

## INFLUÊNCIA DO ENDOTÉLIO SOBRE O EFEITO VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO

Carla Mikevely de Sena Bastos<sup>1\*</sup>, Renata Evaristo Rodrigues da Silva<sup>2</sup>, Thaís de Souza Amorim<sup>1</sup>, Nayane de Sousa Almeida<sup>1</sup>, Andressa de Alencar Silva<sup>2</sup>, Luís Pereira de Moraes<sup>2</sup>, Marta Regina Kerntopf<sup>2,4</sup>, Irwin Rose de Alencar Menezes<sup>2,4</sup>, Roseli Barbosa<sup>2,3,4</sup>

1. Estudante de IC da Universidade Regional do Cariri - URCA
2. Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular - PGBM
3. Pesquisador da Universidade Regional do Cariri - URCA
4. URCA - Departamento de Química Biológica / Orientador

### Resumo:

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) popularmente chamada de erva-cidreira tem seu uso popular atribuído as suas propriedades sedativas e analgésicas, no entanto até o momento não há nada na literatura sobre a musculatura lisa da aorta. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e de seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de ratos. Utilizou-se preparações de anéis de aorta isoladas e mantidas em Tyrode modificado, aerado, pH 7,4, a 37°C. OELa, citral e limoneno relaxaram a musculatura lisa nas contrações induzidas por K60 mM e por FE 0,1 µM. Verificou-se que OELa e citral promoveram um efeito relaxante da musculatura lisa que foi potencializado pela presença do endotélio. Diante disso observou-se que o OELa, o citral e o limoneno apresentaram efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos.

**Autorização legal:** Aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) – URCA, registrado sob o número de protocolo: 00084/2014.2.

**Palavras-chave:** *Lippia alba*, aorta e músculo liso

**Apoio financeiro:** CAPES

### Introdução:

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, (Verbenaceae) é popularmente conhecida como erva cidreira sendo bastante disseminada por todo território brasileiro. *L.*

*alba* amplamente utilizada como calmante, analgésica, sedativa, ansiolítica, antiespasmódica e expectorante (MATOS, 2000; MATTOS et al., 2007; HOLETEZ, et al., 2002). Alguns estudos relatam para a *Lippia alba* atividades antioxidante e antimicrobiana (SOARES, 2001); Para o extrato etanólico da *L. alba*, observou-se um efeito anticonvulsivante, sedativo e miorelaxante (VIANA et al., 2000, SOARES et al. 2001, ZETÓLA et al., 2002)

A *L. alba*, tem a sua composição química, bem estudada por apresentar como uma das características a sua organização em quimiotipos onde os seus quimiotipos mais comuns são: citral e limoneno (BARROS, et al., 2009). O citral é um monoterpeno, definido como um metabólito secundário, resultante da união de dois compostos químicos: o trans-isômero geranial ((E) -3,7-dimetil-2,6-octadienal) e o cis-isômero neral ((Z) -3,7-dimetil-2,6-octadienal) (MATOS, 2000). São atribuídas ao citral algumas atividades biológicas, como: ação calmante e espasmolítica (MATOS, 2000), antiespasmódica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica, antibacteriana (SILVA et al., 2012; SENA FILHO, et al., 2006). O Limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpeno monocíclico (BURDOCK, 2016), o mesmo possui dois enantiômeros, o S(-)-limoneno e o R(+)-limoneno. O mesmo é responsável pelas seguintes atividades: antifúngica, antibacteriana, antitumoral, inseticida, repelente e acaricida (HOLLINGSWORTH, 2005; CAVALCANTI et al., 2011;).

No entanto, até o momento não há estudos envolvendo a ação relaxante do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e seus componentes majoritários citral e limoneno sobre a musculatura lisa vascular. Sendo

assim, o estudo do OELa e dos seus componentes, citral e limoneno, é de extrema importância para elucidar a sua verdadeira ação no músculo liso vascular, estrutura esta, importante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, como a hipertensão. Nessa mesma perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e de seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de ratos.

### Metodologia:

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00084/2014.2. Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos, variedade Wistar, com massa corpórea de 200-300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri-URCA. Os animais foram eutanasiados por decaptação e consequentemente dissecados. A aorta torácica foi seccionada em segmentos transversos circulares medindo entre 4-5 mm de comprimento. Para determinados experimentos, o endotélio foi removido por meio de uma leve raspagem das paredes internas de cada segmento de aorta, os quais foram montados em banho de órgão isolado, com capacidade para 10 ml da solução nutritiva Tyrode, aerado a temperatura de 37°C e pH 7,4. Posteriormente, os anéis de aorta isolados foram submetidos a uma tensão de 1g por um período de 1 hora.

