



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

ERIANE DANTAS BEZERRA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *in vitro* DE *Lippia
alnifolia* Schauer (Verbenaceae) EM TRAQUEIA DE COBAIA**

Petrolina – PE

2016

ERIANE DANTAS BEZERRA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *in vitro* DE *Lippia
alnifolia* Schauer (Verbenaceae) EM TRAQUEIA DE COBAIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido, da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, Campus Petrolina-PE, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido. Área de concentração: Fisiologia e Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Petrolina – PE

2016

	Bezerra, Eriane
* Cutter	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA <i>in vitro</i> DE <i>Lippia alnifolia</i> Schauer (Verbenaceae) EM TRAQUEIA DE COBAIA / Eriane Dantas Bezerra. – Petrolina, 20016. 15 f. ; 79f. ; il. ; 29 cm.
	Trabalho de Conclusão de Mestrado (Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semi-árido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina, Petrolina-PE, 2016.
	Orientador: Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima.
	1. <i>Lippia alnifolia</i> . 2. Plantas Medicinais. 3. Relaxamento. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
	* CDD

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF
Bibliotecário:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eriane Dantas Bezerra

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *in vitro* DE *Lippia alnifolia* Schauer (Verbenaceae) EM TRAQUEIA DE COBAIA

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais
do Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do
São Francisco.

Aprovado em: 29/03/2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima
Orientador (UNIVASF)

Prof^a. Dr^a. Gabriela Lemos de Azevedo Maia
Universidade Federal do Vale do São Francisco (Membro externo)

Prof. Dr. Luciano Augusto de Araújo Ribeiro
Universidade Federal do Vale do São Francisco

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, Fransquinha Dantas, pelo incentivo a continuação dos meus estudos, pelo apoio incondicional em todos os momentos, acreditando em mim e conduzindo-me com muito amor ao melhor caminho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amar e me proteger em todos os momentos, pelas infinitas bênçãos na minha vida, como a oportunidade de me conceder realizar esse trabalho com saúde e força.

Aos meus queridos pais João Edilânio e Fransquinha, heróis que sempre batalharam para proporcionar o melhor para a família, por terem norteado minha formação ética e moral, pelos conselhos e palavras de encorajamento, nem sempre caminhos seguidos, o que me causa arrependimento, pelo exemplo de pessoas que são para mim. Enfim, pelo amor e paciência.

Ao meu orientador Julianeli Tolentino, pelo esforço e dedicação para orientar seus alunos em meio a tantas atribuições, fazendo-a sempre com muito carinho e sabedoria. Pela grandiosidade de sua pessoa, sempre aberto a ouvir e compreender o outro sem pré-julgamentos. Obrigada por ter me aceito como orientanda.

Ao meu co-orientador Fabrício Silva, por ter me adotado como orientanda no momento mais difícil, sem o qual não teria chegado até aqui. Por sua disponibilidade, amparo técnico e prontidão em ajudar, auxiliando-me no que estava ao seu alcance, desde a escolha e o fornecimento do material para pesquisa, até as análises dos dados. MUITÍSSIMO obrigada.

Ao prof. Luciano Ribeiro por ensinar que devemos correr atrás de nossas conquistas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido (PGRNSA) e a todos os professores que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte e apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), instituição maior, pela oportunidade e por promover o desenvolvimento técnico-científico.

Aos meus colegas de laboratório pelos ensinamentos e troca de experiências, em especial a Pablo Dantas, pela amizade, assistência, compreensão, apoio e palavras de conforto e repreensão nos momentos certos, pela disposição e generosa contribuição neste trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta por mais uma conquista, fazendo parte desse caminho de crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada.

RESUMO

Em todas as partes do mundo as plantas medicinais são amplamente empregadas pela população para o tratamento de uma infinidade de doenças. Muitas dessas plantas costumam ser usadas como opção terapêutica nas patologias associadas ao sistema respiratório, visto que o acometimento dessas enfermidades causa grande impacto social, tornando-se, então, de interesse clínico e constituindo alvo de permanente procura por novas entidades terapêuticas. O gênero *Lippia*, da família Verbenaceae, é um dos mais estudados por apresentar espécies com grande potencial terapêutico, ricas em ácidos fenólicos, monoterpenos, sesquiterpenos e flavonóides, sendo tradicionalmente utilizadas para o tratamento de distúrbios respiratórios, gastrointestinais e infecções em geral. Apresentam espécies na sua maioria aromáticas, com um sólido perfil de composição química, atividades farmacológicas e uso popular. Pertencente a esse gênero temos a espécie *Lippia alnifolia* Schauer, uma planta encontrada na caatinga, de distribuição endêmica e usada na medicina popular como antimicrobiana, despertando interesse devido ausência de maiores informações na literatura. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do óleo de *Lippia alnifolia* (LAO) sobre a traqueia de cobaia e seu possível mecanismo de ação farmacológico. Para tanto, utilizou-se o óleo essencial obtido das folhas da planta em concentrações crescentes (1 a 729 µg/mL) sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contráídos por agonistas, sendo analisado posteriormente os registros das contrações isotônicas dos segmentos do órgão isolado para obtenção do valor de CI_{50} (concentração capaz de inibir 50% de seu efeito máximo). Como resultado, os ensaios *in vitro* mostraram que o LAO promoveu relaxamento de maneira dependente de concentração dos anéis de traqueia pré-contráídos com 1 µM de carbacol (CCh), 1 µM de histamina (HIS) e 60 mM de cloreto de potássio (KCl), com valores da CI_{50} de $42,10 \pm 11,59$ %, $39,19 \pm 11,09$ %, e $86,53 \pm 10,04$ %, respectivamente, não havendo diferença significativa entre a CI_{50} da HIS e do CCh. Como o LAO apresentou características espasmolíticas, buscou-se investigar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação envolvido(s) nesse efeito, após contração induzida por CCh. Verificou-se que houve uma redução significativa na potência do LAO na ordem de 2 vezes, aproximadamente, na presença da dexametasona 10 µM ($CI_{50} = 100,20 \pm 18,98$ µg/mL) e da indometacina 10 µM ($CI_{50} = 103,6 \pm 23,98$ µg/mL), concluindo-se que o LAO exibe efeito espasmolítico significativo frente aos agonistas utilizados na pesquisa, estando relacionado a uma possível inibição das enzimas ciclooxigenase (COX) e fosfolipase A2 (PLA2), que impedem a produção das prostaglandinas na traqueia, responsáveis pelo relaxamento do músculo liso.

Palavras-chave: *Lippia alnifolia*; plantas medicinais; óleo essencial; relaxamento.

ABSTRACT

In all parts of the world medicinal plants are widely used by the population for the treatment of a multitude of diseases. Many of these plants are often used as a therapeutic option in diseases associated with the respiratory system, since the onset of these diseases cause great social impact, becoming then of clinical interest and constituting permanent targeted search for new therapeutic entities. The genus *Lippia* Verbenaceae family is one of the most studied species for presenting great potential therapeutic rich in phenolic acids, monoterpenes, sesquiterpenes and flavonoids have traditionally been used to treat respiratory disorders, gastrointestinal and general infections. Species present in its most aromatic, with a solid profile of chemical composition, pharmacological activities and popular use. Belonging to this genre we have the *Lippia alnifolia* Schauer species, a plant found in the bush, endemic and distribution used in folk medicine as antimicrobial, arousing interest because of the absence of more information in the literature. The aim of this study was to evaluate the effect of *Lippia alnifolia* oil (LAO) on the trachea of guinea pig and its possible pharmacological mechanism of action. The instrument used is the essential oil obtained from the leaves with increasing concentrations (1-729 $\mu\text{g/ml}$) on guinea pig tracheal rings precontracted by agonists, and subsequently examined records of isotonic contractions of segments of body isolated to obtain the IC₅₀ value (concentration able to inhibit 50% of its maximum effect). As a result, in vitro tests showed that the LAO a relaxation of concentration dependent manner tracheal rings precontracted with 1 μM carbachol (CCh), 1 μM histamine (HIS) and 60 mM potassium chloride (KCl), with IC₅₀ values of $42.10 \pm 11.59 \%$, $39.19 \pm 11.09 \%$, and $86.53 \pm 10.04 \%$, respectively, with no significant difference between the IC₅₀ HIS and CCh. As the LAO presented spasmolytic characteristics, we sought to investigate the(s) possible(s) mechanism(s) involved action(s) in this effect after contraction induced by CCh. It was found that there was a significant reduction in the power of LAO in the order of 2 times, approximately, in the presence of 10 mM dexamethasone (IC₅₀ = $100.20 \pm 18.98 \text{ mg/ml}$) and 10 mM indomethacin (IC₅₀ = $103.6 \pm 23.98 \text{ mg/ml}$), concluding that the LAO exhibits spasmolytic significant effect compared to the agonists used in the study, being related to a possible inhibition of cyclooxygenase enzymes (COX) and phospholipase A2 (PLA2) which prevent the production of prostaglandins in the trachea responsible for relaxation of smooth muscle.

Keywords: *Lippia alnifolia*; medicinal plants; essential oil; relaxation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação da contração do músculo liso.....	36
Figura 2 - Relaxamento do músculo liso.....	37
Figura 3 - Exsicata da espécie <i>Lippia alnifolia</i> Schauer.....	39
Figura 4 - Esquema do protocolo utilizado para investigar o efeito do LAO frente às contrações tônicas induzidas pelos agonistas selecionados.....	44
Figura 5 - Modelo representativo utilizado para investigar o mecanismo de ação do LAO frente às contrações isotônicas induzidas por carbacol.....	45
Figura 6 - Registro original representativo do efeito relaxante do LAO sobre as contrações tônicas induzidas por agonistas em anéis de traqueia de cobaia.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução Krebs.....	42
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Substâncias, sais e seus fornecedores.....	40
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Valores da CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-incubados pelos agonistas. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$ ($n = 5$). Teste ANOVA.....48
- Gráfico 2** - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos pelos agonistas CCh 1 μ M, HIS 1 μ M e KCl 60 mM. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$ ($n = 5$). Teste ANOVA.49
- Gráfico 3** - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de TEA. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$ ($n = 5$). Teste ANOVA.....51
- Gráfico 4** - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de TEA 5 mM, controle (■) e TEA 5 mM (●). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle vs TEA.....52
- Gráfico 5** - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de 4-AP. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA.....53
- Gráfico 6** - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de 4-AP 2 mM, controle (■) e 4-AP 2 mM (▼). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle vs 4-AP.....53
- Gráfico 7** - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de GLI. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA.....55
- Gráfico 8** - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de GLI 3 μ M, controle (■) e GLI 3 μ M (▲). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, $*p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle vs GLI.....55

Gráfico 9 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de L-NAME. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA.....	56
Gráfico 10 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de L-NAME 10 μ M, controle (■) e L-NAME 10 μ M (◇). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs L-NAME.....	57
Gráfico 11 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de PRP. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA.....	59
Gráfico 12 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de PRP 3 μ M, controle (■) e L- PRP 3 μ M (♠). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs PRP.....	59
Gráfico 13 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de DEX. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA.....	61
Gráfico 14 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de DEX 10 μ M, controle (■) e DEX 10 μ M (□). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs DEX.....	62
Gráfico 15 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de IND. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA.....	64
Gráfico 16 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de IND 10 μ M, controle (■) e IND 10 μ M (♣). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs IND.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca²⁺	Cálcio
Ca²⁺_i	Cálcio intracelular
Ca_v	Canais para cálcio abertos por voltagem
CaM	Calmodulina
CCh	Carbacol
[(Ca²⁺)₄-CaM]	Complexo cálcio-calmodulina
COX	Enzima cicloxigenase
DAG	Diacilglicerol
DEX	Dexametasona
E_{máx}	Valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido pela amostra
E.P.M	Erro Padrão da Média
GLI	Glibenclamida
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
CI₅₀	Concentração da amostra capaz de inibir 50% do seu efeito máximo
IND	Indometacina
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	Receptores de 1,4,5-trisfosfato de inositol
K⁺	Potássio
KCa	Canais para potássio dependente de cálcio
KATP	Canais para potássio dependente de ATP
Kv	Canais para potássio abertos por voltagem
<i>L. alnifolia</i>	<i>Lippia alnifolia</i> Schauer
LAO	Óleo de <i>Lippia alnifolia</i> Schauer

LAPRON	Laboratório de Química e Produtos
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
Na⁺	Sódio
Nav	Canais para sódio abertos por voltagem
NO	Óxido Nítrico
PGE2	Prostaglandina E2
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase C
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
PLA2	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
PRP	Propranolol
RS	Retículo Sarcoplasmático
RyR	Receptores de Rianodina
TEA	Tetraetilamônio
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
V_m	Potencial de membrana
vs	Versus
μg	Microgramas
μM	Micromolar
4-AP	4-aminopiridina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Plantas medicinais	19
3.2 Considerações sobre a família Verbenaceae e o gênero <i>Lippia</i>	20
3.3 Considerações sobre e a espécie <i>Lippia alnifolia</i>	27
3.4 Óleos essenciais	28
3.5 Considerações sobre a espécie <i>Cavia porcellus</i>	31
3.6 A Traqueia e o Músculo Liso Traqueal	32
3.7 Contração e relaxamento do músculo liso traqueal	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 MATERIAL	39
4.1.1 Material botânico.....	39
4.1.2 Animais.....	40
4.1.3 Aspectos éticos.....	40
4.1.4 Substâncias e sais.....	40
4.1.5 Soluções nutritivas.....	41
4.1.6 Aparelhos.....	42
4.1.7 Preparação do óleo para os ensaios farmacológicos.....	42
4.2 MÉTODOS	43
4.2.1 Preparação do experimento <i>in vitro</i> em traqueia de cobaia.....	43
4.2.2 Avaliação da atividade espasmolítica <i>in vitro</i> em traqueia de cobaia.....	44

4.2.3	Investigação <i>in vitro</i> do possível mecanismo de ação do LAO em traqueia de cobaia...	45
4.2.4	Análise estatística dos dados.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1	Estudo da possível atividade espasmolítica do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	47
5.1.1	Investigação do efeito das concentrações crescentes do óleo de <i>L. alnifolia</i> sobre anéis de traqueia de cobaia frente às contrações tônicas induzidas por diferentes agonistas.....	47
5.2	Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítico do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	50
5.2.1	Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito relaxante do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	50
5.2.2	Avaliação da participação do inibidor da óxido nítrico sintase no efeito relaxante do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	56
5.2.3	Avaliação da participação do antagonista β -adrenérgico não seletivo no efeito relaxante do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	58
5.2.4	Avaliação da participação do inibidor da síntese proteica e fosfolipase A2 no efeito relaxante do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	60
5.2.5	Avaliação da participação do inibidor não seletivo da cicloxigenase no efeito relaxante do óleo de <i>L. alnifolia</i> em traqueia de cobaia.....	63
6	CONCLUSÕES.....	67
7	PERSPECTIVAS.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXO.....	78

1 INTRODUÇÃO

O homem sempre utilizou as plantas em função da manutenção da vida, seja para alimentação ou para prevenção e cura de enfermidades, e ao longo do processo evolutivo ele foi aprendendo a selecioná-las de acordo com cada fim. O resultado disso é que muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas para agricultura ou como ervas medicinais a partir de práticas de experimentação e observação (GULLO; HUGHES, 2005).

O acúmulo milenar desses conhecimentos empíricos sobre a ação biológica dos vegetais foi tradicionalmente repassado de geração para geração por diversos grupos étnicos, denominado conhecimento etnofarmacológico, o que propiciou uma das bases mais importantes para o nascimento da medicina popular. Hoje o uso de plantas medicinais é uma prática generalizada pela humanidade e alguns compostos naturais já foram identificados em função do conhecimento etnofarmacológico de algumas plantas (NAVARRO; SCARPA, 2013).

Entretanto, é importante ressaltar que muitas das suposições quanto à eficácia dos produtos naturais utilizados pela medicina tradicional não são comprovadas cientificamente, sendo indispensável o cultivo e uso consciente com o intuito de evitar a administração de plantas tóxicas ou sem comprovação de atividade farmacológica (LORENZI; MATOS, 2008).

Em geral, os produtos naturais que apresentam algum efeito biológico são denominados princípios ativos e resultam, em especial, do metabolismo secundário das plantas. Estes princípios ativos apresentam uma diversidade em termos de estrutura e de propriedades químicas e atuam em alvos moleculares específicos, o que facilita o direcionamento da pesquisa farmacológica de plantas medicinais relatadas pela população (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A identificação de espécies com alguma atividade sobre o metabolismo de um organismo vivo pode servir direta ou indiretamente no desenvolvimento de novos fármacos, sejam estes obtidos por isolamento ou através de síntese a partir de uma molécula protótipo, propiciando não só avanços importantes para a terapêutica de algumas doenças como, também, fornecendo ferramentas extremamente úteis para o estudo teórico da fisiologia e da farmacologia (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A existência de um grande número de espécies vegetais disponíveis para investigação revela uma extraordinária capacidade para a descoberta de novos compostos de ocorrência natural. O Brasil destaca-se como o país com o maior potencial para pesquisa no mundo por deter a mais rica biodiversidade do planeta, com alto índice de espécies endêmicas. Essa diversidade biológica é responsável pela manutenção do equilíbrio e da estabilidade dos ecossistemas, bem como é fonte inestimável de recursos econômicos potencialmente exploráveis. Com tamanha biodiversidade o Brasil tem condições de ser um dos principais países a adotar a fitoterapia como uma alternativa segura e eficaz no tratamento de diversas patologias (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

O interesse científico embutido na busca de substâncias bioativas a partir de derivados vegetais vem da relevância em conservar a variedade e variabilidade genética existente nos ecossistemas, que é muito expressiva, e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem, para que possamos extrair de modo sustentável produtos e subprodutos quase que inesgotáveis dessas fontes, atendendo as necessidades e aspirações das gerações presentes e futuras, mantendo a preservação e perpetuação dos organismos vivos (KINGSTON, 2011).

O único bioma brasileiro cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional é a Caatinga, possuindo um grande número de espécies vegetais endêmicas e sendo proporcionalmente o menos estudado entre as regiões geográficas (IBAMA, 2010). A Caatinga é a vegetação brasileira mais desprotegida em virtude de sua aparência morta. Além disso, incide sobre ela um extenso processo de transformação e degradação ambiental provocado pelo uso desenfreado dos seus recursos naturais, ocasionando a rápida perda de espécies únicas precariamente conhecidas e à eliminação de processos ecológicos chaves que comprometem o equilíbrio biológico entre as espécies (OLIVEIRA et al., 2014). A Caatinga destaca-se por apresentar uma flora bastante diversificada e rica em plantas largamente conhecidas na medicina popular contra várias enfermidades, em decorrência da sua grande variedade biológica e cultural. No entanto, poucas espécies foram estudadas etnobotânica e farmacologicamente (GARIGLIO et al., 2010).

Para a realização desta pesquisa foi utilizada uma espécie endêmica da caatinga, a *Lippia alnifolia* Schauer, pertencente ao gênero *Lippia*, família Verbenaceae. O gênero ao qual ela pertence reúne cerca de 200 táxons, entre ervas, arbustos e pequenas

árvores, distribuídos nos trópicos e subtropicais das Américas e África, com ocorrência especialmente no cerrado e campos rupestres brasileiros. As espécies do gênero parecem apresentar um sólido perfil de uso popular, composição química e atividades biológicas, sendo tradicionalmente utilizadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios respiratórios, gastrointestinais e infecções em geral, efeitos estes atribuídos a presença de óleos essenciais, pois a maioria de suas espécies são aromáticas (PASCUAL et al., 2001).

