDLE, D. N., DE SOUZA, A. N. C., MONTE, F. J., JAFFAR, M., & CARDOSO, J. H. L.. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. **Planta medica**, v. 66, n. 05, p. 408-411, 2000.

LIMA, N. G. et al. Anxiolytic-like activity and GC–MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in foods and plants. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 450-454, 2013.

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.

LORIGO, M., MARIANA, M., FEITEIRO, J., & CAIRRAO, E. How is the human umbilical artery regulated?. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 44, n. 7, p. 1193-1201, 2018.

MACHADO, M.; PIRES, P.; DINIS, A. M.; SANTOS-ROSA, M.; ALVES, V.; SALGUEIRO, L.; CAVALEIRO, C.; SOUSA, M. C. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Experiemental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 223-231, 2012.

MAGALHÃES, P. J., CRIDDLE, D. N., TAVARES, R. A., MELO, E. M., MOTA, T. L., & CARDOSO, J. H. L. Intestinal myorelaxant and antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyl-eugenol and terpineol. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 12, n. 3, p. 172-177, 1998.

MAGALHÃES, C B.; DOUGLAS R.; RIVA, L. J.; DE PAULA, A. B. L.; KOATZ, V. L. G.; CARDOSO, J. H. L.; WALTER, A. Z.; DÉBORA S. F. In vivo anti-inflammatory action of eugenol on lipopolysaccharide-induced lung injury. **J Appl Physiol**, v. 108, p. 845–851, 2010.

MAHAPATRA, S. A.; CHAKRABORTY, S. P.; MAJUMDAR, S.; BAG, B. G.; ROY, S. Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages in vitro. **Europena Journal of Pharmacology**. v. 623, n. 1-3, p. 132-140, 2009.

MALHEIROS, G. C. Características morfológicas do cordão umbilical. **Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2016.

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

MARKOWITZ, K. B.; MOYNIHAN, M.; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**. v. 73, p.729–737, 1992.

MARTIN, P.; REBOLLEDO, A.; PALOMO, A. R; MONCADA, M., PICCININI, L., MILESI, V. Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: A review of their roles in human umbilical artery contraction. **Reprod Sci**. v. 21, p. 432–441, 2014.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**, Fortaleza, Edições UFC. 1994.

\_\_\_\_\_. **Medicinal Plants: Selection chartandemploymentplants used in phytotherapyin Northeast Brazil**. 2 ed. Fortaleza-CE. University Press, 2000.

\_\_\_\_\_. **Plantas Mediciniais: Guia Fitoterápico**. 2. Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2001.

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. de A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.: farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 79, n. 3–4, p. 84–87, 1998.

- 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.
- MELLO, Carlos Henrique Pereira; NETO, Pedro Luiz de Oliveira Costa; TURRIONI, João Batista. Modelo para o projeto e desenvolvimento de serviços: uma proposta brasileira. **Revista Gestão da Produção Operações e Sistemas**, n. 1, p. 61, 2006.
- MELO, M. S.; SENA, L. C.; BARRETO, F.J; BONJARDIM, L. R.; ALMEIDA, J. R.; LIMA, J. T.; SOUSA, D. P.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2010.
- MENEZES, C. P.; GUERRA, F. Q. S.; PINHEIRO, L. S.; TRAJANO, V. N.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Investigation of *Melissa officinalis* L. Essential Oil for Antifungal Activity against *Cladosporium carrionii*. **International Journal of Tropical Disease and Health**, v. 8, n. 2, p. 49-56, 2015.
- MILDENBERGER, Eva et al. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 4, p. H1730-H1737, 2003.
- MOHAUPT, M., Molecular aspects of preeclampsia. **Molecular aspects of medicine**, V. 28, n. 2, p. 169-191, 2007.
- MURALI, R.; SARAVANAN, R. Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 269-275, 2012.
- MURPHY RA. Signal transduction and regulation in smooth muscle: problems and progress. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 134, p. 1-6, 1999.
- MUSIAL, Diego Castro; DA SILVA JUNIOR, Edilson Dantas. A técnica de banho de órgão isolado para estudos farmacológicos. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 2, p. 86-89, 2015.
- NEVES, D. P., CARDOSO, J. H. L., & JAGGAR, J. H. Eugenol dilates rat cerebral arteries by inhibiting smooth muscle cell voltage-dependent calcium channels. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 401, 2014.
- NEVES, D. P., WANG, Q., CARDOSO, J. H. L., ROSSONI, L. V., & JAGGAR, J. H. Eugenol dilates mesenteric arteries and reduces systemic BP by activating endothelial cell TRPV 4 channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 14, p. 3484-3494, 2015.
- NEVES, D. P.; ALVES, K. S. S.; GOMES, M. D. M.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S., MAGALHÃES, P. J. C.; CECCATTO, V. M.; DE SOUSA, A. N. C.; CARDOSO, J. H. L. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 341-350, 2010.
- NISHIJIMA, H., UCHIDA, R., KAMEYAMA, K., KAWAKAMI, N., ONKUBO, T., KITAMURA, K. Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue. **Jpn. J. Pharmacol.** v.79, p.327-334, 1999.

NORTE, M. C. B., COSENTINO, R. M., & LAZARINI, C. A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. **Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 294-298, 2005.

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.

ORTIZ, M. I.; RAMIREZ-MONTIEL, M. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; PONCEMONTER, 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.

PAKDELA, H.; PANTEAA, D.; ROY, C. Production of dl-limonene by vacuum pyrolysis of used tires. **J. Anal. Appl. Pyrolysis**, v. 57, n. 1, p. 91 – 107. 2001.

PARENTE, M. et al. Antidepressant-Like Effect of *Lippia sidoides* CHAM (Verbenaceae) Essential Oil and Its Major Compound Thymol in Mice. **Scientia pharmaceutica**, v. 86, n. 3, p. 27, 2018.

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

PASSOS, C. S.; CARVALHO, L. N.; PONTES JR, R. B.; CAMPOS, R. R.; IKUTA, O.; BOIM, M. Blood pressure reducing effects of *Phalaris canariensis* in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 90, n. 2, p. 201-208, 2012.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2006.

PEREIRA, A. A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

PERIASAMY, M.; KALYANASUNDARAM, A. Serca pump isoforms: their role in calcium transport and disease. **Muscle Nerve**, v. 35, p. 430 – 442, 2007.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N., Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p.808–811, 2006.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Sizygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Jounal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1454-1462, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol 39, 603–613. 2001.

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

SADDIQ, A. A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 89-93, 2010.

- SALDANHA, A. A., VIEIRA, L., DA SILVA MAIA, D. S., DE OLIVEIRA, F. M., DE AZAMBUJA RIBEIRO, R. I. M., THOMÉ, R. G., ... & DE SIQUEIRA, J. M. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a phenylpropanoid-enriched fraction of *Duguetia furfuracea*. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 409-422, 2021.
- SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Inflammatory edema induced by 1,8-cineole in the hind paw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine**, v. 5, p. 115-119, 1998.
- SCREMIN, F. M. Indicação farmacêutica de fitoterápicos: uma análise dos conceitos legais em relação a prática profissional. **Revista Ciências & Cidadania**. v. 2, n. 1, 2016.
- SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 367-377, 1976.
- SILVA, A. J. S., CAIRRÃO, E., & VERDE, I. Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. **Health**, v. 2, n. 04, p. 321, 2010.
- SILVA, A. J. S., CAIRRAO, E., MARQUES, B., VERDE, I. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. **Reprod Sci**; v. 16, p. 1175–1185, 2009.
- SILVA, A. J. S., CAIRRAO, E., MORGADO, M., ALVAREZ, E. & VERDE. I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. **Eur J Pharmacol**. v. 582, p. 102–109, 2008.
- 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.
- SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary parasitology**, v. 234, p. 49–56, 2017.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.159, p. 129-145, 1968.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.; Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V.; Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.
- SOMOLINOS, M.; GARCÍA, D.; CONDÓN, S.; MACKAY, B.; PAGÁN, R. Inactivacion of *Escherichia coli* by citral. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1928-1939, 2009.
- SOUSA D. G.; SOUSA S. D.; SILVA R. E.; ALVES, K. S. S.; DASILVA F.W. F.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R.; CARDOSO J. H. L.; 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.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; DURÁN, D.C.; CÓRDOBA, Y.; CABALLERO, D. Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas em Colômbia. **Revista de la Academia Colombiana de Ciências**, v. 38, p. 89-105, 2014.