Para avaliar o efeito do OELa sobre o tônus muscular espontâneo da aorta, administrou-se concentrações crescentes e cumulativas do OELa (1-1000 µg/ml). Para avaliar o efeito relaxante na contração do músculo liso que ocorre pelo acoplamento eletromecânico, foram administradas concentrações crescentes e cumulativas do OELa (1 - 1000µg/ml), do citral (1-1000µM), e do limoneno (1-3000µM), em preparações de aorta com e sem endotélio, sobre o tônus vascular estável induzido por K60.

Para testar o efeito do OELa, citral e limoneno sobre o acoplamento farmacomecânico, essas substâncias foram administradas cumulativamente (1-1000µg/ml para o OELa, de 1- 1000µM para citral, e de 1-3000µM para o limoneno) sobre o tônus

vascular estável induzido por fenilefrina (0,1 µM) em anéis de aorta isolada de rato com e sem endotélio.

Para avaliar o efeito inibitório do OELa, do citral e do limoneno sobre contrações induzidas por BaCl<sub>2</sub>, a preparação foi mantida em solução de Tyrode livre de cálcio (0Ca<sup>2+</sup>) na presença de alta concentração de potássio (K80mM) e EGTA (1mM). Em seguida, o OELa (1000µg/ml), citral (1000µM) e limoneno (1000µM), ou apenas o controle, foram adicionados a preparação, e seus efeitos expressos em curvas cumulativas concentração-resposta de BaCl<sub>2</sub> (0,1-30 mM) foram avaliados.

Para avaliar o efeito de concentrações cumulativas de OELa, citral e limoneno, sobre contrações sustentadas em resposta ao BAY-K 8644 (3µM), as preparações de aorta foram sensibilizadas com KCL (10mM), e logo após induzida contração com BAY-K 8644 (3µM). Em seguida, foi realizada curva concentração resposta com diferentes concentrações de OELa (1-1000 µg/ml), citral (1-1000µM) e limoneno (1-1000µM).

A exposição dos resultados foi como média ± E.P.M. (n), onde n representa o número de experimentos realizados e o E.P.M. significa o erro padrão da média. Os resultados considerados estatisticamente significantes apresentaram probabilidade de hipótese nula menor que 5% (p< 0,05).

### Resultados e Discussão:

OELa, citral e limoneno promoveram relaxamento da musculatura lisa nas contrações induzidas por potássio (K60mM) e por fenilefrina (0,1 µM). Os efeitos do relaxamento foram potencializados pela presença do endotélio, visto que nas contrações induzidas por FE (0,1 µM) em aorta com endotélio, a CE50 foi de 352,73± 19,39 µg/ml e 99,34±7,2µM para OELa e citral, respectivamente;

Na presença do bloqueador da oxido nítrico sintase, o L-NAME a CE50 foi de 654,19±10,46 µg/ml e 601,66±10,92, para OELa e citral, respectivamente. Observou-se efeito oposto para o limoneno, que na ausência do bloqueador sua CE50 foi de 2682,7± 19,08µM, e com L-NAME-CE50 foi de 997,5± 80,13µM) mostrando assim que o

mecanismo de ação do limoneno é diferente das demais substâncias. Porém, nas preparações pré-incubadas com indometacina, o efeito tornou-se significante a partir da concentração de 30µg/ml para o OELa e 300µM para o citral ( $p < 0,05$ , one way ANOVA, seguido de Holm-Sidak). Esses dados sugerem que a potencialização do relaxamento da musculatura lisa envolve os fatores derivados do endotélio (Figura 1)..

Esses dados corroboram com os dados da literatura, onde foi visto que óleos essenciais e outras substâncias naturais como metil-eugenol, 1,8-cineol e  $\alpha$ -terpineol promovem um maior relaxamento da musculatura lisa da aorta pela ativação da via NO endotelial (LAHLOU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2008; PINTO et al., 2009). Enquanto que para o limoneno, o relaxamento é potencializado na ausência dos fatores derivados do endotélio, NO e prostaciclina

endotélio preservado e pré-incubado com L-NAME e Indometacina Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M.; ( $p < 0,05$ , one-way ANOVA seguido de Holm-Sidak).

