

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL RELAXANTE DO EUGENOL EM ARTÉRIAS UMBILICAIS HUMANAS

Cícera Georgia Brito Milfont¹, Débora de Menezes Dantas², Paulo Ricardo Batista³, Renata Evaristo Rodrigues da Silva⁴, Gabriela Lucena Calixto⁵, Marta Regina Kentopf⁶, Roseli Barbosa⁷

O eugenol é um composto fenólico utilizado na indústria alimentícia e cosmética, e é bastante descrito na literatura por possuir diversas atividades biológicas. No entanto, seu potencial vasorelaxante em tecido humano não fora ainda investigado. Desse modo, esse estudo tem por objetivo determinar o potencial relaxante do eugenol em Artéria Umbilical Humana (AUH). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética (CEP: nº 3.832.881); as AUHs foram isoladas e montadas em banho de órgãos (10 mL de solução nutritiva de *Krebs Henseleit*, à 37 °C; mistura carbogênica). Como resultado, o eugenol (30-1200 µM) foi capaz de promover o bloqueio total das contrações induzidas por KCl (60 mM) e 5-HT (10 µM) apresentando concentrações estatisticamente significativas: 600 µM e 400 µM, e valores de EC₅₀: 986,4 ± 7,9 e 229,9 ± 8,4 µM, respectivamente. O eugenol (1200 µM e 1400 µM) também reduziu a contração provocada pelo BaCl₂ (0,1-30 mM), demonstrando envolvimento do bloqueio dos canais de Cálcio dependentes de voltagem (VOCCs) no seu efeito. Os dados apresentados demonstram novas possibilidades na terapêutica de disfunções vasculares da AUH, com uso de constituintes isolados de plantas.

Palavras-chave: eugenol. relaxante. artéria umbilical humana

1. Introdução

Complicações gestacionais como a pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, prematuridade e insuficiência vascular placentária são intercorrências que estão diretamente relacionadas a alterações circulatórias

1 Universidade Regional do Cariri, email: georgia.milfont@urca.br

2 Universidade Regional do Cariri, email: debora.menezes@urca.br

3 Universidade Regional do Cariri, email: paulo.ricardo@urca.br

4 Centro Universitário Leão Sampaio, email: renataevaristo@leaosampaio.edu.br

5 Universidade Regional do Cariri, email: gabriela.lucena@urca.br

6 Universidade Regional do Cariri, email: roseli.barbosa@urca.br

7 Universidade Regional do Cariri, email: martaluiz@yahoo.com.br

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: “Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação”

que acometem a conexão fetoplacentária, desencadeando alterações no fluxo do reabastecimento fetal (TRUNDIGER et al., 1985; PAPAGEORGHIU ET AL., 2002; VILLAS-BÔAS et al., 2008). Cerca de 2 a 8 % de todas as gestações são complicadas pela pré-eclâmpsia (FERRAZ; BORDIGNON, 2012). Sendo esta, a síndrome responsável pela maior taxa de mortalidade materna quando se apresenta em suas formas graves, como eclâmpsia e síndrome HELLP (MIRANDA, 2019). Tendo em vista os elevados índices de mortalidade em decorrência de problemas circulatórios durante a gestação, faz-se necessário a busca de substâncias bioativas que venham promover uma melhora no quadro dessas complicações, nesse sentido os fitofármacos vem sendo bastante estudados por apresentarem elevado potencial farmacológico em experimentações pré-clínicas.

Diante disso, o eugenol é um composto fenólico da classe dos fenilpropanóides (BRUNETON, 1995; TISSERAND; BALACS, 1995), derivado do metabolismo secundário de algumas plantas medicinais, sendo que a fonte mais utilizada de acordo com os estudos etnobotânicos é a *Eugenia caryophyllata*, mais conhecida como: cravo, onde o eugenol se mostra presente no óleo que é retirado das folhas secas (LAZARO-FILHO, 2000). 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 $[Ca^{2+}]$ e em concentrações em torno de 8 mM promove liberação de 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). No entanto cabe destacar que não existem estudos com essa substância envolvendo vasculatura humana.