STEEGERS, E. A, VON DADELSZEN, P, DUVEKOT J. J., PIJNENBORG, R. Pre-eclampsia. **Lancet**, v. 21, n. 376, p. 631-44. 2010.

STEINEGGER, E.; Hänsel, R. **Pharmakognosie**, 5th ed. Berlin: Springer Verlag, 1992.

SUN, J. D. Limonene: Safety and Clinical Application. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, 2007.

TAHA, M. O. et al. Role of L-arginine, a substrate of nitric oxide biosynthesis, on intestinal ischemia-reperfusion in rabbits. In: **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2010.

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.

TAN, K.H., NISHIDA, R., Methyl eugenol: its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **J. Insect Sci.** v.12, p.1-74, 2012.

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.

USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; BAJAKIAN, K.; Nakkash-Chmaisse, H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 935-940, 2002.

VASSÃO, D. G., KIM, K.-W., DAVIN, L. B., & LEWIS, N. G. Lignans (neolignans) and allyl/propenyl phenols: biogenesis, structural biology, and biological/human health considerations. In: Liu HW and Mander L (eds) **Comprehensive Natural Products II**. v. 1. Elsevier, Amsterdam, p. 815-928, 2010.

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.

WANG, Z. J., TABAKOFF, B., LEVINSON, S. R., & HEINBOCKEL, T. Inhibition of Na<sup>v</sup> 1.7 channels by methyl eugenol as a mechanism underlying its antinociceptive and anesthetic actions. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 7, p. 791-799, 2015.

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

WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.

YANO, S., SUZUKI, Y., YUZURIHARA, M., KASE, Y., TAKEDA, S., WATANABE, S. & MIYAMOTO, K. I. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **European journal of pharmacology**, v. 553, n. 1-3, p. 99-103, 2006.

YOON, W. J., LEE, N. H., HYUN, C. G. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. **Journal of oleo science**, v. 59, n. 8, p. 415-421, 2010.

ZANG, S. X. **An Atlas of histology**. New York, USA, WILSON, Patrick B. Ginger 1999.

**CAPÍTULO 2: PHARMACOLOGICAL SCREENING OF SPECIES OF THE GENUS *Lippia*, TERPENES AND PHENYLPROPANOIDS AND THEIR VASORELAXING EFFECTS ON HUMAN UMBILICAL ARTERY.**

Manuscrito submetido: **Current Pharmaceutical Design**

QUALIS B1 em CBII e Fator de Impacto: 3.116

**Pharmacological screening of species of the genus *Lippia*, terpenes and phenylpropanoids and their vasorelaxing effects on human umbilical artery.**

Débora de Menezes Dantas <sup>a,b</sup>; Luís Pereira-de-Morais <sup>b\*</sup>; Andressa de Alencar Silva <sup>b</sup>; Renata Evaristo Rodrigues da Silva <sup>b</sup>; Francisco Junio Dias <sup>b</sup>; Thais de Sousa Amorim <sup>b</sup>; Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>a</sup>; Roseli Barbosa <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Biological Chemistry Department, Postgraduate Program in Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Pimenta Campus, 63105-010, Crato, CE, Brazil

Physiopharmacology of Excitable Cells Laboratory

<sup>b</sup> Biological Sciences Department, Regional University of Cariri, Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil



## Abstract

This study aimed to perform a pharmacological screening of natural products in human umbilical artery (HUA). The preparations of HUA in organ bath apparatus were submitted to contractions evoked by KCl (60 mM) in the concentrations (1-5000  $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ ) of the essential oils of *Lippia alba* (EOLa) and *Lippia sidoides* (EOLs), of the terpenes: citral, limonene perillyl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol - in distinct experiments. The relaxation corresponded approximately 100%, except for Limonene ( $80\pm 1,2\%$ ). It was observed with values of  $\text{EC}_{50}$ : 424.3  $\mu\text{g/mL}$  (EOLa); 468.7 $\pm$ 6.7  $\mu\text{g/mL}$  (EOLs); 264.2  $\pm$  8.2  $\mu\text{M}$  (citral); 677.8 $\pm$ 5.4  $\mu\text{M}$  (limonene); 186.3 $\pm$ 6.4  $\mu\text{M}$  (peryll alcohol); 986.4 $\pm$ 7.9  $\mu\text{M}$  (eugenol); and 279.1 $\pm$ 4.4  $\mu\text{M}$  (methyl-eugenol) and there was a greater pharmacological potency for peryll alcohol. The data highlight the vasorelaxing effect of plant substances in HUAs paving the way for future investigations that may act on diseases related to these vessels such as pre-eclampsia.

**Keywords:** Vasorelaxant; Smooth muscle; Natural products; Human umbilical artery;

## 1. Introduction

Natural products provide molecular diversity and biological functionality, indispensable for drug discovery [1]. The prospecting of natural products with vasoactive properties is characterized as a promising tool for discoveries of new substances with therapeutic potential in the face of diseases with vascular alterations such as gestational hypertensive syndromes. This group of diseases and conditions includes pre-eclampsia (PE), eclampsia, gestational hypertension and chronic hypertension [2], and still portrays a public health problem affecting about five to ten percent of pregnant women worldwide [3]. The drug treatment for these pathologies still remains uncertain, especially when it comes to the mother-fetus relationship [4]. In this sense, the elucidation of new vasoactive products is of great pharmacological value, since it allows the detection of possible therapeutic targets for the treatment of these disorders.

Among the natural products there are essential oils (EOs) extracted from medicinal plants. The EOs are aromatic complexes that contain a mixture of volatile organic substances, present in the various organs of the plants (roots, bark, leaves, flowers and fruits). Among the classes of compounds present in EOs, terpenes and phenylpropanoids are among the most commonly found [5,6]. Several studies prove the diversity of biological activities of EOs as well as their chemical constituents.

EOs from the genus *Lippia* (*Lippia alba* and *Lippia sidoides*) presents, among the pharmacological characterizations, a vasorecological effect [7] as well as relaxing activity in other organs that contain smooth muscle such as uterus [8] and trachea [9]. Commonly chemical constituents that make up the mixture of EOs from several plants are related to their biological activity. The two main chemical classes [6] terpenes (such as citral, limonene, peryll

alcohol) and phenylpropanoids (such as eugenol and methyl eugenol) have vasoreglazing activities well described in the literature [7,8,10–12]

In this respect, rodent laboratory animals (rats, guinea pigs, mice) have been the main model for investigating the bioactive potential of several natural substances such as the oils and constituents mentioned above. However, it is important to highlight that differences may occur between the responses of vasodilator substances in experimental animal vessels (rodents) and humans [13]. Alternatively, umbilical cords have been used as experimental models for the development of important research, such as in tissue engineering studies and regenerative medicine [14], cardiovascular diseases [15], as well as in the investigation of new compounds with relaxing properties [13]. Few studies evaluate the activity of natural products in human umbilical vessels.

In the present study, a pharmacological screening of essential oils of the species of *Lippia alba* (EOLa) and *Lippia sidoides* (EOLs), of the terpenes citral, limonene, perilic alcohol and phenylpropanoids eugenol and methyl eugenol in human umbilical artery was performed. The objective is to evaluate which substance has a greater relaxing effect and through this study to give basis for future more detailed studies with the substance that obtained the most promising result. The investigation of new substances with relaxing properties in the umbilical artery is of great relevance, since they can bring new perspectives for the therapeutic treatment of vascular disorders such as pre-eclampsia.

