

2.07.02 – Fisiologia de Órgãos e Sistemas.

ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO OLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWNE SEUS CONSTITUENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E L-LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATAS WISTAR.

Cicera Geórgia. Brito Milfont^{1*}, Luís Pereira de Moraes², Ana Karenina Sá Fernandes³, Andressa de Alencar Silva², Cicero Simão Lima Santos¹, Irwin Rose. Alencar de Menezes⁴, Maria Franciele Lima Gomes¹, Marta Regina. Kerntopf⁴, Murilo Rocha Pereira Junior¹, Roseli Barbosa⁵.

1. Estudante de IC da Universidade Regional do Cariri-URCA
2. Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular-URCA
3. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas-UECE
4. Pesquisador da Universidade Regional do Cariri-URCA
5. URCA - Departamento de Química Biológica / Orientador

Resumo:

A espécie brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertence à família Verbenaceae é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro. Popularmente chamada de erva cidreira, tem seu uso popular devido suas propriedades terapêuticas. O objetivo desse estudo é investigar a ação do óleo essencial de *Lippia alba* e seus constituintes sobre o útero isolado de rata. Para a pesquisa foram utilizadas ratas Wistar, com massa corpórea entre 180-250g. Após eutanásia, o útero foi removido, em seguida foi obtido tiras de 2 cm de comprimento, os quais foram mantidos em Tyrode modificado. Para avaliar o efeito do OELA, citral e l-limoneno, foram administradas concentrações cumulativas (OELA e citral 1-600µg/ml, l-limoneno 1-1200 µM). OELA, citral e l-limoneno relaxaram preparações de miométrio pré-contraídos por KCl (60mM), ocitocina (10⁻² UI/mL), 5-HT (10µM) e ACh (10µM). Diante disso observou-se que o OELA, o citral e o l-limoneno apresentaram efeito antiespasmódico em útero isolado de ratas.

Autorização legal: Aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00158/2015.2.

Palavras-chave: *Lippia alba*, útero e antiespasmódico

Apoio financeiro: CAPES

Introdução:

A espécie brasileira *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown pertencente à família Verbenaceae é muito abundante e cresce espontaneamente em todo território brasileiro. Ela é popularmente conhecida por erva cidreira,

erva-cidreira-brasileira, falsa-melissa, cidreira-carmelitana, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, sálvia, entre outras sinonímias [1,2]. Na medicina popular por apresentar diversas propriedades farmacológicas essa planta é utilizada como: sedativo, analgésico, anti-inflamatório, antipirético, desordens intestinais, doenças hepáticas, cólicas menstruais e antiespasmódico [3].

O citral constituinte majoritário do óleo essencial da *Lippia alba* (OELA), do ponto de vista molecular é formado pela junção de dois compostos isômeros, o trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, [1]. O citral possui algumas atividades farmacológicas comprovadas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, sedativa e expectorante, espasmódica e diurética [4,5,6,7]. O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno com fórmula molecular C₁₀H₁₆, é um monoterpene monocíclico [8]. O limoneno tem apresentado diversas e interessantes atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana [9,10], atividade antifúngica [11] e atividade antitumoral [12].

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

Metodologia:

A solução fisiológica utilizada de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) apresenta a seguinte composição em mM: 136,0 NaCl; 5,0 KCl; 0,98 MgCl₂; 0,36 NaH₂PO₄; 11,9 NaHCO₃; 2,0 CaCl₂ e 5,5 Glicose, mantida à temperatura de 37° C e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH (1M). O OELa, o citral e o l-limoneno foram preparados na forma de solução, diluídos diretamente em Tyrode e tween e os demais fármacos e seus estoques foram diluídos em água destilada.

Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 180-250 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri- URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de 23 ± 2° C, em ciclo claro/escuro de doze horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, tratados de acordo-Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil. Aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00158/2015.2.

Os animais foram tratados 24 h antes do início dos experimentos com dietilestilbestrol (1 mg/kg s.c.) para indução do estro. Decorrido este tempo, foram eutanasiadas em câmara de CO₂. Após a abertura da cavidade abdominal, foi feita a dissecação do útero e separação dos cornos medindo entre 1,5-2cm de comprimento. Estes foram mantidos em câmara de banho de órgãos isolado com capacidade para 10 mL da solução nutritiva Tyrode, mantidos sob contínua aeração, temperatura de 32°C e pH 7,4. As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas através de uma haste conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), e este a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), com entrada para uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, com software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA). Para estabilização da preparação, o tecido foi mantido em repouso por ± 1 hora sob tensão de 1g. Todos os protocolos iniciaram com duas contrações subsequentes, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60), de modo hipertônico nas tiras miometriais estudadas, e após atingir um platô, foi considerada a contração máxima da tira. Todos os experimentos foram realizados sempre com a existência de uma preparação controle e experimental, a qual foi submetida às mesmas situações e aos mesmos protocolos

experimentais.

Os dados são expressos como média E.P.M. Para análises estatísticas e produção dos gráficos utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Os resultados considerados estatisticamente significantes apresentaram probabilidade de hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Foram utilizados os testes t de Student e análise de variância (one ou two-way ANOVA) seguidas do teste de t de Bonferroni e método Holm-Sidak de comparações múltiplas, quando apropriado.

Resultados e Discussão:

OELa, citral e l-limoneno relaxaram de forma dependente de concentração preparações de miometrio pré-contraídos por KCl (60mM) (IC_{50} : 37,96 ± 2,41 µg/mL, 130,90 ± 2,82, 316,47 ± 3,12 µM, respectivamente) (Figura 1A), ou previamente contraídas por ocitocina (10⁻² UI/mL) (IC_{50} : 44,96 ± 4,26 µg/mL, 52,48 ± 2,32 e 186,83 ± 2,69 µM, respectivamente) (Figura 1B). ($P < 0,001$, ANOVA, método Holm-Sidak).

As concentrações de 600 µg/mL de OELa, citral e 1000 µM de l-limoneno, foram capazes de reverter as contrações evocadas por ACh em, 97,68 ± 0,74, 100,00 ± 6,12 e 79,26 ± 2,01% respectivamente, e 5-HT (10 µM), 96,20 ± 1,82, 99,47 ± 2,75 e 91,33 ± 2,75% respectivamente, sendo assim estatisticamente significante ($P < 0,001$, ANOVA, Holm-sidak) (Figura 1CeD). Ao final foram feitas lavagens consecutivas durante 30 minutos para posterior contrair com KCl mostrando reversão e viabilidade do tecido depois do experimento.

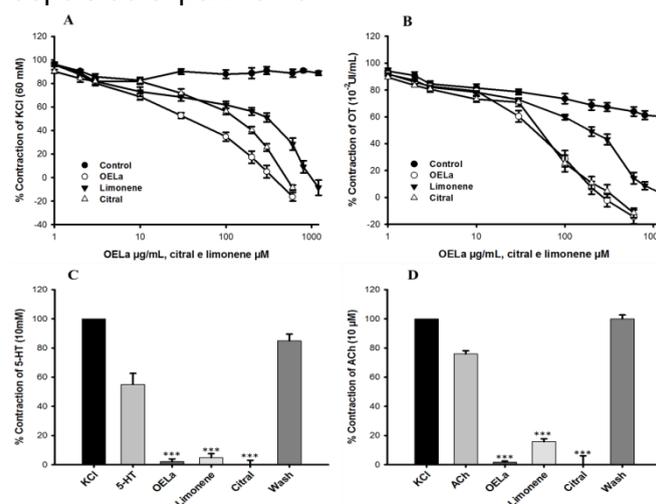


Figura 1: A: Gráfico representativo do relaxamento produzido pelo OELa, citral e l-limoneno em preparações de tecido miometrial de rato contraído com K⁺ (60 mM). B: Gráfico representativo do relaxamento produzido pelo OELa, citral e l-limoneno em preparações de tecido miometrial de rato contraído com Ocitocina 10⁻² UI/mL. C: Gráfico do efeito do OELa, citral, e l-limoneno sobre o componente contrátil da 5-HT. As concentrações

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

Discussão

Este estudo demonstra que o OELa e seus constituintes majoritários citral e l-limoneno bloqueia as contrações induzidas por potássio (eletromecânica), ocitocina serotonina e acetilcolina (farmacomecânica), com eficácia máxima, revertendo totalmente a contração do músculo liso uterino. Mostrando que tanto no acoplamento eletromecânico pela via do potássio, como no farmacomecânico pelas vias da ocitocina, serotonina e acetilcolina, os agentes em estudo apresentaram a mesma eficácia, ou seja, nos dois acoplamentos necessitaram da mesma concentração para reverter a contração. Porém analisando o parâmetro das IC₅₀, pode-se afirmar que há diferença na potência dos AE para os acoplamentos.

Corroborando com nossos resultados Sadraei (2003), verificou que nas duas vias farmacológicas serotoninérgica e colinérgica e a via do potássio, o óleo essencial de *Melissa officinalis* que assim como o OELa também possui o citral como constituinte principal, inibiram as contrações do íleo de rato induzidas por KCl 80 mM, ACh e 5-HT. Os efeitos relaxantes mediados pelo OELa, citral e l-limoneno foram reversíveis com a lavagem, demonstrando assim sua baixa toxicidade.

Conclusões:

Os resultados mostram que tanto o OELa, quanto seus constituintes citral e l-limoneno possuem efeito miorelaxante em tecido miométrial e que os mesmos possuem potencial para serem futuros agentes terapêuticos no tratamento de patologias que envolvem contrações uterinas indevidas, como no caso do desencadeamento do parto prematuro.

Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

[10] ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUZA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; da CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Brazilian journal of pharmacognosy**. v16, p 307-313, 2006.

[11] BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 52, p. 6932-6938, 2004.

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

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