Nesta perspectiva e devido a maior parte dos estudos que visam a descobertas de novas moléculas com propriedades relaxantes ocorrerem em modelos animais (INGELFINGER, 2013), destaca-se a utilização de vasos umbilicais humanos (VUH) na realização de testes pré-clínicos como uma metodologia vascular experimental alternativa e acessível. Pois sabe-se que o cordão umbilical é considerado resíduo biológico, sendo descartado logo após o parto, muito embora, o mesmo seja uma abundante fonte de material biológico (DANTAS et al., 2019). Ademais, estudos como esse contribuem nos avanços com pesquisas clínicas de substâncias vasoativas e auxilia na compreensão dos mecanismos da fisiologia vascular.

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

2. Objetivo

Determinar o potencial relaxante do eugenol em artérias isoladas de cordão umbilical humano, através das vias eletromecânica e fármacomecânica utilizando a metodologia do banho de órgãos.

3. Metodologia

Inicialmente o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital/Maternidade participante da pesquisa e o Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Regional do Cariri-URCA com o seguinte protocolo, nº 3. 832. 881. Foram convidadas a participar do estudo parturientes com as seguintes características: faixa etária acima de dezoito e abaixo de quarenta anos; submetidas ao parto cesariano ou normal, sem relato de complicações médicas e com tempo gestacional de trinta e sete e quarenta e uma semanas. Mediante verificação dos critérios de inclusão as coletas do cordão umbilical humano foram realizadas após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela mãe do bebê no ambiente hospitalar. Em seguida, o cordão foi transportado para o laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis (LFCE) da URCA em solução de Krebs *Henseleit* modificado para transporte, com refrigeração de 4 a 8 °C.

Chegando ao laboratório as artérias foram isoladas do cordão e seccionadas em anéis de 3-5 mm de comprimento para montagem no aparelho banho de órgãos onde foram mantidas em solução de Krebs *Henseleit* sob temperatura de 37 °C, continuamente gaseificada com uma mistura carbogênica 95% de O₂ e 5% CO₂, com um pH relativamente constante de 7,4. Para realização dos protocolos experimentais os tecidos passaram por um período de estabilização e uma contração com uma solução de Krebs *Henseleit* modificada com KCl (60 mM) foi evocada com a finalidade de certificar a viabilidade do tecido.

No protocolo da via eletromecânica, induziu-se uma contração com a solução de Krebs *Henseleit* modificada com KCl 60 mM, no platô da contração, adicionou-se concentrações crescentes e cumulativas de eugenol (100-1400 µM) para obtenção de uma curva concentração-resposta. Na via fármacomecânica, induziu-se uma contração com a 5-HT (10 µM) seguida de concentrações crescentes e cumulativas do eugenol (30-1200 µM). Nesse estudo também foi avaliado a influência dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCCs) onde a contração foi provocada pelo BaCl₂ (0,1-30 mM) em tecidos pré-incubados com o eugenol (1200 µM e 1400 µM). As respostas foram expressas como porcentagem de relaxamento das contrações promovidas pelos agentes contracturantes.

4. Resultados

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: "Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação"

Diante das contrações induzidas por KCl (60 mM) foi possível verificar que o eugenol foi capaz de relaxar 100% de forma dependente da concentração, quando comparadas com o controle. Observou-se que o efeito do eugenol ocorreu de forma estatisticamente significativa a partir da concentração de 600 μM ($p < 0,05$, ANOVA, método Holm-Sidak). Com o valor de EC_{50} de 986,4 \pm 7,9 μM . Ao final foram feitas lavagens consecutivas durante 30 minutos para posteriormente contrair com KCl mostrando reversão e viabilidade do tecido após realização do experimento. Um estudo publicado por DAMIANI et al., 2003, demonstrou que o eugenol foi capaz de inibir contrações induzidas por KCl em anéis aórticos de ratos, tal como foi relatado pelo presente estudo, corroborando com esses dados.