## 2. SUPPLEMENTAL INFORMATION

Other information on preparation of solutions and medications, tissue preparation and isolation, experimental procedure and statistical analysis are contained in the supplementary material as described in previous works by our group[16].

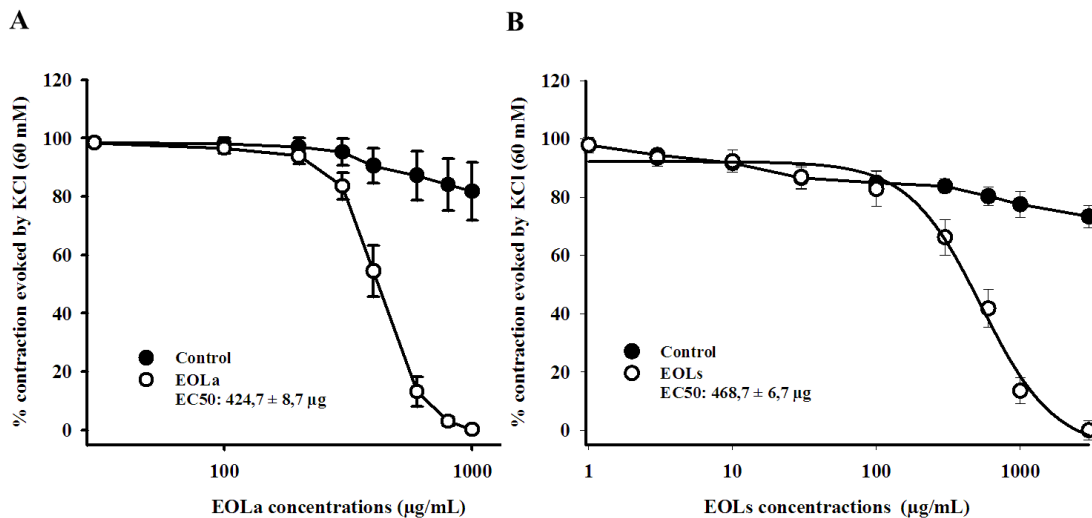
The collection and processing of the samples were approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade Regional do Cariri (URCA, Crato, CE, Brazil, No. 3,832,881) and by the São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee (São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee, Crato, CE, Brazil), as well as submitted and approved by the Brazil platform.

## 3. RESULTS

### 3.1 Effect of essential oils of *Lippia alba* and *Lippia sidoides* on contractions evoked by KCl (60 mM) of AUH

In the experiments performed with EOLa (30 - 1000  $\mu\text{g}$ ) and EOLs (1 - 3000  $\mu\text{g}$ ), to evaluate their effect on the smooth muscle of HUA in contraction evoked and maintained by KCl (60 mM), it was found that the concentrations used of the oils promoted 100% of the relaxation of the arterial muscles, in a concentration-dependent way. It was observed that the effect of the EOLa was statistically significant from the concentration of 400  $\mu\text{g}$ , reaching a total relaxation ( $100\pm 0.2\%$ ) in the concentration of 1000  $\mu\text{g}$ . The EOLs promoted in the concentrations (1 - 3000  $\mu\text{g}$ ) a vasorelaxing effect in  $100 \pm 3.3\%$  ( $p < 0.001$  one way ANOVA) in the maximum concentration of 3000  $\mu\text{g}$ , being 300  $\mu\text{g}$  the initial concentration

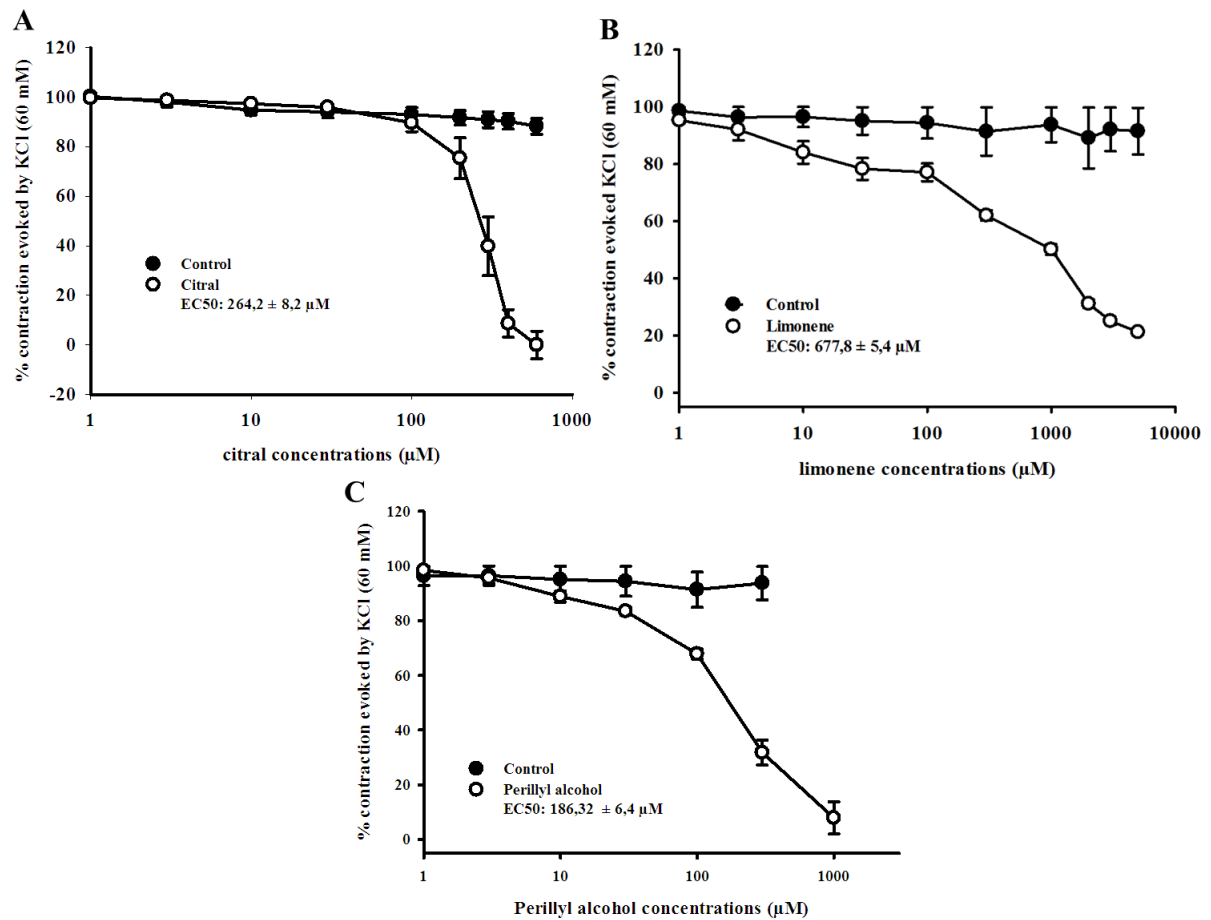
with the result statistically significant (Fig. 1A and 1B). The  $EC_{50}$  values for EOLa and EOLs were  $424.7 \pm 8.7 \mu\text{g}$  and  $468.7 \pm 6.7 \mu\text{g}$  respectively (Table 1).



**Figure 1:** Effect of the essential oils of *Lippia alba* and *L. sidoides* on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA). (A) Graph representing the effect of EOLa (30-1000  $\mu\text{g}$ ) on contractions evoked by KCl (60 mM) in AUH; B: Graph representing the effect of EOLs (1-3000  $\mu\text{g}$ ) on contractions evoked by KCl (60 mM) in HUA; The experimental sample corresponded to  $n = 6$ . Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ; ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA  $p < 0.001$ ).