Apesar das plantas do gênero *Lippia* serem apontadas como de grande importância econômica na indústria e no paisagismo, ela também se destaca na fitoterapia por suas propriedades medicinais. A habilidade de relaxar distintos músculos lisos em preparações de órgãos isolados vem sendo evidenciado em trabalhos com óleos essenciais obtidos de espécies de *Lippia*. No entanto, estudos sobre a atividade farmacológica dessas espécies ainda são muito incipientes na literatura, principalmente utilizando essa abordagem, onde a maioria dos diferentes usos precisa ser investigada cientificamente (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

O intuito de pesquisar produtos extraídos de plantas com atividade sobre a musculatura lisa reside no fato de haver a possibilidade de que tais produtos apresentem extensa aplicação em vários processos fisiopatológicos como a asma, hipertensão, arritmias cardíacas, angina do peito, diarreias, espasmos tanto intestinais como uterinos, tornando as pesquisas imprescindíveis ao processo de descobrimento de novos fármacos favoráveis ao tratamento dessas enfermidades (LIMA et al., 2011).

Neste cenário, devido a grande representatividade, a vasta gama de atividades das espécies do gênero *Lippia* descritas pelas comunidades, e considerando a escassez de trabalhos com a espécie *Lippia alnifolia* Schauer, despertou-se o interesse no estudo desta planta na possibilidade de fornecer informações científicas que possam explicar sua utilização na medicina popular e que sirvam para conhecimento das populações que dela fazem uso. Somando-se a isso, e não menos importantes, estão a tentativa de isolamento de novos princípios ativos, a determinação do perfil farmacológico de espécies endêmicas da caatinga, visando à preservação dessas espécies, e a descoberta de novas aplicações terapêuticas para os recursos naturais oriundos dessa região.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir para o estudo farmacológico da família Verbenaceae e, particularmente, da espécie *Lippia alnifolia* Schauer, com a finalidade de fornecer informações que possam ser utilizadas no rastreamento de substância(s) de interesse terapêutico.

2.2 Específicos

- ✓ Investigar atividade espasmolítica *in vitro* do óleo de *Lippia alnifolia* Schauer (LAO) em traqueia de cobaia;
- ✓ Comparar o perfil relaxante dos agonistas entre si e definir o que apresenta a melhor resposta para CI_{50} ;
- ✓ Determinar o possível mecanismo de ação farmacológico do LAO através da aplicação de protocolos experimentais específicos;
- ✓ Avaliar a participação dos canais de potássio no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaia;
- ✓ Avaliar a participação do inibidor da enzima óxido nítrico sintase, N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaia;
- ✓ Avaliar a participação do antagonista β -adrenérgico não seletivo, propranolol (PRP), no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaia;
- ✓ Avaliar a participação do inibidor da síntese proteica e fosfolipase A₂, dexametasona (DEX), no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaia;
- ✓ Avaliar a participação do inibidor não seletivo da cicloxigenase, indometacina (IND), no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaia.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Plantas Medicinais

O homem sempre buscou na natureza o uso de produtos naturais para o tratamento de muitas doenças, a ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de emprego desses produtos. A administração de plantas com o objetivo de recuperar ou manter a saúde é uma prática que se confunde com a própria história da humanidade (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Desde os primórdios da civilização a medicina popular fundamenta-se no uso de plantas medicinais como primeiro recurso terapêutico e um dos únicos elementos de cura que o homem conhecia, assim, os produtos naturais foram sendo utilizados e, apesar do surgimento dos medicamentos sintéticos, jamais desapareceu por completo (SIMÕES et al., 2010).

Estudos sobre as propriedades medicinais das plantas têm sido incentivados principalmente em países em desenvolvimento onde o serviço de saúde moderno é limitado e a utilização de plantas para a saúde pública baseada nas práticas populares ainda é significativa e de grande aceitação pela população. Aproximadamente 60% da população do mundo depende quase inteiramente de plantas para medicamentos e os produtos naturais têm sido reconhecidos como uma fonte importante e terapeuticamente eficaz (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2008).

Muitas são as propriedades terapêuticas conferidas às plantas medicinais em decorrência dos princípios ativos produzidos, em especial, pelo seu metabolismo secundário. Estes metabólitos secundários vêm despertando interesse como fármacos no tratamento de algumas doenças por oferecerem inúmeras funções. As substâncias pertencentes a essa classe são biossintetizadas como um mecanismo próprio de defesa ou perpetuação da espécie podendo variar dependendo de uma interface química entre o organismo e o ambiente circundante. Fato este que interfere na quantidade e qualidade de metabólitos secundários resultantes contra as condições de adaptação e regulação em um determinado momento (LORENZI; MATOS, 2008).

Ainda não foram farmacologicamente caracterizados muitos dos princípios ativos das plantas medicinais quando se considera a diversidade e as possibilidades de utilização para fins terapêuticos, por isso os produtos naturais têm sido alvo notáveis de pesquisas científicas para se estabelecer os efeitos biológicos de seus constituintes. (GULLO; HUGHES, 2005).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento planejado de novas drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também, como matérias-primas para a síntese destes ou como modelos moleculares de compostos biologicamente ativos. Os estudos envolvendo plantas utilizadas para fins terapêuticos garantem a conservação da biodiversidade por estimular a extração consciente ao descobrir exemplares com potencial farmacológico, comprovando a importância da pesquisa etnofarmacológica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os progressos significativamente interessantes na descoberta de fármacos novos resultam na obtenção inicial de medicamentos fitoterápicos, aqueles adquiridos de plantas medicinais no qual se utiliza exclusivamente como matéria-prima derivados de droga vegetal, caracterizados pelo conhecimento da eficácia e do risco do seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância do sua qualidade (MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

As melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico estão nas fontes naturais ainda em abundância para análise. Até o momento, calcula-se que menos de 2% das plantas superiores foi investigada para identificação de constituintes com atividade biológica e, na realidade, uma grande quantidade de moléculas derivadas de organismos marinhos, microorganismos e de plantas ainda pode ser revelada (KINGSTON, 2011).

3.2 Considerações sobre a família Verbenaceae e o gênero *Lippia*

A família Verbenaceae, incluída na ordem Lamiales, é uma família cosmopolita, muitas vezes aromática, ocorrendo em praticamente todos os ecossistemas terrestres, predominantemente associada às regiões tropicais, subtropicais e, principalmente, nas zonas temperadas do hemisfério sul, com algumas de suas espécies nas zonas

temperadas do hemisfério Norte. Em um sentido amplo, a família compreende cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies, sendo estimadas para o Brasil 296 espécies em 22 gêneros. O gênero com maior número de representantes é o *Verbena* seguido do *Lippia* (MELO et al., 2010).

Esta família agrega plantas herbáceas, subarborescentes, arbustivas e, em menores quantidades, lianáceas a arbóreas. Algumas espécies apresentam amplitudes climáticas extremas que vão desde o trópico gelado e úmido ao subárido e áreas de alta latitude com verões quentes (CRAVEIRO et al., 1981).

A importância econômica da família Verbenaceae fica por conta de algumas espécies ornamentais e madeireiras, que são cultivadas e aplicadas no paisagismo e na decoração natural de ambientes. Alguns gêneros muito empregados no paisagismo são originários do Brasil (SOARES; DIAS, 2013). Além deste emprego, ela também apresenta enorme potencial na indústria têxtil, de alimentos, farmacêutica, cosmética e de perfumes, em virtude da produção de óleos essenciais, como as do gênero *Verbena*, muito utilizadas na elaboração de produtos de higiene pessoal, como hidratantes e sabonetes. Alguns gêneros destacam-se na medicina popular por suas propriedades medicinais, a exemplo do gênero *Lippia* e *Priva*, destacando-se os representantes aromáticos (MARX et al., 2010).

O gênero *Lippia*, da família Verbenaceae, reúne cerca de 200 espécies entre ervas, arbustos e árvores pequenas, distribuídas principalmente em todos os países da América Central e do Sul, e territórios da África Tropical. O maior número de espécies encontra-se no Brasil, cerca de 120, localizadas especialmente em terrenos de grandes altitudes. O nome do gênero é uma homenagem a Auguste Lippi (1678-1704), explorador e naturalista italiano, morto por nativos da Etiópia. Em geral, o gênero parece apresentar um consistente perfil de composição química, atividades farmacológicas e uso popular, porém ainda pouco estudados (SOARES; DIAS, 2013).

Os principais centros específicos de diversidade do gênero *Lippia* estão localizados no Brasil, com aproximadamente 70% das espécies conhecidas sendo algumas endêmicas, e no México. No Brasil a maior representatividade é encontrada nos campos rupestres localizados nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, e embora possua um grande número de espécies algumas estão ameaçadas de extinção, como a *L. elliptica* Shauer, que só foi recoletada uma única vez em Goiás após sua descoberta em

Mato Grosso do Sul, e provavelmente extinta nesta região já completamente descaracterizada pela exploração agrícola (MELO et al., 2010).

A grande maioria das espécies de *Lippia* possui uma fragrância peculiar forte e agradável caracterizada pela presença dos óleos essenciais, os responsáveis, na maioria das vezes, pelos efeitos produzidos por essas plantas, sendo importante fonte de componentes químicos aplicáveis na indústria (MARX et al., 2010).

Os componentes identificados com maior frequência nos óleos essenciais do gênero foram: monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos fenólicos, flavonoides e, em menor quantidade, iridóides, alcaloides, taninos, saponinas e triterpenos. Dentre os terpenóides identificados nas espécies de *Lippia* temos como principais: o limoneno, o cariofileno, o p-cimeno, a cânfora, o linalol, o pineno e o timol (OLIVEIRA et al., 2006). *Lippia alba* N.E. Brown é, sem dúvida, a representante mais estudada do gênero, inclusive na área fitoquímica, devido à grande variabilidade química dos seus óleos essenciais, no qual já foram encontrados diversos compostos, dentre eles o citral e a carvona (MESA-ARANGO et al., 2009; TAVARES et al., 2005).

Estudos farmacológicos de espécies do gênero *Lippia* eram focados, principalmente, nas ações antimicrobiana, antifúngica, larvicida e repelente dos seus óleos essenciais. Estes efeitos são apoiados por pesquisas recentes que também demonstram atividades antiparasitária, anti-helmíntica, espasmolítica e sobre o sistema nervoso central, concentrando os estudos em poucas espécies (PASCUAL et al., 2001).

As espécies do gênero são tradicionalmente utilizadas na medicina popular para o tratamento de transtornos respiratórios, gastrointestinais e infecções em geral. Na maioria dos casos, o material utilizado são as partes aéreas, como folhas ou flores, comumente preparadas por infusão ou decocção, e administrada oralmente. Algumas espécies de *Lippia* também demonstraram atividades antimalárica, antiviral, citostática, espasmolítica, sedativa, hipotensiva e anti-inflamatória. Além disso, as folhas da maioria destas são utilizadas como tempero para preparação de produtos (PASCUAL et al., 2001).

No que diz respeito aos fins culinários, vale destacar a importância da espécie *Lippia dulcis* Trevir, uma planta de sabor adocicado, cujos principais componentes não tóxicos isolados, os sesquiterpenos hernandulcina e 4 β -hidroxihernandulcina, mostraram-se ser 1.000 vezes mais doces do que a sacarose. Embora esta planta tenha

sido descrita pela primeira vez na literatura botânica antiga no século 16, suas propriedades foram confirmadas apenas na década de 1980 em sequências de investigações realizadas (ATTIA; KIM; RO, 2012). As espécies *L. multiflora* Moldenke, *L. graveolens* Kunth e *L. sidoides* Cham. têm importante papel na indústria alimentícia devido à sua capacidade antioxidante e antimicrobiana, pois favorecem a inocuidade e a estabilidade dos alimentos, como também protegem contra alterações lipídicas (ARCILA-LOZANO et al., 2004).

São utilizados como tempero para preparação de produtos alimentícios as folhas de *L. alba* N.E. Brown, *L. citriodora* H.B.K., *L. graveolens* H.B.K e *L. origanoides* H.B.K (OLIVEIRA et al., 2012). Adicionalmente, as folhas de *L. citriodora* H.B.K. são utilizados em bebidas aromatizantes (AGAH; NAJAFIAN, 2012). Na América Central, a raiz do alcaçuz (*L. dulcis* Trevir.) é culturalmente mastigada devido ao sabor característico, o que levou uma fábrica em Cuba a tingir o papel de cigarro com o suco da planta (MORENO et al., 2010). No Brasil, a *L. pseudo-thea* Schau é utilizada como substituto no preparo de alguns chás e seu fruto é comido em algumas comunidades (FABRI et al., 2011).

Em países da América do Sul e Central (Guatemala, Venezuela, Brasil), e na região da Mesoamérica o uso popular das espécies de *Lippia* para o tratamento de doenças respiratórias concentra-se no combate de resfriados, gripe, bronquite, tosse e asma, sendo essas ações confirmadas através de pesquisas ao longo de décadas. Geralmente é preparado uma decocção de espécies como: *L. alba* N.E. Brown ou *L. dulcis* Trevir (CÁCERES et al., 1991), *L. chealieri* Moldenke ou *L. multiflora* Moldenke (BASSOLE et al., 2009), *L. graveolens* H.B.K (SÁNCHEZ et al., 2010), *L. micromera* Schauer, *L. microphylla* Cham. (RODRIGUES et al., 2011), *L. nodiflora* Michx. (ARUMANAYAGAM; ARUNMANI, 2015) e *L. origanoides* H.B.K. (SALIMENA et al. 2010). Na África, além desse modo de preparo são feitas infusões com água ou leite das folhas e raízes da espécie *L. javanica* Spreng., também usadas para combater resfriados, asma e dor no peito (YORK; VAN VUUREN; DE WET, 2012).

Também ao longo da América do Sul e Central, África Tropical e alguns países europeus, espécies de *Lippia* são consideradas muito úteis no costume popular no combate a enfermidades gastrointestinais. Foram confirmados os efeitos dos remédios tomados através do infuso ou decocto de algumas espécies como *L. alba* N.E. Brown

(MACHADO et al., 2014), *L. citriodora* H.B.K., *L. dulcis* Trevir. (CÁCERES et al., 1993), *L. micromera* Schau, *L. origanoides* H.B.K. (OLIVEIRA et al., 2012), *L. reptans* H.B.K., *L. stoechadifolia* H.B.K. e *L. turbinata* Griseb. (NAVARRO; SCARPA, 2013) para o tratamento de dores de estômago, indigestão, diarreia e disenteria. Outras também atuam como carminativas: *L. alba* N.E. Brown. e *L. reptans* H.B.K. e combatendo a *Helicobacter pylori*: *L. citriodora* H.B.K. (OHNO et al., 2003). A *L. graveolens* H.B.K. é tomada como um antisséptico intestinal (SÁNCHEZ et al., 2010).

No Zimbábue, folhas e raízes de *L. javanica* Spreng. são utilizadas na forma de chá para tratar dores abdominais em decorrência de sua ação antiespasmódica (LUDERE; VAN; VLEGGAR, 2013). Na Venezuela, a decocto das raízes de *L. origanoides* H.B.K. é tomado para estimular o apetite (RIVERO et al., 2011). No México, há relatos sobre o uso da infusão de folhas de *L. alba* N.E. Brown para aliviar dores de vesícula (MACHADO et al., 2014) e de *L. multiflora* Moldenke para induzir atividade colerética. Na América Central e Amazônia brasileira a infusão ou decocção de *L. grandis* Scham. é empregada no tratamento de doenças hepáticas (SARRAZIN et al., 2012).

No Brasil e na Guatemala, algumas espécies de *Lippia* são aplicadas topicamente para tratar doenças cutâneas: queimaduras, feridas, úlceras, acne, infecções da pele e do couro cabeludo, como a *L. alba* N.E. Brown e a *L. gracilis* H.B.K., destacando aqui a atividade antimicrobiana sobre vários organismos devido à presença dos monoterpenos fenólicos (SARRAZIN et al., 2012). Também foi relatado o uso de *L. nodiflora* Michx. e *L. geminata* H.B.K. para tratar a gonorreia e *L. alba* N.E. Brown e *L. geminata* H.B.K. para tratar a sífilis (CRAVEIRO et al., 1981).

Na Costa Rica, a decocção com leite de *L. alba* N.E. Brown e *L. graveolens* H.B.K. é usada como vermífugo no combate a *Giardia* e *Entamoeba histolítica* (MACHADO et al., 2010; QUINTANILLA et al., 2014).

Na América Central, a espécie *L. stoechadifolia* H.B.K. é usada como repelente de insetos e plantada em torno de casas e avenidas. Na África, várias espécies de *Lippia* são utilizadas na medicina popular como antimaláricos no combate ao *Plasmodium falciparum*: *L. chealieri* Moldenke, *L. javanica* Spreng. (LUDERE; VAN; VLEGGAR, 2013), *L. multiflora* Moldenke (AJAIYEGBA et al., 2004) e *L. nodiflora* Michx. No México, a *L. graveolens* H.B.K. é utilizada no tratamento da doença de

chagas e sua atividade contra o *Trypanosoma Cruzi* foi comprovada no estudo de Molina et al. (2014).

Algumas espécies são aferidas como remédios analgésicos, anti-inflamatórios e/ou antitérmicos: *L. alba* N.E. Brown (CARMONA et al., 2013), *L. dulcis* Trevir, *L. geminata* H.B.K., *L. graveolens* H.B.K. (GONZALEZ; SOTO; MARTINEZ, 2010), *L. javanica* Spreng., *L. nodiflora* Michx. e *L. citriodora* H.B.K. (PASCUAL et al., 2001).

No Brasil, *L. alba* N.E. Brown (HELDWEIN et al., 2014) e *L. geminata* H.B.K. são usadas como sedativas e anestésicas. No Senegal a *L. chealiari* Moldenke é tomada como chá estimulante, enquanto na Nigéria os relatos afirmam que a mesma infusão é bebida como um remédio sedativo e relaxante (PASCUAL et al., 2001).

A espécie Africana *L. multiflora* Moldenke e a *L. alba* N.E. Brown são usadas no tratamento da hipertensão arterial, comprovado através de estudos que indicam ser os principais componentes químicos de óleos voláteis os responsáveis por exercer propriedades hipotensoras na resolução de doenças cardiovasculares, inclusive contribuindo com a inibição da oxidação do LDL (BASTOS et al., 2010). Na Guatemala, a *L. dulcis* Trevir, a *L. micromera* Schau. e a africana *L. nodiflora* Michx. são utilizadas como diuréticas. No México, a decocção de *L. graveolens* H.B.K. também é tida como um eficaz tratamento contra o diabetes (BOWER et al., 2014).

No Brasil e América Central, *L. alba* N.E. Brown, *L. dulcis* Trevir., *L. geminata* H.B.K., *L. graveolens* H.B.K., *L. grandis* Scham. e *L. nodiflora* Michx. são utilizadas para corrigir distúrbios menstruais. Várias espécies mexicanas de *Lippia* exibem atividade abortiva e de anti-fertilidade. Isto é especialmente comprovado para *L. dulcis* Trevir. e *L. graveolens* H.B.K. A maioria dos autores associam essas atividades com a quantidade relativamente elevada de monoterpenos tóxicos: cânfora, p-cimeno e bornilo de etilo (THOLL, 2006).

De acordo com Pascual et al. (2001), em sua revisão bibliográfica sobre o gênero *Lippia*, as espécies encontradas no Brasil são: *L. alnifolia* Schauer, *L. grata* Schauer, *L. microphylla* Cham., *L. origanoides* H.B.K., *L. alba* N.E. Brown, *L. pseudo-thea* Schauer, *L. sidoides* Cham. e *L. thymoides* Martius e Schauer.