### Conclusões:

Observou-se que o OELa e o citral apresentaram efeito vasorrelaxante em aorta isplada de ratos, o qual é pontencializado pelo endotélio. Entretanto, o limoneno não apresenta os mesmos efeitos do OELa e do citral, indicando a necessidade de um estudo mais detalhado a respeito desse constituinte. Os resultados revelam também que o efeito relaxante pode ser mediado por mecanismos intracelulares, os quais provavelmente envolvem a regulação da sensibilidade ao  $Ca^{+2}$  do sistema contrátil do músculo liso.

### Referências bibliográficas

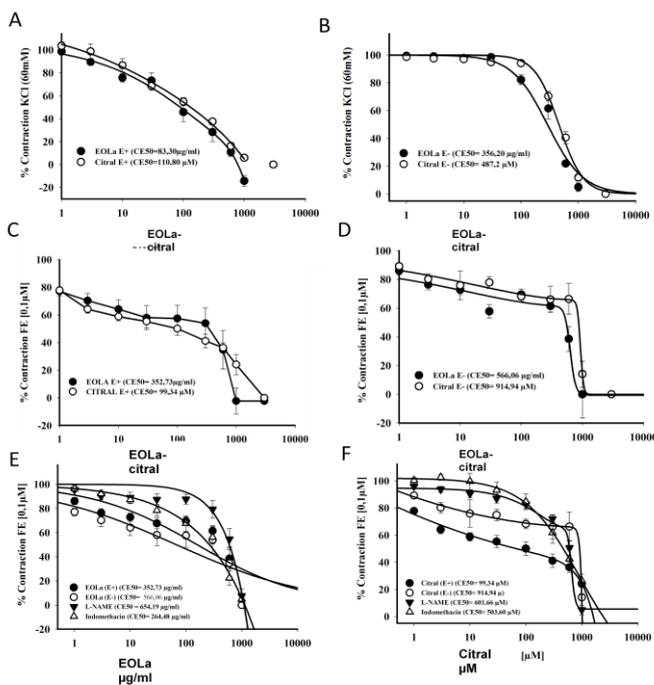
BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. O.; HEINZMANN, B. M.; MALLMANN, C. A. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), **Revista Química Nova**, Vol. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*, **Revista Odontol Brasileira Central**, vol. 20, n.52, p. 68-73, 2011.

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

LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; DUARTE, G.P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundam Clin Pharmacol** 17(3):323-30, 2003.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; JUCÁ, D. M.; COELHO-DE-SOUZA, L. N.; DA FROTA, P. T.; DA COSTA, A. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxation induced by the 66 essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 22, n. 2, p. 169-77, Apr 2008. ISSN 1472-8206.



**Figura 1: Efeito relaxante do OELa e do citral sobre contração mantida por potássio e fenilefrina em aorta isolada de rato.** (A) Efeito relaxante do OELa e citral sobre a contração mantida por KCl (60mM) em aorta isolada com endotélio preservado (E+) e (B) sem o endotélio preservado (E-); (C) Efeito relaxante do OELa e citral sobre contração mantida por FE [0,1µM] em aorta isolada de rato com endotélio preservado (E+) e (D) sem o endotélio preservado (E-). Efeito relaxante do OELa e citral, respectivamente com endotélio (E+) , sem endotélio (E-) e com endotélio pré-incubado com L-NAME; (E) Efeito relaxante do OELa em aorta isolada com endotélio preservado (E+) , sem endotélio preservado (E-) , com endotélio preservado e pré-incubado com L-NAME e Indometacina. (F) Efeito relaxante do Citral em aorta isolada com endotélio preservado (E+) , sem endotélio preservado (E-) , com

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

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

PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; CECCATTO, V. M.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, v. 16, n. 12, p. 1151-1155, 2009.

SENA FILHO, J. G.; MELO, J. G. S.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, A. M.; PSIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S.; Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 506-509, 2006.

SILVA LR; PEREIRA RCA; BRAGA TR; BEZERRA FC; RODRIGUES THS. 2012. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte Horticultura Brasileira, **Revista Hortic. bras.**, v. 30, n. 2, p. S6075-S6080. (Suplemento - CD Rom), 2012.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e biológico de Lippia alba (Miller) N. E. Brown ex Britt. & Wils. (Falsamelissa) Verbenaceae.** Florianópolis, 2001. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. 173 p. 2001.

TEIXEIRA, Andréa Bessa. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de Lippia alba (Mill.) NE Brown.** 2009. Tese de Doutorado.

VIANA, G. S.; DO VALE, T. G.; SILVA, C. M. e MATOS, F. J. Anticonvulsant activity of essential oil and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. – **Biol. Pharm. Bull.** Nov; v 23 (11), p. 1314-17, 2000..