## 2.2 Effect of citral terpenes, limonene and peryl alcohol on contractions evoked by KCl (60 mM) of AUH

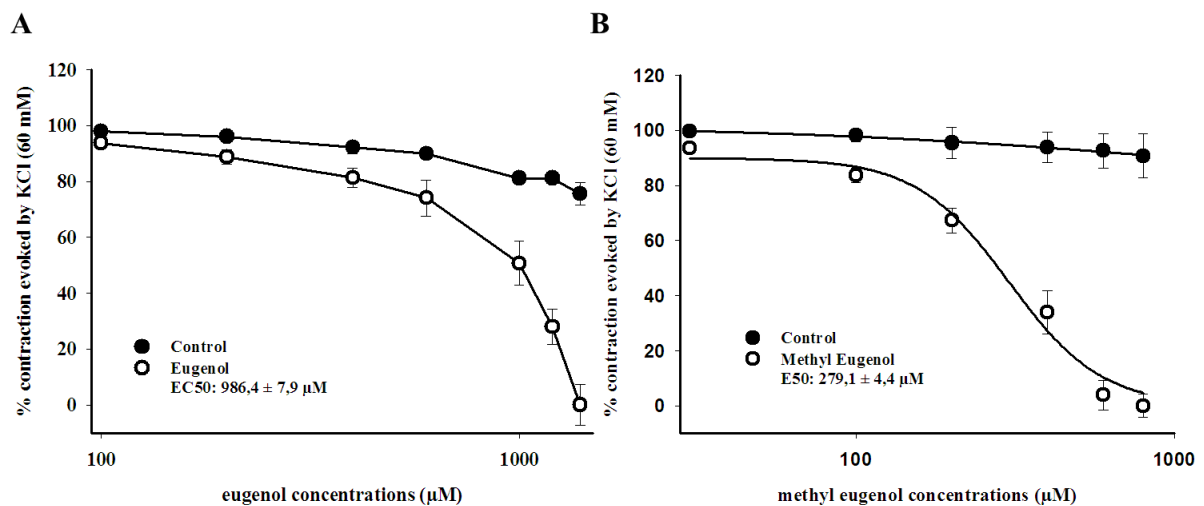
To evaluate the effect of citral terpenes (1-1000  $\mu\text{M}$ ), limonene (1-5000  $\mu\text{M}$ ) and peryl alcohol (1-1000  $\mu\text{M}$ ), in the concentrations on KCl evoked contractions (60 mM) were used. The vasorrelaxing effect was observed in 100% for citral ( $100 \pm 5.5\%$ ) and peryl alcohol ( $100 \pm 5.8\%$ ), which reached their maximum efficiency in the concentration of 1000  $\mu\text{M}$ . The limonene, however, did not obtain the total relaxation even in the concentration of 5000  $\mu\text{M}$  it was obtained relaxation of  $80 \pm 1.2\%$  (Fig. 2A, 2B and 2C respectively); as for the initial concentration statistically significant it was observed that citral 200  $\mu\text{M}$ , limonene 10  $\mu\text{M}$  and peryl alcohol 10  $\mu\text{M}$  respectively followed. The values of  $EC_{50}$  corresponded consequently to that:  $264.2 \pm 8.2 \mu\text{M}$  (citral)  $677.8 \pm 5.4 \mu\text{M}$  (limonene) and  $186.3 \pm 6.4 \mu\text{M}$  (peryl alcohol) ( $p < 0.001$  one way ANOVA). The values found for the three terpenes of  $EC_{50}$  are shown in (Table 1).



**Figure 2:** Effect of the citral, limonene and peryll alcohol terpenes on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA). (A) Graph representing the effect of citral (1-1000 µM) on contractions evoked by KCl (60 mM) in HUA; B: Graph representing the effect of limonene (1-5000 µM) on contractions evoked by KCl (60 mM) in AUH; C: Representative graph of the effect of peryll alcohol (1-1000 µM) on contractions evoked by KCl (60 mM) in AUH; The experimental sample corresponded to n = 6. Values are expressed as mean ± S.E.M. ; (p <0.05, one-way ANOVA p <0.001).

### 3.3 Effect of phenylpropanoids eugenol and methyl eugenol on KCl (60 mM) evoked contractions of AUH

To evaluate the phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol, the following concentrations were used respectively: 100-1400 µM and 30-800 µM in an way on contractions evoked by KCl (60 mM) for which the vasorelaxing effect was observed in 100% for both phenylpropanoids, in concentrations 1400 µM for eugenol (100±7.2%) and 800 µM for methyl eugenol (100±4.3%) respectively (Fig. 3A and 3B). The statistically significant concentrations for both phenylpropanoids were: 600 µM (eugenol) and 200 µM (methyl eugenol) (p< 0.001 one way ANOVA). The EC<sub>50</sub> values found for eugenol and methyl eugenol were: 986.4 ± 7.9 µM and 279.1 ± 4.4 µM respectively (Table 1).



**Figure 3:** Effect of phenylpropanoids eugenol and methyl eugenol on the contractile parameter of the electromechanical coupling on contractions evoked by KCl (60 mM) in smooth muscles of the human umbilical artery (HUA). (A) Graph representing the effect of eugenol (100-1400  $\mu\text{M}$ ) on contractions evoked by KCl (60 mM) in AUH; B: Graph representing the effect of methyl eugenol (30-800  $\mu\text{M}$ ) on contractions evoked by KCl (60 mM) in AUH; The experimental sample corresponded to  $n = 6$ . Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ; ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA  $p < 0.001$ ).

Substances	EC <sub>50</sub>	S.S.C	% Relaxation	P
EOLa	424.7 $\pm$ 8.7 $\mu\text{g}$	400 $\mu\text{g/mL}$	100%	<0,001
EOLs	468.7 $\pm$ 6.7 $\mu\text{g}$	300 $\mu\text{g/mL}$	100%	<0,001
Citral	264.2 $\pm$ 8.2 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M/mL}$	100%	<0,001
Limonene	677.8 $\pm$ 5.4 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M/mL}$	80%	<0,005
Peryl alcohol	186.3 $\pm$ 6.4 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M/mL}$	100%	<0,005
Eugenol	986.4 $\pm$ 7.9 $\mu\text{M}$	600 $\mu\text{M/mL}$	100%	<0,001
Methyl eugenol	279.1 $\pm$ 4.4 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M/mL}$	100%	<0,001

**Table 1:** Representation of the main results found for the evaluation of the evaluated substances (essential oils: EOLa and EOLs, terpenes: citral, limonene and peryl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol) on the human umbilical artery. The table shows the concentration values of the substances (essential oils: from *Lippia alba* and *Lippia sidoides*, terpenes: citral, limonene and peryl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol) capable of triggering 50% of the relaxing response (EC<sub>50</sub>) in the muscles of human umbilical artery; statistically significant concentrations (S.S.C); percentage of relaxation (% relaxation); and significance values (p values). The effect of the substances evaluated on HUA vascular tissue is described only in the absence of a functionally intact vascular endothelium. Values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

#### 4. DISCUSSION

The data allowed to demonstrate that EOs evaluated for this study, EOLa and EOLs, have vasorelaxing effect in human umbilical artery rings, as well as terpenes (citral, limonene and peryl alcohol) and phenylpropanoids (eugenol and methyl eugenol). The substances, except

limonene (relaxation of  $80 \pm 1.2\%$ ) relaxed 100% of contractions evoked by KCl. These findings are of great relevance, because they demonstrate the vasoactive potential of natural compounds in human smooth muscle cells.

The vasoactive potential of essential oils, terpenes and phenylpropanoids is well reported in animal tests (rodents). The main findings of the researcher's group in animal vessels with EOLa, citral describe its vasorelaxing effect in the thoracic aorta of rats [7], by blocking voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels type L; limonene and perillyl alcohol in the thoracic aorta of rats are reported with higher pharmacological potency in mechanisms involving electromechanical coupling such as blocking voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels [10]; eugenol, in turn, presents vascular effects described in rabbit thoracic aorta [17], in rat mesenteric vascular bed [18,19], in thoracic aorta, pulmonary arteries and brain of rats [20–22]. Regarding methyl-eugenol, a vasorelaxing effect was verified by Lahlou et al., (2004) [11] demonstrate this effect in isolated rat aorta, where methyl eugenol was able to inhibit potassium-induced contraction.