O gênero *Lippia* tem sido um dos mais estudados do ponto de vista químico desde a década de 90, com vários trabalhos sobre espécies brasileiras. Um bom exemplo é a espécie *L. alba* N. E. Brown, popularmente conhecida como “erva-cidreira”, nativa

do nordeste brasileiro e bastante cultivada, cujas atividades farmacológicas foram muito estudadas demonstrando grande potencial na produção de fitomedicamentos. Ensaios farmacológicos com componentes presentes nos óleos essenciais das folhas de *L. alba* comprovaram efeitos antiulcerogênico, sedativo, ansiolítico, analgésico, espasmolítico e antibacteriano, sem que nenhum efeito tóxico tenha sido verificado em animais tratados com essa planta (HEINZMANN; BARROS, 2007; VALE et al., 1999).

Foi verificado efeito inibitório dos óleos essenciais obtidos a partir de *L. alba* e *L. citriodora* sobre quatro sorotipos de vírus da dengue. O óleo parece penetrar na pele e atuar dentro da célula bloqueando a replicação viral, sugerindo que o uso tópico pode ser explorado para a prevenção da infecção pelo vírus através da picada do mosquito vetor (OCAZIONEZ et al., 2010; SILVA et al., 2008). Carvalho et al. (2003) ainda apontaram atividade larvicida do óleo essencial de outras espécies importantes, a *L. gracilis* e a *L. sidoides*, contra o *Aedes aegypti*, vetor de doenças como dengue, febre amarela e chicungunha, responsáveis por um elevado número de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Adicionalmente, o óleo essencial de *L. citriodora* e *L. sidoides* apresentou efeito sobre formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonenses* (MEDEIROS et al., 2011). Esses efeitos associados a sua baixa toxicidade em células de mamíferos, caracterizam os óleos dessas espécies como um promissor agente para o tratamento de leishmaniose cutânea (ESCOBAR et al., 2010).

Além das propriedades medicinais, algumas espécies de *Lippia* têm sido utilizadas no reflorestamento de regiões de minério que foram desativadas ou abandonadas, apresentando-se de grande importância para a proteção do solo ao evitar o processo de erosão em comunidades associadas com afloramentos rochosos. Na Venezuela, por exemplo, *L. origanoides* Kunth tem sido utilizada como espécie pioneira na alternativa de reflorestamento de áreas afetadas pela indústria mineradora de ferro, uma vez que esta se apresenta adaptada a solos extremamente ácidos, pedregosos e com baixa concentração de matéria orgânica (SARRAZIN et al., 2015).

Apesar das espécies descritas apresentarem variadas utilidades na medicina popular, ainda não foram esgotadas todas as possibilidades de estudo, além do que e ainda não foi comprovado cientificamente o potencial biológico de outras espécies do gênero não citadas.

3.3 Considerações sobre e a espécie *Lippia alnifolia*

A espécie *Lippia alnifolia*, também conhecida como “alecrim-do-mato”, “pedrécio” ou “alecrim-de-vaqueiro”, é considerada uma planta rara e endêmica da Caatinga, encontrada com maior incidência no estado da Bahia (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007). Ocorre em local com exploração agrícola, agropecuária e garimpeira, sujeita a situações de ameaça de extinção, bem como em área de proteção ambiental (SALIMENA et al. 2010). As degradações induzidas pelo homem são causadas por atividades antrópicas, como exploração de recursos vegetais nativos, abertura de pastagens, queimadas, garimpo e turismo, verifica-se uma tendência de declínio progressivo na qualidade e perda do seu habitat (GARIGLIO et al., 2010).

Quanto às características morfológicas a espécie apresenta-se em forma arbusto de até 2,5 m de altura, possui folhas coriáceas, aromáticas, rugosas e flores rosadas. É encontrada em afloramentos rochosos de campos rupestres, em altitudes de 1000 a 1500 m. Floresce em março e julho e frutifica em julho (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2008).

As folhas de *Lippia alnifolia* são empregadas no uso popular como antisséptico tópico contra dermatite e caspa, antisséptico oral e em infecções vaginais. Pesquisas realizadas evidenciam sua atividade antisséptica e antimicrobiana contra diversos agentes infecciosos (PINTO et al., 2013). Também foi demonstrado atividade antinociceptiva por mecanismo central do óleo essencial de *Lippia alnifolia*.

Informações colhidas na medicina popular têm sido utilizadas como ferramenta para busca de possíveis plantas de interesse farmacológico na terapêutica. Com a espécie *L. alnifolia*, utilizada popularmente no tratamento de infecções cutâneas, vaginais e de boca, foram realizadas pesquisas demonstrando evidências científicas que corroboram para o uso tradicional dessa espécie como agente anti-séptico no tratamento de doenças infecciosas por apresentar atividade antimicrobiana do seu óleo contra bactérias e fungos (PINTO et al., 2013; CONCEIÇÃO; GIULIETTI, 2002). Esta ação foi atribuída aos constituintes químicos encontrados no LAO, que pode ter sua composição alterada por vários fatores, mas, no geral, o composto majoritário encontrado nessa mistura complexa é a carvona (MATOS et al., 2000).

3.4 Óleos Essenciais

De modo geral, os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, comumente odoríferas e líquidas. De origem natural, geralmente apresentam sabor ácido e picante, aroma forte, coloração incolor, e tendem a serem estáveis. A ISO (International Standard Organization) define os óleos essenciais, como sendo os produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos (CAVALEIRO, 2007).

A designação de “óleo” é devida a algumas características físico-químicas como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Sua principal característica, contudo, consiste na volatilidade, que o difere assim dos óleos fixos, e no aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo por isso, também chamados de essências. São ainda solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, recebendo, por isso o nome de óleos etéreos, e possuem uma solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar essas soluções que são denominadas de hidrolatos (SIMÕES et al., 2010).

Os óleos essenciais são formados por componentes complexos oriundos do metabolismo secundário de plantas aromáticas, desempenhando importante função de manutenção da vida. Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele está associado a várias funções essenciais à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores, e na atração de insetos e outros agentes fecundadores (MACHADO; FERNANDES, 2011). Na natureza, os metabólitos secundários podem atuar como protetores contra herbívoros, bem como apresentar ação inseticida, antibacteriana, antiviral e antifúngica, na interação das plantas com o meio ambiente, desempenhando função de adaptação e atividade farmacológica (BOURGAUD et al., 2001).

Quanto à composição dos óleos essenciais, em sua maioria são constituídos quimicamente de substâncias terpênicas e fenilpropanóides, acrescidos de moléculas menores de cadeia curta como: ácidos orgânicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos,

cetonas, cumarinas, ésteres, éteres, fenóis, furanos, lactonas, óxidos, peróxidos e até compostos com enxofre presentes na mistura em diferentes concentrações, bem como alcalóides, compostos fenólicos, flavonóides e tantos outros. Os óleos essenciais juntamente com os compostos fenólicos, outro metabólito secundário, estão entre os mais importantes produzidos por plantas aromáticas (SARTORATTO et al., 2004).

Dentre os constituintes terpênicos dos óleos essenciais, os mais prevalentes são os monoterpenos e sesquiterpenos, enquanto os outros terpenos são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas. É possível ressaltar que as substâncias majoritárias encontradas nos óleos essenciais nem sempre são os componentes responsáveis pelas propriedades que estes demonstram (FIGUEIREDO et al., 2008). Os terpenos são descritos como detentores de uma variedade considerável de propriedades biológicas, entre estas se destacam a ação antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, fungicida (propriedades de grande importância na indicação dos óleos voláteis contra uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, vírus, fungos, insetos, protozoários e moluscos), antinociceptiva, anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória e antiespasmódica (EDRIS, 2007).

De acordo com a família a que pertencem, as diversas espécies de plantas aromáticas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos. Do ponto de vista de exploração da biodiversidade vegetal, quando esse órgão representa um substrato renovável (exemplo: resina, folha, flor, fruto, semente), é possível extrair-se a essência sem eliminar a planta. O mesmo não pode ser dito quando estes se encontram nas cascas, troncos e raízes. A composição do óleo essencial de uma espécie particular de planta pode diferir entre as épocas de colheita e as origens geográficas. No geral, essas plantas ficam localizadas em países de clima temperado ou quente (BAKKALI et al., 2008).

O uso dos óleos essenciais como agentes medicinais é conhecido desde a remota antiguidade. Há registros pictóricos de 6.000 anos atrás, entre os egípcios, de práticas religiosas associadas à cura de males e a busca do bem estar físico, através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais. As substâncias aromáticas também já eram populares nas antigas China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporadas em incensos, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. Foi a partir da Idade Média que se iniciou a real comercialização de

materiais aromáticos introduzido pelos cientistas muçulmanos, através do processo de destilação (FRANZ, 2010).

Desta forma, há séculos os óleos essenciais são amplamente utilizados na perfumaria e produção de cosméticos e farmacologicamente com fins medicinais. Atualmente, são empregados na fabricação medicamentos e produtos sanitários, bem como na odontologia, na agricultura e como conservantes e aditivos para alimentos. Além disso, também são aplicados em terapias alternativas, como na aromoterapia, no qual se utiliza das essências por meio de inalação para curar, abrandar ou prevenir doenças, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes especialmente sobre microrganismos (EDRIS, 2007).

Outro aspecto importante é que pelo fato de serem naturais e biodegradáveis os óleos essenciais geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e podem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármacos sintéticos, tornando-se substâncias chaves para a pesquisa de novos medicamentos. Ainda assim, faz-se necessário conhecer o potencial citotóxico de óleos essenciais (FRANZ, 2010).

Por serem típicas moléculas lipofílicas, os óleos essenciais são capazes de permear a estrutura de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios da membrana plasmática, e atuarem sobre organelas ou vias metabólicas citoplasmáticas dos microorganismos. Portanto, a citotoxicidade de óleos voláteis pode estar relacionada aos danos ocasionados na membrana plasmática ultrapassada (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Dentre as funções biológicas que os óleos essenciais desempenham, já foram relatadas atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, antifúngica, antibacteriana, larvicida, fungicida, entre outras. Também são descritos efeitos antidepressivos, ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivos, hipnóticos, relaxantes musculares e anestésicos. Alguns metabólitos secundários exercem suas funções pela similaridade com produtos endógenos, receptores, hormônios, moléculas da transdução de sinais ou neurotransmissores, e por isso possuem efeito benéfico no ser humano devido a sua semelhança com moléculas dos sistemas nervoso central, cardiovascular, respiratório, endócrino, etc. (FIGUEIREDO et al., 2008).

Quanto aos óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* podemos destacar os da *Lippia dulcis*, que teve as atividades antiespasmódica, anti-histaminérgica e anti-

colinérgica sobre brônquios de porcos evidenciada em bioensaio, o que apoia a utilização racional na medicina popular dos extratos e da planta *in natura* para o tratamento de broncoespasmo (GÖRNEMANN et al., 2008).

Continuando a exemplificar, os principais componentes do óleo essencial da *Lippia microphylla* foram responsáveis pela redução da atividade contrátil do músculo liso do estômago e veia porta de cobaias e íleo e traqueia de ratos, do aumento do transporte mucociliar em traqueia de camundongos, além do vasorelaxamento do tônus espontâneo de artérias aorta e mesentérica de ratos por bloqueio do influxo de cálcio através da membrana (RODRIGUES et al., 2011).

3.5 Considerações sobre a espécie *Cavia porcellus*

A cobaia, *Cavia porcellus*, popularmente conhecida como “porquinho da Índia” ou “preá”, é um roedor originário da América do Sul, mais precisamente dos Andes, e foram trazidos do Peru e introduzidos na Europa pelos espanhóis no século XVII, levados por marinheiros como mascotes com o propósito de domesticação e exposição, sendo aproveitados, anos depois, como animais de laboratório (RIVERA, 2002).

Em liberdade, as cobaias vivem diretamente no solo em grupos reduzidos de 5 a 10 indivíduos de ambos os sexos ou alojadas em colônias. São estritamente herbívoros e comem a maioria dos tipos de grãos, verduras e pasto, geralmente saem ao anoitecer para se alimentar e os filhotes já se alimentam com sólidos a partir do segundo dia de vida (SOUZA, 1996).

Se manejada corretamente a cobaia é o animal mais dócil e inofensivo utilizado na experimentação, que raramente morde ou arranha, porém são muito susceptíveis a estímulos estressantes como ausência de abrigo, de alimentação e de espaço no cativeiro, tornando-as nervosas e agitadas, afetando as atividades de reprodução, locomoção e convívio social. A cobaia é manipulada com facilidade, contendo-a pelo tronco com uma das mãos, enquanto apoia as patas posteriores com a outra, evitando apertar o tórax devido a sua fragilidade (LAPCHIK; MATTARAIA, 2009).

O macho atinge a puberdade em 30-40 dias e as fêmeas entre 55-70 dias. O ciclo estral varia entre 15 a 17 dias, o estro é espontâneo, dura cerca de 8 h e ocorre geralmente à noite. Não foram encontradas evidências de sincronização do estro em fêmeas

mantidas na mesma gaiola. A gestação é longa quando comparada a de outros roedores, durando cerca de 67 dias, o número de filhotes varia de 2 a 4. Os filhotes são precoces, já nascem com olhos abertos, com presença de dentes e pelos (FEIJÓ; BRAGA; PITREZ, 2010).

As cobaias são animais de grande valor para pesquisa, considerada uma espécie convencional de animal de laboratório, devido a grande semelhança com os tecidos e órgãos humanos e a variedade de experimentos nos quais podem ser utilizadas. Entre as características que a tornam uma excelente escolha como modelo comumente utilizada em laboratório estão à facilidade de manipulação pela docilidade, a maturidade dos seus filhotes ao nascer e por não produzirem excretas de odor tão forte como às de outros roedores. São amplamente utilizados nos campos da nutrição, farmacologia, imunologia, alergologia e radiologia. É importante nos laboratórios de produtos biológicos para provas de toxicidade, DL_{50} (dose letal 50%) e outras provas de controle de qualidade (RIVERA, 2002).

3.6 A Traqueia e o Músculo Liso Traqueal

O sistema respiratório é composto pelos tratos respiratórios superior e inferior sendo estes responsáveis pela ventilação, que é o movimento de entrada e saída do ar pelas vias aéreas. O trato respiratório superior, formado pelo nariz, seios paranasais, faringe, tonsilas, adenoides, laringe e traqueia, filtra e aquece o ar inspirado, e o trato respiratório inferior, formado pelos pulmões, realiza as trocas gasosas que compreende a entrega de oxigênio para os tecidos, através da corrente sanguínea, e a excreção de dióxido de carbono pela expiração (LEFF; SCHUMACKER, 1993).

A traqueia é um órgão tubular oco que se localiza ventralmente ao esôfago e se estende da laringe para formar caudalmente os dois principais brônquios (os brônquios primários), cada um deles penetrando nos pulmões direito e esquerdo. Essa estrutura tem aproximadamente 6 a 15 cm de comprimento e 1,5 a 2 cm de diâmetro no homem adulto, contendo 15 a 20 estruturas cartilaginosas rígidas hialinas em forma de C que são fundamentais para a manutenção de sua forma (WEST, 1992).

O diâmetro do canal varia ligeiramente conforme o estado de contração ou relaxamento dos músculos das paredes, controlados de maneira involuntária e

inconsciente pelo sistema nervoso autônomo, de modo a adaptar a passagem de ar às necessidades de cada momento. Deste modo, o comprimento e o diâmetro da traqueia variam ligeiramente em conformidade com os movimentos respiratórios (LEFF; SCHUMACKER, 1993).

Na face voltada para o esôfago não existem anéis cartilagosos e sim tecido muscular composto por uma camada de feixes de fibras lisas com ramificações mínimas e orientação transversal. Esses anéis são separados por espaços interfasciculares de dimensões variadas contendo colágeno, elastina, fibroblastos, axônios, vasos sanguíneos e mastócitos, podendo também ser encontrado musculatura lisa (WEST, 1992).

O músculo liso tem essa denominação pela ausência de estriações como as existentes nos músculo esquelético e cardíaco. Ele é encontrado forrando a parede de vários órgãos no corpo humano como, por exemplo, vasos sanguíneos, estômago, intestinos, bexiga, útero e vias aéreas. O músculo liso presente na traqueia é o principal efetor no controle do calibre dessa via e na resistência à passagem de ar, regulando o tônus broncomotor, por isso torna-se crucial a presença de um estado de equilíbrio entre o estímulo de contração e relaxamento. O controle da atividade contrátil do músculo liso pode ser efetuado por uma variedade de fatores como hormônios, drogas, estiramento, além de marcapasso, no entanto, é realizado predominantemente o controle neural do músculo liso pelo sistema nervoso autônomo através da estimulação adrenérgica e colinérgica (HAKONARSON; GRUNSTEIN, 2003).

Semelhante ao músculo esquelético, o músculo liso é formado por filamentos contráteis, actina e miosina (principal componente do filamento grosso) e filamentos não contráteis. No músculo liso é encontrada a miosina-II que possui duas cadeias pesadas e quatro cadeias leves, com atividade ATPase lenta. A actina compõe os filamentos finos e está associada à tropomiosina, à caldesmon (CaD) e à calponina (CaP). A tropomiosina está colocada entre duas hélices de actina e é responsável por modificar a atividade ATPase da junção actomiosina. A caldesmon é uma proteína que direciona e estabiliza o acoplamento actomiosina, podendo atuar também como inibidora da atividade ATPase da actomiosina, impedindo o movimento do filamento de actina. A calponina tem uma função similar à caldesmon, diferindo no sítio de ligação (CaD – domínios terminais; CaP – domínio central), contudo, pode ser fosforilada pela Proteína quinase C (PKC) levando à perda dessa função. A calmodulina (CaM) é uma proteína que apresenta quatro sítios de ligação para o cálcio e compõe o papel de

receptor intracelular. Ela tem várias funções no músculo liso, destacando-se a de ativar os ciclos de pontes cruzadas (MARTHAN, 2004).

As patologias que acometem o sistema respiratório incluem doenças relacionadas ao pulmão, à cavidade pleural, brônquios, traqueia, vias aéreas superiores, nervos e músculos da respiração, sendo o músculo liso um dos principais alvos para o desenvolvimento dessas fisiopatologias. Como exemplo dessas doenças temos a pneumonia, hipertensão arterial pulmonar, asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Dentre estas, a asma e DPOC (compreendendo bronquite crônica e enfisema pulmonar) estão entre as doenças crônicas mais comuns em todo o mundo e há indícios de que a prevalência delas deve aumentar nos próximos anos (PAULUHN; MOHR, 2005).

Hoje se sabe que a contração do músculo liso das vias aéreas é o fator chave para a manifestação do sinal mais clássico da asma e da DPOC: o aumento da resistência à passagem do ar expirado. Essa resistência é decorrente da obstrução parcial das vias aéreas deflagrada por um estímulo não específico, como exercício físico, mudanças bruscas de temperatura do ambiente, exposição a alérgenos variados, que estimulam a liberação de acetilcolina, histamina, prostanoídes e outros mediadores endógenos ativando seus respectivos receptores farmacológicos, dando origem a eventos de sinalização intracelular que culminam com a contração deste músculo (PAULUHN; MOHR, 2005).

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 (SANDERSON et al., 2008).

3.7 Contração e Relaxamento do Músculo Liso

Tanto a contração quanto o relaxamento no músculo liso estão relacionados, respectivamente, com o aumento e a diminuição da concentração citoplasmática de cálcio (Ca^{2+}), proveniente tanto do meio intracelular quanto do extracelular. Para isto ocorrer é necessário haver um estímulo que resulte no evento contrátil, acoplamento excitação-contração, provenientes de mecanismos que envolvem o potencial

transmembrana (acoplamento eletromecânico) ou a ativação de receptores através de agonistas (acoplamento farmacomecânico) ou por esses dois mecanismos juntos. O resultado final do processo de contração da célula muscular lisa é a ativação mecânica das proteínas contráteis miosina e actina (WEBB, 2003).