Se sabe que a presença de K^+ no meio extracelular desencadeia na célula lisa vascular um gatilho para a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e consequente mecanismo de alteração do potencial transmembrana mediado por acoplamento eletromecânico (BOLTON et al., 1999). Desse modo pode-se inferir com base nos dados obtidos, que o eugenol foi capaz de relaxar a musculatura lisa de AUH via acoplamento eletromecânico através de uma eventual inibição dos canais de cálcio dependentes da voltagem (VOCCs). Uma vez que, o efeito contrátil induzido por KCl é atribuído principalmente ao influxo de cálcio extracelular por meio da depolarização da membrana relacionada aos canais de cálcio dependentes da voltagem (WYLAM et al, 1993; MARIN, 1990).

Nos tecidos onde a contração da musculatura lisa de artéria umbilical foi evocada por 5-HT (10 μM), foram administradas concentrações crescentes e cumulativas do eugenol (30-1200 μM). Observou-se que essa substância também promoveu um relaxamento de 100% do vaso, com efeito estatisticamente significativo a partir da concentração de 400 μM apresentando um valor de EC_{50} de 229,9 \pm 8,4 μM . Nesse protocolo o eugenol também foi capaz de relaxar a musculatura lisa de AUH via acoplamento farmacomecânico mediante a utilização da Serotonina (5-HT) como agente contracturante. Nesse protocolo a potência farmacológica do eugenol foi maior cuja EC_{50} foi de 229,9 μM do que comparado com seu efeito na presença do KCl cuja EC_{50} foi de 986,4 μM e a concentração que seu efeito passou a ser significativo também foi inferior (400 μM) do que o eugenol na presença do KCl (600 μM).

Cabe destacar que, a 5-HT é um agente vasoconstritor com alta potência em AUH, bem como o mais utilizado para evocar contrações em estudos sobre os mecanismos vasoativos. Essa potência elevada é atribuída a uma alta sensibilidade para 5-HT, tendo sido sugerido que a sua liberação exacerbada, possa reduzir ou interromper o fornecimento de sangue, levando a um retardamento do crescimento do feto ou mesmo ao aborto (KARLSSON et al., 1999). Além disso, o aumento da sua liberação está associada a pré-eclâmpsia (SANTOS-SILVA et al., 2009). Também verificou-se a influência dos VOCCs sob o eugenol, onde o mesmo foi pré-incubado a (1200 μM e 1400 μM) e utilizou-se a nifedipina (10 μM) como controle positivo para posterior administração do

VI SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA XXIV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA URCA

13 a 17 de Dezembro de 2021

Tema: “Centenário de Paulo Freire: contribuição da divulgação científica e tecnológica em defesa da vida, da cidadania e da educação”

BaCl₂ (0,1-30 mM). Com isso, verificou-se que o eugenol comportou-se de maneira semelhante a nifedipina, diminuindo as contrações promovidas pelo BaCl₂, sugerindo que o efeito do eugenol está atribuído ao bloqueio dos VOCCs.

5. Conclusão

O trabalho exposto demonstrou que o eugenol exerceu um efeito relaxante, sobre as contrações induzida por KCl (60 mM) e por 5-HT (10 µM) na musculatura lisa de artérias umbilicais humanas e reduziu as contrações promovidas pelo BaCl₂, sugerindo que o efeito do eugenol está atribuído ao bloqueio dos VOCCs. Desse modo, tais resultados demonstram novas possibilidades na terapêutica de disfunções vasculares da AUH como a pré-eclâmpsia, com uso de constituintes isolados de plantas, como o eugenol.

6. Agradecimentos

Ao programa de Química Biológica da Universidade Regional do Cariri-URCA, FUNCAP, CNPq, LFCE e Parturientes da maternidade

7. Referências

BRUNETON, J. Terpenoids and steroids. In: Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants, ed. Bruneton, J., pp. 385-621. Paris, France, Technique & Documentation – Lavoisier. 1995.

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.

FERRAZ, Lucimare; BORDIGNON, Maiara. Mortalidade materna no Brasil: uma realidade que precisa melhorar. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. 527-527, 2012.

LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SOUZA, I. T.; FIGUEIREDO, I. M. Effects of eugenol on excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 327: 1, 113-124, 1994.

MIRANDA, Freddy Franklin Sposito et al. PRÉ-ECLÂMPسيا E MORTALIDADE MATERNA. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 1, 2019.