EOLs has been reported in the literature as having an antispasmodic effect in pig bronchioles and trachea in rats acting in voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels [23,24]. Many studies correlate the effect of mixtures such as EOs to their diverse chemical composition, in this respect some of the constituents of EOLs are described for vasorelaxing action vessels of rodents [25]. The findings of this study for the EOLa and EOLs attribute to both EOs a vasorelaxing effect on HUA and corroborate with the action of their constituents in smooth muscle aorta of rats.

It is observed that the previous findings for both EOs, terpenes and phenylpropanoids evaluated involve the voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels or even  $\text{K}^+$  channels, in this aspect it is highlighted that some ions such as calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) and potassium ( $\text{K}^+$ ) participate directly in the contractile regulation of HUA, as well as substances such as Serotonin (5-HT), Histamine (His) and Thromboxane. The increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  can be triggered by increased extracellular concentration of  $\text{K}^+$  ions resulting in depolarization of the membrane and opening of VOCCs [26,27] and consequent contraction in smooth muscle cells.

The displacement to the right of the contraction curve evoked by KCl (60 mM) observed in the presence of increasing and cumulative concentrations of the evaluated substances - EOLa, EOLs, citral, limonene, perillyl alcohol, eugenol and methyl eugenol - suggests an involvement with voltage-dependent channels, which proposes further investigations of the mechanisms of action involved in the effect of EO, terpenes and phenylpropanoids in studies on HUA rings, supported by the findings in the literature and previous data from this research.

Besides the effects on animal vessels, this study also described for EOLa the tocolytic effect in rat uterus [8] effect attributed to the involvement with  $\text{K}^+$  channels (BKca, KATP, KV); antispasmodic in rat trachea [9] due to the blocking of contractions evoked by  $\text{BaCl}_2$  thus proposing involvement with voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VOCCs); in the same studies, the citral and limonene were able to relax 100% the contraction promoted by K60 (in uterus and trachea) in a concentration-dependent manner suggesting for both the blocking of voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  (VOCCs), because the  $\text{K}^+$  in the extracellular medium promotes a

depolarization of the transmembrane potential caused by the displacement of the electrochemical gradient of  $K^+$ , which opens the ionic channels, such as the VOCCs, causing the influx of  $Ca^{2+}$ , thus promoting contraction.

When describing the present results, it is also possible to observe that in the HUA rings the pharmacological potency verified for the EOLa and EOLs present statistically similar values:  $424.7 \pm 8.7 \mu\text{g}$  and  $468.7 \pm 6.7 \mu\text{g}$  respectively; for the terpenes, the peryl alcohol presented the highest pharmacological potency when checking its  $EC_{50}$  corresponding to the lowest among the three terpenes evaluated:  $186.3 \pm 6.4 \mu\text{M}$ ,  $264.2 \pm 8.2 \mu\text{M}$ ,  $677.8 \pm 5.4 \mu\text{M}$  (peryl alcohol, citral and limonene respectively); for the phenylpropanoids in turn, although they present a similar molecular structure, differing only by the presence of the methyl group in the molecule of methyl eugenol, when compared to eugenol, methyl eugenol showed greater pharmacological potency given by the  $EC_{50}$  values:  $289.9 \mu\text{M}$  and  $998, 93 \mu\text{M}$  (methyl eugenol and eugenol, respectively), which showed statistically significant differences. The obtained data corroborate the findings of [28], which found that methyl eugenol inhibited the contractions in rat ileum, induced by KCl (60mM), with  $EC_{50}$  value equal to  $65 \mu\text{M}$ . Eugenol also reversed the contractions evoked by KCl (60 mM) in ileum, with  $EC_{50}$  of  $162 \mu\text{M}$  [29], a value higher than its previous studies with methyl eugenol. It is also evident from the  $EC_{50}$  values that peryl alcohol, citral and methyl eugenol correspond as the substances with the highest pharmacological potency in this study.

The effect of natural products in umbilical vessels, although scarce, points to the potential of such substances as is observed in the effect of monoterpene carveol in HUA rings [16], described by this study with mechanisms that involve the effective participation of VOCCs and a partial modulation of BKCa; other studies highlight natural substances such as: fraction rich in polyphenols (chlorogenic acid, isoorientin and swertiajaponin) of *Cymbopogon citratus* [30]; Genistein, a natural phytoestrogen belonging to the group of isoflavones, demonstrated inhibition of  $Ca^{2+}$  channels operated by voltage in human umbilical artery [31]. These data corroborate and subsidize the continuity of the study with the natural substances evaluated in this work.

It is observed that the data in the literature and the results found for EOs, terpenes and phenylpropanoids in this work subsidize the continuity of the studies and point to promising results. Since HUA vasoactivity is cited as more responsive to contracting substances, especially responses involving the mechanism of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, many studies seek to evaluate the activation of already existing contracting and/or relaxing agonists to understand the contractile and relaxing mechanisms of these vessels, or even endogenous substances that may perform local HUA vasoactivity [32–34].

The findings contribute to a vasorelaxant description in human smooth muscle cells of well studied natural substances such as EOs, terpenes and phenylpropanoids, but little described in human vessels. The effect of natural vasoactive substances from plants is widely evaluated, however the extrapolation of these studies to human smooth muscle cells corresponds to a limited amount.

## 5. CONCLUSION

This study constitutes evaluation of the vasodilating effect of EOLa and EOLs, of terpenes (citral, limonene and perillyl alcohol) and phenylpropanoids (eugenol and methyl eugenol) in smooth muscle cells of HUA. The perillyl alcohol, citral and methyl eugenol correspond to the substances with the highest pharmacological potency in this study. The results are promising, since there are many gaps between the effect of natural products with the vasorelaxing effect in laboratory animals and humans. The present data suggest that these compounds may be promising in vasorelaxing therapy of diseases that result in greater resistance in the umbilical arteries, such as pre-eclampsia.

## COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

**Funding:** The study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Ethical approval:** The collection and processing of the samples were approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade Regional do Cariri (URCA, Crato, CE, Brazil, No. 3,832,881) and by the São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee (São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee, Crato, CE, Brazil), as well as submitted and approved by the Brazil platform.

**Consent to participate:** Informed consent was obtained from legal guardians.

**Authors' contribution:** Conceptualization: [Débora de Menezes Dantas, Renata Evaristo Rodrigues da Silva, Luís Pereira de Moraes, Andressa de Alencar Silva and Roseli Barbosa]; Methodology: [Débora de Menezes Dantas, Renata Evaristo Rodrigues da Silva, Luís Pereira-de-Moraes, Andressa de Alencar Silva and Roseli Barbosa]; Research: [Débora de Menezes Dantas, Luís Pereira de Moraes, Andressa de Alencar Silva, Francisco Junio Dias, Thais de Sousa Amorim]; Formal analysis: [José Henrique Leal Cardoso and Roseli Barbosa]; Writing - preparation of the original draft: [Débora de Menezes Dantas]; Writing - revision and editing: [Débora de Menezes Dantas, Renata Evaristo Rodrigues da Silva, Luís Pereira de Moraes, Andressa de Alencar Silva, José Henrique Leal Cardoso and Roseli Barbosa]; Acquisition of financing: [Roseli Barbosa]; Resources: [Roseli Barbosa]; Supervision: [Roseli Barbosa]. All authors read and approved the final manuscript. The authors declare that all data was generated internally and that no paper mill was used.

**Acknowledgments:** The development of this research was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES); Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). Funding code BPI: BP3.00139-00072.0200/18; and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funding bodies had no role in the design of the study, collection, analyses, or interpretation of data, nor in the writing of the manuscript, nor in the decision to publish the results.