O que determina se serão utilizadas fontes intracelulares e/ou extracelulares de Ca^{2+} para a contração do músculo liso é o tipo de estímulo utilizado. Fontes extracelulares dependem da despolarização da membrana e as intracelulares do estímulo de agonistas. A principal fonte de cálcio intracelular (Ca^{2+}_i) é o retículo sarcoplasmático (RS), através da ativação dos receptores de IP_3 (IP_3R), e a fonte de Ca^{2+} extracelular é o líquido intersticial, onde o influxo de Ca^{2+} se deve à presença na membrana plasmática dos canais específicos para Ca^{2+} aberto por voltagem de (Ca_v). A concentração do Ca^{2+} no meio celular se altera em resposta a uma diversidade de sinais ativando um vasto número de moléculas efetoras a desencadeando a contração (SANDERSON et al., 2008).

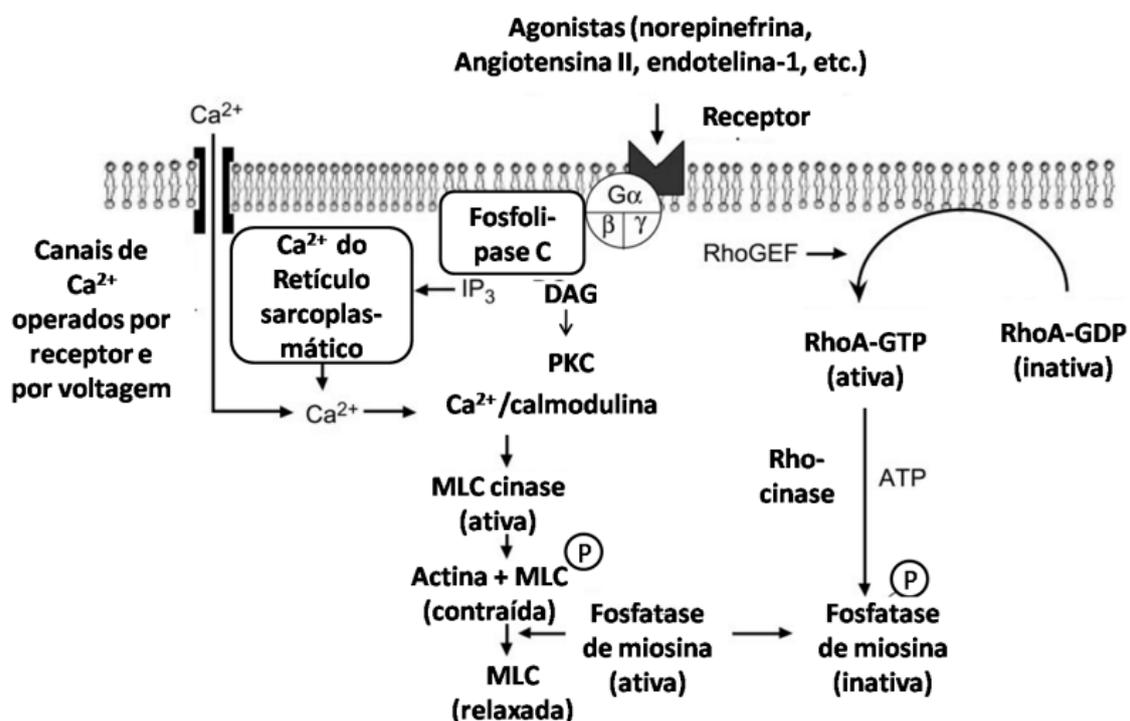
O acoplamento eletromecânico é originado a partir da estimulação elétrica, aumento na concentração extracelular de potássio (K^+) e diminuição intracelular de sódio (Na^+), ou ativação dos canais iônicos da membrana plasmática dependentes de estiramento, que ao atingir o limiar excitatório dispara o potencial de ação, levando a uma mudança no potencial de membrana (V_m). Como resultado temos o aumento do influxo de Ca^{2+} por meio da abertura em especial dos Ca_v , favorecendo a ligação do Ca^{2+} à calmodulina (CaM). O complexo originado dessa junção, cálcio-calmodulina ($[(\text{Ca}^{2+})_4\text{-CaM}]$), ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) a fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC), liberando energia em forma de ATP, que promove a interação das pontes cruzadas e o deslizamento entre os filamentos de actina e miosina através da atividade da ATPase da miosina, conduzindo assim a contração (SOMLYO; SOMLYO, 1990).

O mecanismo farmacomecânico da contração envolve vários agonistas (hormônios, neurotransmissores, etc.) promovendo a liberação de Ca^{2+} via mensageiros secundários intracelulares. Os agonistas se ligam a receptores de membrana acoplados à proteína G aumentando a atividade da fosfolipase C (PLC) que, por seguinte, ativa a produção de dois segundos mensageiros potentes oriundos dos lipídios de membrana, 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e do diacilglicerol (DAG). O IP_3 liga-se a seu receptor IP_3R no RS permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, o que favorece a

formação do complexo $[(Ca^{2+})_4-CaM]$, disparando o início do mecanismo contrátil. Já o DAG, juntamente com o Ca^{2+} , ativa a proteína quinase C (PKC). O aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura dos canais Ca^{2+}_v induz a liberação de mais Ca^{2+} através dos canais de rianodina presente na membrana do RS (Figura 1) (MITCHELL, 2009).

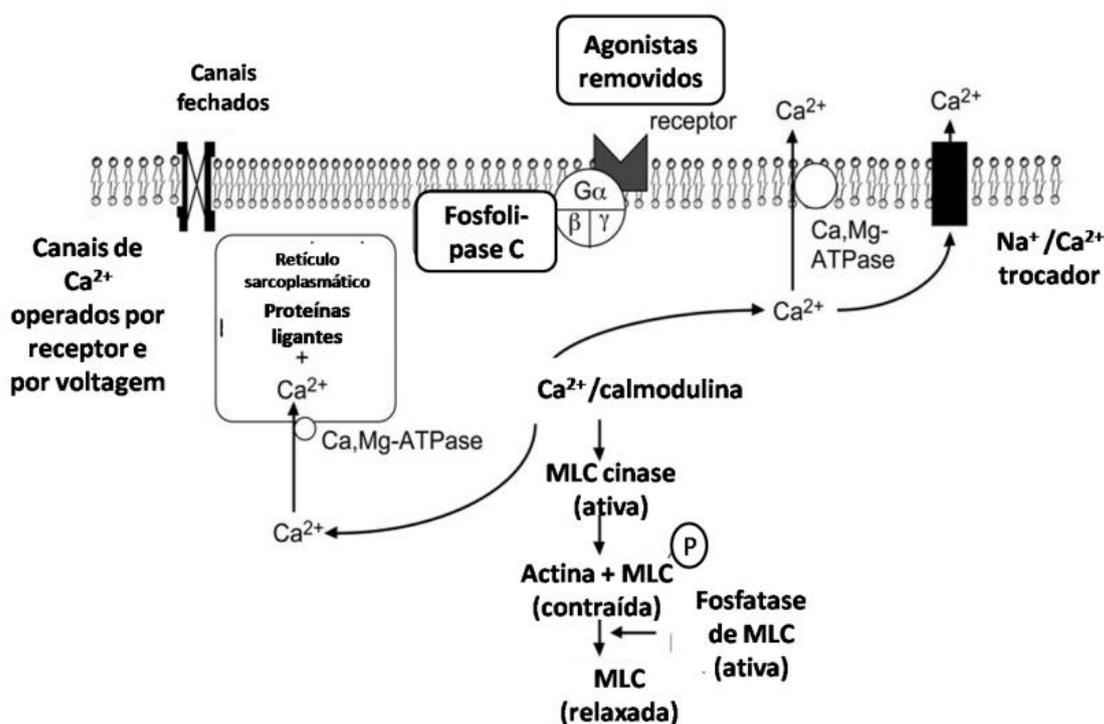
A elevação da concentração do Ca^{2+}_i é passageira, dependente da fosforilação da MLC, e a resposta contrátil é mantida por um mecanismo sensibilização de Ca^{2+} promovido pela inibição da miosina-fosfatase, através da Rho-quinase (Rho-K), enzima alvo da Rho (proteína monomérica G), cuja ativação favorece a contração, enquanto que sua inibição induz o relaxamento em segmentos isolados de músculo liso contraídos por diferentes agonistas (SOMLYO; SOMLYO, 1994). Quando a Rho, proteína de ligação ao trifosfato de guanosina (GTP), ultrapassa a membrana na célula e ativa a Rho-K, esta fosforila e inativa a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), promovendo assim um aumento do tempo de contração por acúmulo em rede de cadeias leves de miosina fosforiladas (MBIKOU et al., 2011).

Figura 1. Regulação da contração do músculo liso. Fonte: Webb, 2003.



O relaxamento do músculo liso ocorre tanto pela remoção do estímulo contrátil quanto pela ação direta de uma substância que iniba o mecanismo contrátil, por exemplo, vários subtipos de fosfatases ou ativação da guanilil ciclase pelo óxido nítrico (NO), monóxido de carbono ou peptídeo natriurético atrial. Todos esses processos envolvem a redução dos níveis intracelulares de Ca^{2+} e o aumento na atividade da MLCP promovendo a remoção do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) ou do monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (Figura 2) (LIU, 2009).

Figura 2. Relaxamento do músculo liso. Fonte: Webb, 2003.



Os canais de membrana através dos quais ocorre a entrada de Ca^{2+} do meio externo foram subdivididos em canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCCs), canais de Ca^{2+} operados por receptor (ROCCs), canais para Ca^{2+} operados por estoques (SOCCs), canais para Ca^{2+} ativados por estiramento e canais para Ca^{2+} tipo L (MARTHAN, 2004).

Vários são os mecanismos de remoção do Ca^{2+} citosólico que envolvem diretamente a membrana do citoplasma e a do RS. Como exemplo podemos citar a

proteína Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase que, quando fosforilada, liga-se a dois íons Ca^{2+} e os transportam para a face luminal do retículo ou para fora da célula muscular (WEBB, 2003). O aumento da extrusão ou do seqüestro de Ca^{2+} pelo RS presumivelmente se dá pela: fosforilação das bombas de Ca^{2+} dependentes do GMPc; aumento da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; a fosforilação das pontes cruzadas e o aumento das concentrações celulares de AMPc, levando ao aumento da probabilidade de abertura de canais de potássio ativados por cálcio (KCa) e canais de potássio ativados por ATP (KATP); o aumento de GMPc, levando a abertura de canais de K^+ , ambos produzindo conseqüentemente hiperpolarização, que reduz a entrada de Ca^{2+} pelos canais tipo L (HIROTA; HELLI; JANSSEN, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material Botânico

A espécie *Lippia alnifolia* Schauer foi coletada em seu hábitat natural, em Feira de Santana no Estado da Bahia, sobre o número K000017050 da exsicata, com o registro da data da coleta, localização geográfica das espécies, condições climáticas e demais observações que foram julgadas relevantes (Figura 3). O material botânico foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) e identificado pela Profa. Dra. Tânia Regina Silva.

Foi utilizado o óleo essencial obtido das folhas da espécie *Lippia alnifolia* Schauer, previamente processados e fornecidos pelos colaboradores do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON), da UEFS, chefiados pela Dra. Tânia Regina Silva.

Figura 3. Exsicata da espécie *Lippia alnifolia* Schauer.



4.1.2 Animais

Foram utilizadas para os ensaios de avaliação da atividade espasmolítica *in vitro* em traqueia, quarenta cobaias (*Cavia porcellus*) adultas, de ambos os sexos, pesando entre 300 e 500 g, todas procedentes do Biotério Central da UNIVASF. Antes dos experimentos os animais foram mantidos em caixas adequadas contendo maravalha e sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo “pellets”, com livre acesso a água, com ventilação e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 h, sendo o período claro das 06:00 às 18:00 h. Todos os experimentos foram realizados no período de 07:00 às 20:00 h.

4.1.3 Aspectos éticos

Todos os experimentos previstos neste trabalho foram executados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIVASF (CEUA-UNIVASF) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) após sua submissão pelo protocolo de nº 0002/181113 para o julgamento da utilização de animais de laboratório no modelo experimental proposto, tendo parecer favorável (ANEXO).

4.1.4 Substâncias e Sais

Quadro 1 – Substâncias, sais e seus fornecedores.

SUBSTÂNCIAS	FORNECEDORES
Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	Labsynth, Brasil
Sulfato de magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Proquímios, Brasil
Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)	
Cloreto de potássio (KCl)	Dinâmica, Brasil
Cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Isofar,

Fosfato de potássio hidratado ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Brasil
Cloreto de sódio (NaCl)	Vetec,
Álcool Etilico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)	Brasil
Cremofor EL	Sigma-Aldrich TM ,
Histamina	USA.
Indometacina	Hipolabor,
TEA	Brasil
Propranolol	Merck,
Glibenclamida	Brasil
L-NAME	União Química,
Carbacol	Brasil
4-Aminopiridina	Fluka
Dexametasona	Riedel-de Haën, Germany

Todas as substâncias foram solubilizadas em água pura ou, quando não foi possível, em solventes adequados indicados pelos seus fabricantes, desde que esses não fossem tóxicos em demasia para o órgão isolado usado neste estudo.

Todos os agonistas e bloqueadores utilizados também foram dissolvidos de acordo com a recomendação do fabricante e mantidos em soluções estoque a temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$, sendo a diluição necessária realizada em água destilada no momento do experimento.

4.1.5 Soluções Nutritivas

Para os experimentos de contração e relaxamento do músculo liso de traqueia, utilizou-se solução nutritiva de Krebs, aerada com mistura carbogênica (95 % de O_2 e 5 % de CO_2) e mantida a temperatura constante de $37 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. O pH era ajustado para valores entre 7,2 e 7,4 com solução de HCl ou NaOH (1N). A composição desta solução está descrita a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da solução Krebs.

Substâncias	Concentração (mM)
NaCl	118
KCl	4,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	5,7
KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5
Glicose	11
NaHCO ₃	25

4.1.6 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas os segmentos dos órgãos isolados foram suspensos em cubas (10 mL) de um sistema de banho para órgãos isolados modelo EFF-321 (Insight[®] Instruments, Brasil). Para o monitoramento das contrações isotônicas foram utilizados transdutores de força modelo TRO015 (Panlab[®], S.L., Espanha) acoplados a um amplificador de força do tipo “bridge system” (Insight[®] Instruments, Brasil), conectado a um computador, onde foram observados e armazenados os registros de contração e relaxamento através do software DATAQ.

Para aferição do pH das soluções nutritivas foi utilizado um pHmetro digital de bancada modelo pH250 (Policontrol[®], Brasil). Todas as substâncias foram pesadas em balança analítica modelo FA2104N (Celtac[®], Brasil) ou semi-analítica modelo MARK300 (Bel[®], Brasil) e os animais em balança comum modelo 9094C/4 (Toledo[®], Brasil).

4.1.7 Preparação do óleo para os ensaios farmacológicos

O óleo foi solubilizado em cremofor e diluídos em água destilada (pH 7,0) para obtenção da solução estoque (10 mg/mL) que foi armazenada em um “freezer” entre -18 e -20 °C. A concentração final de cremofor na cuba nunca excedeu 0,01 % (V/V), nesta concentração o cremofor é desprovido de efeito contrátil ou relaxante. No momento da

realização dos ensaios experimentais esta solução foi diluída de acordo com a exigência de cada protocolo experimental.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do experimento *in vitro* em traqueia de cobaia

As cobaias foram eutanaziadas por deslocamento cervical seguida por secção dos vasos cervicais, sendo o tórax aberto e dissecado, com a traqueia retirada e adicionada a uma placa de Petri com solução de Krebs aerada com mistura carbogênica, para a realização da limpeza de todo o tecido conjuntivo e adiposo. O órgão foi dividido em 4 segmentos contendo de 4 a 5 anéis cartilagosos cada, conectados a transdutores de força através de linhas de algodão, com o auxílio de hastes de aço inoxidável, e foram suspensos individualmente em cubas de vidro (10 mL) de um banho de órgãos contendo solução nutritiva de Krebs preparada no dia do experimento, a 37 °C e aerada com carbogênio.

As contrações isotônicas foram registradas através de transdutores de força conectados a um amplificador, que por sua vez foi conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador executando o programa WinDaq.

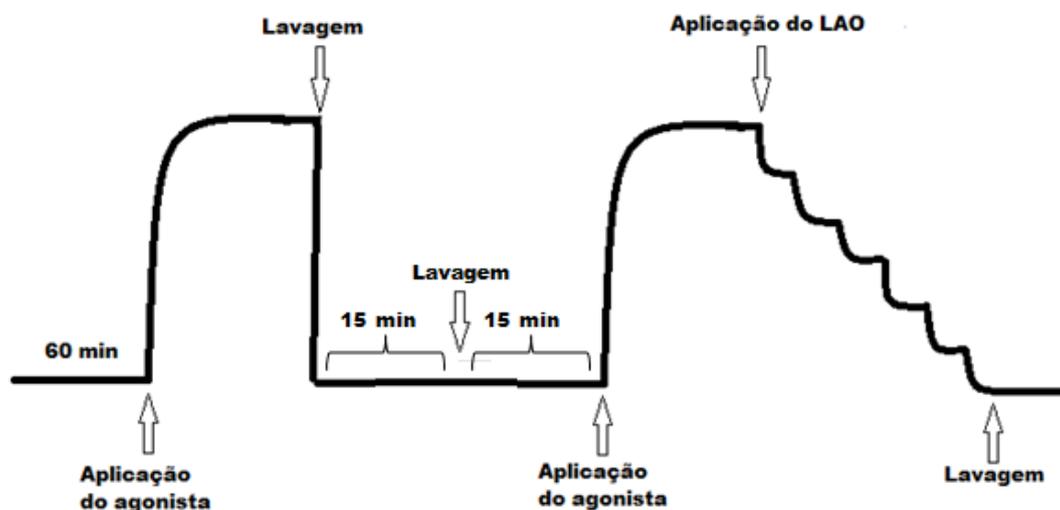
Foram utilizados para cada protocolo experimental um n de 5 animais e os dados obtidos dos registros foram plotados em curvas concentração-resposta e estas ajustadas por regressão não linear no *software* Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), para obtenção do valor da CI_{50} (concentração do óleo capaz de inibir 50% de seu efeito máximo) servindo como parâmetro de potência relativa de uma amostra, que é definido como a razão entre as concentrações necessárias para alcançar o mesmo efeito; e o E_{max} (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido pelo óleo em relação ao maior valor possível num dado tecido) servindo como parâmetro de eficácia relativa de sua amostra.

4.2.2 Avaliação da atividade espasmolítica *in vitro* em traqueia de cobaia

A traqueia foi montada como descrito anteriormente no item 4.2.1, e os tecidos foram deixados em repouso por 60 minutos, sob uma tensão de 1 g a 37 °C e aeração constante com mistura carbogênica, sendo a solução de Krebs substituída a cada 15 minutos. Após o período de estabilização uma primeira contração foi induzida pela adição em cada cuba de um dos agonistas: carbacol (CCh) a 1 μ M, histamina (HIS) a 1 μ M ou cloreto de potássio (KCl) a 60 mM, sendo a solução nutritiva do órgão substituída após atingir a contração máxima e após 15 minutos de repouso.

Após o tecido estar estabilizado, uma segunda contração foi induzida com o mesmo agonista na mesma concentração, e durante o componente tônico dessa foi adicionado individualmente o óleo de *Lippia alnifolia* (LAO), de maneira cumulativa em concentrações crescentes (1 a 729 μ g/mL). Os relaxamentos foram expressos como a porcentagem reversa da tensão máxima inicial induzida pela adição do agonista à cuba, onde o relaxamento máximo será obtido quando a tensão registrada for reduzida aos níveis basais (Figura 4).

