

EFEITO ANTIESPASMÓDICO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *LIPPIA SIDOIDES CHAM.* E SEUS CONSTITUÍNTES, TIMOL, PARACIMENO E BETA- CARIOFILENO, SOBRE O MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE RATOS.

Taylena Maria do Nascimento Garcia Teófilo¹

José Henrique Leal Cardoso²

INTRODUÇÃO

O estudo das plantas aromáticas do Nordeste resultou na descoberta de vários óleos essenciais (OEs) obtidos de plantas dotados de propriedades aromatizantes, farmacológicas e anti-sépticas dentre outras. (CRAVEIRO et al., 1981). Dentre essas plantas, destacam-se as da família *Verbenaceae* que compreende cerca de 175 gêneros e 2.800 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (BARROSO, 1991).

Nessa família, destaca-se o gênero *Lippia*, que apresenta muitas espécies de interesse medicinal e reúne cerca de 200 espécies arbustivas com distribuição pantropical e cerca de 150 espécies que estão distribuídas por campos rupestres e cerrados no Brasil (SALIMENA, 2002). As plantas desse gênero têm sido objeto de diversos estudos no Brasil e no mundo, pois muitas delas são bastante utilizadas na medicina popular com diversas finalidades, o que despertou o interesse da comunidade científica em elucidar seus efeitos.

É encontrada no sertão nordestino, principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Grande parte das plantas do gênero *Lippia* são aromáticas, destacando-se a *L. sidoides* por seu uso medicinal popular, principalmente como antisséptico (LACOSTE et al., 1996; LEMOS et al., 1990). Sua folhagem é geralmente utilizada para tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo. A infusão tem sido usada na medicina popular em inalações, rinite alérgica e no tratamento das infecções vaginais, da boca e da garganta (MATOS; OLIVEIRA, 1998). Os resultados obtidos no estudo de Silva et al. (2010) mostram que o extrato da *Lippia sidoides* possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*.

Por apresentar importantes propriedades, este vegetal faz parte do grupo de plantas selecionadas pelo Governo do estado, como fitoterápico e é cultivado em hortos de plantas medicinais (COSTA et al., 2002). A administração aguda do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs) acima de 3 g/kg por via oral, em camundongos, não apresentou toxicidade. A administração oral por 30 dias do OELs (117.95 mg/kg/dia) em ratos, não induziu nenhuma alteração significativa histopatologicamente, hematologicamente ou bioquimicamente (FONTENELLE, 2008). Segundo Veras et al. (2012), o OELs e seu constituinte majoritário, timol, influenciam a atividade de aminoglicósídeos e podem ser utilizados como adjuvantes na terapia antibiótica contra bactérias patogênicas do trato respiratório.

Adicionalmente, Lobo et al. (2011) demonstraram que o enxaguatório e o gel bucal a base de OELs apresentaram-se efetivos contra o patógeno oral *Streptococcus mutans* em estudo in vivo com crianças. Adicionalmente, Mota et al. (2012) demonstrou atividade do OELs contra *Plasmodium falciparum* in vitro e in vivo (via gavagem) em ratos infectados

¹ Docente da Universidade Estadual do Ceará/lealcard@gmail.com

² Docente da Prefeitura Municipal de Fortaleza/tayceara@hotmail.com

pelo parasita. OELs e timol apresentaram efeito antiinflamatório tópico em edema de orelha de rato no estudo de Veras et al (2012) e foram efetivos contra nematódeo intestinal *Haemonchus contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

Dos diversos constituintes do OELs, três se destacam por sua abundância no óleo, são eles em ordem decrescente de predominância, Timol, para-cimeno e beta- cariofileno. Centenas de milhões de pessoas sofrem todos os dias de doenças crônicas respiratórias. De acordo com a última estimativa da OMS, em 2017, 210 milhões de pessoas têm Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica enquanto milhões têm rinites alérgicas, entre outras doenças respiratórias crônicas freqüentes não diagnosticadas (OMS, 2018).

Um exemplo de tais doenças é a asma que, em sua fisiopatologia, recebe a contribuição de alguns fatores para o estabelecimento completo da doença. Dentre esses fatores, as contribuições importantes da contração e inflamação do músculo liso respiratório já foram bem estabelecidas. (PASCUAL; PETERS, 2009; WEGMANN; HAUBER, 2010). Foram avaliadas as ações farmacológicas do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs) e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, na contratilidade da musculatura lisa traqueal de ratos.

O OE extraído das folhas é fluido, incolor ou amarelado, menos denso que a água, dotado de odor forte de timol e sabor fortemente picante (CRAVEIRO et al., 1981). Em geral, seu OE é rico em timol e carvacrol e, segundo Matos (1996), apresentou propriedades bactericida e fungicida, enquanto o hidrolato revelou atividade moluscicida e larvicida. A administração aguda do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs) acima de 3 g/kg por via oral, em camundongos, não apresentou toxicidade. A administração oral por 30 dias do OELs (117.95 mg/kg/dia) em ratos, não induziu nenhuma alteração significativa histopatologicamente, hematologicamente ou bioquimicamente (FONTENELLE , 2008).

Segundo Veras et al. (2012b), o OELs e seu constiuinte majoritário, timol, influenciam a atividade de aminoglicósídeos e podem ser utilizados como adjuvantes na terapia antibiótica contra bactérias patogênicas do trato respiratório. Adicionalmente, Lobo et al.(2011) demonstraram que o enxaguatório e o gel bucal a base de OELs apresentaram-se efetivos contra o patógeno oral *Streptococcus mutans* em estudo in vivo com crianças. Fontenelle et al.(2007) caracterizou efeito inibitório do OELs sobre o crescimento dos fungos das espécies *Microsporium canis*, *Microsporium pachydermatis* e *Candida spp*.

Estudos recentes também relataram atividade larvicida do OELs sobre *Aedes aegypti*, sendo esse efeito atribuído ao seu principal componente, timol. (CARVALHO et al., 2003). Lima et al. (2011) demonstrou que o OELs também é capaz de matar o *Tenebrio molitor*, inseto que infesta grãos armazenados, apresentando nesse estudo DL50 de 8,04 µL/L. Além disso, o OELs apresentou atividade inibitória dose-dependente sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA, 2009) e atividade do contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonenses* (MEDEIROS, 2011). Esses efeitos associados a sua baixa toxicidade em células de mamíferos, caracterizam o OELs como um promissor agente para o tratamento de leishmaniose cutânea. Adicionalmente, Mota et al. (2012) demonstrou atividade do OELs contra *Plasmodium falciparum* in vitro e in vivo (via gavagem) em ratos infectados pelo parasita.

OELs e timol apresentaram efeito antiinflamatório tópico em edema de orelha de rato no estudo de Veras et al (2012) e foram efetivos contra nematódeo intestinal *Haemonchus contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007). Dos diversos constituintes do OELs,

três se destacam por sua abundância no óleo, são eles em ordem decrescente de predominância, Timol, para-cimeno e beta- cariofileno.

O músculo liso presente na traqueia é o principal efetor no controle do calibre dessa via e por isso, torna-se crucial a presença de um estado de equilíbrio entre o estímulo de contração e relaxamento (HALL, 2000).

A terapia clínica sintomática de estados fisiopatológicos tais como asma, alergia e inflamação, é realizada objetivando a broncodilatação, uma vez que, nas fases aguda e crônica, tais estados caracterizam-se por uma broncoconstrição excessiva. (AY et al., 2006). Devido a alta incidência de afecções respiratórias relacionadas ao espasmo da musculatura lisa da via aérea no Nordeste, como a asma (SANTO, 2006), e aos relatos sobre os efeitos de seu constituinte majoritário sobre os músculos vascular (PEIXOTO-NEVES, 2010), liso de estômago (BEER et al., 2007) torna-se de fundamental importância o estudo dos efeitos do OELs e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno no músculo liso traqueal.

METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)

Anéis traqueais de ratos Wistar machos (200-300 g) foram montados em câmaras de perfusão para órgão isolado contendo solução Krebs-Henseleit (KH) modificada a 37°C, pH 7,4, gaseificadas com solução carbogênica e postos a equilibrar por uma hora. Mudanças na tensão foram medidas por um transdutor de força conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado. A viabilidade do tecido foi determinada pela resposta contrátil a 60 mM de potássio (K60).

Sete séries experimentais foram realizadas, a saber: protocolo de tônus basal, reversão da contração induzida pelo potássio, inibição da contração induzida pela acetilcolina, reversão da contração induzida pelo cloreto de bário 30µM, reversão da contração induzida pelo carbacol (CCh) 50 µM na presença de nifedipina, reversão da contração induzida pelo éster forbol (DBP) (1µM), inibição do componente contrátil de ACh 60 µM independente do cálcio extracelular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apenas timol foi capaz de alterar o tônus basal do musculo liso, amplificando-o em $0,061 \pm 0,031$ g. Todos os 4 agentes em estudo(AE) OELs, timol, para- cimeno e beta- cariofileno relaxaram totalmente e de forma concentração- dependente a contração induzida e sustentada por KCl (80 mM) (IC_{50} : $40,52 \pm 4,42$, $27,52 \pm 1,21$, $159,43 \pm 8,65$ e $252,87 \pm 9,63$ µg/mL). OELs, timol e para-cimeno relaxaram a contração induzida por ACh (10 µM) em cerca de, respectivamente, 100%, 95% e 98% (IC_{50} : $100,38 \pm 3,96$, $59,23 \pm 3,74$, $1762,51 \pm 293,54$ µg/mL) ; beta-cariofileno, porém, apenas apresentou efeito inibitório parcial, inibindo cerca de 28 % (IC_{50} : $2190,49 \pm 247,68$ µg/mL). Além disso, OELs e timol relaxaram a contração induzida e sustentada por BaCl₂ para valores além da linha de base que foram, respectivamente, - 10, $58 \pm 2,70$ e - 13, $78 \pm 2,19$ % (IC_{50} : $90,55 \pm 5,76$, $40,03 \pm 2,55$ µg/mL). O para-cimeno relaxou cerca de 94% (IC_{50} : $130,36 \pm 18,43$ µg / mL) dessa contração, e o beta- cariofileno, 85% (IC_{50} : $1016,00 \pm 355,45$ µg/mL) . OELs, timol e para-cimeno, mas não beta-cariofileno, relaxaram 100 % da contração induzida por CCh na presença de nifedipina (IC_{50} : $76,40 \pm 5,96$, $74,89 \pm 5,40$ e $80,41 \pm 10,34$ µg/mL) e, além disso, relaxaram totalmente a contração do DBP 1 µM, apresentando nessa série experimental efeitos máximos, respectivamente, sob as concentrações de 300, 3000 e 5000 µg/mL. Em

meio isento de Ca^{2+} contendo EGTA (0,2 mM), a concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de OELs e de timol promoveu inibição de, respectivamente 83% e 82 % da contração da ACh 60 μM ; para-cimeno e beta-cariofileno na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$, relaxaram, respectivamente, 86 % e 58 % dessa contração.

Este estudo demonstrou que os OELs bloqueia as contrações induzidas por agentes contraturantes sobre o músculo liso traqueal com máxima eficácia farmacológica. Os efeitos do OELs poderiam ser largamente atribuídos ao seu principal constituinte, o timol, que é 66,7% da massa do óleo. No que diz respeito aos seus constituintes que correspondem ao segundo e terceiro mais abundantes nos OELs, o para-cimeno e o beta-cariofileno, é pouco provável que tenham contribuído para o efeito antiespasmódico dos OELs. Apesar de esses constituintes terem um efeito semelhante ao dos OELs, o para-cimeno e o beta-cariofileno, correspondem apenas a 15,01% e 4,01% da massa desse óleo essencial.

Os agentes em estudo foram mais potentes e efetivos sobre o acoplamento eletromecânico, em comparação ao farmacomecânico, quando foram feitas as comparações apropriadas entre as IC_{50} em ambas as séries experimentais ($p < 0,05$, teste t student). Os agentes em estudo atuam inibindo a liberação de cálcio do retículo. Esse achado de timol pode ser confirmado pelo trabalho de Peixoto-Neves (2010), que também relatou a atividade bloqueadora do timol sobre o componente contrátil da ACh, que não depende do cálcio extracelular.

Os EA foram capazes de reverter a contração induzida e mantida por BaCl_2 30 μM . O timol foi tão eficaz quanto os OELs ($p > 0,05$, ANOVA, método de Bonferroni), e ambos apresentaram maior eficácia que para-cimeno e beta-cariofileno ($p < 0,05$, ANOVA, método de Bonferroni). Pode-se concluir que os agentes em estudo apresentam o efeito de bloqueio dos VOCCs e que os três principais componentes dos OELs participam dessa ação.

Em relação ao acoplamento farmacomecânico, os efeitos dos agentes em estudo sobre a contração induzida e mantida pelo carbacol foram investigados. Tal contração ocorreu pela estimulação dos ROCCs. OELs, timol e para-cimeno apresentaram a mesma potência farmacológica ($p > 0,05$, ANOVA, método de Bonferroni). O beta-cariofileno, por sua vez, não induziu efeito sobre esse mecanismo. Com base nisso, pode-se sugerir que o efeito do OELs sobre os ROCCs poderia ser atribuído aos seus componentes mais abundantes.

Sugere-se, então, que a atividade antiespasmódica deste EA possa ser mediada pela diminuição da entrada de cálcio através de ROCCs e, além disso, poderia haver uma via de sinalização intracelular comum no mecanismo das ações de OELs, timol e para-cimeno. Todos os EAs, com exceção do beta-cariofileno, apresentaram efeito relaxante sobre a contração induzida pelo DBF, ativador específico da (proteína quinase C)PKC (YANAGITA et al., 1999). OELs, timol e para-cimeno apresentaram potências distintas e eficácias semelhantes ($p > 0,05$, ANOVA, método de Bonferroni). Este resultado enfatiza as descobertas anteriores que sugerem que os OELs são um inibidor de VOCCs, provavelmente graças ao timol, sem excluir a contração via do músculo liso traqueal mediado pela PKC. Pode-se sugerir que nesse mesmo mecanismo também existe uma parte do para-cimeno.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os agentes em estudo são mais potentes e mais efetivos sobre o acoplamento eletromecânico do que sobre o acoplamento farmacomecânico e têm efeito inibitório sobre a

contração via que envolve os VOCCs, e o timol foi o mais potente. OELs, timol e para-cimeno provavelmente exercem efeito inibidor sobre os ROCCs, exceto para beta-cariofileno. OELs, timol e para-cimeno (beta-cariofileno em menor proporção) promoveram efeito inibitório sobre o componente contrátil da ACh, que não depende do cálcio extracelular. O mecanismo de ação de EA, com exceção do beta-cariofileno, provavelmente pode envolver a ativação da via da PKC. Os resultados obtidos em conjunto permitem sugerir que o efeito dos OELs é devido ao seu principal componente, o timol.

Palavras-chave: OELs, Músculo liso e Traqueia.

REFERÊNCIAS

AY, B.; IYANOYE, A.; SIECK, G.C.; PRAKASH, Y.S.; PABELICK, C.M. Cyclic nucleotide regulation of store-operated Ca²⁺ influx in airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology*, v. 290 p. 278- 283, 2006. BARROSO, G.M. Sistemática de angiospermas do Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1991.

BEER, A.M.; LUKANOV, J.; SAGORCHEV, P. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 14(1):65-9, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148: 288–294, 2007.

COSTA, S M O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. *Rev. bras. farmacogn.*, v.12, p. 66-67, 2002.

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, CE: Edições UFC, 1981.

FONTENELLE, R O S. EFEITO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia sidoides* Cham., *Croton argyrophylloides* Muell., *Croton zehntneri* Pax et Hoffm., *Croton nepetaefolius* Baill. E DE SEUS PRINCIPAIS CONSTITUINTES CONTRA DERMATÓFITOS E *Candida* spp. ISOLADOS DE CÃES. 2008. 150 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Programa De Pós-graduação Em Ciências Veterinárias, Uece, Fortaleza, 2008.

HALL, I. P. Second messengers, íon channels and pharmacology of airway smooth muscle. *Eur Respir J*, v. 15, p. 1120-1127, 2000.

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. *Ann. Pharm. Fr.* 54 228–230, 1996.

LEMOS TLG, MATOS FJA, ALENCAR JW, CRAVEIRO AA, Antimicrobial activity of essential oils of brazilian plants. *Phytoterapy Research.*; v. 4: p. 82-4, 1990.

LOBO PL, FONTELES CS, DE CARVALHO CB, DO NASCIMENTO DF, DA CRUZ FONSECA SG, JAMACARU FV, DE MORAES ME. Dose-response evaluation of a novel essential oil against Mutans streptococci in vivo. *Phytomedicine*, v.18, p.551- 556, 2011.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham.–Farmacognosia, química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 79, p. 84-87, 1998.

MEDEIROS MD, DA SILVA AC, CITÓ AM, BORGES AR, DE LIMA SG, LOPES JA, FIGUEIREDO RC. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int.* v.60, p. 237-41, 2011.

MOTA ML, LOBO LT, GALBERTO DA COSTA JM, COSTA LS, ROCHA HA, ROCHA E SILVA LF, POHLIT AM, DE ANDRADE NETO VF. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil, *Planta Med.* v 78,p. 658-64, 2012.

OLIVEIRA, Valéria C.S. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. *Parasitology Research*, Teresina (pi), v. 104, n. 5, p.1053-1059, 2009.

PASCUAL, R.M.; PETERS, S.P. The irreversible component of persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 124, p. 883-890, 2009.

PEIXOTO-NEVES, D., SILVA-ALVES, K., GOMES, M., LIMA, F., LAHLOU, S., MAGALHÃES, P., CECCATTO, V., COELHO-DE-SOUZA, A. AND LEAL- CARDOSO, J. , Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 24: 341– 350, 2010.

SALIMENA, F.R.G. Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). *Darwiniana* ,v. 40,p.121-125, 2002.

SANTO, A.H. Mortalidade relacionada à asma, Brasil, 2000: um estudo usando causas múltiplas de morte. *Cad. Saúde Pública*. v. 22, n.1, 2006.

SILVA, V.A. et al . Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. *Revista brasileira de plantas medicinais*, Botucatu, v. 12, n. 4,dez. 2010.

VERAS HN, RODRIGUES FF, COLARES AV, MENEZES IR, COUTINHO HD, BOTELHO MA, COSTA JG. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia*.v.83,p 508-12, 2012 b.

WEGMANN, M.; HAUBER, H.P. Experimental approaches towards allergic asthma therapy- murine asthma models. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, v. 4 p. 37-53, 2010.

YANAGITA, T.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, R.; TAKAMI, Y.; YOKOO, H.; YUHI,T.; NAKAYAMA, T.; WADA, A. Protein kinase C and the opposite regulation of sodium channel alpha- and beta1-subunit mRNA levels in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem*. 73(4):1749-57, 1999.