## References

- [1] Lahlou M. The success of natural products in drug discovery 2013.
- [2] Steegers EAP, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia 2010; 376: 631–44.
- [3] Janani F, Changae F. Seasonal variation in the prevalence of preeclampsia 2017; 6: 766.
- [4] Committee SP. SMFM Statement: benefit of antihypertensive therapy for mild-to-moderate chronic hypertension during pregnancy remains uncertain 2015; 213: 3–4.
- [5] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review 2008; 46: 446–75.
- [6] Castro HG de, Oliveira LO de, Barbosa LC de A, Ferreira FA, Silva DJH da, Mosquim PR, et al. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto 2004; 27: 55–57.
- [7] Silva RER, Morais LP De, Silva AA, Bastos CMS, Pereira-gonçalves Á. Vasorelaxant effect of the Lippia alba essential oil and its major constituent , citral , on the contractility of isolated rat aorta 2018; 108: 792–98.
- [8] Pereira-de-Morais L, Silva A de A, da Silva RER, Costa RHS da, Monteiro ÁB, Barbosa CR dos S, et al. Tocolytic activity of the Lippia alba essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats 2019; 297: 155–59.
- [9] Carvalho PMM, Macêdo CAF, Ribeiro TF, Silva AA, Da Silva RER, de Morais LP, et al. Effect of the Lippia alba (Mill.) N.E. Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats 2018; 17: 31–34.
- [10] Cardoso-Teixeira AC, Ferreira-Da-Silva FW, Peixoto-Neves D, Oliveira-Abreu K, Pereira-Gonçalves Á, Coelho-De-Souza AN, et al. Hydroxyl group and vasorelaxant effects of perillyl alcohol, carveol, limonene on aorta smooth muscle of rats 2018; 23: 1–13.
- [11] Lahlou S, Figueiredo AF, Magalhães PJC, Leal-Cardoso JH, Gloria PD. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats 2004; 74: 2401–12.
- [12] Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhaes PJC, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta 2010; 24: 341–50.
- [13] Fei JQ, Zhou H Bin, Shen YL, Chen XZ, Wang LL. A comparison study on the responses of umbilical arteries and thoracic aorts to the adrenergic receptor agonists 2008; 32: S55–S55.

- [14] Velarde F, Castañeda V, Morales E, Ortega M, Ocaña E, Álvarez-Barreto J, et al. Use of Human Umbilical Cord and Its Byproducts in Tissue Regeneration 2020; 8.
- [15] Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) as a model to study cardiovascular disease: A review 2020; 10: 938.
- [16] Silva RER da, de Alencar Silva A, Pereira-de-Morais L, de Sousa Almeida N, Iriti M, Kerntopf MR, et al. Relaxant Effect of Monoterpene (-)-Carveol on Isolated Human Umbilical Cord Arteries and the Involvement of Ion Channels 2020; 25: 2681.
- [17] Nishijima H, Uchida R, Kameyama K, Kawakami N, Ohkubo T, Kitamura K. Mechanisms mediating the vasorelaxing action of eugenol, a pungent oil, on rabbit arterial tissue 1999; 79: 327–34.
- [18] Criddle DN, Madeira SVF, de Moura RS. Endothelium-dependent and -independent vasodilator effects of eugenol in the rat mesenteric vascular bed 2003; 55: 359–65.
- [19] Peixoto-Neves D, Wang Q, Leal-Cardoso JH, Rossoni L V, Jaggar JH. Eugenol dilates mesenteric arteries and reduces systemic BP by activating endothelial cell TRPV 4 channels 2015; 172: 3484–94.
- [20] Costa EE. Efeito do eugenol no mecanismo contrátil da artéria pulmonar em ratos. Universidade Estadual do Ceará, 2012.
- [21] Damiani CEN, Rossoni LV, Vassallo DV. Vasorelaxant effects of eugenol on rat thoracic aorta 2003; 40: 59–66.
- [22] Peixoto-Neves D, Leal-Cardoso JH, Jaggar JH. Eugenol dilates rat cerebral arteries by inhibiting smooth muscle cell voltage-dependent calcium channels 2014; 64: 401.
- [23] Pereira-de-morais L, Silva ADA, Evaristo R, Bastos MDS, Araújo IM, Henrique R, et al. Bronchodilator Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* in Bronchial Isolated from Swine *Sus scrofa domestica* 2020; 4: 33–40.
- [24] Teófilo TM do NG. Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides* C ham . e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 2012.
- [25] Peixoto-Neves D, Silva-Alves KS, Gomes MDM, Lima FC, Lahlou S, Magalhães PJC, et al. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta: ORIGINAL ARTICLE 2010; 24: 341–50.
- [26] Quan A, Leung SWS, Lao TT, Man RYK. 5-Hydroxytryptamine and Thromboxane A<sub>2</sub> as Physiologic Mediators of Human Umbilical Artery Closure 2003; 10: 490–95.
- [27] Santos-silva AJ, Cairrão E, Verde I. Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility 2010; 2: 321–31.
- [28] Lima CC, Criddle DN, Coelho-De-Souza AN, Monte FJQ, Jaffar M, Leal-Cardoso JH. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum 2000; 66: 408–11.
- [29] Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Coelho-de-Souza AN, Criddle DN, Pinto Duarte GIB,

- Santos MA V, et al. Inhibitory actions of eugenol on rat isolated ileum 2002; 80: 901–6.
- [30] Campos J, Schmeda-Hirschmann G, Leiva E, Guzmán L, Orrego R, Fernández P, et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf) polyphenols protect human umbilical vein endothelial cell (HUVECs) from oxidative damage induced by high glucose, hydrogen peroxide and oxidised low-density lipoprotein 2014; 151: 175–81.
- [31] Speroni F, Rebolledo A, Salemme S, Roldán-Palomo R, Rimorini L, Añón MC, et al. Genistein effects on Ca<sup>2+</sup> handling in human umbilical artery: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release and of voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channels Efectos de la genisteína en los niveles del Ca<sup>2+</sup> citosólico en células musculares de arteria umbilical hum 2009; 65: 113–24.
- [32] Gunduz E, Arun O, Bagci ST, Oc B, Salman A, Yilmaz SA, et al. Effects of propofol and sevoflurane on isolated human umbilical arteries pre-contracted with dopamine, adrenaline and noradrenaline 2015; 41: 697–703.
- [33] Gupta S, Mehrotra S, Villalón CM, Perusquía M, Saxena PR, MaassenVanDenBrink A. Potential role of female sex hormones in the pathophysiology of migraine 2007; 113: 321–40.
- [34] Unlugenc H, Emre M, Demir C, Guler T, Kavak S, Isik G. Remifentanil-induced mechanical responses and membrane potential changes in human umbilical arteries 2007; 51: 244–51.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Pharmacological screening of species of the genus *Lippia*, terpenes and phenylpropanoids and their vasorelaxing effects on human umbilical artery.

Débora de Menezes Dantas <sup>a,b</sup>; Luís Pereira-de-Morais <sup>b\*</sup>; Andressa de Alencar Silva <sup>b</sup>; Renata Evaristo Rodrigues da Silva <sup>b</sup>; Francisco Junio Dias <sup>b</sup>; Thais de Sousa Amorim <sup>b</sup>; Henrique Douglas Melo Coutinho <sup>a</sup>; Roseli Barbosa <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Biological Chemistry Department, Postgraduate Program in Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Pimenta Campus, 63105-010, Crato, CE, Brazil

Physiopharmacology of Excitable Cells Laboratory

<sup>b</sup> Biological Sciences Department, Regional University of Cariri, Campus of Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brazil

## Abstract

This study aimed to perform a pharmacological screening of natural products in human umbilical artery (HUA). The preparations of HUA in organ bath apparatus were submitted to contractions evoked by KCl (60 mM) in the concentrations (1-5000  $\mu\text{g/mL}$  e  $\mu\text{M}$ ) of the essential oils of *Lippia alba* (EOLa) and *Lippia sidoides* (EOLs), of the terpenes: citral, limonene perillyl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol - in distinct experiments. The relaxation corresponded approximately 100%, except for Limonene ( $80\pm 1,2\%$ ). It was observed with values of  $\text{EC}_{50}$ : 424.3  $\mu\text{g/mL}$  (EOLa); 468.7 $\pm$ 6.7  $\mu\text{g/mL}$  (EOLs); 264.2  $\pm$  8.2  $\mu\text{M}$  (citral); 677.8 $\pm$ 5.4  $\mu\text{M}$  (limonene); 186.3 $\pm$ 6.4  $\mu\text{M}$  (perillyl alcohol); 986.4 $\pm$ 7.9  $\mu\text{M}$  (eugenol); and 279.1 $\pm$ 4.4  $\mu\text{M}$  (methyl-eugenol) and there was a greater pharmacological potency for perillyl alcohol. The data highlight the vasorelaxing effect of plant substances in HUAs paving the way for future investigations that may act on diseases related to these vessels such as pre-eclampsia.

**Keywords:** Vasorelaxant; Smooth muscle; Natural products; Human umbilical artery;

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Botanical Material and Essential Oils

The essential oils of *Lippia alba* (EOLa) and *Lippia sidoides* (EOLs) were obtained by donation of Dr. Sergio Horta (UFC).

The botanical material of EOLa and EOLs were obtained in the experimental farm of UFC by Dr. Sergio Horta (experimental farm of the Federal University of Ceará, Brazil). They were evaluated and chemically analyzed at the Laboratory of Natural Products and the Technological Development Park (PADETEC) of the Federal University of Ceará, Brazil.

Both essential oils have already had their chemical composition identified and described in works related to our group. For EOLa the following compounds were detected: citral 75.92 % [Geraniol (41.81%) and neral (34.11%)], limonene (9.85%), carvone (8.92%), gamma-terpinene (2.05%), cimene (1.02%), as observed in the work of [1]. For the EOLs the following compounds were detected: thymol (66.00%), p-Cimene (15.01%), cariofilene (4.60%), myrcene (4.23%), gamma-terpinene (1.87%), thymethyl ether (1.15%) and alpha-terpinene (1.01%) [2]. As described in the work of Pereira-de Moraes et al., (2020) [3] similar chemical composition was also identified.

The terpenes: citral, limonene, perillyl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl eugenol were obtained at Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA), stored according to the manufacturer's instructions.

### Solutions and medicines

The drugs and reagents used were of analytical purity, obtained at Sigma Chemical Corporation (St. Louis, MO, USA), stored according to the manufacturer's instructions. The following salts were used: potassium chloride (KCl), sodium chloride (NaCl), magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ), calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ), glucose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), potassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sodium carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), - [4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazinyl] ethanesulfonic acid (HEPES) and the solubilizing agent Tween 80 (CAS number 9005-65-6). The concentrations were expressed in millimoles / liter (mM). The essential oils of *Lippia alba* and *Lippia sidoides*, the terpenes: citral, limonene, perillyl alcohol and phenylpropanoids: eugenol and methyl-eugenol were diluted in Krebs solution and Tween 80 to 3%, minutes before each experiment, previously remained stored at 22 °C.

### **Preparation, tissue isolation and experimental procedure**

The collection and processing of the samples were approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade Regional do Cariri (URCA, Crato, CE, Brazil, No. 3,832,881) and by the São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee (São Francisco de Assis Hospital and Maternity Ethics Committee, Crato, CE, Brazil), as well as submitted and approved by the Brazil platform.

Fragments of human umbilical cord (portions that would be destined for biological disposal) of approximately 10cm were obtained with the consent of the donor mothers, healthy, normotensive and without cord disorders, after vaginal delivery or cesarean section. The samples were collected and stored in modified Krebs solution (mM): NaCl 125; KCl 4.8;  $\text{CaCl}_2$  1;  $\text{MgSO}_4$  1.2;  $\text{NaHCO}_3$  25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2;  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  11; HEPES 25; EDTA 0.3), refrigerated in a thermal box and transported to URCA's Laboratory of Excitable Cells. The cord segments were stored in a 4 to 8°C refrigerator and were used within 48 hours after the collection period [4]. The vascular endothelium was mechanically removed with a cotton thread that passed through the lumen of the artery to avoid interference from substances released by the endothelial cells.

The HUA was isolated from the connective tissue and sectioned in rings of 3 to 4mm, individually suspended with stainless steel hooks inserted in its lumens, with isometric tension of 3g in glass chambers with 10mL in organ bath apparatus in the Krebs-Henseleit solution at 37°C, with constant bubbling with carbogenic mixture (95%  $\text{O}_2$ ; 5%  $\text{CO}_2$ ). The solution was renewed every 15 minutes after the suspension of the rings of the arteries. After a period of stabilization (2h:30min), two subsequent contractions were evoked, produced by the addition of 60 mM KCl (K60) hypertonic in preparations of HUA, in which the maximum response obtained after a plateau was reached - this was considered the maximum contraction of the ring. Subsequently the viability of the rings the contractile agonist KCl (60 mM) was added for evaluation of the vasorelaxing effect of the ring: EOLa (30-1000  $\mu\text{g}$ ), EOLs (1-3000  $\mu\text{g}$ ), citral (1-1000  $\mu\text{M}$ ) limonene (1-5000  $\mu\text{M}$ ), perillyl alcohol (1-1000  $\mu\text{M}$ ), eugenol (100-1400  $\mu\text{M}$ ), and methyl eugenol (30-800  $\mu\text{M}$ ) added incrementally and cumulatively in separate experiments. The concentrations used were established by pilot experiment for each substance and evaluation of the behavioral response of the tissue evaluated on exposure of each.

Records of isometric tension of the HUA rings, kept in a thermostatic organ bath apparatus, were measured using a rod connected to a force transducer (MLT0420). The transducer was connected to an amplifier (ADInstruments Bridge Amps), which was later connected to an analog digital converter platform (BCN / pod port) installed on a computer and converted into traces and stored in files using LabChart Pro software for later analysis.

### Statistical Analysis

The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Sigma Plot software version 11.0 (Systat Software San Jose, CA 95110, USA) was used for statistical analysis and graphic production. The results considered statistically significant presented a probability of null hypothesis below 5% ( $p < 0.05$ ). Student's t-tests and analysis of variance (one-way or two-factor ANOVA), followed by the Holm-Sidak test, were performed when appropriate. EC50 values were determined as the concentration of the substance capable of producing 50% inhibition of maximum contraction. A logarithmic interpolation was performed for each experiment in the calculations. Where this was not possible, a linear relationship between two EC50 points was obtained.

### REFERENCES

- [1] Sousa DG, Sousa SDG, Silva RER, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, Kerntopf MR, et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves 2015; 48: 697–702.
- [2] Barbosa R, Cruz-Mendes Y, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, Ribeiro NM, Morais LP, et al. Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability 2017; 50.
- [3] Pereira-de-morais L, Silva ADA, Evaristo R, Bastos MDS, Araújo IM, Henrique R, et al. Bronchodilator Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* in Bronchial Isolated from Swine *Sus scrofa domestica* 2020; 4: 33–40.
- [4] Mildenerger E, Biesel B, Siegel G, Versmold HT. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein 2003; 285: H1730–37.

## **CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **3.1 Conclusões gerais**

Conclui-se, que os EOLa e EOLs, os terpenos (cital, limoneno e álcool perfílico) e fenilpropanóides (eugenol e metil eugenol) apresentam efeito vasodilatador em células de musculatura lisa de AUH. Dentre as substâncias o álcool perfílico apresentou maior potência farmacológica. Os resultados são promissores uma vez que muitas são as lacunas entre o efeito de produtos naturais com o efeito vasorrelaxante em animais de laboratório e humanos. Nossos dados sugerem que esses compostos podem ser promissores na terapia vasorrelaxante de doenças que resultam em maior resistência nas artérias umbilicais, como a pré-eclâmpsia.

### **3.2 Perspectivas de Investigações Futuras**

Temos como perspectivas futuras, as investigações dos mecanismos de ação para compreendermos quais canais iônicos estão envolvidos no efeito vasorrelaxante das substâncias estudadas. Espera-se também a realização de novos experimentos para avaliar o efeito desses compostos no acoplamento farmacomecânico.

Além disso, temos buscado parcerias com outros grupos de pesquisas, na busca de outras tecnologias que venham somar e nos auxiliar na elucidação dos efeitos dos produtos naturais estudados.

E por fim, espera-se desenvolver relevantes produções científicas de nível nacional e internacional, que contribuam na descoberta de novas drogas capazes de promover o vasorrelaxamento dos vasos umbilicais e assim restabelecer o fluxo sanguíneo em casos de distúrbios hipertensivos gestacionais.

**ANEXOS****ANEXO 1**

UNIVERSIDADE REGIONAL DO  
CARIRI - URCA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** AÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS SOBRE A MUSCULATURA DOS VASOS DO CORDÃO UMBILICAL HUMANO

**Pesquisador:** Roseli Barbosa

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 65254316.5.0000.5055

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** Universidade Regional do Cariri - URCA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.245.549

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Rua Cel. Antônio Luiz, nº 1161

**Bairro:** Pimenta

**CEP:** 63.105-000

**UF:** CE

**Município:** CRATO

**Telefone:** (88)3102-1212

**Fax:** (88)3102-1291

**E-mail:** cep@urca.br



## APÊNDICES

### APÊNDICE 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do(s) responsável (eis): \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Foi esclarecido que:

- o fragmento de cordão umbilical - FCU - deverá ser coletado somente após a secção do cordão umbilical, não trazendo portanto nenhum prejuízo à mãe e ao (à) filho(a);
- o FCU deverá ser utilizado para realização de experimentos com as artérias. O critério de utilização deverá ser de acordo com as normas do comitê de ética humano;
- todas as informações referentes à mãe, ao(a) filho(a) e ao FCU coletado, deverão ser tratadas de forma sigilosa, garantindo o anonimato;
- o prontuário hospitalar da mãe o do(a) filho(a) poderão ser consultados pelos pesquisadores a qualquer momento, para obtenção de dados clínicos e história médica necessários;
- o Laboratório de Fisiofarmacologia das Células excitáveis - LFCE fica autorizado a descartar o restante do FCU caso não seja utilizado para fins de experimentos farmacológicos;
- fica autorizada a utilização da unidade do FCU em outros projetos de pesquisa aprovados pelo comitê de ética humano, projetos esses vinculados com a Universidade Regional do Cariri - URCA;
- não receberemos nenhuma remuneração, compensação material ou financeira, ou privilégio pela doação da unidade do FCU;
- a doação é livre e voluntária sendo facultada a desistência no momento da coleta, sem que isto cause prejuízo ao atendimento da mãe e do recém-nascido;
- este consentimento prévio não obriga o hospital, a maternidade, ou a URCA a colher o FCU do(a) nosso(minha) filho(a), se houver impedimentos técnicos para a coleta;
- lemos, compreendemos e estamos satisfeitos com todas as informações recebidas. Pudemos formular todas as perguntas convenientes e todas as dúvidas foram esclarecidas.
- Em consequência, damos o nosso consentimento para coleta do FCU do (a) nosso(a) filho(a) e aceitamos as condições acima descritas.

---

Assinatura do(s) responsável (eis) legal (ais)

---

Assinatura e carimbo do médico responsável pela coleta

---

Assinatura e carimbo do professor pesquisador responsável pela pesquisa

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE II:

### PRODUÇÃO ACADÊMICA (2019-2021)

#### ARTIGOS PUBLICADOS

DE ALENCAR SILVA, ANDRESSA ; PEREIRA-DE-MORAIS, LUÍS ; RODRIGUES DA SILVA, RENATA EVARISTO ; DE MENEZES DANTAS, DÉBORA ; BRITO MILFONT, CÍCERA GEORGIA ; GOMES, MARIA FRANCIELE ; ARAÚJO, ISAAC MOURA ; KERNTOPF, MARTA REGINA ; ALENCAR DE MENEZES, IRWIN ROSE ; BARBOSA, ROSELI. Pharmacological screening of the phenolic compound caffeic acid using rat aorta, uterus and ileum smooth muscle. **CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS**, v. 332, p. 109269, 2020.

AMORIM, YARLLA SANTOS; DANTAS, DÉBORA DE MENEZES; ALVES, ANA MARIA DE SOUZA; OLIVEIRA, FRANCISCO CEZAR ALVES DE; OLIVEIRA, ELAINE CRISTINA CONCEIÇÃO DE; BEZERRA, NORMA SUELLY RAMOS FREIRE; FIGUEIREDO, FRANCILEIDE VIEIRA; TORRES, CICERO MAGERBIO GOMES. INTERDISCIPLINARIDADE NO ENSINO DE BIOLOGIA: MOVIMENTO ARTICULADOR DO FAZER PEDAGÓGICO E DO PROCESSO DE ENSINO E DE APRENDIZAGEM. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, v. 8, p. 409-416, 2020.

BEZERRA, J. W. A.; FONSECA, V. P.; ROCHA, M. I.; RODRIGUES, A. S. ; MACEDO, G. F.; SILVA, L. V.; SOUSA, J. D. ; SILVA, V. B.; DANTAS, D. M.; GONCALO, M. A. B. F.; OLIVEIRA, R. S.; SANTOS, L. T.; BARROS, L. M. CHEMICAL COMPOSITION AND INSECTICIDE EVALUATION OF ESSENTIAL OIL OF *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. (CHUMBINHO) AGAINST *Nauphoeta cinérea*. **REVISTA CUBANA DE PLANTAS MEDICINALES**, v. 24, p. 1-11, 2019.

DANTAS, D. M.; SILVA JUNIOR, C. P.; BARBOSA, R.; MORAES, L. P. IMPLEMENTAÇÃO DE MÉTODO ALTERNATIVO PARA SUBSTITUIÇÃO DO USO DE ANIMAIS EM ESTUDOS COM MÚSCULO LISO. **CIENCIA ANIMAL** (UECE), v. 29, p. 148-154, 2019.

#### CAPÍTULO DE LIVRO

MORAIS, LUÍS PEREIRA DE ; Pereira - de - Moraes, Eliane; DANTAS, DÉBORA DE MENEZES; Calixto, Gabriela Lucena; BASTOS, CARLA MIKEVELY DE SENA; Silva Júnior, Cicero Pedro da; ARAÚJO, ISAAC MOURA; Oliveira, Dayanne Rakelly de; Cruz, Rachel de Sá Barreto Luna Callou. CONHECIMENTO DE GESTANTES ATENDIDAS POR UMA EQUIPE DE SAÚDE DA FAMÍLIA SOBRE O ALEITAMENTO MATERNO

EXCLUSIVO. Ações de Saúde e Geração de Conhecimento nas Ciências Médicas 4. 4ed.: Atena Editora, 2020, v. , p. 23-37.

### **PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO**

SILVA, R. E. R.; BARBOSA, R.; DANTAS, D. M.. Participação em banca de CARLA MIKEVELY DE SENA BASTOS. **CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO VASODILATADOR DO MONOTERPENO CARVEOL EM ARTÉRIA ISOLADA DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Regional do Cariri.

BARBOSA, R.; SILVA, A. A.; BASTOS, C. M. S; DE MENEZES DANTAS, DÉBORA; MORAES, L. P. Participação em banca de CÍCERA GEORGIA BRITO MILFONT. **EFEITO MIORELAXANTE DO EUGENOL EM ARTÉRIAS ISOLADAS DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Regional do Cariri.