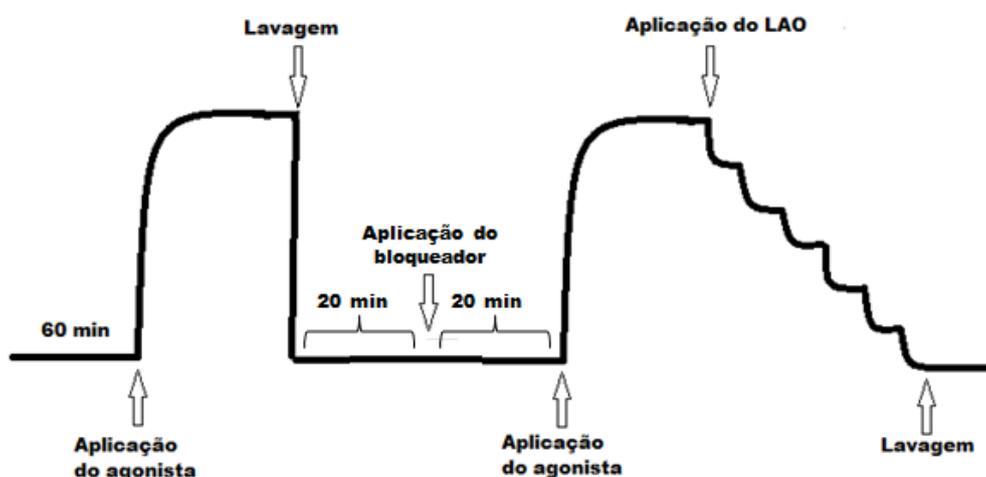
Figura 4. Esquema do protocolo utilizado para investigar o efeito do LAO frente às contrações isotônicas induzidas pelos agonistas selecionados. Fonte: Autoria própria.



4.2.3 Investigação *in vitro* do possível mecanismo de ação do LAO em traqueia de cobaia

Para a investigação do mecanismo de ação foi utilizado o agonista em que o LAO apresentou o CI_{50} mais potente. Os órgãos foram montados conforme descrito anteriormente no item 4.2.1 e 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com o agonista de melhor resposta, as preparações foram expostas a um bloqueador. Os bloqueadores utilizados nos ensaios foram: inibidores dos canais para K^+ ativado por ATP (K_{ATP}), glibenclamida (GLI), na concentração de $3 \mu M$, Tetraetilamônio (TEA), na concentração de 5 mM e 4-aminopiridina (4-AP), na concentração de 2 mM ; inibidor da óxido nítrico sintase, N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), na concentração de $10 \mu M$; antagonista β -adrenérgico não seletivo, propranolol (PRP), na concentração de $3 \mu M$; inibidor não seletivo da cicloxigenase, indometacina (IND), na concentração de $10 \mu M$; e o inibidor da síntese proteica e fosfolipase A2, dexametasona (DEX), na concentração de $10 \mu M$. Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fase tônica, a amostra foi adicionada às cubas, em diferentes preparações, de maneira cumulativa em concentrações crescentes, sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência dos bloqueadores (Figura 5).

Figura 5. Modelo representativo utilizado para investigar o mecanismo de ação do LAO frente às contrações isotônicas induzidas por carbacol. Fonte: Autoria própria.



4.2.4 Análise estatística dos dados

Os dados numéricos obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm e.p.m$). O valor de “n” refere-se ao número de animais utilizados ou experimentos realizados em um dado protocolo, de modo que o resultado obtido possa ser representativo e ao mesmo tempo não se use animais em demasia. Diferenças entre as médias dos experimentos *in vitro* foram comparadas estatisticamente usando o teste “t” de Student não-pareado como parâmetro estatístico, após Tukey pós-teste, onde essas diferenças foram consideradas significantes quando o valor calculado de “p” foi menor que 0,05. Para as análises estatísticas de variância foi utilizada ANOVA. Todos os cálculos foram realizadas com o programa Graph-Pad Prism© versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Para os experimentos *in vitro*, usando órgãos isolados, as curvas mostrando a relação concentração-resposta de uma substância foram ajustadas por uma regressão não-linear descrita pela equação: $Y = \min + (\max - \min) / (1 + 10^{(\log EC_{50} - X) * S})$; onde “X” é o logaritmo na base 10 da concentração molar da substância testada, “Y” é a resposta relaxante da substância testada em percentagem, “min” é o menor efeito assumido para “Y”, “max” é o maior efeito assumido para “Y” e “S” é o valor da constante de Hill (MOTULSKY; CHRISTOPOULOS, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente trabalho investigou o possível efeito espasmolítico do óleo essencial de *Lippia alnifolia* Schauer (LAO), dependente da sua concentração, em anéis de traqueia de cobaia pré-contraídas por agonistas utilizados como padrão e determinou o possível mecanismo de ação sobre esse órgão. Para atender os objetivos propostos foram realizados protocolos experimentais *in vitro* para determinar o perfil farmacológico da espécie *L. alnifolia*, testando o óleo essencial de suas folhas sobre a traqueia de cobaias.

5.1 Estudo da possível atividade espasmolítica do óleo de *Lippia alnifolia* em traqueia de cobaia

As preparações de traqueia de cobaias foram expostas a várias concentrações do óleo do LAO adicionado cumulativamente para se demonstrar e caracterizar o efeito relaxante desta substância após contração induzida pelos agonistas: histamina (HIS), carbacol (CCh) e cloreto de potássio (KCl), utilizados como padrão, e obter a sua concentração inibitória de 50% (CI₅₀) para esse tipo de tecido.

5.1.1 Investigação do efeito das concentrações crescentes do óleo de *L. alnifolia* sobre anéis de traqueia de cobaia frente às contrações tônicas induzidas por diferentes agonistas

Analisando os resultados obtidos inicialmente podemos constatar que o LAO é capaz de promover eficiente relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos pelos agonistas CCh 1 μ M, HIS 1 μ M e KCl 60 mM de maneira dependente de concentração (1 a 729 μ g/mL) (Figura 6). Comparando o perfil espasmolítico desses agonistas entre si através dos valores da CI₅₀, constata-se que quem apresenta maior potência para relaxar a traqueia de cobaias é a HIS com valores expressivamente menores (teste ANOVA, $p < 0,05$) (Gráfico 1), apresentando a melhor resposta da CI₅₀ de $39,19 \pm 11,09$ %, em relação ao CCh com CI₅₀ de $42,10 \pm 11,59$ % e ao KCl com

CI₅₀ de $86,53 \pm 10,04$ %, não havendo diferença estatística entre a HIS e o CCh (Gráfico 2).

Figura 6. Registro original representativo do efeito relaxante do LAO sobre as contrações tônicas induzidas por agonistas em anéis de traqueia de cobaia. Os números representam os pontos de aplicação do LAO durante o curso temporal nas seguintes concentrações: (1) 0,00 µg/mL, (2) 0,47 µg/mL, (3) 0,95 µg/mL, (4) 1,43 µg/mL, (5) 1,90 µg/mL, (6) 2,38 µg/mL e (7) 2,86 µg/mL. Fonte: Autoria própria.

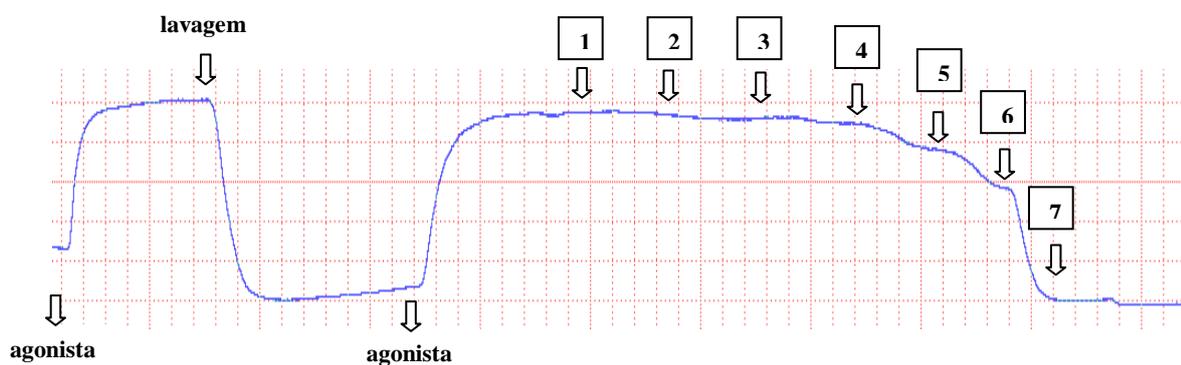


Gráfico 1 - Valores da CI₅₀ do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-incubados pelos agonistas. As colunas e barras verticais representam a média e o e.p.m, respectivamente, *p < 0.05 (n = 5). Teste ANOVA.

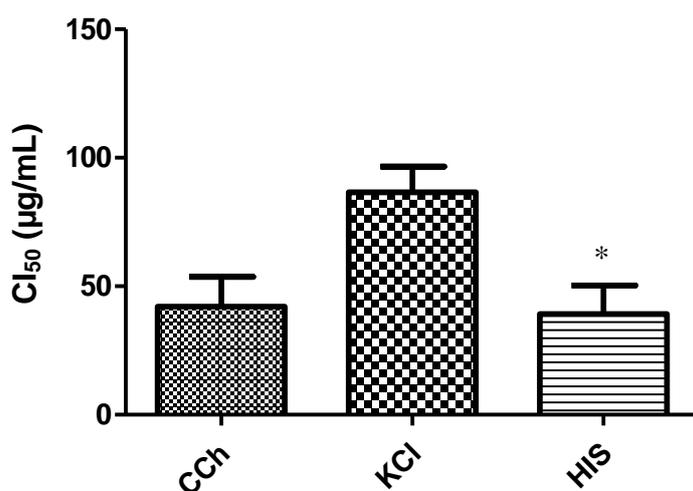
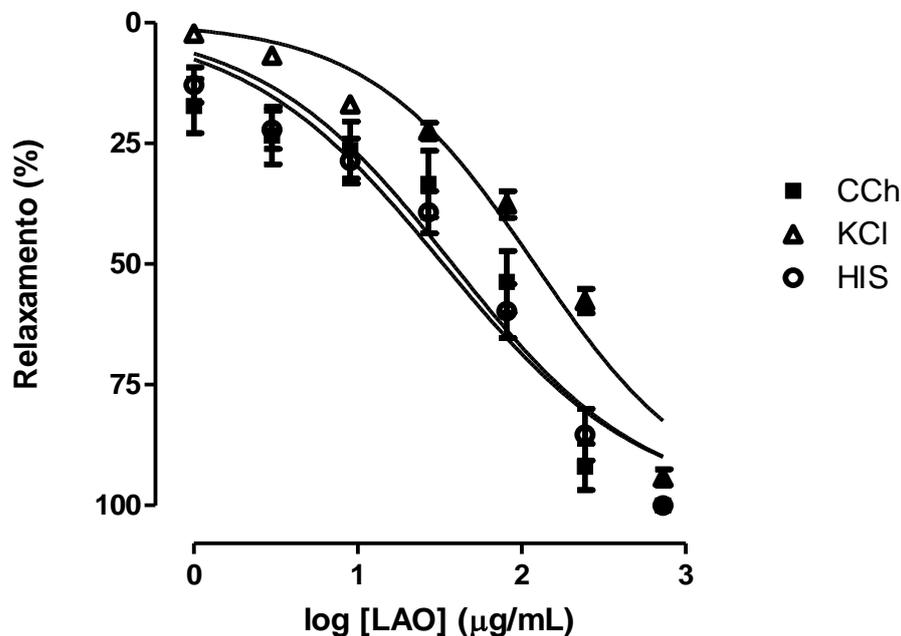


Gráfico 2 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos pelos agonistas CCh 1 μ M, HIS 1 μ M e KCl 60 mM. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$ (n = 5). Teste ANOVA.



Observa-se que o LAO reduz aos valores basais a contração induzida na presença da HIS e do CCh, atingindo o valor médio em percentagem do efeito máximo obtido pela amostra ($E_{m\acute{a}x}$) de 100 % entre as concentrações 2,38 e 2,86 μ g/mL quando adicionado concentrações cumulativas crescentes, enquanto o KCl alcançou o $E_{m\acute{a}x}$ de 82 % na concentração 2,86 μ g/mL, sendo os valores do $E_{m\acute{a}x}$ obtidos pela HIS e o CCh significativamente superiores quando comparados todos os agonistas entre si.

Vários constituintes provenientes de plantas utilizadas na medicina popular são empregados no tratamento de enfermidades e, considerando que, a identificação de espécies com atividade relaxante de músculos lisos é estratégica na pesquisa em produtos naturais, ressalta-se a importância desse trabalho na identificação dos efeitos farmacológicos do óleo da *L. alnifolia*, uma espécie nativa e endêmica da caatinga, ainda pouco investigada, como uma possível fonte de metabólitos secundários de interesse econômico.

5.2 Investigação do possível mecanismo de ação espasmolítico do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Através dos ensaios preliminares realizados foi demonstrado que o LAO exibe melhor efeito espasmolítico frente ao agonista CCh, tão significativo quanto frente a HIS, com variação na CI_{50} , e o agonista que apresentou melhor resposta foi utilizado para investigar mais detalhadamente o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação relaxante do LAO sobre traqueia de cobaias, sendo o CCh o agonista eleito para realização dos testes.

O CCh é um agonista dos receptores muscarínicos e ao ativá-los desencadeia o aumento de Ca^{2+} no meio intracelular e, conseqüentemente, a contração do músculo liso. A ação do CCh resulta da ligação a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) que ativam a cascata do IP₃, estimulando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares pelo RS e a entrada de Ca^{2+} pela abertura dos seus canais de membrana (Ca_v) (TAKEUCHI et al., 2004).

As drogas escolhidas para averiguar o mecanismo de ação do LAO em preparações de traqueia de cobaia foram as bloqueadoras dos canais para K^+ : tetraetilamônio (bloqueador dos KCa), 4-aminopiridina (bloqueador dos K_v) e glibenclamida (bloqueador dos $KATP$); a inibidora da enzima óxido nítrico sintase: N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME); a antagonista não-seletiva dos receptores β -adrenérgicos: propranolol; a inibidora da síntese proteica e da enzima fosfolipase A₂: dexametasona; e a inibidora não seletiva da enzima cicloxigenase (COX): indometacina.

5.2.1 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito relaxante do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Para averiguar se a ação relaxante do LAO sobre o músculo liso traqueal envolve a participação dos canais para potássio (K^+) foi comparado o relaxamento promovido pelo LAO na presença e na ausência de drogas bloqueadores para canais de potássio: Tetraetilamônio (TEA), na concentração de 5 mM, 4-aminopiridina (4-AP), na

concentração de 2 mM, e glibenclamida (GLI), na concentração de 3 μ M, pré-contraído com CCh, na concentração de 1 μ M.

A adição cumulativa do LAO (1 a 729 μ g/mL) relaxou de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M tanto na presença de 5 mM TEA ($CI_{50} = 16,58 \pm 5,21$ μ g/mL), como na sua ausência ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59$ μ g/mL), de acordo com o gráfico 3.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que não houve uma redução significativa na potência de LAO sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, não sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de TEA (Gráfico 4). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{m\acute{a}x}$) de 100 % atingido na concentração 2,38 μ g/mL.

Gráfico 3 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de TEA. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0,05$ (n = 5). Teste ANOVA.

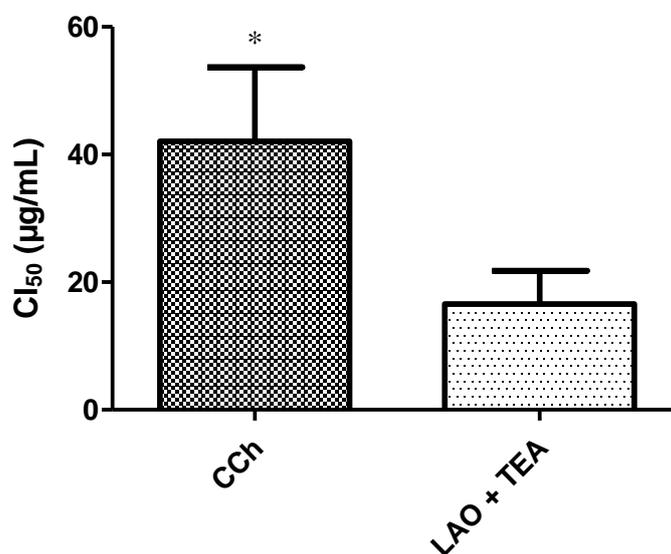
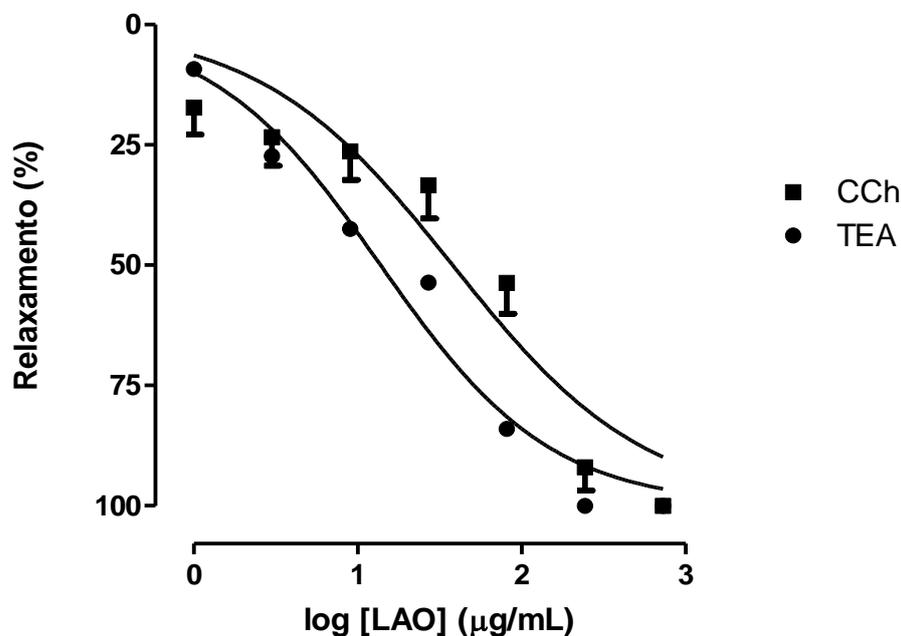


Gráfico 4 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de TEA 5 mM, controle (■) e TEA 5 mM (●). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs TEA).



A adição cumulativa do LAO (1 a 729 μ g/mL) promoveu relaxamento de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M tanto na presença de 2 mM 4-AP ($CI_{50} = 36,17 \pm 7,05$ μ g/mL), como na sua ausência ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59$ μ g/mL), de acordo com o gráfico 5.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que não houve uma redução significativa na potência de LAO sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, não sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de 4-AP (Gráfico 6). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{m\acute{a}x}$) de 100 % alcançado na concentração 1,90 μ g/mL.

Gráfico 5 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de 4-AP. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA.

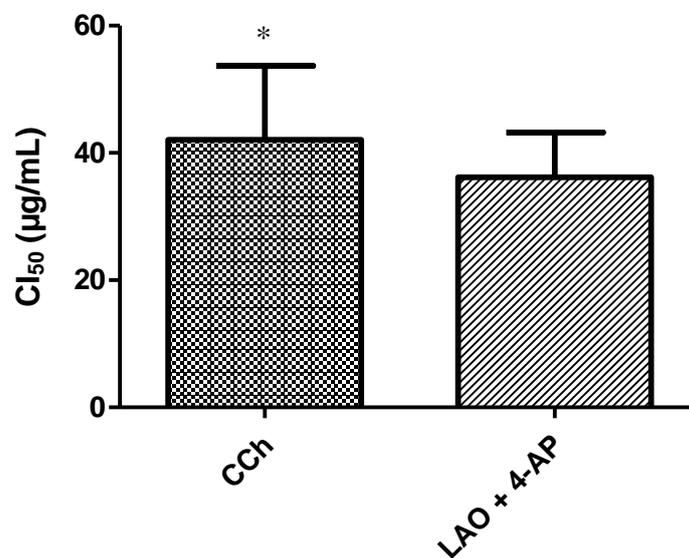
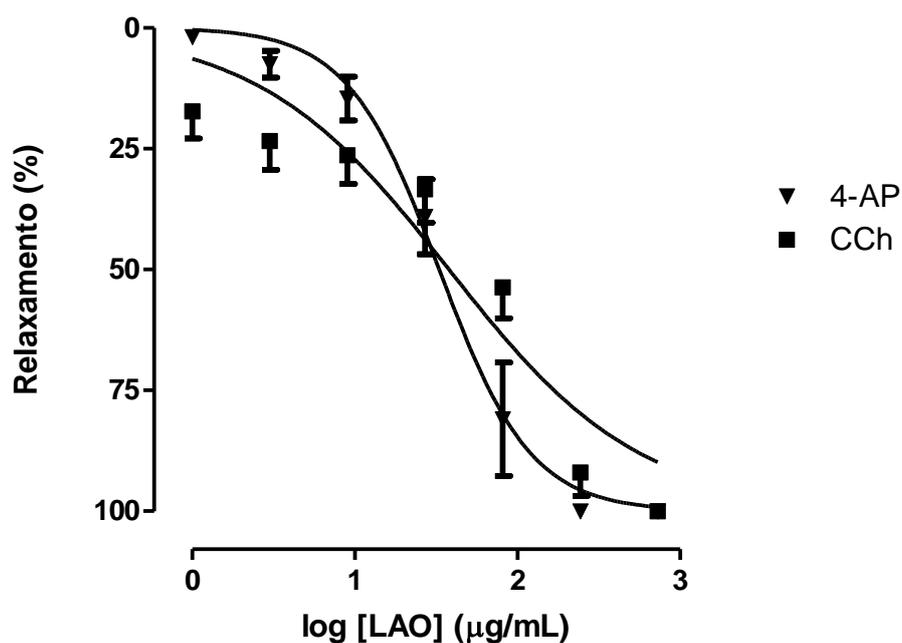


Gráfico 6 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de 4-AP 2 mM, controle (■) e 4-AP 2 mM (▼). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle *vs* 4-AP.



A adição cumulativa do LAO (1 a 729 $\mu\text{g/mL}$) produziu relaxamento de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μM tanto na presença de 3 μM GLI ($\text{CI}_{50} = 67,28 \pm 11,20 \mu\text{g/mL}$), como na sua ausência ($\text{CI}_{50} = 42,10 \pm 11,59 \mu\text{g/mL}$), de acordo com o gráfico 7.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que não houve uma redução significativa na potência de LAO sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, não sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de GLI (Gráfico 8). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{\text{máx}}$) de 100 % atingido na concentração 2,38 $\mu\text{g/mL}$.

Como não houve diminuição significativa da CI_{50} do LAO na presença de drogas bloqueadoras de canais para K^+ , os dados sugerem que sua atividade espasmolítica não está relacionada à participação de canais para K^+ . Portanto, mesmo que essas substâncias promovam a repolarização/hiperpolarização da fibra muscular, o óleo ainda tem a propriedade de relaxar o músculo liso da traqueia.

Os principais canais para K^+ envolvidos na repolarização, quando há deflagração do potencial de ação, ou hiperpolarização, quando as células estão em repouso, das fibras musculares lisas da traqueia são os canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_v), a maior família de canais iônicos sensíveis a voltagem, ativados pelo ATP (KATP) e ativados pelo Ca^{2+} (KCa) (SOTO et al., 2008).

O retorno ao nível basal do Ca^{2+} na célula muscular lisa ocorre em resposta à remoção dos estímulos contráteis: retirada do agonista do receptor de membrana ou ação direta de algumas substâncias que estimulem a inibição do mecanismo contrátil, bem como a repolarização/hiperpolarização pela abertura de outros canais iônicos, resultando na redução da excitabilidade da membrana e, em seguida, o relaxamento muscular (ZHUGE et al., 2010).

De grande importância para tal fenômeno é o movimento dos íons K^+ , através de canais para potássio abertos por voltagem (K_v) presentes na membrana plasmática, contribuindo para a regulação do influxo de Ca^{2+} pelo fechamento dos canais de Ca_v . Os canais para K^+ exercem uma função chave no controle do V_m e da excitabilidade celular, o qual decorre do balanço entre o elevação da condutância ao K^+ , ocasionando

uma hiperpolarização, e a redução da condutância ao K^+ , ocasionando uma despolarização (PEREZ-ZOGHBI et al., 2009).

Gráfico 7 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de GLI. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA.

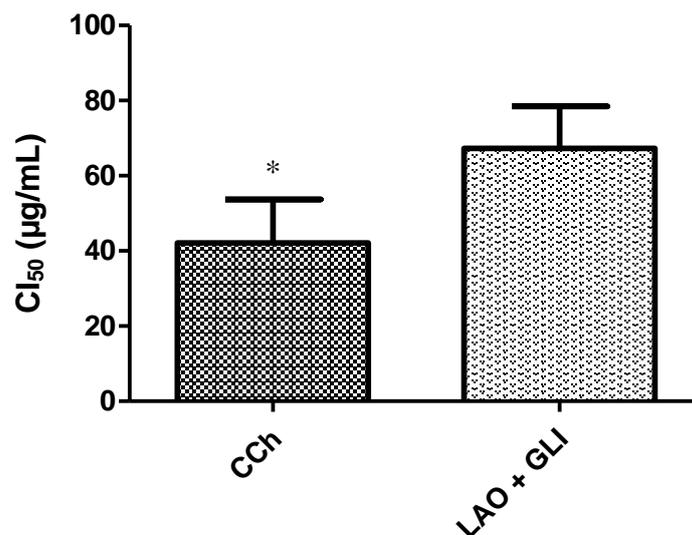
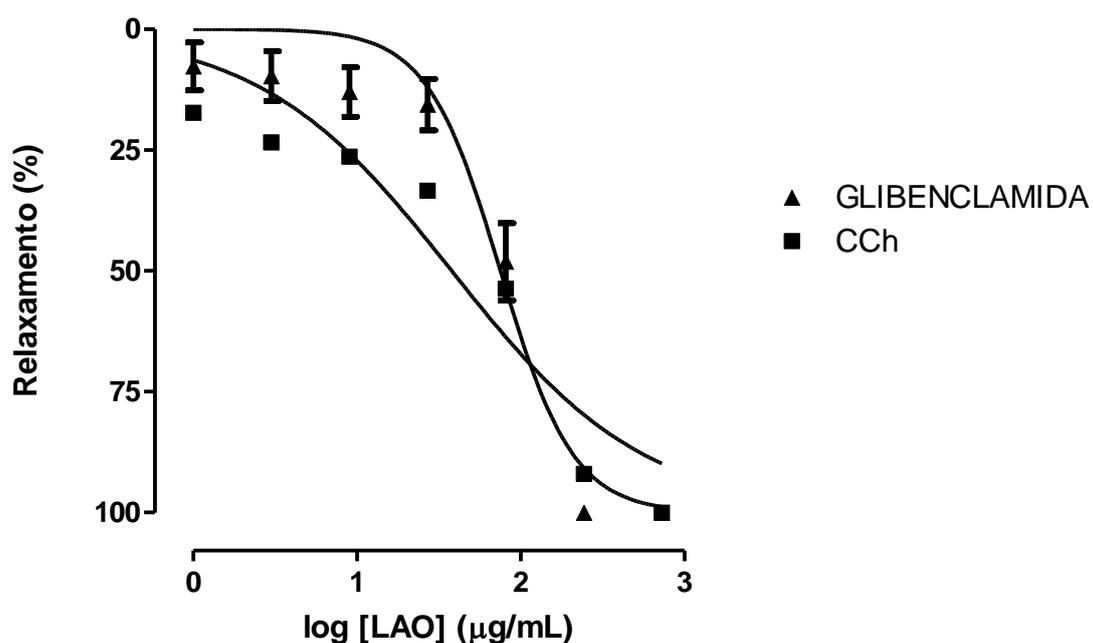


Gráfico 8 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de GLI 3 μ M, controle (■) e GLI 3 μ M (▲). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs GLI.



5.2.2. Avaliação da participação do inibidor da enzima óxido nítrico sintase no efeito relaxante do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Para a avaliação do efeito do LAO na presença do inibidor da enzima óxido nítrico sintase foi utilizada a droga N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), na concentração de 10 μ M, comparada ao controle, CCh, na concentração de 1 μ M.

A adição cumulativa do LAO (1 a 729 μ g/mL) relaxou de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M tanto na presença de 10 μ M L-NAME (CI_{50} = 65,82 \pm 11,40 μ g/mL), como na sua ausência (CI_{50} = 42,10 \pm 11,59 μ g/mL), de acordo com o gráfico 9.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que não houve uma redução significativa na potência de LAO sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, não sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de L-NAME (Gráfico 10). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{m\acute{a}x}$) de 100 % alcançado na concentração 2,38 μ g/mL.

Gráfico 9 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de L-NAME. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0,05$, (n = 5). Teste ANOVA.

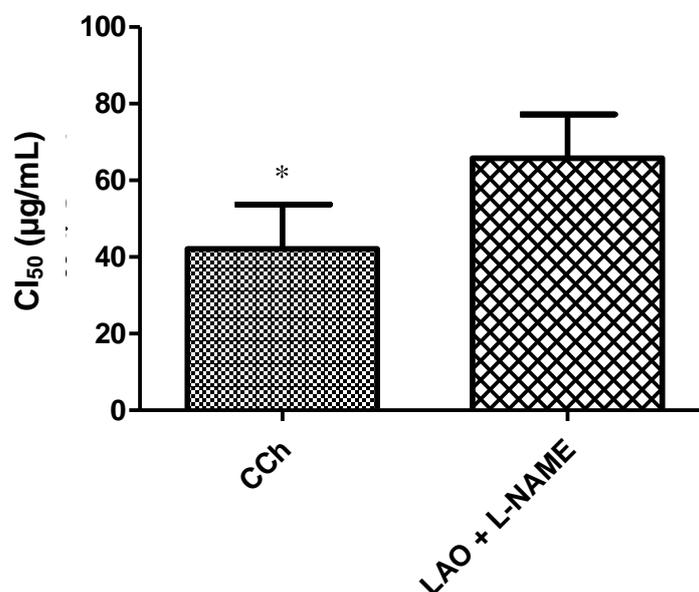
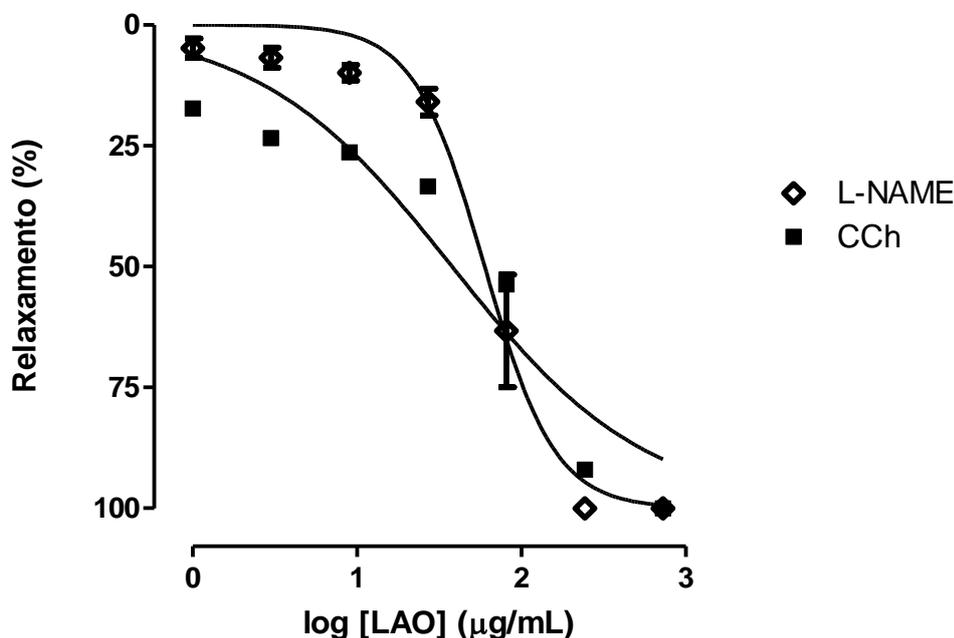


Gráfico 10 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de L-NAME 10 μ M, controle (■) e L-NAME 10 μ M (◊). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs L-NAME.



Está comprovado que diversas doenças estão relacionadas a superprodução de NO, tal como a inflamação que ocorre no processo asmático, e uma das possíveis abordagens terapêuticas consiste na utilização de inibidores da óxido nítrico sintase, responsável pela síntese do NO. Este estimula diretamente a enzima guanilato ciclase (GC) a formar monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) intracelular a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O GMPc ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) na fibra muscular lisa, que fosforila vários alvos intracelulares, resultando no relaxamento (PARENT et al., 2015). Desta forma, o descobrimento de novos inibidores mais potentes e seletivos são extremamente importantes para virem a serem usados como futuros agentes terapêuticos.

Para verificar a influência da produção de óxido nítrico na ação relaxante do LAO sobre o músculo liso da traqueia, comparou-se o relaxamento promovido na presença e na ausência do bloqueador L-NAME frente à contração induzida pelo CCh e observou-se que a CI₅₀ do LAO não sofre alteração significativa na presença do L-NAME, indicando que a inibição não seletiva da enzima óxido nítrico sintase não está relacionado com a atividade espasmolítica do óleo.

5.2.3. Avaliação da participação do antagonista β -adrenérgico não seletivo no efeito relaxante do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Para a avaliação do efeito do LAO na presença do antagonista β -adrenérgico não seletivo foi utilizada a droga propranolol (PRP), na concentração de 3 μ M, comparada ao controle, CCh, na concentração de 1 μ M.

A adição cumulativa do LAO (1 a 729 μ g/mL) relaxou de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contráídos com CCh 1 μ M tanto na presença de 3 μ M PRP ($CI_{50} = 70,99 \pm 22,78$ μ g/mL), como na sua ausência ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59$ μ g/mL), de acordo com o gráfico 11.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que não houve uma redução significativa na potência de LAO sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, não sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de PRP (Gráfico 12). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($Emáx$) de 100 % atingido entre as concentrações 2,38 e 2,86 μ g/mL.

A ligação do propranolol a receptores β -adrenérgicos provoca o bloqueio dos receptores acoplados à proteína Gs, que medeia uma cascata de eventos intracelulares após sua ligação (JOHNSON, 2006). Inibem a ativação da adenilil ciclase (AC), a formação do segundo mensageiro celular, o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), e a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA) que fosforila proteínas celulares específicas, provocando a inibição de agentes estimuladores da contração do músculo liso das vias aéreas (GUO et al., 2014).

Para conferir se a ação relaxante do LAO sobre anéis de traqueia envolve a participação dos receptores β -adrenérgicos, comparou-se o relaxamento promovido na presença e na ausência de propranolol pré-contráído com CCh. Como o LAO não influenciou significativamente a CI_{50} na presença desse bloqueador, os dados indicam que sua atividade espasmolítica não está relacionada ao antagonismo dos receptores β_2 -adrenérgicos.

Gráfico 11 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de PRP. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA.

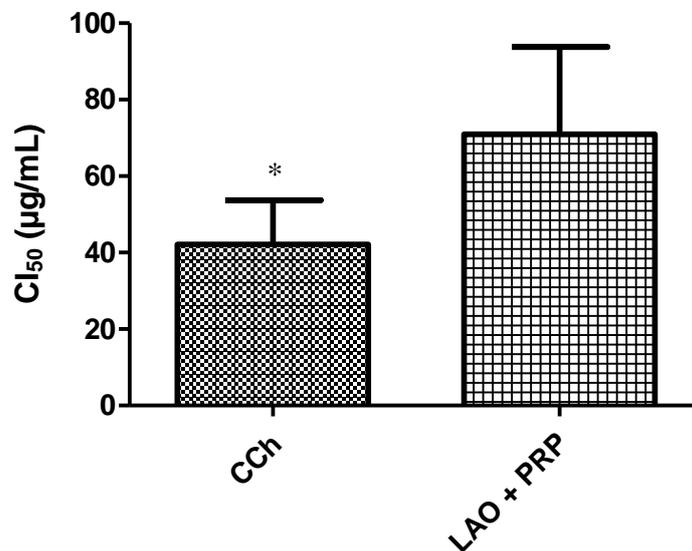
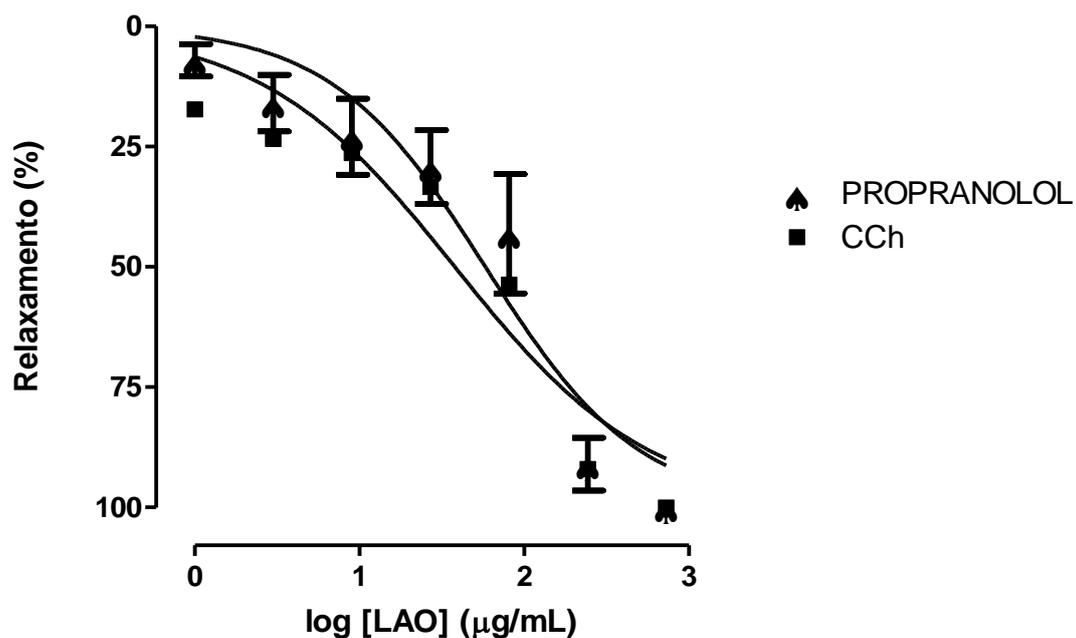


Gráfico 12 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contráídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de PRP 3 μ M, controle (■) e L- PRP 3 μ M (♣). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle vs PRP.



5.2.4. Avaliação da participação do inibidor da síntese proteica e fosfolipase A2 no efeito relaxante do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Para a avaliação do efeito do LAO na presença do inibidor da síntese proteica e fosfolipase A2 foi utilizada a droga dexametasona (DEX), na concentração de 10 μM , comparada ao controle, CCh, na concentração de 1 μM .

A adição cumulativa do LAO (1 a 729 $\mu\text{g/mL}$) relaxou de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μM , tanto na presença de 10 μM DEX ($\text{CI}_{50} = 100,20 \pm 18,98 \mu\text{g/mL}$), como na sua ausência ($\text{CI}_{50} = 42,10 \pm 11,59 \mu\text{g/mL}$), de acordo com o gráfico 13.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que houve uma redução significativa na potência de LAO na ordem de 2 vezes aproximadamente sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de DEX (Gráfico 14). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{\text{máx}}$) de 100 % alcançado entre as concentrações 2,38 e 2,86 $\mu\text{g/mL}$.

O mecanismo de ação dos glicocorticoides acontece quando estes se difundem através das membranas celulares e formam complexos com receptores citoplasmáticos específicos, GR α e β . Estes complexos penetram no núcleo da célula, unem-se ao DNA e estimulam a transcrição do mRNA e a posterior síntese de enzimas, que são as responsáveis por dois tipos de efeitos dos glicocorticóides sistêmicos, ou podem suprimir a transcrição do mRNA em algumas células, por exemplo, linfócitos (HENRY et al., 2005).

Como efeito anti-inflamatório esteroide, o glicocorticoide impede o acúmulo de células inflamatórias, incluindo macrófagos e leucócitos, na zona da inflamação, inibe a fagocitose, a síntese ou liberação de enzimas lisossômicas e mediadores químicos da inflamação, diminui a produção e ação das citocinas, muitas interleucinas e eicosanóides. Como imunossupressor, reduz a concentração de monócitos, eosinófilos e linfócitos dependentes do timo, diminui a produção de IgG e dos componentes do complemento do sangue, reduz a união das imunoglobulinas aos receptores celulares da superfície, bloqueia a síntese ou liberação de interleucinas e diminui a importância da resposta imune primária. Além de estimular o catabolismo protéico, induzir o

metabolismo dos aminoácidos e aumentar a disponibilidade de glicose (BENYAHIA et al., 2012).

A dexametasona atua na inibição da fosfolipase A2 (PLA2) de maneira indireta, através da estimulação da síntese protéica, produzindo a anexina I, e da inibição do fator nuclear (NF- κ B), que induz a expressão da PLA2, evitando assim a liberação do ácido araquidônico a partir de lipídios da membrana plasmática, e deste a prostaglandina E2 (PGE2), responsável pelo relaxamento do músculo liso (SALEH et al., 2008).

Para constatar se a ação relaxante do LAO sobre o músculo liso de traqueia envolve a participação da PGE2, comparou-se o relaxamento promovido na presença e na ausência de dexametasona, uma substância pertence à classe dos anti-inflamatórios esteroidais, frente a contrações induzidas pelo CCh. Este protocolo também apresentou aumento significativo da CI_{50} do LAO na presença de dexametasona ($CI_{50} = 100,20 \pm 18,98 \mu\text{g/mL}$) comparada ao controle ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59 \mu\text{g/mL}$), indicando que o efeito espasmolítico dependente, de alguma maneira, da PGE2.

Gráfico 13 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de DEX. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0,05$, (n = 5). Teste ANOVA.

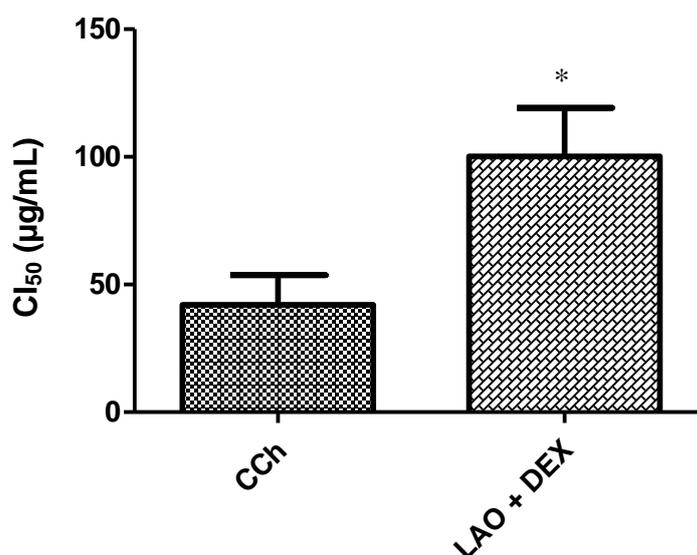
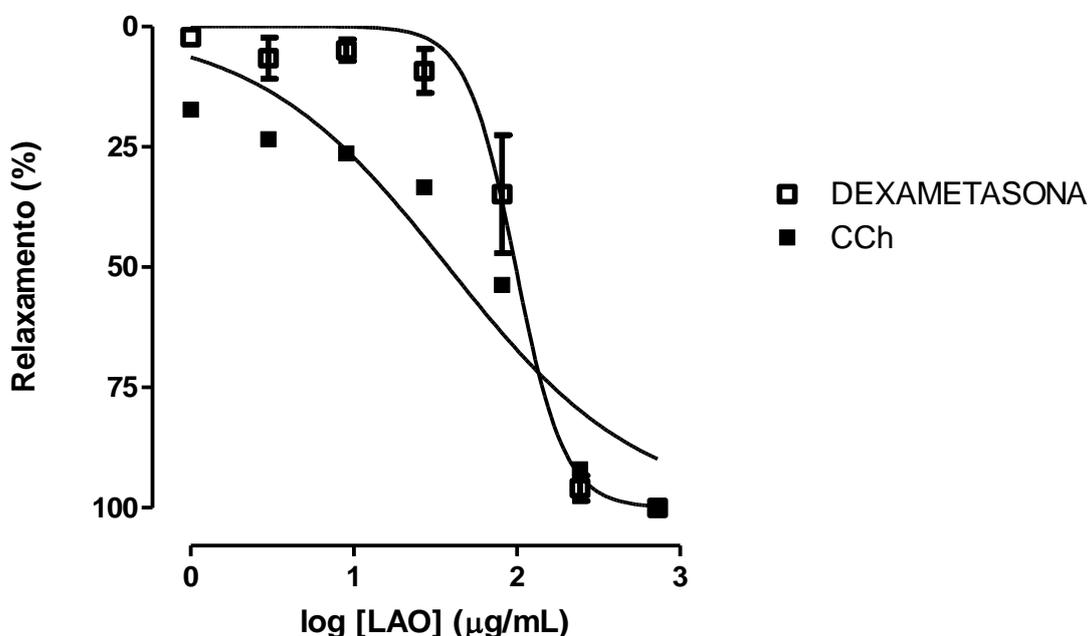


Gráfico 14 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na presença e ausência de DEX 10 μ M, controle (■) e DEX 10 μ M (□). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, (n = 5). Teste ANOVA: controle vs DEX.



5.2.5. Avaliação da participação do inibidor não seletivo da cicloxigenase no efeito relaxante do óleo de *L. alnifolia* em traqueia de cobaia

Para a avaliação do efeito do LAO na presença do inibidor não seletivo da cicloxigenase foi utilizada a droga indometacina (IND), na concentração de 10 μ M, comparada ao controle, CCh, na concentração de 1 μ M.

A adição cumulativa do LAO (1 a 729 μ g/mL) relaxou de maneira dependente da concentração os anéis de traqueia de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M tanto na presença de 10 μ M IND ($CI_{50} = 103.6 \pm 23.98$ μ g/mL), como na sua ausência ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59$ μ g/mL), de acordo com o gráfico 15.

Comparando o valor da CI_{50} do bloqueador em relação ao controle, verificou-se que houve uma redução significativa na potência de LAO na ordem de 2 vezes aproximadamente sobre o relaxamento dos anéis de traqueia de cobaia, sendo diferente estatisticamente (teste ANOVA, $p > 0,05$) do observado na ausência de IND (Gráfico

16). Em todos os casos, a eficácia do LAO foi mantida, sendo obtido o relaxamento ($E_{m\acute{a}x}$) de 92,6 % atingido na concentração 2,86 $\mu\text{g/mL}$.

As prostaglandinas têm sua síntese desencadeada através de estímulos químicos que se ligam nas membranas celulares e ativam receptores acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico (proteína G). Tais estímulos podem ser de natureza fisiológica, farmacológica ou patológica. As prostaglandinas são quimicamente derivadas do ácido araquidônico, constituinte normal dos fosfolipídios das membranas, então convertido pela PLA2 na face intracelular da membrana plasmática. A liberação do ácido araquidônico ativa a enzima ciclooxigenase (COX) a produzir mediadores da inflamação como as prostaglandinas que, quando derivados do epitélio da traqueia, são responsáveis pelo relaxamento do seu músculo liso (LARSEN et al., 2007).

A utilização da indometacina, um inibidor não seletivo da COX, permitiu verificar se a ação do LAO adicionado cumulativamente sobre o músculo liso de traqueia de cobaia em preparações pré-contraída com CCh é dependente da produção de prostaglandinas, através da construção de uma curva concentração-efeito. Foi demonstrado, neste protocolo experimental, que houve aumento significativo da CI_{50} provocado pelo LAO na presença da indometacina ($CI_{50} = 103,6 \pm 23,98 \mu\text{g/mL}$) comparada ao controle ($CI_{50} = 42,10 \pm 11,59 \mu\text{g/mL}$), sugerindo que sua atividade espasmolítica está relacionada à inibição da síntese e/ou liberação de PGE2.

Gráfico 15 - Valores de CI_{50} do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia na presença e ausência de IND. Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA.

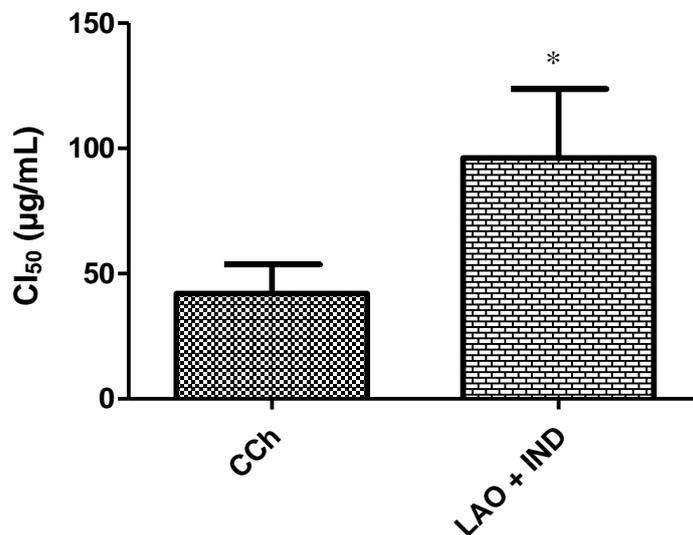
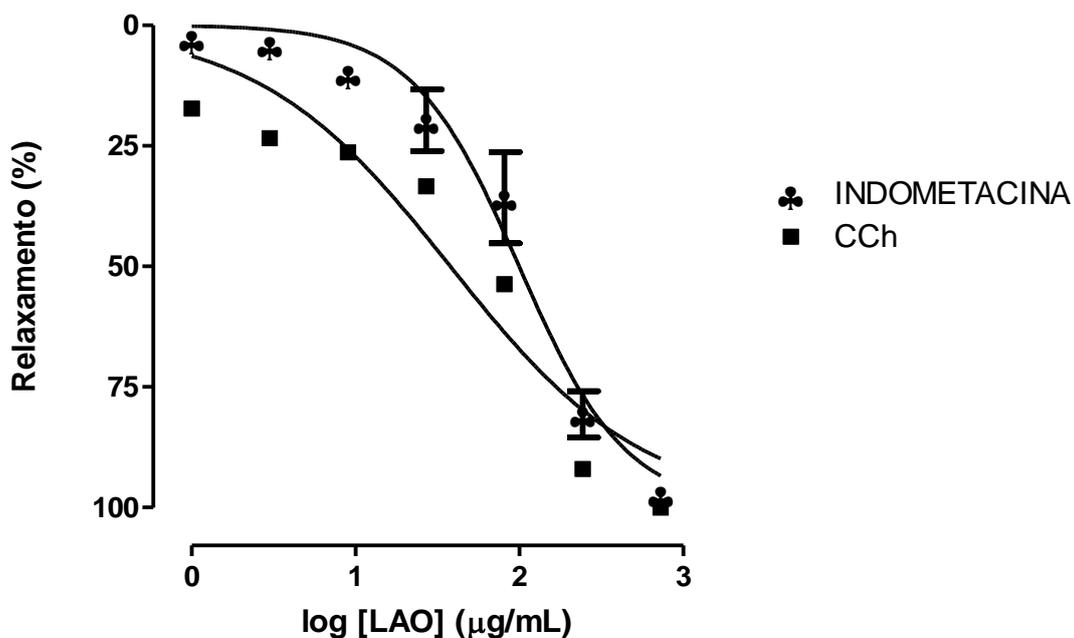


Gráfico 16 - Efeito relaxante do LAO sobre anéis de traqueia de cobaia pré-contráidos com CCh 1 μ M na presença e ausência de IND 10 μ M, controle (■) e IND 10 μ M (♣). Os símbolos e barras verticais representam a média \pm e.p.m., respectivamente, * $p < 0.05$, ($n = 5$). Teste ANOVA: controle *vs* IND.



Diante dos resultados expostos obtidos inicialmente foi possível observar nesta pesquisa evidências farmacológicas que norteiam o entendimento do efeito relaxante do LAO sobre o músculo liso respiratório, sendo demonstrado aqui uma predominância na participação das prostaglandinas neste efeito, mediante a resposta significativa do LAO frente ao bloqueio dos alvos de atuação da indometacina e da dexametasona, o que representaria um indicativo do provável mecanismo de ação. Parece que essa ação é mediada, pelo menos em parte, pela inibição das enzimas COX e PLA2 que, conseqüentemente, impede a produção das prostaglandinas na traqueia, responsáveis pelo relaxamento do músculo liso.

O relaxamento no músculo liso ocorre como resultado da remoção do estímulo contrátil ou pela ação direta de uma substância que inibi o mecanismo contrátil. Nos ensaios preliminares do mecanismo de ação espasmolítico do LAO, avaliou-se a condição de bloqueio da contração muscular a nível de receptor por drogas selecionadas, através da curvas cumulativas concentração-resposta.

A habilidade de relaxar distintos músculos lisos em preparações de órgãos isolados vem sendo evidenciado em trabalhos com óleos essenciais obtidos de espécies de *Lippia*. A *L. turbinata*, por exemplo, apresentou efeito gastroprotetor contra úlceras e entiespasmódico em ratos (TOSO et al., 2007); a *L. graveolens*, reduziu a contratilidade da musculatura lisa de íleo de cobaia frente a contrações induzidas por HIS e CCH (RIVERO et al., 2011); a *L. alba* promoveu relaxamento de artéria mesentérica de rato (MAYNARD et al., 2011); a *L. thymoides* induziu relaxamento em aorta de rato, útero de rata e traqueia de cobaia de maneira dependente da concentração (SILVA et al., 2015); a *L. microphylla* exibiu atividade espasmolítica em íleo de cobaia (RODRIGUES et al., 2011); e a *L. dulcis* em brônquios de porco pré-contraídos tanto com HIS quanto com CCh, explicando, em parte, os relatos da utilização de *L. dulcis* na medicina popular para tratar inflamações e bronquite (GÖRNEMANN et al., 2008);

Na medicina tradicional de alguns países é prática comum a utilização de infusões e tinturas de *L. alba* como eupéptico para a indigestão, sendo objeto de estudo de Souza et al. (2013) e Blanco et al., 2013. Eles confirmaram o efeito antiespasmódico intestinal do óleo essencial da espécie atribuindo esta ação aos monoterpenos encontrados, possivelmente ao aparecimento da carvona, um monoterpeno presente nos óleos essenciais de várias espécies do gênero *Lippia*, indicando que este terpenóide pode ser utilizado na terapêutica para tratar espasmos em músculo liso.

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída quimicamente de derivados terpenóides, quase que exclusivamente, estes tem sua estrutura modificada de acordo com a adição de unidades de isopreno (C_5H_8): hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos. Uma grande variedade de substâncias vegetais derivadas de terpenos ocorrem em praticamente todas as plantas e alimentos naturais, podendo haver alteração na sua composição de acordo com as condições ambientais. Com as espécies do gênero *Lippia* não é diferente. Seus variados efeitos farmacológicos são provavelmente devido à grande diversidade estrutural desses constituintes presentes nos óleos voláteis que podem ser comercializados na sua forma bruta ou purificada (CAVALEIRO, 2007).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais abrange diferentes formas de inibir o crescimento ou destruir o micro-organismo, decorrente de suas propriedades hidrofóbicas, ao permitir que seus constituintes atravessem com maior facilidade a membrana plasmática, liguem-se a componentes celulares essenciais para a vida dos micro-organismos e promovam seu efeito (OLIVEIRA et al., 2008).

No estudo da composição química do LAO foi evidenciado a carvona como constituinte majoritário (60%) presente em suas folhas, com pequena variação nos demais componentes (CATALAN; LAMPASONA, 2002). Geralmente, o constituinte majoritário é o responsável pela atividade biológica exibida pelo óleo essencial, porém o complexo não pode ser desprezado, uma vez que pode haver o sinergismo entre as substâncias constituintes do óleo inteiro (BAKKALI et al., 2008).

Estudos realizados a respeito das propriedades farmacológicas e efeitos tóxicos da carvona exibiram diversas propriedades eficazes, tais como: atividade espasmolítica (SOUSA et al., 2008), anticonvulsivante (ALMEIDA; MOTTA; LEITE, 2003), larvicida (COSTA et al., 2005; SILVA et al., 2008), antinociceptiva e anti-inflamatória (SOUSA et al., 2004; ROCHA et al., 2013), antidepressiva e ansiolítica (HATANO et al., 2012), antimicrobiana (LIMA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006) e sedativa (SOUSA et al., 2007).

Os elementos divulgados nessa pesquisa, através da análise dos dados exibidos, corroboram com o fato de que nessas condições experimentais o LAO, planta endêmica da caatinga e ainda pouco explorada, exibe efeito espasmolítico sobre traqueia de cobaias, revelando o grande potencial farmacológico dessa espécie no rastreamento de substância(s) de interesse terapêutico, através de relatos inéditos de seus efeitos e formas de ação em modelos experimentais *in vitro*.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou, através de estudos farmacológicos, o potencial biológico da espécie *Lippia alnifolia* Schauer, indicando que esta planta pode se tornar fonte de substâncias de interesse médico. A confirmação dessa observação reside no fato de que a avaliação farmacológica *in vitro* do óleo essencial de *L. alnifolia* sobre preparações de traqueia de cobaia sugerem, pela primeira vez, atividade espasmolítica sobre o sistema respiratório.

Comparando o relaxamento promovido pelo LAO sobre contrações tônicas indizadas por agonistas, constata-se que o óleo apresentam a melhor resposta para CI_{50} sobre os agonistas HIS e o CCh, não havendo diferença estatística entre eles.

Quanto ao provável mecanismo de ação evidenciado por meio de protocolos experimentais, o efeito relaxante do LAO pode estar relacionado a uma possível inibição na liberação de prostaglandinas, contudo estudos posteriores são necessários para assegurar este efeito.

Esta pesquisa farmacológica não sugere a participação dos canais de potássio, do inibidor da enzima óxido nítrico sintase e do antagonista β -adrenérgico não seletivo no resultado espasmolítico do LAO. Contudo, demonstra participação do inibidor da síntese proteica e fosfolipase A2 e do inibidor não seletivo da cicloxigenase no efeito relaxante do LAO em traqueia de cobaias.

Todos os resultados apresentados nesse trabalho configuram-se como pioneiros e inéditos no estudo biológico da espécie *L. alnifolia*, dessa forma, uma importante contribuição foi dada para a farmacologia de plantas do Bioma Caatinga. Pesquisas deste tipo são relevantes, uma vez que propiciam uma perspectiva para o desenvolvimento de novas terapias, com a associação de drogas sintéticas e vegetais, utilizando principalmente plantas do bioma caatinga o qual dispõe de uma vasta diversidade de moléculas bioativas.

7 PERSPECTIVAS

Apesar dos resultados obtidos colaborarem para utilização do óleo essencial da *L. alnifolia* (LAO) como um possível agente relaxante do músculo liso da traqueia, novos estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nesses processos e para um promissor emprego do óleo, ou de substâncias isoladas dele, como adjuvante no tratamento de afecções respiratórias. Estas enfermidades são um grave problema de saúde pública, por isso há um crescente interesse na identificação de agentes espasmolíticos de origem natural para utilização em produtos farmacêuticos, destacando-se aqui o potencial biológico identificado da espécie *L. alnifolia*.

A partir dos parâmetros obtidos nos testes farmacológicos *in vitro*, sugere-se:

- Proceder investigação do mecanismo de ação espasmolítico do LAO em traqueia de cobaia utilizando outros agentes relaxantes da musculatura lisa traqueal, como a isoprenalina (agonista β_2 -adrenérgico seletivo), a aminofilina (inibidores das isoenzimas da fosfodiesterase) e a capsaicina (ativador do receptor de potencial transitório - TRP) em concentrações cumulativas pré-incubadas com LAO em diferentes concentrações;
- Avaliar o grau de toxicidade *in vivo* do LAO em várias concentrações;
- Caracterizar o efeito do LAO *in vitro* sobre a contração de outros músculos lisos
- Caracterizar o efeito do LAO sobre a contração traqueal *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGAH, M.; NAJAFIAN, S. *Essential oil content and composition of Lippa citriodora as affected by drying method in full flowering stages*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences. v. 3, n. 2, p. 371-377, 2012.
- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P.F.D.; BARBOSA-FILHO, J.M. *Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. pp. 114-140, 2007.
- AGRA, M. D. F.; FREITAS, P.F.D.; BARBOSA-FILHO, J. M. *Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 3, 2008.
- AJAIYEGBA, E. O. et al. *Efficacy of herbal remedies used by herbalists in Oyo State Nigeria for treatment of Plasmodium falciparum infections--a survey and an observation*. Afr J Med Med Sci. v. 33, n. 2, p. 115-119, 2004.
- ALMEIDA, R. N.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. *Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes*. Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat, v. 2, p. 3-6, 2003.
- ARCILA-LOZANO, C. C. et al. *Orégano: propiedades, composición y actividad biológica*. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, v. 54, p. 100-111, 2004.
- ARUMANAYAGAM, S.; ARUNMANI, M. *Hepatoprotective and antibacterial activity of Lippia nodiflora Linn. against lipopolysaccharides on HepG2 cells*. Pharmacogn Mag. v. 11, n. 41, p. 24-31, 2015.
- ATTIA, M.; KIM, S. U.; RO, D. K. *Molecular cloning and characterization of (+)-epi- α -bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in Lippia dulcis*. Arch Biochem Biophys. v. 527, n. 1, p. 37-44, 2012.
- BAKKALI, F. et al. *Biological effects of essential oils e a review*. Food and Chemical Toxicology, v. 46, 2008.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. *Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos*. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BASSOLE, I. H. et al. *A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of Lippia chevalieri and Lippia multiflora from Burkina Faso*. Phytochemistry. v. 62, n. 2, p. 209-212, 2009.
- BASTOS, J. F. et al. *Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. v. 106, n. 4, p. 331-317, 2010.
- BENYAHIA, C. et al. *PGE2 receptor EP(4) agonists: potent dilators of human bronchi and future asthma therapy?* Pulm Pharmacol Ther. v. 25, n. 1, p. 115-118, 2012.

BLANCO, M. A. et al. *Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of Lippia alba*. J Ethnopharmacol. v. 149, n. 3, p. 803-809, 2013.

BOURGAUD, F. et al. *Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective*. Plant Science, v. 161, p. 839-851, 2001.

BOWER, A. M. et al. *Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV*. J Agric Food Chem. 2014.

CÁCERES, A. et al. *Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria*. J Ethnopharmacol. v. 31, n. 2, p. 193-208, 1991.

CÁCERES, A. et al. *Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants*. Ethnopharmacol. v. 38, n. 1, p. 31-38, 1993.

CARMONA, F. et al. *Lippia alba (Mill.) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women*. Phytomedicine. v. 20, n. 10, p. 947-950, 2013.

CARVALHO, N. F. U. et al. *Larvicidal Activity of the Essential Oil from Lippia sidoides Cham. against Aedes aegypti Linn.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CAVALEIRO, C. *Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina*. Laboratório de farmacognosia da Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2007.

CATALAN, C. A. N.; LAMPASONA, M. E. P. de. *The chemistry of the genus Lippia (Verbenaceae)*. London, Taylor and Francis, p. 127-149, 2002.

CONCEIÇÃO, A.A.; GIULIETTI, A.M. *Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil*. Hoehnea, v. 29, n. 1, p. pp. 37-48, 2002.

COSTA, J. G. M. et al. *Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de Hyptis martiusii, Lippia sidoides e Syzigium aromaticum frente às larvas do Aedes aegypti*. Rev Bras Farmacogn, v. 15, p. 304-309, 2005.

CRAVEIRO, A. A. et al. *Essential oils from brazilian verbenaceae. Genus Lippia*. Journal of Satural Product, v. 44, n. 5, p. 598-601, 1981.

EDRIS, A. E. *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*. Phytotherapy Research, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ESCOBAR, P. et al. *Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major componentes*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FABRI, R. L. et al. *Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of Lippia species by bioautography*. J Med Food. v. 14, n. 7-8, p. 840-846, 2011.

FEIJÓ, A. G. S; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. *Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 421, 2010.

FIGUEIREDO, A. C. et al. *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils*. Flavour Frag J, v. 23, p. 213-226, 2008.

FRANZ, C. M. *Essential oil research: past, present and future*. Flavour Fragrance Journal, v. 25, p. 112-113, 2010.

GARIGLIO, M. A. et al. *Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga*. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.

GONZALEZ, G. M. C.; SOTO, H. M.; MARTINEZ, V. M. *Isolation of (-)(2S)-5,6,7,3',5'-pentahydroxyflavanone-7-O-β-D-glucopyranoside, from Lippia graveolens H.B.K. var. berlandieri Schauer, a new anti-inflammatory and cytotoxic flavanone*. Nat Prod Res, v. 24, n. 16, p. 1528-1536, 2010.

GÖRNEMANN, T. et al. *Antispasmodic activity of essential oil from Lippia dulcis Trev*. J Ethnopharmacol. v. 117, n. 1, p. 166-169, 2008.

GULLO, V. P.; HUGHES, D. E. *Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry*. Drug Discovery Today: Technologies, v. 2, n. 3, 2005.

GUO, Y. et al. *Effects of one month treatment with propranolol and metoprolol on the relaxant and contractile function of isolated trachea from rats exposed to cigarette smoke for four months*. Inhal Toxicol. v. 26, n. 5, p. 271-277, 2014.

HAKONARSON, H.; GRUNSTEIN, M. M. *Autocrine regulation of airway smooth muscle responsiveness*. Respir Physiol Neurobiol, v. 137, n. 2-3, p. 263-76, 2003.

HATANO, V. Y. et al. *Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from Lippia alba and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze*. Braz J Med Biol Res, 2012.

HEINZMANN, B. M.; BARROS, F. M. C. de. *Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo Lippia alba (mill.) N. E. Brown (verbenaceae)*. Santa Maria: Saúde, v. 33, n 1, p 43-48, 2007.

HELDWEIN, C. G. et al. *S-(+)-Linalool from Lippia alba: sedative and anesthetic for silver catfish (Rhamdia quelen)*. Vet Anaesth Analg, v. 41, n. 6, p. 621-629, 2014.

HENRY, P. J. et al. *Inhibitors of prostaglandin transport and metabolism augment protease-activated receptor-2-mediated increases in prostaglandin E2 levels and smooth muscle relaxation in mouse isolated trachea*. J Pharmacol Exp Ther. v. 314, n. 3, p. 995-1001, 2005.

HIROTA, S.; HELLI, P.; JANSSEN, L. J. *Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle*. Eur Respir J. v. 30, n. 1, p. 114-133, 2007.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. *Monitoramento do desmatamento no bioma caatinga por satélite*. Centro de Sensoriamento Remoto – CSR/IBAMA, Brasília, 2010.

KINGSTON, D. G. I. *Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation*. Journal of Natural Products, v. 74, 2011.

JOHNSON, M. *Molecular mechanisms of beta(2)-adrenergic receptor function, response, and regulation*. J Allergy Clin Immunol. 2006.

LAPCHIK, V. B. V., MATTARAIA, V. G. M. *Finalização humanitária*. In: LAPCHIK, V. B. V., MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu, p. 603-15, 2009.

LARSEN, G. L. et al. *Modulation of airway responses by prostaglandins in young and fully grown rabbits*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. v. 293, n. 1, p. 239-244, 2007.

LEFF, A. R. SCHUMACKER, P. T. *Respiratory Physiology: Basics and Applications*. Philadelphia, W. B. Saunders Co., 1993.

LIMA, I. O. et al. *Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida*. Rev Bras Farmacogn, v. 16, p. 197-201, 2006.

LIMA, F. C. et al. *Antispasmodic effects of eugenol on rat airway smooth muscle*. Fundam Clin Pharmacol, v. 25, n. 6, p. 690-699, 2011.

LIU, Q. H. et al. *Protein kinase C-epsilon regulates local calcium signaling in airway smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol. v. 40, n. 6, p. 663-671, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*, 2^a ed., Plantarum: Nova Odessa, p. 527, 2008.

LUDERE, M. T.; VAN, R. T.; VLEGGAAR, R. *Isolation and relative stereochemistry of lippialactone, a new antimalarial compound from Lippia javanica*. Fitoterapia. v. 86, p. 188-192, 2013.

MACHADO, M. et al. *Effects of essential oils on the growth of Giardia lamblia trophozoites*. Nat Prod Commun, v. 5, n.1, p. 137-141, 2010.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. *Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais*. Cad. acad., Tubarão, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

- MACHADO, T. F. et al. *The antimicrobial efficacy of Lippia alba essential oil and its interaction with food ingredients*. J Microbiol, v. 45, n. 2, p. 699-705, 2014.
- MARTHAN, R. *Store-operated calcium entry and intracellular calcium release channels in airway smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v. 286, p. 907-908, 2004.
- MARX, H. E. et al. *A molecular phylogeny and classification of verbenaceae*. American Journal of Botany, v. 97, n. 10, p. 1647–1663, 2010.
- MATOS, F. J. de A.; MACHADO, M. I. L.; SILVA, M. G. DE V.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. *Essential Oils of Lippia alnifolia Schau. (Verbenaceae) and Lippia aff. gracillis H.B.K., Two Aromatic Medicinal Shrubs from Northeast Brazil*. Journal of Essential Oil Research, vol. 12, n. 3, p. 295-297, 2000.
- MAYNARD, L. G. et al. *Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery*. Indian Journal of Pharmacology, v. 43, p. 694-698, 2011.
- MBIKOU, P. et al. *Contribution of Rho kinase to the early phase of the calcium-contraction coupling in airway smooth muscle*. Exp Physiol. v. 96, n. 2, p. 240-258, 2011.
- MEDEIROS, M. D. et al. *In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from Lippia sidoides Cham*. Parasitol Int, v. 60, 2011.
- MELO, J. I. M. et al. *Verbenaceae sensu lato em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil*. Revista Caatinga, v. 23, p. 41-47, 2010.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. *Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian Lippia alba (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity*. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 104, n. 6, p. 878-884, 2009.
- MITCHELL, H. W. *Airway smooth muscle contraction - perspectives on past, present and future*. Pulm Pharmacol Ther. v. 22, n. 5, p. 363-369, 2009.
- MOLINA, G. Z. J. et al. *Anti-Trypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico*. Acta Trop, v. 136, p. 14-18, 2014.
- MOREIRA, T. M. S.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. *O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 20, n. 3, 2010.
- MORENO, B. M. et al. *Essential oil from leaves of Lippia dulcis grown in Colombia*. Nat Prod Commun, v. 5, n. 4, p. 613-614, 2010.
- MOTULSKY, H. J.; CHRISTOPOULOS, A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc., 2003.

- NAVARRO, R. C.; SCARPA, G. F. *The cultural-bound disease "empacho" in Argentina. A comprehensive botanico-historical and ethnopharmacological review.* J Ethnopharmacol. v. 148, n. 2, p. 349-60, 2013.
- OCAZIONEZ, R. E. et al. *Virucidal activity of Colombian Lippia essential oils on dengue virus replication in vitro.* Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 304-309, 2010.
- OHNO, T. et al. *Antimicrobial activity of essential oils against Helicobacter pylori.* Helicobacter. v. 8, n. 3, p. 207-215, 2003.
- OLIVEIRA, F. P. et al. *Effectiveness of Lippia sidoides Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of Staphylococcus aureus strains isolated from clinical material.* Rev Bras Farmacogn, v. 16, p. 510-516, 2006.
- OLIVEIRA, O. R. de et al. *Efeito de óleos essenciais de plantas do gênero Lippia sobre fungos contaminantes encontrados na micropropagação de plantas.* Rev. Ciên. Agron., Fortaleza, v. 39, n. 1, p. 94-100, 2008.
- OLIVEIRA, G. de et al. *Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change.* Biodiversity and Conservation. v. 21, n. 11, 2012.
- OLIVEIRA, D. R. et al. *Ethnopharmacological studies of Lippia origanoides.* Rev. bras. farmacogn. v. 24, n. 2, p. 206-214, 2014.
- PARENT, M. et al. *Nitric oxide-eluting scaffolds and their interaction with smooth muscle cells in vitro.* J Biomed Mater Res A. v. 23, 2015.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.* Journal of Ethnopharmacology, v. 76, n. 3, 2001.
- PAULUHN, J.; MOHR, U. *Experimental approaches to evaluate respiratory allergy in animal models.* Experimental and Toxicologic Pathology, v. 56, p. 203-234, 2005.
- PEREZ-ZOGHBI, J. F. et al. *Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function.* Pulm Pharmacol Ther. v. 22, n. 5, p. 388-397, 2009.
- PINTO, C. P. et al. *Antimicrobial Activity of Lippia Species from the Brazilian Semiarid Region Traditionally Used as Antiseptic and Anti-Infective Agents,* Hindawi Publishing Corporation, 2013.
- QUINTANILLA, R. L. et al. *Antiprotozoal activity against Entamoeba histolytica of plants used in northeast Mexican traditional medicine. Bioactive compounds from Lippia graveolens and Ruta chalepensis.* Molecules, v. 19, n. 12, p. 21044-21065, 2014.
- ROCHA, M. L. et al. *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice.* Journal of Natural Medicines, v. 67, n. 4, p. 743-74, 2013.

RIVERA, E. A. B. *Estresse em animais de laboratório*. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 263-273, 2002.

RIVERO, C. I. et al. *Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils*. Journal of Food Science, v. 76, p. 309-317, 2011.

RODRIGUES, F. F. G. et al. *Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla**. Cham. Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2011.

SALEH, S. M. et al. *Influence of dexamethasone on protease-activated receptor 2-mediated responses in the airways*. J Pharmacol Exp Ther. v. 324, n. 2, p. 622-630, 2008.

SALIMENA, F. R. G., THODE, V., MULGURA, M., O'LEARY, N. *Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

SÁNCHEZ, A. A. et al. *Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin*. Lett Appl Microbiol. v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.

SANDERSON, M. J. et al. *Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca^{2+} signaling and sensitivity*. Proc Am Thorac Soc. v. 1, n. 1, p. 23-31, 2008.

SARRAZIN, S. L. et al. *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon*. Food Chem. v. 134, n. 3, p. 1474-1478, 2012.

SARRAZIN, S. L. F. et al. *Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia organoides* Kunth*. Molecules, v. 20, p. 1860-1871, 2015.

SARTORATTO, A. et al. *Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil*. Brazilian Journal of Microbiology. v. 35, p. 275-280, 2004.

SILVA, W. J. et al. *Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides*. Bioresource Technology, v. 99, 2008.

SILVA, F. S. et al. *Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides**. Pharm Biol. v. 9, p. 1-10. 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed., Florianópolis: UFSC, 2010.

SOARES, B. V.; DIAS, M. T. *Espécies de Lippia (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura*. Biota Amazônia, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. *Flash photolysis studies of excitation-contraction coupling, regulation, and contraction in smooth muscle*. Annual Review of Physiology, v. 52, p. 857-874, 1990.

SOMLYO, A.P; SOMLYO, A.V. *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. Nature, v. 372, n. 6503, p. 231-236, 1994.

SOTO, E. et al. *Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT_{2A} receptors: role of Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase pump and Ca⁽²⁺⁾-activated K⁽⁺⁾ channels.*, Flores-Life Sci. v. 83, n. 11-12, p. 438-446, 2008.

SOUSA, O. V. et al. *Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de Duguetia lanceolata St. Hil., Annonaceae*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 14, p. 11-14, 2004.

SOUSA, D. P. et al. *Pharmacological effects of the monoterpene a,b-epoxy-carvone in mice*. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 17, n. 2, p. 170-175, 2007.

SOUSA, D. P. de et al. *Structure and spasmolytic activity relationships of monoterpene analogues found in many aromatic plants*. Z Naturforsch C. v. 63, n. 11, p. 808-812, 2008.

SOUZA, N. L. *Comportamento, contensão e sexagem de espécies convencionais de laboratório*. In: DE LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. *Manual para técnicos em bioterismo*. São Paulo: Winner Graph, p. 67-78, 1996.

SOUZA, F. V. M. et al. *Carvone: Antispasmodic effect and mode of action*. Fitoterapia, Elsevier, v. 85, p. 20-24, 2013.

TAKEUCHI, T. et al. *Mechanisms involved in carbachol-induced Ca⁽²⁺⁾ sensitization of contractile elements in rat proximal and distal colon*. Br J Pharmacol. v. 142, n. 4, p. 657-666, 2004.

TAVARES, E. S. et al. *Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de Lippia alba (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes*. Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

THOLL, D. *Terpene synthases and the regulation, diversity and biological*. Elsevier, v. 9, p. 297, 2006.

TOMAZZONI, I. M.; NEGRELLE, B. R. R.; CENTA, L. M. *Fitoterapia popular: A busca instrumental enquanto prática terapêutica*. Florianópolis, 2006.

TOSO, R. E. et al. *Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica*. v. 9, n.1, p. 145-151, 2007.

VALE, T. G. et al. *Behavioral effects of essential oils from Lippia alba (Mill.) N.E. Brown chemotypes*. Journal Ethnopharmacology, v.167, p. 127-33, 1999.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. *Os produtos naturais e a química medicinal moderna*. Quim. Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEBB, R.C. *Smooth muscle contraction and Relaxation*. Advances in Physiology Education, v. 27, p. 201 – 206, 2003.

WEST, J. B. *Pulmonary Pathophysiology: The Essentials*. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1992.

YORK, T.; VAN VUUREN, S. F.; DE WET, H. *An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa*. J Ethnopharmacol. v. 144, n. 1, p. 118-127, 2012.

ZHUGE, R. et al. *Ca²⁺ sparks act as potent regulators of excitation-contraction coupling in airway smooth muscle*. J Biol Chem. v. 15, n. 3, p. 2203-2210, 2010.

ANEXO



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *in vitro* DE *Lippia alnifolia* Schauer (Verbenaceae) EM TRAQUEIA DE COBAIA**”, protocolo nº 002/181113, que utiliza 20 animais da espécie *Cavia porcellus*, sob a responsabilidade de **Eriane Dantas Bezerra**, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled “**Research of spasmolytic activity *Lippia alnifolia* Schauer (Verbenaceae) in guinea pig trachea**”, protocol number 0002/181113, utilizing 20 animal species *Cavia porcellus*, under the responsibility **Eriane Dantas Bezerra**, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Committee of Ethics and Deontology Studies and Research at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 18 de fevereiro de 2014.

Profa. Márcia Bento Moreira

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF

Prof. Alexandre H. Reis

Coordenador do Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF