UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

RENATA EVARISTO RODRIGUES DA SILVA

ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO

CRATO-CE
2016

RENATA EVARISTO RODRIGUES DA SILVA

ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de concentração: Bioprospecção de produtos naturais

Orientador (a): Prof.ª. Drª. Roseli Barbosa

Co-Orientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

CRATO-CE

2016

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

A citação de qualquer texto desta dissertação é permitida, de acordo com as normas da ética cientifica, e encontrar-se-á a disposição da biblioteca setorial do referido programa.

Dissertação aprovada em: ____/____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof.ª. Drª. Roseli Barbosa (Orientadora)

Universidade Regional do Cariri-URCA

_____

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Membro Interno)

Universidade Regional do Cariri-URCA

_____

Profª. Drª. Kerly Shamyra da Silva Alves (Membro Externo)

Universidade Estadual do Ceará-UECE

CRATO-CE

2016

“E uma das condições necessárias a pensar certo é não estarmos demasiado certos de nossas certezas...”

Paulo Freire

Dedico aos grandes amores da minha vida, meu esposo *José Carvalho Pinheiro Duarte* por todo apoio, amor e compreensão. E a minha filha *Rebeca* que me ensinou o verdadeiro sentido de tudo.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, a Ele toda honra e glória. Sem Ele na minha vida não chegaria aqui. Foi Ele que me fez forte quando eu estava cansada e me fez sentir uma vencedora, que cuidou e me colocou nos braços em todos os momentos.

Aos meus pais, **Severino Rodrigues da Silva** (painho) e **Marinalva Evaristo Rodrigues da Silva** (mainha) pelo amor, dedicação e todo incentivo para os estudos. E a minha irmã, Rafaela Evaristo Rodrigues da Silva pela sua amizade, sua alegria por sempre acreditar em mim. E mesmo distante geograficamente, estão sempre presentes em minha vida.

À minha **família** do Crato, meus sogros (Josuite e Marcos), meus cunhados (Marcos e Izabel), meus concunhados (Dawin e Raissa) e minha sobrinha (Geovana), que sempre me apoiaram em tudo, minha gratidão.

À minha querida orientadora, Drª. **Roseli Barbosa**, pela orientação, ensinamentos, paciência, incentivo e sem dúvida sua confiança. Sou grata por um dia ter acreditado em mim, sem nem me conhecer e ter me dado a oportunidade de trabalharmos juntas. Gratidão por todos os conselhos profissionais e pessoais, por toda sua simplicidade e generosidade.

Ao meu co-orientador Dr**. José Henrique Leal Cardoso**, por todos seus sábios ensinamentos, generosidade e simplicidade, que mesmo longe geograficamente sempre se colocou disponível para ajudar. Um exemplo de profissional, um ser de extrema gentileza.

Aos queridos **Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes** e **Drª Marta Regina Kerntopf** pela acolhida, por toda colaboração e disponibilidade de sempre nos ajudar e sempre ter uma idéia nos momentos de sufoco, sempre parceiros. Serei sempre grata.

Ao laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), na pessoa do professor **Dr. José Galberto Martins da Costa** pela disponibilidade e colaboração.

Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) na pessoa do **Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho**.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) pela identificação da espécie trabalhada.

À todos os professores do **Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular** (PPBM).

À Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) na pessoa da **Dr.ª Glauce Socorro Barros Viana** e do bioterista Sr. **Francisco**, por ceder as matrizes dos animais utilizados nos experimentos.

Ao **Laboratório de Eletrofisiologia** (LEFE) da Universidade estadual do Ceará (UECE), em especial ao aluno Átila por toda ajuda e apoio.

Aos queridos **Francisco Walber Ferreira da Silva** e **Kerly Shamyra** da Silva Alves por todo conhecimento partilhado, pela generosidade e disposição em ajudar sempre.

Á professora Drª **Andrelina Noronha Coelho de Souza** pelas discussões científicas e apoio.

Á Universidade Federal da Paraíba, na pessoa da professora Drª **Bagnólia Araújo Silva** pela disponibilidade e valiosas orientações no início deste trabalho.

Á querida **Renata Sampaio** que não mediu esforços em nos ajudar e sempre foi solícita em todos os aspectos. Sou grata a ciência por ter me apresentado alguém tão especial.

Á amiga **PolianaMoreira de Medeiros Carvalho** pelos conhecimentos repassados e por todo apoio.

Aos amigos que esta pesquisa me presenteou **Andressa de Alencar Silva** e **Luís Pereira de Morais**, meus eternos alunos de Iniciação Científica, por toda acolhida, por todas as lágrimas e risadas juntos, por todo apoio que foram fundamentais para conquista deste título. Amigos para sempre.

Aos fiéis e queridos alunos de Iniciação Científica **Cícero André, Tiago Feitosa, Carla Mikevely, Cristina, Nayane Almeida e Thaís de Sousa**, por toda dedicação, renúncia, companhia de todas as horas longas de testes, e por toda alegria que sempre tiveram, serei sempre grata.

Aos amigos de mestrado e laboratório **Álefe Brito Monteiro, Francisco Rafael Alves Santana Cesário, Lindaiane Bezerra Rodrigues e Roger Henrique Sousa da Costa**, por todos os momentos de estudos, de partilha e a convivência maravilhosa.

Á todos os alunos que fazem parte do **Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais** (LFPN) e do **Laboratório de farmacologia e Química** Molecular (LFQM) que direta ou indiretamente prestaram apoio.

Á secretária do Mestrado **Manuela Martins Fernandes e Maria Andercieli Rolim de Brito** pela disponibilidade e generosidade de sempre.

Á todos os funcionários da Universidade Regional do Cariri, em especial aos motoristas.

Aos queridos amigos da graduação, em especial Dr. **Fillipe Pereira, Drª Kelly Samara e Drª Girliane Regina** que são verdadeiros exemplos e incentivo no caminho da docência. E os demais que mesmo com caminhos profissionais diferentes, sempre estiveram presentes em minha vida, incentivando e apoiando.

Á FUNCAP, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO
ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO..... 17
1.1CONSIDERAÇÕES GERAIS..... 17
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS 18
1.3 *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BROWN..... 20
1.3.1 USO TRADICIONAL E CONHECIMENTO POPULAR 23
1.3.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS 24
1.4 CITRAL 26
1.5 LIMONENO 27
1.6 MECANISMOS DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO VASCULAR 29
1.7 REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR 32
1.8 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA 34

2.OBJETIVOS 37
2.1 OBJETIVO GERAL..... 37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

3.METODOLOGIA 39
3.1 MATERIAIS 39
3.1.1 SAIS E FÁRMACOS 39
3.1.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ALBA* (MILL.) N.E. BROWN 39
3.1.3 SOLUÇÕES..... 39
3.1.4 ANIMAIS 40
3.2 MÉTODOS 40
3.2.1 PROCEDIMENTO PARA ISOLAMENTO DA AORTA TORÁCICA DE RATO 40
3.2.2 MEDIDAS DA ATIVIDADE CONTRÁTIL DA AORTA 41
3.2.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS 42
3.2.3.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OELA SOBRE O TÔNUS INTRÍNSECO DE AORTA ISOLADA DE RATO 43
3.2.3.2 EFEITO DO OELA, CITRAL E LIMONENO SOBRE CONTRAÇÃO INDUZIDA POR K^+ EM AORTA ISOLADA DE RATO 43
3.2.3.3 EFEITO DO OELA, CITRAL E LIMONENO SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS E SUSTENTADAS POR FE EM AORTA ISOLADA DE RATO 44
3.2.3.4 INFLUÊNCIA DO ENDOTÉLIO 44
3.2.3.5 EFEITO INIBITÓRIO DO OELA, DO CITRAL E DO LIMONENO SOBRE CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR $BACL_2$ 45
3.2.3.6 EFEITO SOBRE A VIA DA PROTEÍNA RHO..... 46

3.2.3.7 EFEITO RELAXANTE DO OELA, CITRAL E LIMONENO EM CONTRAÇÕES SUSTENTADAS E INDUZIDAS PELO BAY-K 8644 (3µM) 46
3.3ANÁLISE ESTATÍSTICA 47
3.4 INSTITUIÇÕES PARCEIRAS E FINANCEIRAS 47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 50
4.1ARTIGO 50

5. CONCLUSÃO 71

REFERÊNCIAS 73
PRODUÇÃOACADÊMICA 91
ANEXOS 96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$[Ca^{2+}]i$ - Concentração intracelular de cálcio

$0Ca^{2+}$ - Solução de Tyrode isenta de cálcio

ACh - Cloridrato de Acetilcolina

DAG - Diacilglicerol

DMSO - Dimetilsulfóxido

E - - Anéis de aorta com endotélio removido

E+ - Anéis de aorta com endotélio intacto

EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF - Fator relaxante derivado do endotélio

EGTA - Ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético

FE - Hidrocloridrato de Fenilefrina

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

GTP - Guanosina trifosfato

IP3 - Trifosfato de inositol

L-NAME - NG-nitro-L-arginina-metil-ester

MLCK - Cinase da cadeia leve da miosina

MLCP - Fosfatase da cadeia leve da miosina

NO - Óxido Nítrico

NOs - Óxido Nítrico Sintase

OELa - Óleo essencial de *Lippia alba*

PGI_2 - Prostaciclina

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PIP2 - Bifosfato de fosfotidilinositol

PKC - Proteína cinase C

PLC - Fosfolipase C

RhoK - Rho cinase

rMLC - Cadeia leve regulatória da miosina

TM - Tyrode modificado

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FOLHAS DA ESPÉCIE DE *Lippia alba (*MILL.) N. E. BROWN 22
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DO CITRAL E SEUS ISÔMEROS 26
FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DOS ENANTIÔMEROS DO LIMONENO 27
FIGURA 4. MECANISNO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO..... 30
FIGURA 5. FATORES RELAXANTES PRODUZIDOS PELO ENDOTÉLIO VASCULAR..... 34
FIGURA 6. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO SISTEMA UTILIZADO PARA REGISTRO DAS RESPOSTAS MECÃNICAS DO MÚSCULO LISO 42
FIGURA 7. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 1 43
FIGURA 8. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 2 44
FIGURA 9. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 3 44
FIGURA 10. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 4 45
FIGURA 11. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 5 45
FIGURA 12. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 6 46
FIGURA 13. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROTOCOLO 7 47
FIGURA 14. EFEITO RELAXANTE DO OELa, CITRAL E LIMONENO SOBRE CONTRAÇÃO MANTIDA POR POTÁSSIO E FENILEFRINA EM AORTA ISOLADA DE RATO 56
FIGURA 15. RELAXAMENTO PRODUZIDO PELO OELa, CITRAL E LIMONENO EM PREPARAÇÕES COM FE NA PRESENÇA DOS BLOQUEADORES L-NAME E INDOMETACINA 57
FIGURA 16. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS DE CÁLCIO E DA RHO CINASE NO RELAXAMENTO PRODUZIDO PELO OELa, CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO 59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VALORES DE CE_{50} DO EFEITO RELAXANTE DO OELa, CITRAL E LIMONENO EM ANÉIS DE AORTA DE RATO 55
TABELA 2. VALORES DE CE_{50} DO EFEITO RELAXANTE DO OELa, CITRAL E LIMONENO EM ANÉIS DE AORTA DE RATO EM CONTRAÇÕES INDUZIDAS POR FE (0,1 µM) NA PRESENÇA DE L-NAME E INDOMETACINA 58

RESUMO

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) popularmente chamada de erva-cidreira cresce espontaneamente em todo território brasileiro e tem seu uso popular atribuído as suas propriedades sedativas, carminativas, analgésicas, espasmolítica e emenagoga, estas ações podem também estar relacionados a influência dos metabólitos secundários presentes na composição da planta. Entretanto, até o momento não há estudos envolvendo a ação relaxante do óleo essencial da *L. alba* e seus componentes majoritários citral e limoneno sobre a musculatura lisa vascular. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e de seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de ratos. Para realização dos experimentos foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com massa corpórea entre 200-300g. Após eutanásia, a aorta foi removida, em seguida foi seccionada em anéis de 4-5mm de comprimento, os quais foram mantidos em solução de Tyrode modificado aerado, pH 7,4, a 37ºC, para registro isométrico das contrações musculares. Para avaliar o efeito do OELa sobre o tônus muscular espontâneo, foram administrados cumulativamente (1-1000µg/ml) OELa em anéis de aorta, sob tensão de 1g, que apresentou um aumento, o qual não foi estatisticamente significante em relação à preparação controle. OELa, citral e limoneno relaxaram de forma dependente de concentração preparações de anéis de aorta pré-contraídas por KCl (60mM) com endotélio (CE_{50}: 83,30±9,78 µg/ml, 110,80±8,04 e 866,91±35,5µM , respectivamente) e sem endotélio (CE_{50}: 356,20±43,71 µg/ml, 487,2±39,43 e 309,27±53,83 µM, respectivamente), ou previamente contraídas por FE(0,1µM) com endotélio (CE_{50}: 352,73±19,39 µg/ml, 99,34±7,2 e 2682,7±19,08µM, respectivamente) e sem endotélio (CE_{50}: 566,06±38,31 µg/ml, 914,94±49,73 e 1680µM, respectivamente). Esses dados demonstram que o OELa e o citral tem relaxamento da musculatura lisa da aorta sendo mais potentes do que o limoneno. Verificou-se que esse relaxamento é potencializado pelo endotélio, ao contrário do limoneno onde houve uma diminuição do relaxamento na presença do endotélio. Quando utilizou-se um bloqueador do óxido nítrico sintase (L-NAME) na presença do agente contraturante FE (0,1 µM), verificou-se que o OELa, o citral e limoneno apresentaram os seguintes resultados (CE_{50}: 654,19±10,46 µg/ml, 601,66±10,92 e 997,5±80,13µM, respectivamente) e na presença do bloqueador da cicloxigenase, a indometacina, o OELa o citral e limoneno apresentaram os seguintes resultados (CE_{50}: 264,48±11,87 µg/ml, 503,6±30,10 e 230,64±10,63µM (respectivamente). Demonstrando que o relaxamento produzido pelo OELa e o citral atuam sobre a via do endotélio, pois na ausência das substâncias liberadas pelo endotélio o efeito relaxante é minimizado, no entanto o limoneno apresentou um resultado oposto, tendo um maior relaxamento na ausência das substâncias liberadas pelo endotélio. O OELa e o citral foram capazes de inibir contrações induzidas pelo $BaCl_2$ (0,1-30 mM) cujo comportamento similar foi observado nas preparações pré-incubadas com nifedipina (1µM), contrariamente, o limoneno não inibiu de forma significante estas contrações. OELa, citral e limoneno também foram capazes de relaxar de forma concentração-dependente as contrações induzidas e sustentadas por BAY-K 8644, um agonista de canal de cálcio , sendo estatisticamente significante a partir das concentrações de 10 µg/ml, 30 µM e 100 µM, respectivamente para cada substância. Em 1000µg/ml de OELa, e 1000µM de citral e limoneno, observou-se que o OELa e o limoneno relaxaram a contração de KCl de forma similar ao relaxamento produzido pelo inibidor de Rho cinase, Y27632. Diante disso observou-se que o OELa e o citral apresentaram efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos, o qual é potencializado pelo endotélio. Entretanto, o limoneno não apresenta os mesmos efeitos do OELa e do citral, indicando a necessidade de um estudo mais detalhado a respeito desse constituinte. Os resultados revelam também que o efeito relaxante pode ser mediado por mecanismos intracelulares, os quais provavelmente envolvem a regulação da sensibilidade ao Ca^{+2} do sistema contrátil do músculo liso vascular.

Palavras-chave: *Lippia alba*, aorta, efeito vasorrelaxante.

ABSTRACT

The species *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), popularly known as erva-cidreira grows spontaneously throughout the Brazilian territory and has its popular use attributed to its sedative, analgesic, carminative, spasmolytic, and emmenagogue properties, which can also be related to influence of secondary metabolites present in the composition of the plant. However, to date, there are no studies involving the action of the *L. alba* and its major components citral and limonene on vascular smooth muscle. The aim of this study was to evaluate the vasorelaxant effect of the essential oil of *L. alba* (EOLa), and its major components citral and limonene in isolated rats aorta. To carry out the experiments, it was used male Wistar rats, with body mass between 200-300 g. After euthanasia, the aorta was removed, then was split in 4 rings-5 mm in length, which were kept in aerated modified Tyrode, in pH 7.4, at 37ºC, for registration of isometric twitches. To evaluate the effect of EOLa on the spontaneous muscle tone, it was administered cumulatively (1-1000µg/ml) EOLa in aortic rings, under tension of 1g, which showed an increase, which was not statistically significant in relation to the preparation control sample. EOLa, citral and limonene relaxed depending on concentrations and preparations of aortic rings pre-contracted with KCl (60mM) with endothelium (CE_{50}: 83.30±9.78 µg/ml, 110.80±8.04 and 866.91±35.5µM , respectively) and without endothelium (CE_{50}: 356.20±43.71 µg/ml, 487.2±39.43 and 309.27±53.83 µM, respectively), or previously contracted with FE(0.1µM) with endothelium (CE_{50}: 352.73±19.39 µg/ml, 99.34±7.2 and 2682.7±19.08µM, respectively) and without endothelium (CE_{50}: 566.06±38.31 µg/ml, 914.94±49.73 e 1680µM, respectively). These data demonstrate that the EOLa and the citral have aortic smooth muscle relaxation being more powerful than the limonene. It was found that this relaxation is potentiated by the endothelium, unlike limonene where there was a decrease of relaxation in the presence of endothelium. When it was used the nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) in the presence of the contracturant agent FE (0.1 µM), It was found that the EOLa, the citral and limonene presented the following results (CE_{50}: 654.19±10.46 µg/ml, 601.66±10.92 and 997.5±80.13µM, respectively) and in the presence of the cyclooxygenase inhibitor, the indomethacin, the EOLa, citral and limonene presented the following results (CE_{50}: 264.48±11.87 µg/ml, 503.6±30.10 and 230.64±10.63µM (respectively). Demonstrating that the relaxation produced by EOLa and the citral act on the endothelium are because in the absence of substances released by the endothelium the relaxing effect is minimized, however the limonene presented an opposite result, having a greater relaxation in the absence of substances released by the endothelium. The EOLa and the citral were able to inhibit contractions induced with $BaCl_2$ (0.1-30 mM) which similar behavior was observed in preincubated preparations with nifedipine (1µM), otherwise, the limonene did not inhibit significantly these contractions. EOLa, citral and limonene, were also able to relax with concentration-dependent form the contractions induced and supported by BAY-K 8644 (3µM), a calcium channel agonist, and statistically significant from the concentrations of 10 µg/ml, 30 µM and 100 µM, respectively for each substance. In 1000µg/ml of EOLa, and 1000µM of citral and limonene, it was observed that the EOLa and the limonene relaxed the contraction of KCI similar to the relaxation produced by Rho-kinase inhibitor, Y27632. Given that it was observed that the EOLa and the citral presented vasorelaxant effect in isolated rat aorta, which is potentiated by the endothelium. However, the limonene does not present the same effects of the EOLa and the citral, indicating the need for a more detailed study about this component. The results also reveal that the relaxing effect may be mediated by intracellular mechanisms, which will probably involve the adjustment of the sensitivity to the Ca^{+2} of the contractile system of vascular smooth muscle.

Keywords: *Lippia alba*, aorta, vasorelaxant effect.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Plantas medicinais

O tratamento de várias doenças a partir de plantas medicinais ocorre há anos, em virtude do conhecimento que as antigas civilizações tinham sobre o poder medicinal e do cultivo de informações culturais a cada geração (FEIJÓ, 2012). No Brasil, por ser considerado um dos maiores centros de biodiversidade do planeta, e, por apresentar uma flora diversificada em toda sua extensão, ainda existem vegetações de características e compostos bioativos desconhecidos (VARANDA, 2006).

A utilização de plantas medicinais neste país teve origem a partir da cultura indígena, na busca do tratamento de diversas enfermidades, em virtude da sua riqueza em diversos produtos terapêuticos e por incluir em seu território biomas, como: cerrado, caatinga, pantanal, floresta amazônica e mata atlântica. Porém em contraste com outros países como, Alemanha, Canadá e Estados Unidos, é evidenciada que esta vasta riqueza do Brasil ainda se encontra pouco explorada em relação ao seu potencial medicinal (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA JUNIOR, 2008).

Mesmo o uso das plantas medicinais como forma alternativa ou complementar aos medicamentos ofertados pela medicina tradicional serem datados de muito tempo (LORENZI; MATOS, 2002), ainda estima-se que existam aproximadamente 25.000 a 75.000 espécies vegetais das quais apenas 1% foi comprovada por estudos científicos, os quais revelaram seu potencial terapêutico quando usadas em humanos (LIMA et al., 2007).

É sabido de todos que a utilização das plantas como método curativo das enfermidades foi por muito tempo baseado nos conhecimentos empíricos repassados, e esta sabedoria popular vem gradativamente perdendo espaço na atualidade, visto que a aplicabilidade muitas vezes não apresenta caráter verdadeiro, por alguns é abusivo e que podem ofertar diversos riscos à saúde. Porém este conhecimento popular quando aliado ao conhecimento científico, muitas vezes podem trazer excelentes resultados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

A busca pelo uso e pelas potencialidades das plantas medicinais está longe de se esgotar, visto que com os novos paradigmas do desenvolvimento social e econômico, bem como na busca por um estilo de vida mais saudável, sustentável e renovável tem levado a necessidade de encontrar no reino vegetal soluções para as enfermidades. A descoberta e a

produção de novas moléculas com potencial terapêutico terão grande aplicabilidade na tecnologia farmacêutica e no desenvolvimento de fitoterápicos cada vez mais eficientes (SCHENKEL et al.,2003).

Ainda segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010) a grande carência encarada pela população brasileira no tocante a saúde pública, além dos altos preços dos medicamentos industrializados, levou uma retomada e fortalecimento do uso das plantas medicinais, visto que é um recurso mais acessível. Esse resgate teve respaldo e incentivo do governo, com a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos- PNPMF e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares- PNPIC no Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2006; 2009) , a qual regulamentou e deu grande importância a necessidade de se estudar mais sobre esses materiais vegetais.

Levando em consideração as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), a cultura e a biodiversidade do Brasil, bem como a complexidade que envolve a fitoterapia, a PNPMF teve como principal meta a ampliação do acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia voltada para a segurança, eficácia, qualidade e integralidade da atenção à saúde dos cidadãos brasileiros, além do desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, e ainda o incentivo ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento do complexo produtivo da saúde. (BRASIL, 2006a).

1.2 Óleos essenciais

O avanço nos conhecimentos técnicos sobre os óleos essenciais datam do século XVIII, quando iniciou o desenvolvimento de estudos que envolviam as caracterizações químicas do óleo. Hoje já temos um grande número de plantas conhecidas pela produção de óleos essenciais e envolvidas no desenvolvimento econômico (VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias, voláteis, geralmente odoríferos e lipofílicos, que podem ser obtidos a partir de qualquer órgão vegetal. Apresentam-se como líquidos oleosos em temperatura ambiente, característica que o difere dos óleos fixos, e ainda, de forma geral podemos caracterizar os óleos essenciais como substâncias instáveis, sobretudo na presença de calor, umidade, luz, metais, substâncias oxidantes ou redutoras (SIMÕES et al., 2007; BAKKALI, et al., 2008). As diversas substâncias presentes nos óleos essenciais são encontradas em diferentes concentrações, sendo

geralmente de duas a três substâncias majoritárias, e que são geralmente responsáveis pelas propriedades biologicamente ativas das plantas aromáticas (TAVARES et al., 2011; SOUZA et al., 2012). É possível dividir os constituintes dos óleos essenciais das plantas em duas classes químicas, perfeitamente diferenciadas em: terpenóides e fenilpropanóides (SANGWAN et al. 2001).

Os constituintes presentes nos óleos essenciais conferem as plantas medicinais seu potencial terapêutico, além de trazer outros benefícios para sobrevivência da planta e continuidade das espécies na natureza. São produzidos a partir do metabolismo secundário junto com a produção de compostos orgânicos, e não estão diretamente ligados ao crescimento e desenvolvimento da planta, e sim com a interação da planta com o meio ambiente (SANTOS, 1999). Encontram-se três grandes grupos de metabólitos secundários: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, usados pelas plantas na defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são compostos produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Enquanto que os alcaloides são oriundos de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), que são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Flavonoides, taninos e ligninas fazem parte dos compostos fenólicos; óleos essenciais, saponinas, carotenoides e a maioria dos fitorreguladores são terpenos (ALVES, 2001; PERES, 2004).

A presença desses compostos nos óleos essenciais pode variar tanto qualitativamente quanto quantitativamente, e isso se deve a influência de vários fatores, dos quais é possível citar: fatores climáticos e geográficos, as estações do ano, a época de floração, hora da coleta, solo, índice pluviométrico, partes da planta e a fase que ela se encontra podem influenciar em conjunto na síntese destes metabólitos. Além da influência de fatores ambientais, ainda é possível identificar variação em função da variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2006; CAMÊLO et al., 2011).

Os óleos essenciais são de grande interesse industrial, pois já representa importante papel na economia, por serem muito utilizados para conferir aromas especiais nos mais diversos produtos, como: cosméticos, perfumes, sabonetes e em alguns condimentos. Além disso, são utilizados para minimizar odores em ambientes, e atualmente já vem sendo incluído em diversos produtos industriais, como plásticos, tintas, borrachas e outros (TELES, 2003). Esta última utilização tem dado destaque aos óleos essenciais, que vem ganhando espaço na sua utilização associada às embalagens plásticas devido à sua ação antimicrobiana (BOTRE et al., 2010; STIEVEN et al., 2009).

1.3 *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown é encontrada em todas as áreas tropicais e subtropicais da América do Sul, América Central, Ilhas Caribenhas e na região sul dos Estados Unidos (PASCUAL, et al.,2001; MARTINS et al., 1995). É possível encontra-la também na Índia (SINGH et al., 2000) e Austrália (HENNEBELLE et al., 2008; AQUINO et al., 2010). No entanto, possui ampla distribuição e utilização fortemente tradicional na América Central e Latina, desde o México, Cuba, Uruguai, Paraguai e Brasil, observando-se grande variedade fenotípica que favorece sua adaptação nas variadas condições climáticas (PALÁCIO-LOPÉZ; RODRÍGUEZ-LOPÉZ, 2007).

No Brasil ela é encontrada praticamente em todas as regiões: Norte (Amapá, Pará, Amazonas, Acre), Nordeste (Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) (SALIMENA, 2010).

Essa larga distribuição levou a geração de vários nomes populares, que geralmente estão relacionados com seu odor aromático característico e suas propriedades medicinais (HENNEBELLE, et al.,2008). Na Colômbia, por exemplo, ela é popularmente conhecida como “pronto alívio” e dependendo da região pode ser também chamada de “curatodo” (STASHENKO et al., 2003). No Brasil, as denominações mais comuns são: erva-cidreira, falsa melissa, chá-de-tabuleiro, erva-cidreira-do-campo, salva-do-Brasil, salva-limão, erva-cidreira-brava, chá-de-febre, erva-cidreira-brasileira, alecrim-do-mato, alecrim-do-campo e alvia sija (MATOS, 2000; HOLETEZ, et al., 2002; PASCUAL et al., 2001).

Além de diversos nomes populares, a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown possui também várias sinonímias botânicas, que pertencem aos gêneros Lippia, Lantana, Filos, Verbena e Zapania (ISB, 2007), tais como: *L. alba* (Mill.) N.E. Brown ex Britton & Wilson; *L. asperifólia* A. Rich; *L. crenata* Sessé & Moc; *L. geminata microphylla* Griseb; *L. germinata* H.B. K; *L. glabriflora* Kuntze; *L. haanensis* Turcz; *L. lantanoides* Coult; *L. trifólia* Sessé & Moc; *Lantana alba* Mill; *Lantana canescens* Hort.; *Lantana geminata* (H.B.K.) Spreng.; *Lantana geminata* Spreng; *Lantana lippioides* Hook. & Arn.; *Phyla geminata* H.B.K.; *Verbena lantanoides* Willd (PASCUAL et al., 2001 a). A taxonomia mostra-se confusa, pois essa diversidade de sinonímias dificulta de certa forma, a classificação botânica do gênero *Lippia*. Estas controvérsias taxonômicas são causadas pelas diferenças morfológicas,

anatômicas e fisiológicas desta espécie, que possui diferentes graus de ploidia, bem como ampla plasticidade fenotípica (TAVARES et al., 2003).

Em estudo realizado por Pierre (2004), analisou-se a cariologia de três quimiotipos de *Lippia alba* (citral, carvona e linalol) e se constatou diferenças entre eles no número e morfologia dos cromossomos, revelando assim que o quimiotipo citral apresentava 2n=30 cromossomos, enquanto que o quimiotipo carvona possui o número de cromossomos 2n=60, podendo ser este um autopoliploide do quimiotipos citral. Já no quimiotipos linalol o estudo revelou variação numérica dentro do próprio quimiotipo, um mixoplóide que mostrou 2n=12 a 2n=60. A hibridização fluorescente *in situ*, conhecida como FISH (fluorescence *in situ* hybridization) técnica citogenética utilizada para detectar e localizar a presença ou a ausência de determinadas sequências de DNA em cromossomos, utilizada no mesmo estudo demonstrou que a *Lippia alba* tem origem alpolipóide, analisando plantas com diferenças no número de cromossomos, levando a classificação de quimiotipos 1-citral e 2-linalol. Estudos assim revelam parte das variações existentes na espécie *Lippia alba* que decorre assim de variações cariotípicas.

A *L. alba*, no tocante a sua composição química, é bem estudada por apresentar como uma das características a sua organização em quimiotipos (BARROS, et al., 2009). Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para constatação de fatores que possam influenciar na variação de constituintes majoritários dessa espécie. Os quimiotipos mais comuns a *L. alba* são: citral, carvona e limoneno, que podem está combinados entre si (CUNHA et al., 2012). Matos (1998) relata que existem, no Nordeste, três tipos de *L. alba*, caracterizados pelos constituintes químicos de seus óleos essenciais, sendo os de elevado teor de citral e mirceno, o tipo 1; de citral e limoneno, o tipo 2 e de carvona e limoneno, o tipo 3.

Silva et al. (2006) analisou o perfil químico de *Lippia alba* em diferentes estações do ano (verão, inverno, primavera e outono) no Sul da Bahia, onde foi identificado como componente majoritário o citral em maior ocorrência no verão, enquanto nas outras estações houve variações significativas de componentes secundários como β-mirceno; em estudo desenvolvido no Rio Grande do Sul analisando o rendimento e a composição química de óleo essencial de *L. alba* verificou-se em todas as estações do ano a maior presença de Linalol e 1,8-cineol (BARROS, et al. 2009). Januzzi et al. (2010), em estudo no Distrito Federal identificou os quimiotipos citral-limoneno, citral-mirceno, limoneno-carvona, citral, linalol, mirceno e linalol-limoneno.

No aspecto físico, a *Lippia alba* é um subarbusto de variável morfologia, que possui ramos esbranquiçados e finos, quebradiços e arqueados (MATOS, 2000). Podem atingir até

cerca de 3 metros de altura, e podem florescer o ano todo. Possui inflorescências que variam nas cores, podendo ser brancas, rosas ou violeta, que formam com o cálice frutífero uma porção dispersora de sementes através do vento. (SALIMENA, 2002; SCHOCKEN , 2007).

É considerada uma planta rústica, porte arbustivo, com ciclo perene e veloz crescimento e desenvolvimento, que facilmente se coloniza através de natural enraizamento dos ramos que tenham contato com o solo (BIASI; COSTA, 2003; EHLERT,2003). Habitualmente apresenta-se prostrada, decumbente, e com seu potencial colonizador encontra-se facilmente em tanto em solos arenosos, quanto em margens de rios, lagos e açudes (STEFANINI et al., 2001).

Umas das formas de reconhecer a *Lippia alba* é observando suas folhas que são simples, inteiras, serrilhadas, não possui forma de redonda e nem quadrada, oblonga, agudas e dispostas de formas opostas, que ocorrem em número de duas por nó. São membranáceas, pecioladas, pubescente e com aroma cítrico característico (Figura 1) (CASTRO, 2001)

Figura 1: Folhas da espécie de *Lippia alba (*Mill.) N. E. Brown. **Fonte**: SILVA, 2015

1.3.1 Uso tradicional e conhecimento popular

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown é uma das plantas consideradas medicinal mais usada nas práticas tradicionais curativas da população brasileira apontada pela Central de Medicamentos (CEME) (ANGELUCCI et al., 1990; MING, 1992). Além disso, com sua larga difusão e utilização pela população do nordeste, a popularmente conhecida erva cidreira também foi incluída no projeto "Farmácia Vivas" da Universidade Federal do Ceará (MATTOS, 2000), no projeto "Fitoterapia nos Serviços de Saúde" implementado pela Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (MING, 1990), e ainda de projetos promovidos pela Prefeitura de Campinas (SP), de assistência farmacêutica fitoterápica à população carente (CASTRO, 2001). No Brasil ela se encontra atualmente entre as 66 espécies regulamentadas com finalidade medicinal (BRASIL 2010).

Diversas pesquisas etnofarmacológicas constataram uma variedade grande no uso tradicional da *Lippia alba*, sendo as principais indicações, como: analgésico, anti-inflamatório, antipirético, sedativo, disenterias e diarreias, doenças cutâneas, doenças hepáticas, cólicas menstruais, antiespasmódico, tratamento de sífilis e gonorreia, e como tempero culinário. (PASCUAL et al., 2001b; PINTO et al., 2006; MATTOS et al., 2007). Em outro estudo os principais usos relatados: doenças respiratórias, digestivas, cardiovasculares, para hipertensão e como sedativos (HENNEBELLE et al., 2008).

Largamente utilizada pela difusão de suas atividades como calmante, sedativa, ansiolítica, antiespasmódica e expectorante (MATTOS et al., 2007). Para esses fins terapêuticos observa-se diversas formas de utilização da *Lippia alba*, com suas folhas ou raízes, como chás, infusões, banhos, extratos alcoólicos, compressas, xaropes, principalmente pela presença de seus constituintes químicos, principalmente o óleo essencial (JULIÃO et al., 2003).

Outros estudos etnofarmacológicos têm apresentado o uso da *Lippia alba* fortemente presente na cultura popular. No México, foi citado uso tradicional por curandeiros para problemas gastrointestinais (HEINRICH et al., 1992). Na Colômbia, no município de San José de Pare-Boyacá, a *Lippia alba* foi citada como analgésica, para dores estomacais, gripe e tosse (TOSCANO-GONZÁLEZ, 2006). Em estudo, realizado em três cidades no estado de São Paulo, a *Lippia alba* foi a sétima planta mais citada, usada em forma de infusão para hipertensão, problemas digestivos, náuseas e frio, para curar feridas externamente e ainda como xarope contra a tosse e bronquite (DI STASI et al., 2002). No estado da Bahia foram realizados mais dois estudos onde a espécie *Lippia alba* também foi a mais citada, usada

como sedativo, para hipertensão, dor e flatulência (RODRIGUES E GUEDES, 2006). Em Pernambuco, no município de Igarassu, a *Lippia alba* foi citada para uso em tratamento de anemia e problemas digestivos (GAZZANEO et al., 2005).

1.3.2 Atividades biológicas

Considerando as atividades biológicas de extratos e/ou frações polares da espécie *Lippia alba*, encontramos estudos *in vitro* que constataram: atividade antioxidante, que preserva o DNA de um possível stress oxidativo (RAMOS et al., 2003); atividade antimicrobiana evidenciada contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*), causadoras de infecções respiratórias (CÁCERES et al., 1991; SOARES, 2001). Em outro estudo usando extratos hidroalcoólicos à 90% de teor alcoólico não observou-se atividade antimicrobiana, porém evidenciou-se que o mesmo apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. crusei* (HOLETZ et al., 2002). Utilizando extrato etanólico de raiz de *Lippia alba* evidenciou-se atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e contra *Klebsiella pneumonia* (SENA-FILHO et al., 2006). Corroborando com este estudo Aguiar e colaboradores (2008) utilizaram também a partir da raiz de *Lippia alba* além do extrato etanólico, extratos acetônicos e clorofórmicos e constatou-se atividade frente a *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Monilia sitophila* e *Candida albicans*, aplicou-se também extratos hexânicos, etanólico e metanólicos das folhas de *Lippia alba* e verificou-se inibição de *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Chrysonilia sitophila*. Além desses patógenos, evidenciou em outro investigação a ação da *Lippia alba* frente ao *Bacillis subtilis*, *Sacrina lutea*, *Xanthomonas campestri* e *Escherichia coli* (MAMUN-OR-RASHID et al., 2012).

Atividade antimicrobiana também foi observada em outras espécies de microrganismos utilizando extratos brutos, óleo essencial e mel do néctar das flores de *Lippia alba*, como: frente ao fungo *Candida albicans* (HOLETZ et al., 2002), contra os vírus da Herpes simples tipo I e da pólio tipo 2 (PV-2) (ANDREGHETTI-FROHNER et al., 2005), contra o vírus influenza tipo A (H3N2) (RUFFA et al., 2004) e contra a replicação do vírus da febre amarela (GOMEZ et al., 2013). Constatou-se ainda ação em potencial frente a fungos dermatófitos com o óleo essencial rico em linalol (COSTA et al., 2013).

Na realização de testes *in vivo* observou-se que a infusão da *Lippia alba* protege contra o aparecimento de úlceras gástricas induzidas por indometacina, considerando assim sua

atividade antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001b), e ainda relatos da mesma atividade determinada por constituintes majoritários, como 1,8-cineol (SANTOS; RAO, 2001), linalol (BAROCELLI et al., 2004), limoneno (MORAES et al., 2009; ROZZA et al., 2010) e citral (ORTIZ et al., 2010). Estudos realizados para avaliarem propriedades sedativas constatou ação fraca ou moderada do quimiotipo citral sobre os receptores benzodiazepínicos (HENNEBELLE et al., 2008a). Corroborando com estes tipos de estudo, analisou-se atividade de um quimiotipo de *Lippia alba*, a carvona, e evidenciaram significativa ação ansiolítica do óleo essencial (HATANO et al., 2012). Avaliando atividades antinociceptiva e antiedematogênica do óleo essencial dos quimiotipos citral-limoneno e carvona-limoneno mostraram resultados significativos para os testes de placa quente e contorções abdominais (VIANA et al., 1998). Observou-se ainda atividade inibitória na excitabilidade do nervo isquiático de ratos, utilizando o óleo essencial de *Lippia alba* (SOUSA et al., 2015).

No intuito de avaliar um dos seus principais usos tradicionais, modelos de investigação que usaram a *Lippia alba* para hipertensão observaram que o extrato da mesma reduziu a frequência cardíaca em coração isolado de rato, porém sem mudança da sua força contrátil (GAZOLA et al., 2004), e ainda ação hipotensora causada pelo componente majoritário de um quimiotipo de *Lippia alba*, o citronelol (BASTOS et al., 2009).

Foi investigada também a ação antioxidante da *Lippia alba* e em estudo realizado com óleo essencial das folhas, obtidos por hidrodestilação, constatou-se resultado significativo, semelhante ao da vitamina E, usada como controle positivo (STASHENKO et al., 2004). Corroborando com este estudo, utilizando extratos metanólicos das folhas de *Lippia alba* demonstrou também propriedade antioxidante, atribuída a flavonoides e cumarinas (HENNEBELLE et al., 2008a).

Um estudo clínico, de fase II, não controlado e prospectivo, foi também relatado utilizando extratos hidroalcoólicos das folhas de *Lippia alba* em pacientes que relatavam crises de enxaqueca, e observou-se que o quimiotipo que tinham carvona e geranial como compostos majoritários reduziram significativamente a frequência e a intensidade da dor (CONDE, 2011).

1.4 Citral

O citral é um monoterpeno bastante apreciado pelas indústrias de alimentos, farmacêuticas e ainda de cosméticos e perfumaria (LALKO; API, 2006). É possível defini-lo como um metabólito secundário, resultante da união de dois compostos químicos o trans-

isômero geranial ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) e o cis-isômero neral ((z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 2) (MATOS, 2000).

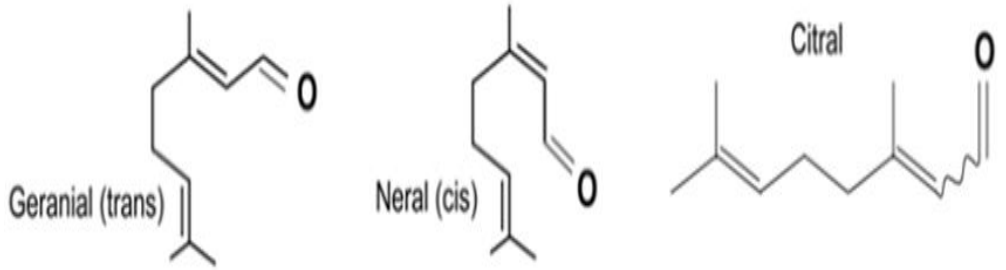

Figura 2. Representação da estrutura química dos trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, compostos que compõem o citral**. Fonte:** Adaptado de CARVALHO, 2014

É um constituinte que apresenta aroma bastante característico, comparado ao intenso odor do limão, o que conferiu ao citral grande aplicabilidade nas indústrias de perfumaria, de detergentes e ainda na alimentícia, bem difundida na cozinha do Sudeste Asiático (DUDAI et al., 2005). Além disso, é utilizado na produção das ionona, beta caroteno e para composição da vitamina A (MARTINS et al., 2004).

É possível encontrar o citral na constituição dos óleos essenciais de diversas plantas, principalmente nas consideradas cítricas, entre as mais conhecidas com grande teor de citral temos: o capim limão (*Cybopogon citratus*), a verbena (*Verbena officinalis*), a melissa (*Melissa officinalis*) e nas variadas espécies do gênero *Lippia* (DUDAI et al., 2005).

Como o citral está como constituinte majoritário em várias plantas medicinais, é atribuído a sua molécula algumas atividades biológicas. Observou-se atividade antisséptica, mais forte em cinco vezes que no fenol (HARBORNE et al., 1999). Apresentou ação calmante e espasmolítica (MATOS, 2000). Para o óleo essencial da espécie *Cybopogon citratus,* foi demonstrado atividade antifúngica, a qual foi atribuída ao citral, uma vez que este representa mais de 70% da composição do óleo essencial (PARANAGAMA et al., 2003; MAHANTA et al., 2007; ROZWALKA et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2011; AQUINO et al., 2012), pela atividade anti-helmíntica (ALMEIDA et al., 2003), antibacteriana (PEREIRA et al., 2004; VARGAS et al., 2010; VALERIANO et al., 2012), antiprotozoários (ROJAS et al., 2012), repelente (YANES, 2011), larvicida (FURTADO et al., 2005; FREITAS et al., 2010) e inseticida (SAMARASEKERA et al., 2006; FRANZ et al., 2011; SOARES et al., 2011).

Ainda foi possível identificar que o citral demonstrou atividade como agente anti-mutagênico, antimicrobiano e inibidor enzimático (RAO et al., 2005).

A espécie *Lippia alba* em alguns de seus quimiotipos tem o citral como constituinte predominante, e nestes observou-se atividades biológicas que podem estar atribuídas ao citral e que se assemelham as citadas para o capim limão, tais como: calmante, antiespasmódica suave, analgésica, sedativa, ansiolítica, antibacteriana (SILVA et al., 2012; SENA FILHO, et al., 2006).

1.5 Limoneno

O limoneno, 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexeno, é um monoterpeno monocíclico que está presente na estrutura de muitos vegetais (BURDOCK, 1995). Como um dos monoterpenos mais abundantes, pode ser encontrado em algumas árvores e arbustos, e pode representar o maior constituinte de muitos óleos essenciais, especialmente os advindos de plantas com características cítricas, como laranja e limão (BICAS; PASTORE, 2007).

O limoneno possui dois enantiômeros, que se encontra em abundancia na natureza O *S*-(-)-limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto *R*-(+)-limoneno é o componente majoritário dos óleos das cascas de limão e laranja, assim como do óleo essencial de alcarávia, os quais conferem funções naturais de proteção e evitando a desidratação dos vegetais que eles estão presentes (Figura 3) (DEMYTTENAERE; KIMPE**,** 2001).

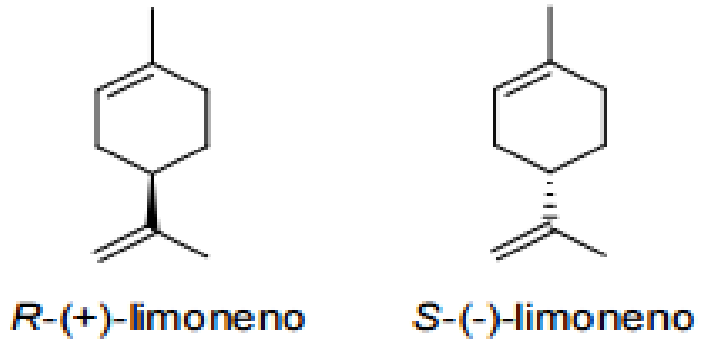

Figura 3. Estrutura química dos enantiômeros do limoneno, o (R)-limoneno e o (S)- limoneno, respectivamente.
Fonte: Adaptado de LEAL, 2011.

Possui como característica marcante o seu odor, e por este motivo é bastante comercializado, além de ser facilmente obtido. O limoneno apresenta uma vasta utilização

que envolve grandes interesses das indústrias, destacando-se como solvente para produtos a base de óleo e resina, e ainda para conferir sabor e/ou odor de laranja em produtos alimentícios, cosméticos e de limpeza (SANTOS, 2005). Seu uso como solvente biodegradável direto pode substituir produtos como metil, cetona e acetona, para fabricação de adesivos e borrachas, como flavorizantes e ainda como aditivo para combustível (FILIPSSON, 1998). O limoneno é um subproduto industrial indicado para bioconversões a compostos de elevado valor comercial, graças á características como, baixa solubilidade em água, elevada tendência a autoxidação e polimerização, e a formação de "off-flavors" (BERGER et al., 2002).

Foi possível sintetizar a molécula do limoneno, e com seu uso bastante difundido como produto para produção de compostos naturais é possível obter várias atividades biológicas (FERRARINI, 2008). Boa parte das ações biológicas atribuídas ao limoneno deve-se a alteração de sua molécula para formar compostos derivados (CARDOSO; GONÇALVES; 1995).

Várias atividades já foram citadas no meio científico apresentando como responsável o limoneno, mesmo sendo sua maioria direcionada a composto derivados desta molécula. Para tais atividades temos: atividade antifúngica, antibacteriana, antitumoral, inseticida, repelente, acaricida (HOLLINGSWORTH, 2005; CAVALCANTI et al., 2011;). Ainda é possível citar atividade antimicrobiana do óxido de limoneno, derivados do limoneno e óleo essencial contendo limoneno, atividade antifúngica de análogos sintéticos, do óxido de limoneno e óleo essencial, atividade antitumoral do limoneno, do óxido e derivados entre outras (BELETTI, et al., 2004; GRAEBIN et al., 2004; ARRUDA, et al., 2006; CAVALCANTI, et al. 2011).

Segundo Singh et al. (2010) esse monoterpeno possui efeito anti-inflamatório, antioxidante e antifúngico. Outros estudos também revelaram o efeito inibidor do limoneno em vários microrganismos, e que o mesmo diminui a velocidade do processo de fosforilação oxidativa nas células (CHATTERJEE E BHATTACHARYYA, 2001).

1.6 Mecanismos de contração e relaxamento do Músculo Liso Vascular

Mecanismo de Contração

A contração do músculo liso vascular é essencialmente coordenada através da sinalização do cálcio (Ca^{+2}). Basicamente é possível distinguir duas maneiras de resposta contrátil no músculo liso que levam a dois tipos de acoplamento: um que pode ocorrer através

da despolarização da membrana, denominada acoplamento eletromecânico e outra, que ocorre através da ativação de receptores de membrana, através de agonistas, chamada de acoplamento farmacomecânico (SOMLYO E SOMLYO, 1968).

Assim, o músculo liso passou a ser uma importante possibilidade para o desenvolvimento de técnicas que permitissem estudar substâncias que interferissem na sinalização do Ca^{+2} (KARAKI et al., 1997). O cálcio desenvolve ações estratégicas e necessárias, atua como segundo mensageiro, além de está envolvido em vários processos biológicos, como regulação enzimática, trânsito de proteínas, apoptose e a orientação do acoplamento excitação-contração do músculo (CARAFOLI, 2002). Normalmente esse íon sinalizador pode advir do meio extracelular através do influxo dele pelos canais na membrana plasmática, ou do meio intracelular através dos seus estoques internos, primordialmente pelo retículo sarcoplasmático que liberam o Ca^{+2} para o citosol (PAN E MA, 2003).

A resposta contrátil ocorrida no acoplamento eletromecânico é gerada devido a uma despolarização da membrana que ocorre com aumento da concentração externa de K^{+}, ou indiretamente pela ligação de algum agonista ao seu receptor, e consequentemente abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (VOCCs), causando entrada de Ca^{+2} e, gerar contração (REMBOLD, 1996).

No acoplamento farmacomecânico a resposta contrátil pode acontecer através do aumento de 1,4,5- trifosfato de inositol (IP_3) e do diacilglicerol, pela ativação da proteína $G_{q/11}$- fosfolipase C (PLC) mediante ligação de um agonista. A liberação de cálcio dos estoques intracelulares ocorre mediante ligação do IP_3 ao seu receptor de IP_3, provocando a formação do complexo cálcio-calmodolina, e assim a contração (GARRET E GRISHAM, 1995). Outra resposta contrátil pode ocorrer através da abertura dos canais de Ca^{+2} tipo L, levando a um influxo de Ca^{+2} sem mudança do potencial de membrana, ou ainda a liberação de Ca^{+2} provocada por Ca^{+2} através dos receptores de rianodina, sensíveis a cafeína, que estão presentes na membrana do retículo sarcoplasmático (KOMORI et al., 1995).

Outra possibilidade é relatada sobre a contração do músculo liso, é a modulação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP). A harmonia entre a cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) e a MLCP se desenvolve como um mecanismo regulador reversível de fosforilação/desfosforilação que compõem a contração da musculatura lisa. Ocorre a inibição da MLCP através da ativação da proteína ligante de GTP (RhoA), a qual estimula a sua quinase associada (ROK) (KIMURA et al., 1996; KARAKI et al., 1997; HORI E KARAKI, 1998) e uma fosfolipase D (PLD) específica para fosfatidilcolina, o que libera ácido fosfatídico o qual é o diacilglicerol (DAG), ocorrendo assim a ativação do proteína quinase C

(PKC) (EXTON, 1997). A ROK e a PKC agem de forma isolada, porém em cooperação para inibir a atividade da MLCP (Figura 4) (SOMLYO e SOMLYO, 2000).

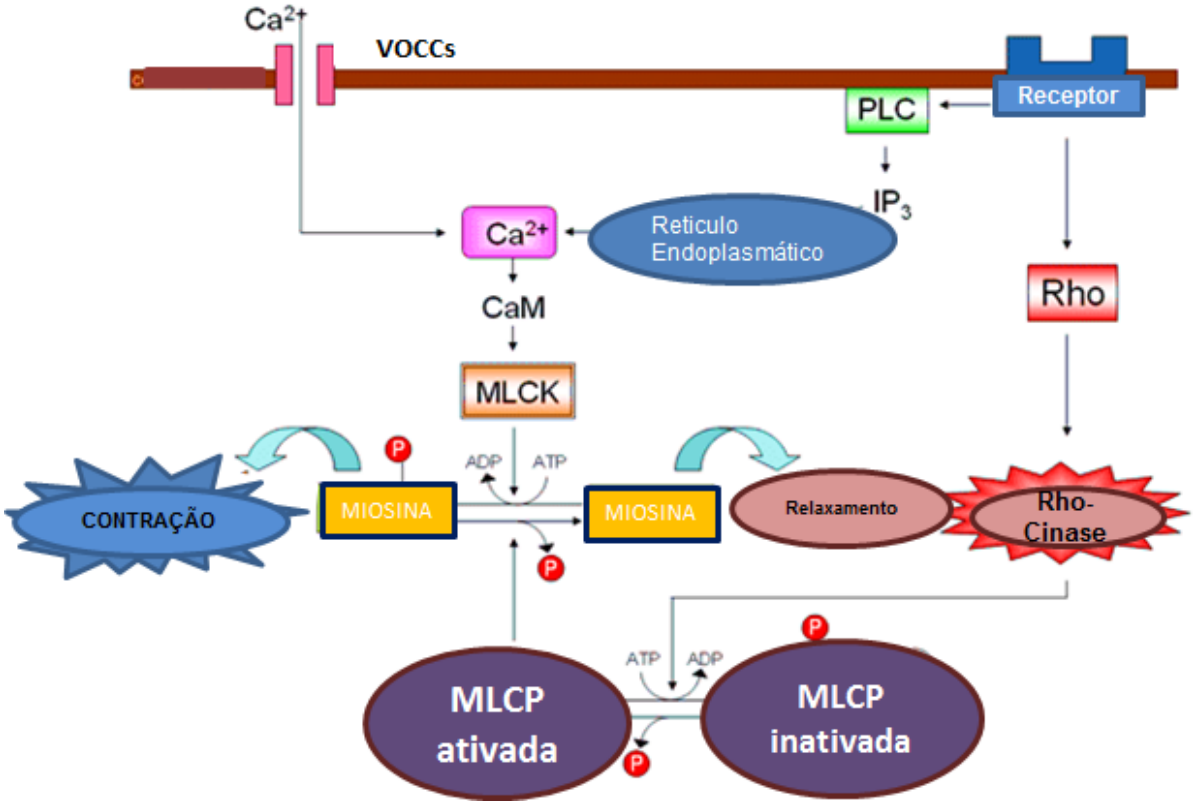

Figura 4. Representação esquemática da contração e do relaxamento do músculo liso no acoplamento farmacomecânico. Diversos agonista de receptores ligado a proteína G, estimulam, simultaneamente a produção de IP3 e a via da Rho cinase. O IP3 é produzido pela hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato, mediado pela fosfolipase C- PLC. O IP3 aumenta o cálcio intracelular pela abertura dos canais de cálcio dependente de IP3 no retículo sarcoplasmático, resultando assim no aumento de cálcio e na ativação da enzima cálcio/calmodulina e na fosforilação subsequente cinase de cadeia leve da miosina MLCK, promovendo a integração actina-miosina (contração). O cálcio de origem dos canais catiônicos operado por voltagem- VOOCs promove uma potencialização da resposta de contração. Outra via de potencialização é via proteína Rho, que estimula a Rho cinase que ativa a MLCP-fosfatase de cadeia leve da miosina promovendo um aumento da contração. Fonte: Adaptado de Berne e Levy, 2011.

Mecanismo de relaxamento

O relaxamento do músculo liso pode ocorrer diretamente pela abertura dos canais de K^+ através do mecanismo eletromecânico, a hiperpolarização. Pode ser provocada por drogas, como por exemplo, a cromacalina, ou através de fatores hiperpolarizante derivados do endotélio (FHDEs) (CAMPBELL et al., 1996; MEDHORA et al., 2001; ARCHER et al.,

2003)**,** o que aumentará o efluxo de K^+ da célula (GURNEY, 1994). Outra possibilidade, indiretamente é em função da liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), como o NO ou a prostaciclinas (DUSTING; MONCADA; VANE, 1977). O NO ativa a guanilil ciclase solúvel, que produz o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), e este aumento da concentração de GMPc ativa a proteína quinase G (PKG). Já na ligação das prostaciclinas (PGI2) ao seu receptor, ativará a ciclase de Adenil (AC), levando a formação do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), o qual ativa a proteína quinase A (PKA), e em concentrações elevadas ativa a PKG. O resultado final destes mecanismos é a ativação dos canais de K^+ por essas quinases, e esta hiperpolarização diminuirá o influxo de Ca^{2+} , diminuindo sua concentração, fosforilação da miosina e por fim da contração (REMBOLD, 1996).

Através do acoplamento farmacomecânico podemos ter o aumento da atuação da enzima Ca^{2+} -ATPase no retículo sarcoplasmático ou na membrana plasmática, pela fosforilação através da PKG e/ou PKA, ocasionado aumento do sequestro e saída de Ca^{2+} , reduzindo assim sua concentração intracelular. Pode também ocorrer diminuição da formação de IP_3 e consequente diminuição da liberação do cálcio nos estoques intracelulares. Outra forma é acontecer redução da concentração de Ca^{2+} via GMPc/PKG ou AMPc/PKA por diminuir indiretamente o influxo de Ca^{2+}. E ainda poderá diminuir a concentração de Ca^{2+} por ativar o trocador de Na^+/ Ca^{2+} na membrana plasmática (BLAUSTEIN, 1989).

1.7 Regulação do tônus vascular

O controle do tônus vascular é de extrema relevância para vários processos fisiológicos, como o da regulação da pressão sanguínea e distribuição do fluxo, através dos processos de contração e relaxamento do músculo liso. Alterações nesses processos são geralmente associadas com várias doenças, e uma das mais citadas alterações é o aumento na tensão aórtica que tem causado problemas como: aterosclerose (DART et al., 1991), vários fatores de risco como hipertensão (DZAU E SAFAR, 1988;HEINTS et al, 1993) diabetes (LIU E FUNG, 1992; AIRAKSINEN et al., 1993;SALOMMA et al., 1995), hiperlipidemia (LEHMANN et al., 1992).

Esta regulação é um importante fator para controle da hipertensão, e o responsável por este comando é o endotélio. Ele é formado por células epiteliais, compondo a camada mais íntima dos vasos sanguíneos, tendo contato direto com a corrente sanguínea. O endotélio

detecta estímulos mecânicos (*shear stress)* e hormonais, e em resposta tem a capacidade de produzir e secretar várias substâncias vasodilatadoras e inflamatórias, dentre elas o óxido nítrico (NO), as prostaciclinas (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (ZANESCO e ANTUNES, 2005). E entre as substâncias vasoconstritoras, cita-se a endotelina-1, angiotensina II, o tromboxano A_2 e espécies reativas de oxigênio. Além dessas funções o endotélio participa da angiogênese, do equilíbrio dos fluidos e da permeabilidade vascular (ENDEMANN e SCHIFFRIN, 2004; YASUNAGA et al., 2014).

Em resposta ao constante estresse de cisalhamento do sangue com as paredes dos vasos, normalmente as células endoteliais liberam basalmente NO, modulando, consequentemente, a todo o momento o processo de contração da musculatura lisa vascular (RUBANY et al., 1986). No entanto, em momentos de súbita diminuição da enzima NO sintase (NOS) endotelial, é possível identificar um aumento do tônus miogênico ou da ação de agentes vasoconstritores no músculo liso vascular, aumentando assim a contração, observado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (REES et al., 1989). O relaxamento da musculatura lisa vascular através do NO está diretamente relacionado a estimulação da enzima guanilil ciclase solúvel, e consequentemente, crescimento da produção GMPc (FLEMING e BUSSE, 1999). Este, prontamente estimula a quinase dependente de GMPc (PKG), a qual através de inúmeros mecanismos promove relaxamento da musculatura lisa dos vasos. Além disso, a PKG poderá ativar os canais de K^+ levando a uma hiperpolarização ou ainda, promover a saída de Ca^{2+} intracelular, gerando uma vasodilatação. O envolvimento neste processo é tão complexo da PKG que a mesma, de semelhante modo, pode diminuir a sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{2+}, e reduzir a contração muscular (RAPOPORT E MURAD, 1983).

Outra substância capaz de relaxar o músculo liso vascular, produzida no endotélio, é a prostaciclinas (PGI_2). Ela é formada a partir do ácido araquidônico, e catalisada pela PGI_2 sintase (BOS et al., 2004). A atividade desta é mediada através da ativação da adenilato ciclase, e consequente aumento do AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (MONCADA e VANE,1979; TATESON et al.,).

Além do NO e das prostaciclinas, o endotélio ainda produz uma terceira substância relaxante que produz hiperpolarização do músculo liso vascular. Mesmo exercendo importante função fisiológica no controle do tônus vascular, sua identidade química é desconhecida, porém, sabe-se que é resistente as inibidores da NOS e da cicloxigenase (COX). O fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) tem seu mecanismo desenvolvido via ativação de canais para potássio e/ou através da ativação das junções comunicantes entre as células endoteliais, o que levará o vasorrelaxamento (RICHARD e

COHEN, 2005). Porém o relaxamento endotelial ligado ao EDHF é evitado pelo uso de inibidores da Na^+/K^+-ATPase, do bário ou ainda a remoção do endotélio (Figura 5) (SCOTLAND et al, 2005).

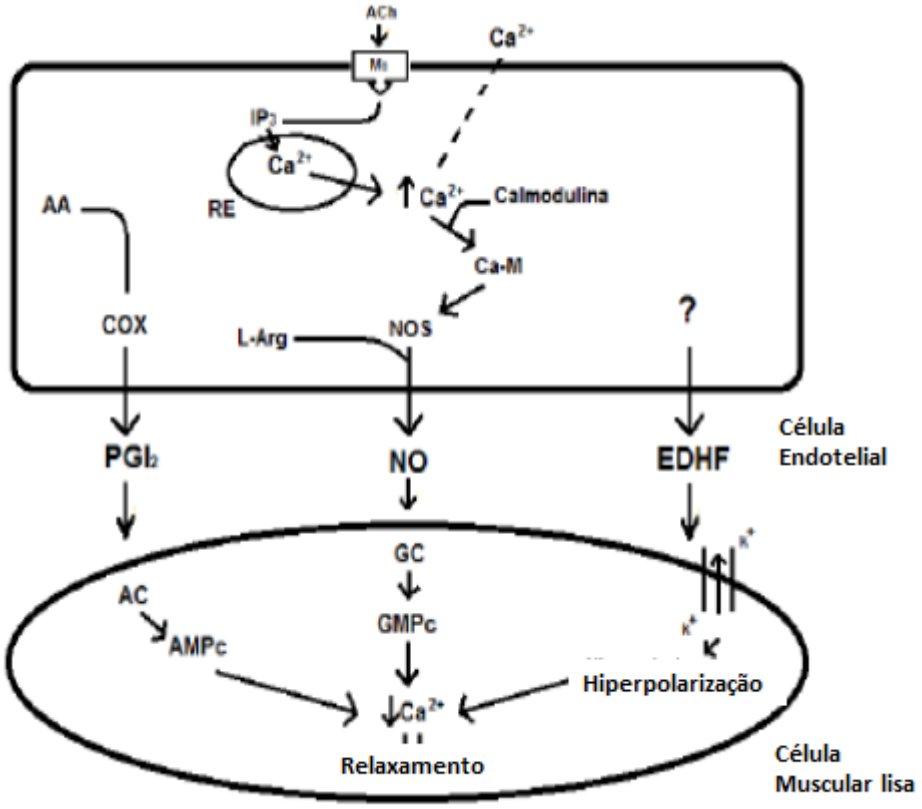

Figura 5. Fatores relaxantes produzidos pelo endotélio vascular. Via da prostaciclinas (PGI_2), via da produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). PGI_2 é formada a partir do ácido araquidônico (AA) pela ação da ciclooxigenase (COX) no endotélio, promovendo o relaxamento da célula muscular lisa adjacente via aumento do AMPc. O estímulo das células endoteliais , com acetilcolina (ACh) e outros agentes resulta na formação e na liberação do fator relaxante derivados do endotélio como o óxido nítrico (NO). O NO estimula a guanilil ciclase (GC) promovendo um aumento do GMPc no musculo liso vascular para produzir o relaxamento. A via EDHF poderá ativar os canais de K^+ levando a uma hiperpolarização ou ainda, promover a saída de Ca^{2+} intracelular, gerando uma vasodilatação. (Adaptado de STANKEVICIUS et al., 2003).

1.8 Justificativa e Relevância

Nos últimos tempos o interesse pelas plantas medicinais como fonte de tratamento tem tido uma ressignificação por diversos fatores, como: a preferência por terapias naturais, a preocupação com efeitos colaterais das drogas sintetizadas, alto custo das drogas sintéticas,

falta de acesso pela população mais carente e ainda um resgate das práticas populares (CALIXTO, 2000).

No entanto, o uso das plantas medicinais vem a cada dia sendo explorado no tocante à sua atividade farmacológica, para que se consolide em comprovações científicas e seu uso seja de forma segura (MENDELSON E BALICK, 1995). Pois ainda temos inúmeras plantas usadas como forma terapêutica, cuja eficácia e segurança ainda não foram comprovadas (SOARES, 2008). Grande parte das pessoas que utilizam as plantas medicinais relatam intervenção no nível primário da saúde e ainda para tratar doenças agudas e crônicas, dentre as quais a hipertensão.

Há poucos estudo sobre a atividade da *Lippia alba* no sistema cardiovascular. O que se sabe até o momento é que em alguns estudos relataram atividade vasorrelaxante atribuídos a potentes compostos, que foram isolados a partir da *Lippia alba*, como os verbascosídeos e isoverbascosídeos, os glicosídeos de apigenina (citrus bioflavonóide) e ainda a luteolina (HENNEBELLE et al., 2008). Em outros estudos avaliou-se o efeito da *Lippia alba* sobre a hipertensão, observou-se que o extrato da mesma reduziu a frequência cardíaca em coração isolado de rato, porém sem mudança da sua força contrátil (GAZOLA et al., 2004). Entretanto ainda não temos a elucidação pela farmacologia experimental do uso da *Lippia alba* e seus constituintes citral e do limoneno como agentes envolvidos na regulação da contração da musculatura lisa vascular e consequentemente auxiliar na regulação dos mecanismos de controle da pressão arterial.

Sendo assim, o estudo do óleo essencial da *Lippia alba* (OELa) e dos seus componentes, citral e limoneno, é de extrema importância para que possamos elucidar a sua verdadeira ação no músculo liso vascular, estrutura esta, importante na fisiopatologia das doenças cardiovasculares, como a hipertensão. Além disso, é relevante realizarmos o resgate da cultura medicinal popular, visto ser uma planta largamente utilizada pela população, como base para busca de elucidação científica, valorizando assim a pesquisa com produtos naturais.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeitos do OELa e seus componentes majoritários, citral e limoneno, sobre a contratilidade da musculatura lisa de aorta torácica em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do OELa sobre o tônus intrínseco da musculatura lisa da aorta de rato;
- Investigar o mecanismo de ação farmacológica do OELa e dos seus constituintes citral e limoneno nos parâmetros contráteis do acoplamento eletromecânico e farmacomecânico da contração muscular lisa da aorta de rato;
- Verificar a participação do endotélio vascular no efeito vasorrelaxante do OELa e seus componentes citral e limoneno em aorta isolada de rato;
- Avaliar a ação do OELa , do citral e do limoneno sobre a via que promovem sensibilidade aos canais de cálcio das proteínas contráteis do músculo liso de aorta de rato;
- Avaliar a ação do OELa , do citral e do limoneno sobre a via da proteína Rho quinase;

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Materiais

3.1.1 Sais e Fármacos

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas foram de grau e pureza analítica, obtidos da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). As concentrações foram expressas em milimol/litro (mM).

O cloridrato de acetilcolina (ACh), o ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético (EGTA), a fenilefrina (FE), a nifedipina (NIF) ,o NG-nitro-L-arginina-metil-éster (LNAME), e o Y27632 foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

3.1.2 Óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown

O óleo essencial extraído de uma amostra de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foi fornecido pelo Dr. Sergio Horta (fazenda experimental da UFC) e analisados no Laboratório de Produtos Naturais e do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará. Os componentes identificados como majoritários na amostra de OELa, o citral e o limoneno foram adquiridos da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). O acompanhamento dos constituintes presentes no OELa foi realizado através de técnicas cromatográficas, analisados na PADETEC, tendo como quantificação dos principais constituintes: 75,92% de citral [geranial (41.81%) e neral (34.11%)], 9,85% de 1-limoneno, 8,92% de carvona, 2,05% de gamma-terpineno e 1,02% de 1-methyl-3-(1-methylethyl) (1.02%).

3.1.3 Soluções

A solução nutridora utilizada de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) apresenta a seguinte composição em mM: 136,0 NaCl; 5,0 KCl; 0,98 $MgCl_2$; 0,36 NaH_2PO_4; 11,9 $NaHCO_3$; 2,0 $CaCl_2$ e 5,5 Glicose. Esta solução nutritiva foi mantida sob aeração por borbulhamento de ar constante, à temperatura de 37° C e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH (1M).

O OELa, o citral e o limoneno foram preparados na forma de solução, diluídos diretamente em Tyrode e tween. O L-NAME e o Y27632 foram dissolvidos em água destilada. Todas as soluções estoques foram armazenadas a -4 ºC para posterior utilização.

A administração do OELa, citral e limoneno, bem como de todas as substâncias foram realizadas de forma hipertônica, observando os volumes específicos adicionados diretamente ao banho, com a finalidade de atingir as concentrações finais esperadas dentro da câmara de banho de órgão isolado.

A solução isenta de cálcio ou "zero cálcio" ($0Ca^{2+}$) foi produzida com a omissão do $CaCl_2$ da solução de Tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA.

3.1.4 Animais

Os animais utilizados neste trabalho foram ratos (*Rattus norvegicus*) albinos machos, variedade Wistar, pesando entre 200-300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri- URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de 23 ± 2° C, em ciclo claro/escuro de doze horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, tratados de acordo com as recomendações de manuseio bioético do Guia Internacional de Princípios para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, Suíça, e do livro "Princípios éticos na experimentação animal" do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri - URCA, registrado sob o número de protocolo: 00084/2014.2.

3.2 Métodos

3.2.1 Procedimento para isolamento da aorta torácica de rato

Os animais foram sacrificados por decaptação, pesados, e logo em seguida dissecados, promovendo a abertura da região cervical-torácica, remoção dos pulmões e coração para a exposição do seguimento torácico da aorta que foi isolada e cuidadosamente removida. A aorta torácica foi, então, transferida para uma placa de Petri contendo solução nutridora Tyrode, onde foi realizada toda limpeza, eliminando tecidos anexos e logo após seccionada em segmentos transversos circulares medindo ente 4-5mm de comprimento. Para

determinados experimentos, o endotélio foi removido através de uma leve raspagem das paredes internas de cada segmento de aorta.

3.2.2 Medidas da atividade contrátil da aorta

Os segmentos de aorta foram montados, cada um por vez, em banho de órgão isolado, com capacidade para 10 ml da solução nutridora Tyrode, mantidos sob contínua aeração por borbulhamento de ar, temperatura de 37°C e pH 7,4. As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas passando duas hastes metálicas através do lúmen dos anéis de aorta, sendo: uma haste fixa do equipamento, e outra haste, móvel, conectada, verticalemente, a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), o qual permitia captar a medida de tensão isométrica produzida pelos anéis de aorta, sendo transformadas em sinais elétricos. O tansdutor estava conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), e este à entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para análise posterior (Figura 6). Depois da montagem da preparação, os anéis de aorta isolados foram submetidos a uma tensão de 1g , reajustado quando necessário, e mantido por um período de 1 hora, com a finalidade de adaptação do tecido às novas condições. Nesse período realizou-se renovação da solução nutridora a cada 15 minutos. Chegando ao final da estabilização, considerou-se que a preparação alcançou seu tônus basal de repouso.

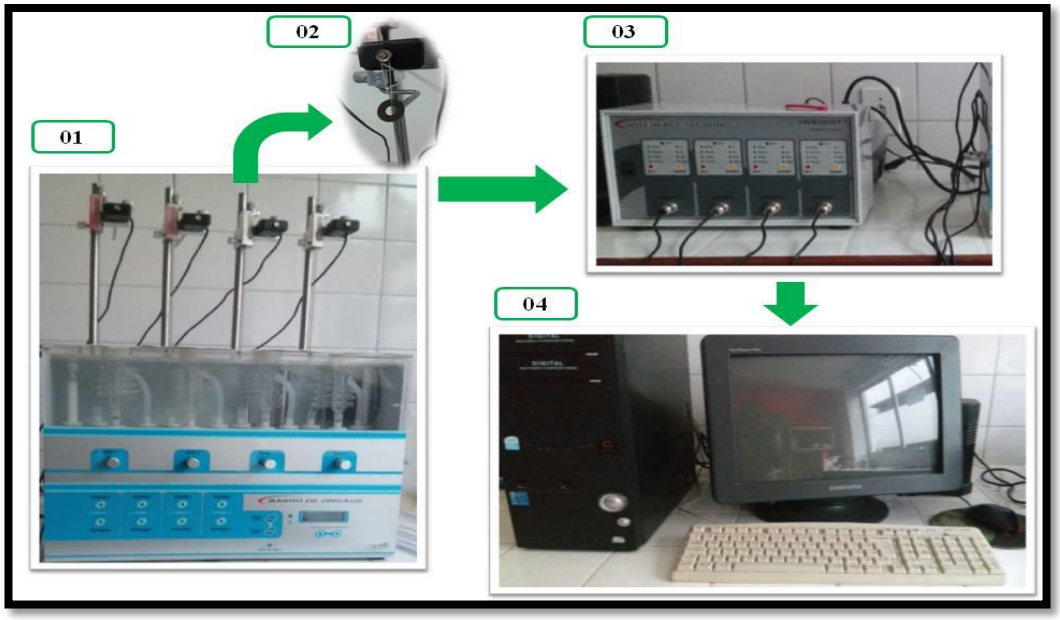

Figura 6. **Esquema ilustrativo do equipamento utilizado para medir a resposta mecânica do músculo liso**. Em 01: Banho de órgão isolado (acondiciona o tecido nas condições fisiológicas ideais para o desenvolvimento do experimento); 02: transdutor (transmissão da resposta mecânica do tecido para o amplificador); 03: amplificador do sinal; 04: computador- responsável por converter os dados coletados em traçados digitais e armazená-los em arquivos através do software WINDAQ. FONTE: SILVA, 2015.

3.2.3 Protocolos experimentais

Após o período de estabilização todos os protocolos iniciaram com duas contrações subsequentes, com intervalo de 30 minutos, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60),de modo hipertônico, administrados em todos os anéis de aorta estudados. Esta manobra teve a finalidade de avaliar a viabilidade da preparaçao e a capacidade contrátil dos anéis de aorta isolados. Após a contração induzida pelo K60 atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. Apenas os experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para as séries experimentais

Posterior a estabilização seguida do K60, verificou-se a integridade funcional do endotélio através do relaxamento provocado por Ach (10 µM) sobre contrações induzidas por FE (0,1µM). Os anéis eram considerados com endotélio íntegro quando apresentavam relaxamento maior que 70% da contração, e caso fosse inferior ou igual a 10% era considerado sem endotélio. Após este procedimento, os anéis de aorta eram lavados com a

solução nutridora, Tyrode, e novamente esperado um período de estabilização em tensão basal antes da realização dos protocolos experimentais.

Todos os experimentos foram realizados sempre com a existência de uma preparação controle e experimental, a qual foi submetida às mesmas situações e aos mesmos protocolos experimentais. As preparações controle receberam somente o veículo, Tween, diluído em solução de Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais.

3.2.3.1 Avaliação do efeito do OELa sobre o tônus intrínseco da aorta isolada de rato

Para avaliar o efeito do OELa sobre o tônus muscular espontâneo da aorta, administrou-se concentrações crescentes e cumulativas do OELa (1, 3,10,30,100,300,600 e 1000 µg/ml) em anéis de aorta, sobre tensão basal de 1g.

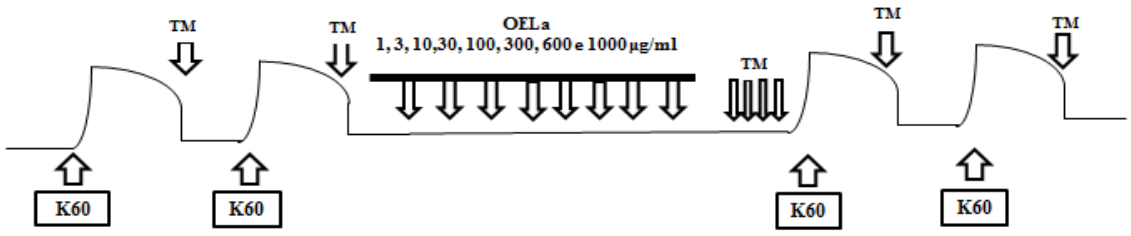

Figura 7. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito do OELa sobre o tônus intrínseco da aorta isolada de rato. TM= Tyrode modificado.

3.2.3.2 Efeito do OELa , citral e limoneno sobre contração induzida por K^+ em aorta isolada de rato

Para avaliar o efeito relaxante na contração do músculo liso que ocorre pelo acoplamento eletromecânico, foram administradas concentrações crescentes e cumulativas do OELa (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000µg/ml), do citral (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600 e 1000µM), e do limoneno (1, 3, 10, 30, 100, 300, 600, 1000 e 3000µM), em preparações de aorta com e sem endotélio, sobre o tônus vascular estável induzido por K60 em anéis de aorta.

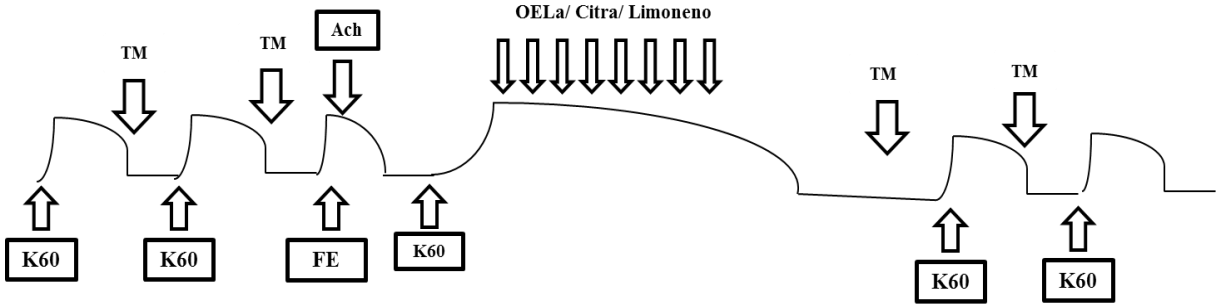

Figura 8. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito do OELa , citral e limoneno sobre contração induzida por K^+ em aorta isolada de rato. TM=Tyrode Modificado.

3.2.3.3 Efeito do OELa , citral e limoneno sobre contrações induzidas e sustentadas por fenilefrina em aorta isolada de rato

Para testar o efeito do OELa, citral e limoneno sobre o acoplamento farmacomecânico, essas substâncias foram administradas cumulativamente (1-1000µg/ml para o OELA, de 1-1000µM para citral, e de 1-3000µM para o limoneno) sobre o tônus vascular estável induzido por fenilefrina (0,1 µM) em anéis de aorta isolada de rato com e sem endotélio.

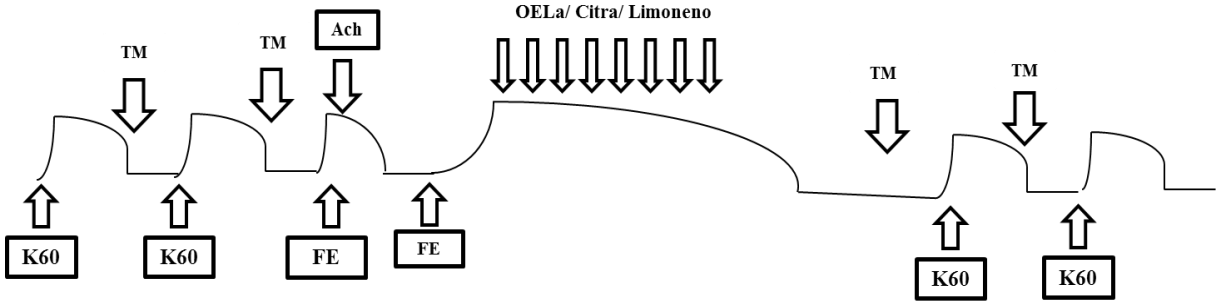

Figura 9. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito do OELa , citral e limoneno sobre contrações induzidas e sustentadas por fenilefrina em aorta isolada de rato. TM=Tyrode Modificado.

3.2.3.4 Influência do endotélio

Par avaliar a influência dos mediadores do endotélio, as preparações foram pré-incubadas com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, L-NAME (100µM, n=6) ou indometacina, bloqueador não seletivo das cicloxigenase (100µM, n=6). As preparações de aorta com endotélio preservado foram expostas durante 20 minutos ao L-NAME (100µM), e

em seguida uma nova contração com FE (0,1µM) era obtida. Nestas condições, foram adicionados sobre o platô de contração da FE (0,1µM) OEla (1-1000 µg/ml), citral (1-1000µM) ou limoneno (1-3000µM).

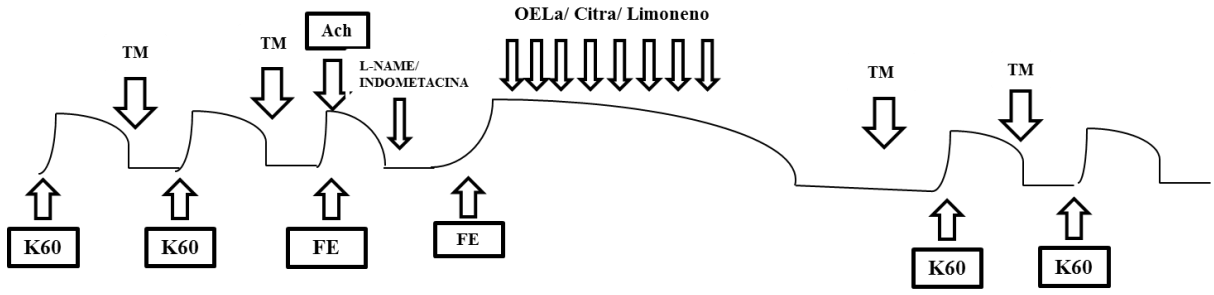

Figura 10. Esquema ilustrativo da avaliação da influência do endotélio. TM=Tyrode Modificado.

3.2.3.5 Efeito inibitório do OELa, do citral e do limoneno sobre contrações induzidas por $BaCl_2$

Neste protocolo foi avaliado o efeito inibitório do OELa, do citral e do limoneno em contrações induzidas pelo íon Ba^{2+} , nas preparações de anéis de aorta, despolarizados por potássio (K80mM) em solução livre de Ca^{2+}. Logo após verificar a viabilidade do tecido, a preparação foi mantida em solução de Tyrode livre de cálcio ($0Ca^{2+}$) na presença de alta concentração de potássio (K80mM) e EGTA (1mM), afim de reduzir o cálcio extracelular.

Em seguida, o OELA (1000µg/ml), citral (1000µM) e limoneno (1000µM), ou apenas o controle, foram adicionados a preparação, e seus efeitos expressos em curvas cumulativas concentração-resposta de $BaCl_2$ (0,1-30 mM) foi avaliada. Também foi incluído na curva a nifedipina (1µM), um bloqueador de canais de dihidropiridina, como controle positivo, sendo adicionada no lugar do veículo e depois de 10 min, sendo realizada curva cumulativa concentração-resposta de $BaCl_2$.

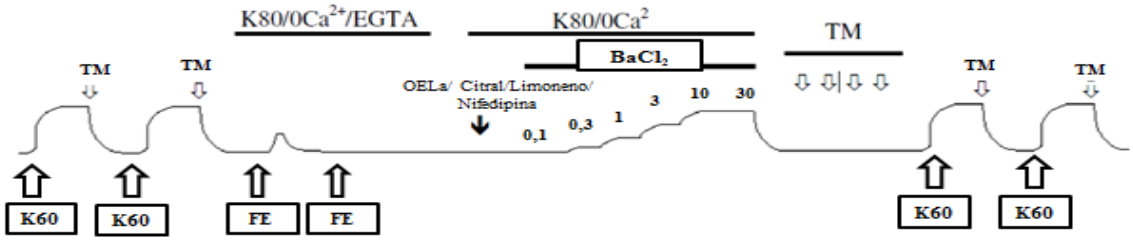

Figura 11. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito inibitório do OELa, do citral e do limoneno sobre contrações induzidas por $BaCl_2$

3.2.3.6 Efeito sobre a via da proteína Rho

Com a finalidade de avaliar a atuação do OELa, do citral e do limoneno pela via da Rho cinase, foi promovida uma contração sustentada por uma solução isotônica de KCl (K80), e sobre este platô de contração, administrou-se o Y27632 (1µM), um inibidor da Rho cinase. Em experimentos similares, foram administrados o OELa (1000µg/ml), ou citral, ou o limoneno (1000µM) sobre o platô da contração por K80, afim de comparar com o efeito do Y27632.

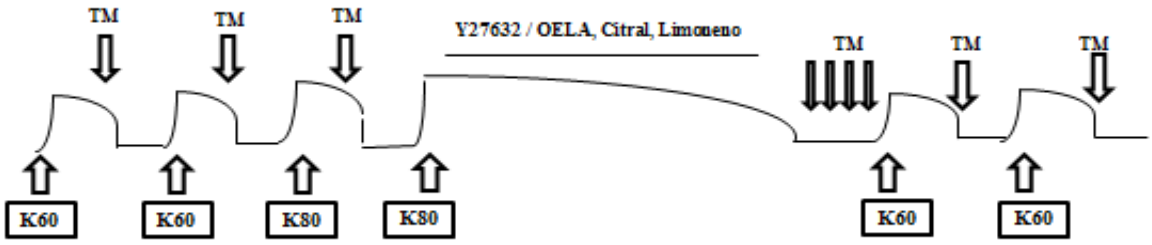

Figura 12. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito sobre a via da proteína Rho. TM= Tyrode modificado.

3.2.3.7 Efeito relaxante do OELa, citral e limoneno em contrações sustentadas e induzidas pelo BAY-K 8644 (3µM).

Neste protocolo experimental, buscou-se avaliar o efeito de concentrações cumulativas de OELa, citral e limoneno, sobre contrações sustentadas em resposta ao BAY-K 8644 (3µM), visto que o BAY-K 8644 facilita a abertura de canais de cálcio tipo-L, em contrações evocadas por elevadas concentrações de potássio. As preparações de aorta foram sensibilizados com KCL (10mM), e logo após induzida contração com BAY-K 8644 (3µM), em seguida foi realizada curva concentração resposta com diferentes concentrações de OELa (1-1000 µg/ml), citral (1-1000µM) e limoneno (1-1000µM).

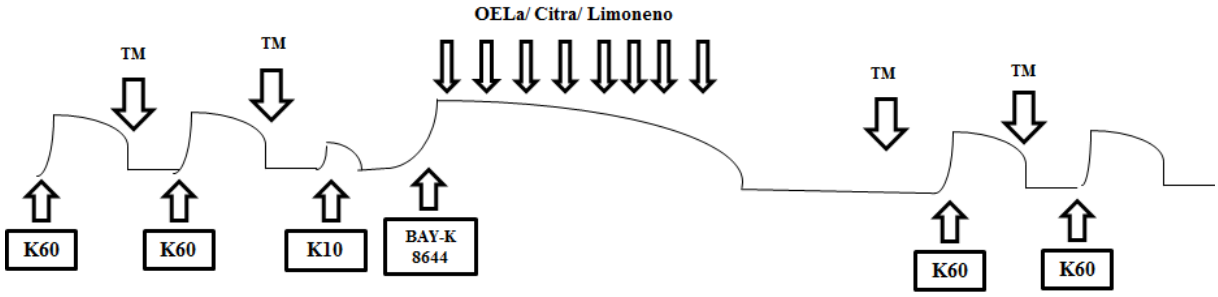

Figura 13. Esquema ilustrativo da avaliação do efeito relaxante do OELa, citral e limoneno em contrações sustentadas e induzidas pelo BAY-K 8644.

3.3 Análise estatística

A exposição dos resultados foi como média ± E.P.M. (n), onde n representa o número de experimentos realizados e o E.P.M. significa o erro padrão da média. Para análises estatísticas e produção dos gráficos utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Os resultados considerados estatisticamente significantes apresentaram probabilidade de hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Foram utilizados os testes t de Student e análise de variância (one ou two-way ANOVA) seguidas do teste de t de Bonferroni e método Holm-Sidak de comparações múltiplas, quando apropriado. Para cálculo da IC50 ou CE50 foi realizado interpolação logarítmica, sendo considerado como a concentração da substância a qual é capaz de produzir 50% da sua inibição ou do seu efeito máximo, sendo os cálculos realizados para cada experimento.

3.4 Agradecimentos

A realização desta pesquisa contou com o apoio da instituição e dos profissionais do Biotério da Universidade Regional do Cariri (URCA), do Biotério da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (FMJ), dos Laboratórios da Universidade Regional do Cariri (Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), Laboratório de Farmacologia dos Produtos Naturais (LFPN) e Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis (LFCE), para prospecção do óleo essencial o Laboratório de Química dos Produtos Naturais (LQPP)) e o Laboratório de Eletrofisiologia -UECE. Os recursos financeiros para execução desse projeto foram advindos do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, e das agências de fomento CAPES, FUNCAP e CNPQ.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Artigo 1

Atividade vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de rato.

R.E.S. da Silva [a], L.P. de Morais [a], M. R. Kerntopf [a], I. R. A. Menezes [a], J.H. Leal-Cardoso[b], R. Barbosa[a] .

[a] Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, Campus Pimenta, 63105-010, Crato, CE, Brasil.

[b] Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará-UECE, 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

Resumo:

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E.. Brown (Verbenaceae) popularmente chamada de erva-cidreira, tem seu uso popular atribuído as suas propriedades sedativas, analgésicas e espasmolítica. Este estudo buscou avaliar o efeito vasorrelaxante do óleo essencial de *L. alba* (OELa) e de seus componentes majoritários citral e limoneno em aorta isolada de ratos. Foram utilizadas preparações de anéis de aorta isoladas e mantidas em Tyrode modificado, aerado, pH 7,4, a 37ºC, para registro isométrico das contrações musculares. OELa, citral e limoneno promoveram relaxamento da musculatura lisa nas contrações induzidas por potássio (K60mM) e por fenilefrina (0,1 µM). Os efeitos do relaxamento foram potencializados pela presença do endotélio, visto que nas contrações induzidas por FE (0,1 µM) em aorta com endotélio, a CE_{50} foi de 352,73± 19,39 µg/ml e 99,34±7,2µM para OELa e citral, respectivamente; enquanto que , na presença do bloqueador da oxido nítrico sintase, o L-NAME a CE_{50} foi de 654,19±10,46 µg/ml e 601,66±10,92, para OELa e citral, respectivamente. Observou-se efeito oposto para o limoneno, que na ausência do bloqueador sua CE_{50} foi de 2682,7± 19,08µM, e com L-NAME-CE_{50} foi de 997,5± 80,13µM) mostrando assim que o mecanismo de ação do limoneno é diferente das demais substâncias. OELa, citral e limoneno também foram capazes de relaxar de forma concentração-dependente as contrações induzidas e sustentadas por BAY-K 8644, um agonista de canal de cálcio , sendo estatisticamente significante a partir das concentrações de10 µg/ml, 30 µM e 100 µM, respectivamente para cada substância. Em 1000µg/ml de OELa, e 1000µM de citral e limoneno, observou-se que o OELa e o limoneno relaxaram a contração de KCl 60 mM de forma similar ao relaxamento produzido pelo inibidor de Rho cinase, Y27632 . Diante disso observou-se que o OELA, o citral e o limoneno apresentaram efeito vasorrelaxante em aorta isolada de ratos, o qual é potencializado pela presença do endotélio, e envolve a regulação da sensibilidade ao Ca^{+2} do sistema contrátil do músculo liso vascular.

Palavras-chaves: *Lippia alba*, óleo essencial, citral, limoneno, aorta, músculo liso

Introdução

A espécie *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, pertencente à família Verbenaceae é encontrada em todas as áreas tropicais e subtropicais da América do Sul (MARTINS et al., 1995; PASCUAL, et al.,2001). No Brasil, popularmente chamada de "erva cidreira", é amplamente utilizada como calmante, analgésica, sedativa, ansiolítica, antiespasmódica e expectorante (MATOS, 2000; MATTOS et al., 2007; HOLETEZ, et al., 2002).

Em estudo científico utilizando o extrato etanólico da *Lippia alba*, observou-se um efeito anticonvulsivante, sedativo e miorrelaxante, sendo maior ação de sedação e relaxamento muscular no extrato que continha a maior quantidade de flavonoides (VIANA et al., 2000, SOARES et al. 2001, ZETÓLA et al., 2002). Em testes *in vivo*, com infusão do extrato de *Lippia alba* observou-se atividade antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001b),e em testes onde utilizaram o óleo essencial sobre o sistema nervoso evidenciou-se significativa ação ansiolítica e anestésica (HATANO et al., 2012, SOUSA et al., 2015).

O citral e o limoneno são dois constituintes majoritários encontrados na composição do óleo essencial do gênero *Lippia* (DUDAI et al., 2005). É possível definir o citral como um metabólito secundário, resultante da união de dois compostos químicos o trans- isômero geranial ((E)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) e o cis-isômero neral ((z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal) (MATOS, 2000). Estudos demonstraram que o citral apresenta ações farmacológicas comprovadas como: antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, sedativa, inseticida, desodorizante, expectorante entre outras (HEINZMANN E BARROS, 2007). Já o monoterpeno monocíclico limoneno apresentam atividades farmacológicas relevantes, como antifúngico, antibacteriana, antitumoral, inseticida, repelente, acaricida. Grande parte das ações biológicas atribuídas ao limoneno deve-se a alteração de sua molécula para formar compostos derivados (CARDOSO E GONÇALVES, 1995).

Entretanto até o momento não há estudos que caracterize os efeitos vasorrelaxante do óleo essencial de *Lippia alba*, assim como seus constituintes majoritários citral e limoneno. O presente estudo tem como objetivo investigar as ações destes produtos naturais sobre aorta isolada de ratos, o que poderá levar a sua utilização no tratamento de algumas patologias, como a hipertensão.

Materiais e métodos

- *Material botânico*

O óleo essencial extraído de uma amostra de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown foi fornecido pelo Dr. Sergio Horta (fazenda experimental da Universidade Federal do Ceará) e analisados no Laboratório de Produtos Naturais e do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará. Os principais componentes detectados na composição do óleo foram citral 75,92% [geranial (41.81%) e neral (34.11%)], 1-limoneno (9,85%), carvona (8,92%), gamma-terpineno (2.05%), benzeno, 1-methyl-3-(1-methylethyl) (1.02%).

O acompanhamento dos constituintes presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (OELa) foi realizado através de técnicas cromatográficas, analisados na PADETEC.

- Soluções e drogas

A solução nutridora utilizada de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) apresenta a seguinte composição em mM: 136,0 NaCl; 5,0 KCl; 0,98 MgCl2; 0,36 NaH2PO4; 11,9 NaHCO3; 2,0 CaCl2 e 5,5 Glicose, mantida à temperatura de 37° C e pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH (1M). O OELa, o citral e o limoneno foram preparados na forma de solução, diluídos diretamente em Tyrode e tween, o Bay-K8644 diluído em dimetil sulfóxido(DMSO), nifedipina diluída em etanol, indometacina foi diluída em bicarbonato 5%, e os demais fármacos e seus estoques foram diluídos em água destilada. A solução isenta de cálcio ou "zero cálcio" ($0Ca^{2+}$) foi produzida com a omissão do $CaCl_2$ da solução de Tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA. Todos os sais e reagentes utilizados foram de grau e pureza analítica, obtidos da companhia Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

- Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200-300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri- URCA. Os mesmos foram mantidos sob condições constantes de umidade e temperatura de 23 ± 2° C, em ciclo claro/escuro de doze horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, tratados de acordo-Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Brasil. aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA)-URCA, registrado sob o número de protocolo: 00084/2014.2.

- Preparação para isolamento do tecido

Os animais foram eutanasiados por decaptação, seguida da dissecação da aorta torácica, a qual foi seccionada em segmentos transversos circulares medindo ente 4-5mm de

comprimento. Estes foram mantidos em câmara de banho de órgão isolado com capacidade para 10 ml da solução nutridora Tyrode, mantidos sob contúna aeração por borbulhamento de ar, temperatura de 37°C e pH 7,4. As medidas da atividade contrátil do tecido foram mensuradas através de uma haste conectada a um transdutor de força (TRI, modelo 210, Panlab, Spain), e este a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), com entrada para uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada em um computador, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA). Os anéis de aorta isolados foram submetidos a uma tensão de 1g, e mantido por um período de equilíbrio por 1 hora. Todos os protocolos iniciaram com duas contrações subsequentes, reproduzidas pela adição de 60 mM de KCl (K60),de modo hipertônico nos anéis de aorta estudados, e após atingir valores estáveis, um platô, a resposta máxima obtida foi considerada a contração máxima do anel. Apenas os experimentos com contrações reproduzíveis foram considerados viáveis para as séries experimentais. A integridade funcional do endotélio foi verificada através do relaxamento provocado por ACh (10 μM) sobre contrações induzidas por Fenilefrina (FE) (0,1μM).

Todos os experimentos foram realizados sempre com a existência de uma preparação controle e experimental, a qual foi submetida às mesmas situações e aos mesmos protocolos experimentais. As preparações controle receberam somente o veículo, Tween, diluído em solução de Tyrode, nas mesmas proporções utilizadas nas preparações experimentais.

Análise estatística

Os dados são expressos como média ± E.P.M. Para análises estatísticas e produção dos gráficos utilizou-se o software Sigma Plot 11.0. Os resultados considerados estatisticamente significantes apresentaram probabilidade de hipótese nula menor que 5% ($p < 0,05$). Foram utilizados os testes t de Student e análise de variância (one ou two-way ANOVA) seguidas do teste de t de Bonferroni e método Holm-Sidak de comparações múltiplas, quando apropriado. Para cálculo da CE50 foi realizado interpolação logarítmica, sendo considerado como a concentração da substância a qual é capaz de produzir 50% da sua inibição ou do seu efeito máximo, sendo os cálculos realizados para cada experimento, e quando não possível foi realizado a relação linear entre dois pontos da CE50.

Resultados

Efeito relaxante do OELa, citral e limoneno sobre o tônus e sobre as contrações induzidas e sustentadas por K^+ e FE em aorta isolada de rato com e sem endotélio.

Sobre o tônus muscular intrínseco de anéis de aorta com endotélio preservado e não preservado, foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas (1- 1000µg/ml) de OELa, onde não causou nenhum efeito relaxante ou contraturante considerado estatisticamente significante sobre o tônus basal das preparações dos anéis de aorta ($p>0,05$, *one-way* ANOVA).

Para avaliar a influência sobre contrações induzidas por K^+ e FE, concentrações crescentes e cumulativas de OEla (1-1000µg/ml), citral (1-1000µM) ou limoneno (1-3000µM), foram adicionadas às preparações de aorta com e sem endotélio, previamente contraídas por KCl (60mM) ou FE (0,1µM).

Nas preparações previamente contraídas com KCl 60 mM na presença de endotélio preservado (Figura 14A), as concentrações crescentes do OELa e o citral promoveram um relaxamento concentração-dependente, onde observou-se seu efeito significativo em concentrações ≥ 10µg/ml para o OELa e ≥ 30µM para o citral. O limoneno também apresentou efeito relaxante, sendo significativo a partir da concentração de 600 µM. Em preparações cujo endotélio não foi preservado, o efeito relaxante do OELa, citral e limoneno foram a partir de 100µg/ml, 300µM e 30µM respectivamente ($p< 0,05$, *one-way* ANOVA, seguido de Holm-Sidak) (Figura 14B) (CE50 tabela 1). Ao avaliar a CE50 das substâncias na aorta com endotélio verificamos que o OELa e citral, tem uma potencia maior no relaxamento da musculatura lisa comparando com o limoneno e essa diferença é estatisticamente significante ($p > 0,05$, teste t de Student não pareado). Nos resultados da aorta sem endotélio obtivemos uma diminuição do relaxamento da musculatura lisa para o OELa e citral, que foi estatisticamente significante ($p > 0,05$, teste t de Student não pareado - tabela 1) e um aumento do relaxamento da musculatura lisa para o limoneno ($p > 0,05$, teste t de Student não pareado- tabela 1), indicando que OELa e o citral possam estar agindo através de mediadores endoteliais como NO e a cicloxigenase, potencializando o relaxamento da musculatura, os resultados demonstram ainda que o limoneno teve um efeito oposto, aumentando a contração na presença do endotélio, demonstrando que ele tem uma ação oposta a do OELa e do citral sobre o endotélio.

Nas preparações previamente contraídas com FE (0,1µM), as substâncias foram também capazes de relaxar de forma concentração-dependente ($p<0,001$, *one-way* ANOVA) as preparações de aorta. Em preparações de aorta com endotélio (Figura 14C), a adição do OELa e do citral provocou relaxamento total, sendo estatisticamente significante a partir das concentrações de 300µg/ml e 30µM, respectivamente. O limoneno apresentou duas respostas distintas, conhecido como efeito bifásico. Nas concentrações de 100, 300 e 600 µM o limoneno potencializou a contração provocada pela FE, no entanto apresentou efeito relaxante, que foi estatisticamente significante a partir a partir da concentração de 1000 µM ($p <0,05$, *one way* ANOVA, seguido de Holm-Sidak). Os valores da CE50 para o OELa, citral e limoneno estão demonstrados na tabela 1.

Em aorta sem endotélio (Figura 14D), o efeito do OELa e do citral foi estatisticamente significante a partir das doses de 30 µg/ml e 100 µM, respectivamente. Nas preparações experimentais com limoneno, também se observou dois efeitos, sendo a contração da FE potencializada nas concentrações de 30, 100 e 300 µM , e efeito relaxante estatisticamente significante apenas na dose de 3000 µM, cujo contração provocada pela FE foi totalmente bloqueada. O valor da CE 50 para o limoneno foi de 1680,20 µM (figura 14D) (Tabela 1).

Tabela 1

Valores de CE_{50} do efeito relaxante do OELa, citral e limoneno em anéis de aorta de rato

Substância	Aorta E+	Aorta E-
KCl+OELa	83,30 ± 9,78µg/mL	356,20 ±43,71µg/ml ***
KCl+Citral	110,80 ±8,04 µM	487,2 ±39,45µM ***
KCl+Limoneno	866,91±35,50 µM	309,27 ±53,83µM ***
FE+OELa	352,73± 19,39 µg/ml	566,06± 38,31µg/ml ***
FE+Citral	99,34±7,2µM	914,94± 49,73µM***
FE+Limoneno	2682,7± 19,08µM	1680,20 µM ***

NOTA: No relaxamento provocado por limoneno em aorta E-, na presença de FE, a curva sigmoide não conseguiu expressar o E.P.M. OELa, citral e limoneno. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; n= 6 representa o número de experimentos. ***$p<0,001$.

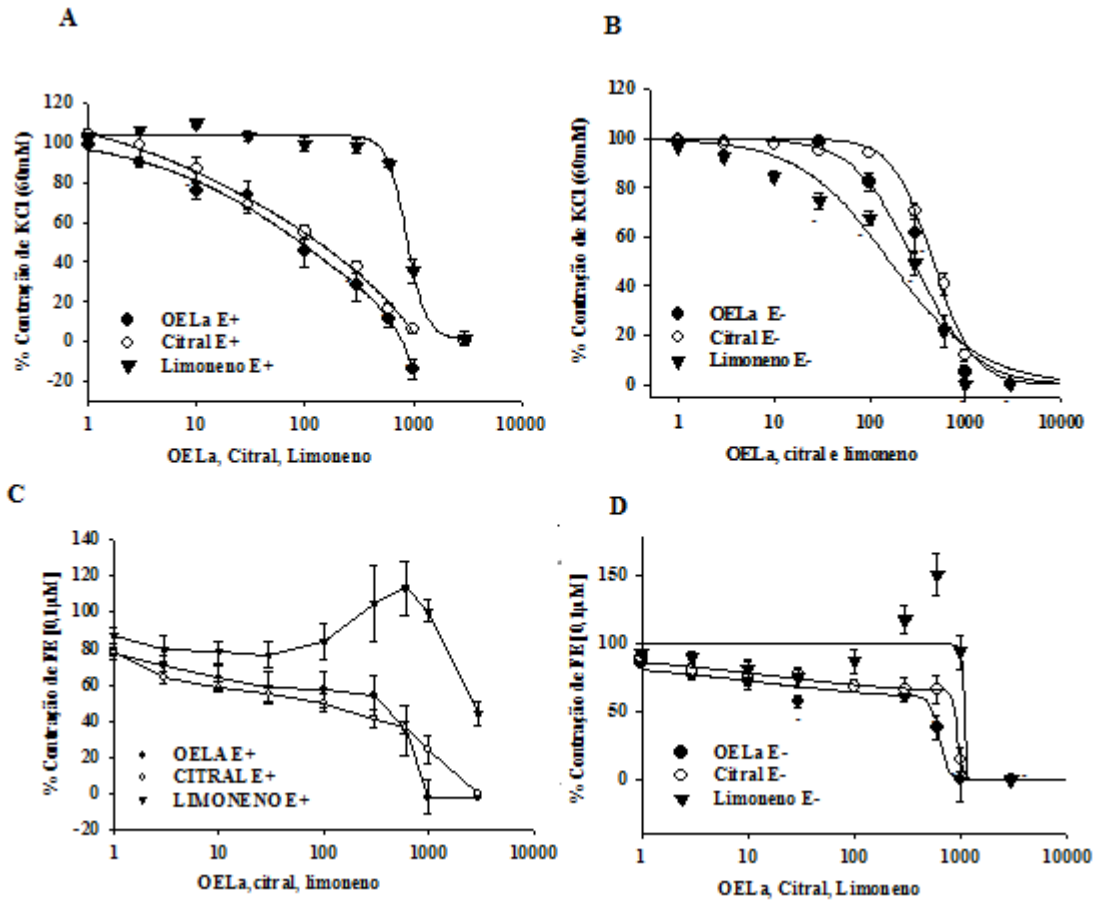

Figura 14: Efeito relaxante do OELa, citral e limoneno sobre contração mantida por potássio e fenilefrina em aorta isolada de rato. (A) Gráfico representativo do efeito relaxante do OELa, citral e limoneno sobre a contração mantida por KCl (60mM) em aorta isolada com endotélio preservado (E+) e (B) sem o endotélio preservado (E-); (C) Efeito relaxante do OELa, citral e limoneno sobre contração mantida por FE [0,1µM] em aorta isolada de rato com endotélio preservado (E+) e (D) sem o endotélio preservado (E-). Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; n representa o número de experimentos. ($p<0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

Estudo da influência do endotélio sobre o relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno

Para avaliar a influência dos mediadores do endotélio nesse efeito, as preparações foram pré-incubadas com o inibidor de óxido nítrico sintase, L-NAME (100µM, n=6) ou indometacina, bloqueador não seletivo das cicloxigenases (100µM). Nas preparações de aorta com endotélio preservado, foram expostas durante 20 minutos ao L-NAME (100µM), e em seguida uma nova contração com FE (0,1µM) era obtida. Nestas condições, foram adicionados sobre o platô de contração da FE (0,1µM) OEla (1-1000 µg/ml), citral (1-1000µM) ou limoneno (1-3000µM), sendo o efeito significante a partir de 600 µg/ml para o OELa, 100 µM para o citral e 300µM para o limoneno e estes relaxaram a contração das

preparações de forma dependente de concentração (CE_{50} tabela 2) (Figura 15A, 15B e 15C). Porém, nas preparações pré-incubadas com indometacina, o efeito tornou-se significante a partir da concentração de 30µg/ml para o OELa, 300µM para o citral e 30 µM para o limoneno ($p < 0,05$, *one way* ANOVA, seguido de Holm-Sidak) (CE_{50} tabela 2) (Figura 15 D, E e F). Esses dados sugerem que a potencialização do relaxamento da musculatura lisa envolve os fatores derivados do endotélio.

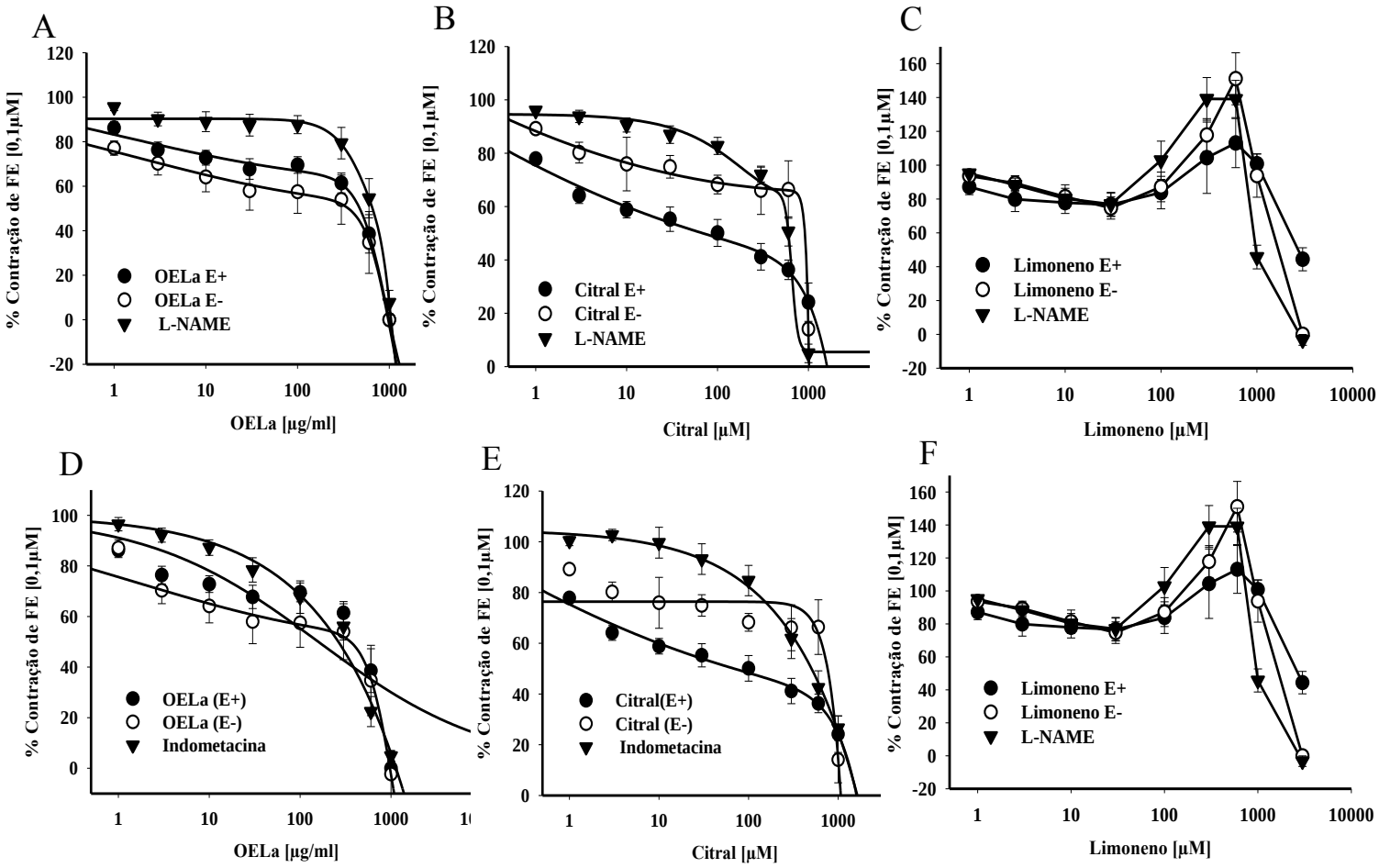

Figura 15: Relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em preparações com FE (0,1µM). (A) (B) (C) Gráficos representativos do OELa , citral e limoneno, respectivamente com endotélio (E+) , sem endotélio (E-) e com endotélio pré-incubado com L-NAME; (D), (E), (F) Gráficos representativos do OELa , citral e limoneno, respectivamente com endotélio preservado (E+) , sem endotélio preservado (E-) e com endotélio pré-incubado com Indometacina. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; ($p<0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

Tabela 2

Valores de CE_{50} do efeito relaxante do OELa, citral e limoneno em anéis de aorta de rato em contrações induzidas por FE (0,1 µM) na presença de L-NAME e Indometacina

Substância	FE (E+)	L-NAME	Indometacina
OELa	352,73± 19,39 µg/ml	654,19±10,46 µg/ml	264,48±11,87 µg/ml
Citral	99,34±7,2µM	601,66±10,92 µM	503,60±30,10 µM
Limoneno	2682,7± 19,08µM	997,5± 80,13µM	230,64±10,63 µM

Nota: E+, aorta com endotélio intacto. Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; n =6 ,representa o número de experimentos. ($p<0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak).

Avaliação da participação dos canais de cálcio e da Rho cinase no relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em aorta isolada de rato

Em experimentos onde os anéis de aorta foram mantidos despolarizados em meio livre do íon cálcio na presença de $[K^+]$ 80mM, a adição de concentrações cumulativas de $BaCl_2$ induzem contrações de forma concentração dependente (Figura 16A). Essas contrações atingiram valor maior máximo na concentração de 30mM de $BaCl_2$. Nas preparações pré-incubadas com 1000µg/ml de OELa e 1000 µM de citral, não foi observada contração significativa, comportamento este similar ao da nifedipina (1µM), um bloqueador de canal de cálcio dependente de voltagem, o qual apresentou contração não significante estatisticamente, na concentração de 30 mM de $BaCl_2$. Porém, nas preparações pré-incubadas com 1000 µM de limoneno, a adição de $BaCl_2$ nas preparações induziram contrações de forma concentração-dependente (Figura 16A) ($p > 0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak). Para confirmar esta série experimental, adicionou-se sobre as preparações de aorta, de forma cumulativa o OELa, citral e limoneno, e estes, causaram efeito relaxante de forma

concentração-dependente sobre contrações induzidas e sustentadas por BAY-K 8644 (3µM, n=6), um agonista de canal de cálcio, e sensibilizadas por [K+] 10 mM. O efeito tornou-se significante a partir de [OELa] ≥ 10 µg/ml, [citral] ≥ 30 µM e [limoneno] ≥ 100 µM ($p < 0,05$, one-way ANOVA e teste t de Bonferroni, Figura 16B).

Para avaliar a ação do OELa e seus constituintes sobre a proteína Rho cinase, adicionou-se às preparações o inibidor desta, o composto Y27632 (1µM), e este relaxou as preparações de aorta isolada de ratos, submetidas a uma contração evocada de KCl (80mM) para 3,01 ± %, de forma estatisticamente significante ($p < 0,001$, teste t de Student pareado). Nas preparações onde ocorreu a adição de 1000µg/ml de OEla, e 1000µ de citral e limoneno, sobre o platô da contração produzida por KCl (80mM),e também verificou-se relaxamento para 11,73±3,17 %, 41,55±4,81 % e 1,83±0,92 % do controle, respectivamente (Figura 16C). Não se verificou diferenças estatísticas entre o relaxamento provocado pelo composto Y27632 e aquele provocado pelo OELa ou por limoneno($p > 0,05$, teste t de Student não pareado).

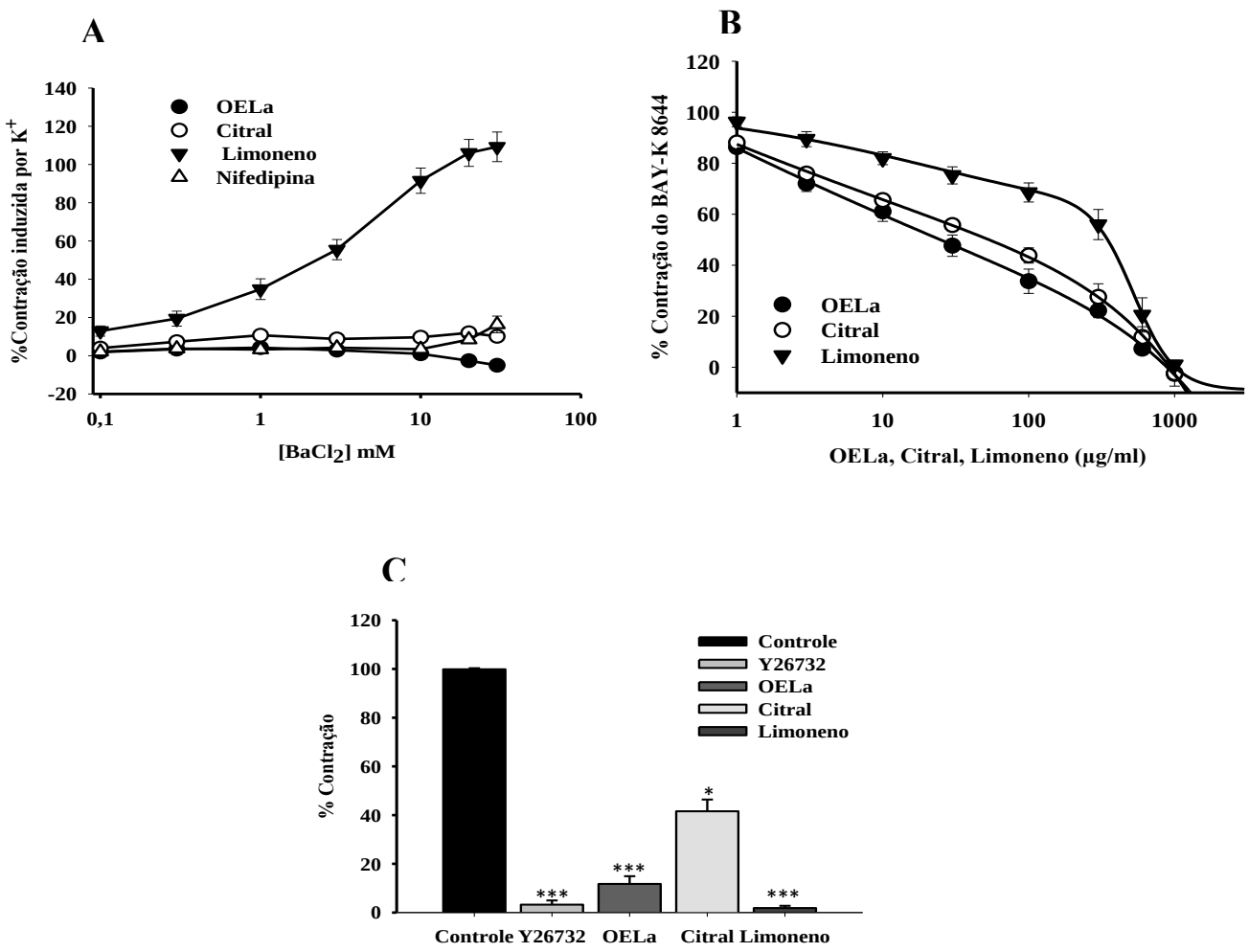

Figura 16. Avaliação da participação dos canais de cálcio e da Rho cinase no relaxamento produzido pelo OELa, citral e limoneno em aorta isolada de rato. (A) Efeito do OELa (1000µg/ml, n=6), citral e limoneno (1000 µM) em contrações evocadas por $BaCl_2$ exógeno, Nifedipina (1 µM) foi usado como controle positivo. **(B)** Efeito do OELa, citral e limoneno sobre contrações evocadas por BAY-K 8644, um agonista de canal de cálcio (3µM). Os valores estão expressos como média ± E.P.M.; n=6 ($p<0,05$, *one-way* ANOVA seguido de Holm-Sidak. **(C)** Efeito relaxante do Y27632 (1µM), OELa (1000µg/ml) e de citral e limoneno (1000 µM) sobre o platô de contração em aorta isolada de rato induzida KCl 80 µM. Os valores estão expressos como média ± E.P.M., e n representa o número de experimentos. . ***$p < 0,001$; *$p < 0,005$; Y27632, OEla, citral ou limoneno vc. KCl 80mM (teste t de Student não pareado).

Discussão

No presente estudo observou-se que OELa não alterou o tônus vascular e em contrações da musculatura lisa da aorta induzidas por potássio ou fenilefrina tanto o OELa,

quanto seus componentes majoritários citral e limoneno, promoveram relaxamento. Verificou-se que tanto para o OELa quanto para o Citral, o relaxamento da musculatura lisa é potencializado pelo endotélio, uma vez que na ausência dele há uma redução do relaxamento. Entretanto, o limoneno apresenta um perfil diferente, o relaxamento é potencializado na ausência do endotélio das artérias isoladas de ratos.

Esses dados nos levou a investigar por qual via endotelial OELa, citral e limoneno tem a sua ação sobre a musculatura lisa da aorta. Verificamos que para o OELa e Citral predomina sobre a via do NO, pois ao bloquear a formação do NO, através do L-NAME, o relaxamento foi menor comparando com a via das prostaciclinas, que foi bloqueada pela indometacina. Esses dados corroboram com os dados da literatura, onde foi visto que óleos essenciais e outas substâncias naturais como metil-eugenol, 1,8-cineol e α-terpineol promovem uma maior relaxamento da musculatura lisa da aorta pela ativação da via NO endotelial (LAHLOU et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2008; PINTO et al., 2009). Enquanto que para o limoneno, o relaxamento é potencializado na ausência dos fatores derivados do endotélio, NO e prostaciclinas.

Outra evidência avaliada foi o influxo de Ca2+ através dos canais catiônicos operados por voltagem (CCOVs), mecanismo compartilhado pelos acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico, esperando assim que houvesse bloqueio destes canais. Fato este observado com o OELa e o citral que inibiram contrações provocadas por $BaCl_2$, tanto quanto o controle positivo, nifedipina. Os efeitos relaxantes mediados pelo OELa, citral e limoneno foram reversíveis com a lavagem, demonstrando assim não ser tóxico.

Na homeostase do organismo, o tônus do músculo liso vascular é de grande importância, pois várias patologias podem estar relacionadas com modificações no tônus muscular, como por exemplo, a hipertensão arterial, a aterosclerose, insuficiência cardíaca e ainda a isquemia (PEREZ-VIZCAINO; DUARTE, 2010). Em alguns estudos foi possível revelar efeito contraturante de alguns óleos essenciais e seus constituintes, como o terpineno-4-ol, sobre o tônus basal, efeito este relacionado à probabilidade de algumas substâncias interferirem no armazenamento de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (HISAYAMA e TAKAYANAGI, 1986; CÂMARA et al., 2003; PEIXOTO-NEVES, 2010; PINHO-DA-SILVA et al., 2010).

Nesse estudo investigamos o efeito do OELa sobre os anéis aórticos com e sem endotélio, em condições de repouso não houve alteração estatisticamente significante, mostrando assim que o OELa não modifica o tônus basal de aorta isolada de rato. Este fato é

de suma importância para nosso estudo, visto que a resistência ao fluxo sanguíneo na circulação é regulado principalmente pelo tônus vascular (SANTOS et al., 2007).

Sabe-se que as células da musculatura lisa sofrem despolarização pela presença de potássio, observa-se que ocorre ativação dos canais de cálcio operados por voltagem (CCOV), e a abertura destes culmina influxo de cálcio através da membrana, resultando no aumento da concentração de cálcio no meio intracelular, levando assim a contração muscular (SOMLYO;SOMLYO, 1968; BOLTON *et al*., 1999). Nesse estudo observamos que o OELa, o citral e o limoneno provocaram efeito relaxante sobre contrações induzidas por KCl (60 mM) . Os valores de CE_{50} foram distintos entre as substâncias, verificou-se que o OELa é mais potente do que seus constituintes. Observou-se ainda que o efeito do relaxamento muscular pelas três substâncias OELa, citral e limoneno tem uma redução da CE_{50} na presença do endotélio e ao contrário com a remoção do endotélio aumentou a $CE_{50,}$ mas anão alterou o efeito máximo destes. Sugerindo assim, que OELa, o citral e o limoneno estão agindo através de um mecanismo miogênico que é potencializado pelas substâncias que são liberadas do endotélio, como a cicloxigenase e o NO.

Outra evidência do relaxamento provocado pelo OELa, citral e limoneno, foi que as três substâncias foram capazes de induzir o relaxamento em contrações induzidas por fenilefrina. Neste tipo, a contração ocorre através da ligação do agonista (FE) ao seu receptor, promovendo uma cascata de segundo mensageiro (COTECCHIA, 2010). Esta cascata de segundo mensageiro provoca uma liberação de cálcio dos estoques intracelulares, o que eleva a sensibilidade do aparato contrátil a concentração de cálcio intracelular e um influxo de cálcio extracelular, levando assim a uma contração. Sobre este platô de contração induzido pela FE (0,1µM), o OELa, o citral e o limoneno induziram vasorrelaxamento nos anéis de aorta. Na análise deste efeito relaxante em anéis de aorta sem endotélio preservado, pré-contraídas com FE, concluiu-se que o OELa foi a substância com menor CE_{50} (566,06 µg/ml), o citral foi a segunda substância com menor CE_{50} (914,94 µM). Já o limoneno foi a que apresentou maior CE_{50} (1680,20 µM) sendo aproximadamente três vezes maior que o OELa. Considerando relatos na literatura, e devido ao fato da CE_{50} do OELa ser a menor, pode está ocorrendo sinergismo entre os constituintes , pois o citral está em maior quantidade no OELa, com 75,92% , já o limoneno com 9,85%, carvona com 8,92% e gama-pineno com 2,05%, podendo assim, causar influência no relaxamento da musculatura lisa. Neste protocolo experimental, ainda foi observado a existência de efeito bifásico, induzido pelo limoneno, o que equivale a uma vasoconstricção, nas doses de 30, 100 e 300 µM, e nas doses mais altas, a

partir de 600 µM observou-se uma vasodilatação significativa nas preparações de anéis de aorta sem endotélio e pré-contraído com FE.

Vários mediadores possuem essa dualidade no efeito sobre o musculo liso vascular, ora induzindo relaxamento pelo estímulo da produção de NO ou pela ação autócrina no endotélio em receptores de endotelina ETb, principalmente a endotelina 1(ET-1) (RAPOPORT E ZUCCARELLO, 2012). A hipótese de que estes mediadores atuam de forma dual, direta ou indiretamente sobre a musculatura vascular, pode levar o limoneno a apresentar efeito bifásico influenciado também pelo endotélio, devido à estimulação de fatores endoteliais relaxantes e contraturantes, visto que na presença de inibidores dos principais fatores relaxantes derivados do endotélio o efeito contraturante do limoneno não é tão atenuado.

Outras substâncias são relatadas na literatura apresentando essa dualidade no efeito, como a cafeína, que se destacou como utilidade farmacológica, e permitiu revelar descobertas sobre o retículo sarcoplasmático. Vários estudos demonstraram que a cafeína tem ação em musculatura lisa de forma contrátil e também com ação relaxante (LEIJTEN; VAN BREEMEN, 1984; ARNAUD, 1986; WATANABE et. al.; 1992). Outro relato demonstrou que a citocalasina-B e floretina, também apresentaram essa dualidade de efeitos, com efeito relaxante e contraturante (DRESEL, 1987).

No presente estudo, o OELa e o citral apresentou maior potência em relaxar o acoplamento eletromecânico do que o farmacomecânico nos tecidos com endotélio preservado e não preservado. Estes resultados sugerem algumas hipóteses para o mecanismo de ação relacionado ao vasorrelaxamento causado pelo OELa e pelo citral , como: bloqueio do influxo de Ca^{+2} através da membrana celular, mudança na sensibilização das proteínas contráteis ao cálcio, e/ou, ainda a influência nos mecanismos intracelulares de armazenamento.

Verificou-se que OELa na presença do bloqueador do NO o L-NAME, promoveu um aumento CE_{50} 654,19±10,46 µg/ml comparado com o controle CE_{50} 352,73± 19,39 µg/ml, assim como o citral CE_{50} 601,66±10,92 comparado com o controle CE_{50} , 99,34±7,2µM. Por outro lado, o limoneno promoveu um maior relaxamento da musculatura lisa, CE_{50} 997,5± 80,13µM comparado com o controle CE_{50} 2682,7±19,08µM. Esses dados demonstram que OELa e o citral estão agindo sob influência do endotélio, via NO, para promover a potencialização do relaxamento da musculatura lisa da aorta. Porém, o limoneno pode potencializar o relaxamento pela ausência da ação do endotélio, por mecanismo que ainda precisam ser elucidados. Curiosamente, bloqueando os produtos do endotélio com a

ciclooxigenase, por indometacina, observou-se que foi aumentada a CE_{50} do citral 503,60±30,10 µM comparado com o controle CE_{50} , 99,34±7,2µM. Enquanto que, OELa e limoneno promoveram um maior relaxamento, onde a CE_{50} do OELa com indometacina foi de 264,48±11,87µg/ml e controle 352,73± 19,39µg/ml, e limoneno com indometacina presente apresentou CE_{50} 230,64±10,63 µM e controle 2682,7±19,08µM. Estes dados sugerem que o citral também age via cicloxigenase para o aumento do relaxamento da musculatura lisa da aorta via endotélio. Entretanto o OELa não apresentou o mesmo efeito do citral, pois sendo o limoneno, também um dos constituintes majoritários presente no OELa, pode modular a ação promovendo um aumento do relaxamento na ausência da substância que cicloxigenase.

Sabe-se que a à liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares pode ser ocasionada a partir da ativação de receptores de membrana, fazendo com que ocorra influxo de cálcio através dos CCOVs e dos canais iônicos operados por receptor (ROCCs) (TOSUN et al., 1998; FACEMIRE e ARENDSHORST, 2005; KARAKI et al., 1997; WEBB, 2003), mecanismo estes, compartilhado pelos acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico. Logo, era esperado que o OELa, citral e limoneno bloqueassem CCOVs com potência farmacológica próxima à potência para bloquear o acoplamento eletromecânico. Fato este observado nas preparações em que o OELa e o citral inibiram contrações provocadas por $BaCl_2$. Sabendo que o CCOVs tipo L são bastante permeáveis ao $BaCl_2$ é provável que o OELa e o citral promovam um relaxamento da musculatura lisa da aorta via acoplamento eletromecânico, provavelmente por um bloqueio dos CCOVs tipo L (MURRAY E KOTLIKOFF, 1991). Hipótese reforçada pela semelhança com os efeitos da nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio, presente no estudo como controle positivo. Comportamento contrário foi observado com o limoneno, o qual não inibiu a contração provocada pelo $BaCl_2$, o que nos leva a hipótese de que o relaxamento induzido por ele estaria adicionalmente envolvendo a inibição do influxo de cálcio por uma via diferente do CCOVs, que não o tipo-L, pois na célula muscular lisa vascular, mesmo em menor quantidade, pode ser encontrado também o tipo T (Ca_v-T); ou ainda a influência na entrada de Ca^{+2} por canais operados por estoques (SOCs) e/ou pelos canais operados por receptor (ROCs).Tendo em vista que a ativação de receptores α_1-adrenérgico ou receptores tromboxano levam tanto a entrada de Ca^{+2} por CCOVs, como por ROCs e SOCs na célula muscular lisa (WATANABE et al., 2008; FIRTH; REMILLARD; YUAN, 2007).

Além disso, para confirmar estes achados experimentais, observou-se a semelhança da eficácia dos efeitos do OELa, citral e limoneno, em contrações induzidas pelo BAY-K 86644,

um agonista de CCOVs tipo L (PIASCIK E BABICH, 1986). Demonstrando assim, que o mecanismo de ação vasorrelaxante induzido pelo OELa, citral e limoneno, é em grande parte devido ao bloqueio do influxo de cálcio, via canal de Ca^{+2} tipo L, através da membrana em musculatura vascular de anéis isolados de aorta de ratos Wistar.

No presente estudo evidenciamos, como já relatado acima, que tanto o OELa, quanto o citral e o limoneno promoveram um relaxamento das contrações induzidas por KCl (60mM), com valores de CE_{50} menores que no acoplamento farmacomecânico, demonstrando maior potência farmacológica. A explicação para essa resposta da potencia do relaxamento da via eletromecânica pode estar na via da Rho quinase. Estudos já realizados, revelaram que nas contrações induzidas por KCl, é também ativada a proteína Rho cinase, a qual induzirá um aumento na sensibilidade no músculo liso vascular das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (MITA et al., 2002; REMBOLD E MURPHY, 1988). A ativação da Rho cinase é totalmente dependente de Ca^{2+} extracelular e o aumento da [Ca^{2+}] intracelular ativa a vida de sinalização da PI3K-C2α de classe II, enzimas estas que regulam a atividade da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) pela ativação da Rho (SAKURADA et al., 2003; WANG et al., 2006).

Levando em consideração esta participação da Rho cinase na sustentação do platô de contração, comparou-se o efeito do inibidor de Rho cinase, Y27632 (1µM) sobre a contração de KCl, com o efeito relaxante do OELa, do citral e do limoneno. Nosso estudo revelou que o Y27632 relaxou para aproximadamente 3% a contração do KCl, e o OELa na concentração de 1000µg/ml , citral e limoneno na concentração de 1000 µM reduziram para aproximadamente 11,7%, 41,55% e 1,83 %, respectivamente (Figura 16C). Sugerindo assim que todas as substâncias, e mais fortemente o limoneno e o OELa, nestas condições, podem estar agindo através de mecanismos que envolvem a via da Rho cinase ativada, evidenciando assim o efeito mais potente destas substâncias em relaxar contrações sustentadas por KCl.

Mediante ao estudo realizado, constatou-se que o OELa e seus constituintes majoritários citral e limoneno, encontrados na espécie *Lippia alba* demonstrou efeito relaxante em aorta isolada de ratos, e que tal investigação deve ser continuada, pois abre-se espaço para surgimento de novas substâncias vasorrelaxante.

Conclusão

Os resultados revelam que tanto o OELa, quanto seus constituinte citral e limoneno possuem efeito vasorrelaxante concentração dependente, nas vias eletromecânicas e farmacomecânica. Além disso, o efeito causado pelo OELa e citral são potencializados pelo

endotélio por influência principalmente do óxido nítrico. O limoneno possui efeito bifásico nas preparações com contrações evocadas por fenilefrina. As três substâncias estudadas podem agir pela via da proteína Rho cinase e o OELa e citral agem possivelmente via canal de cálcio operados por voltagem. O que nos leva a concluir que os mesmos possuem potencial para serem agentes terapêuticos no tratamento de patologias que envolvem distúrbios da musculatura lisa de vasos.

Agradecimentos

Os autores envolvidos nesse estudo gostariam de agradecer às instituições de fomento à pesquisa CNPq, CAPES e FUNCAP pelo suporte financeiro.

Referências

ARNAUD, M. J.; **The pharmacology of caffeine.** Progress in Drug Research, 1986, 31, 273-317.

BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 85-115, 1999.

CARDOSO, T. H.; GONÇALVES, B. N. **Ensaios sobre a desidrogenação do limoneno,** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1995.

CÂMARA, C.C.; NASCIMENTO, N.R.; MACÊDO-FILHO, C.L.; ALMEIDA F.B.; FONTELES, M.C. Antispasmodic effect of the essential oil of Plectranthus barbatus and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Med**. V. 69, p. 1080- 1085, 2003.

CHIWORORO, W. AND J.A. OJEWOLE. Biphasic effect of Psidium guajava Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated vascular smooth muscles. J. Smooth Muscle Res. 44: 217-229, 2008.

COTECCHIA, S. The α1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. **J Recept Signal Transduct Res,** v. 30, n. 6, p. 410-9, Dec 2010. ISSN 1532-4281.

DRESEL, P. E.;KNICKLE, L.; **Cytochalasin-B and phloretin depress contraction and relaxation of aortic smooth muscle.** European Journal of Pharmacology, 144, 1987, 153-157.

DUDAI N, WEINSTEIN Y, KRUP M, RABINSKI T, OFIR R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med 71*: 484-488, 2005.

FACEMIRE, C. S.; ARENDSHORST, W. J. Calmodulin mediates norepinephrineinduced receptor-operated calcium entry in preglomerular resistance arteries. **Am J Physiol Renal Physiol.** V. 289, p. F127–F136, 2005.

FIRTH, A.L.; REMILLARD, C. V.; YUAN, J. X. J. TRP channels in hypertension. Biochimica et Biophysica Acta, 1772 895-906, 2007.

HATANO, V.Y.; TORRICELLI, A.S.; GIASSI, A.C. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* end (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , n.45, v.3, p.238-243, 2012.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; GRESSIER, B. et al. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba.* **Phytotherapy Research**, n.2, v.22, p. 256-258, 2008a.

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

HISAYAMA, T.; TAKAYANAGI, I. Some properties and mechanisms of thymolinduced release of calcium from the calcium-store in guinea-pig taenia caecum. **Jpn J Pharmacol**. V. 40, p. 69-82, 1986.

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

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; KEN-ICHI HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; JONG WON, K.; SATO, K. Calcium Movements, Distribution, and Functions in Smooth Muscle. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 49, n. 2, 1997.

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

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of Alpinia zerumbet leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med,** v. 68, n. 12, p. 1097-102, Dec 2002. ISSN 0032-0943.

LEIJTEN, P. A. & VAN BREEMEN, C.; **The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta.** Journal of Physiology 357, 1984, 327-339.

MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; JUCÁ, D. M.; COELHO-DE-SOUZA, L. N.; DA FROTA, P. T.; DA COSTA, A. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxation induced by the

essential oil of Croton nepetaefolius and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 22, n. 2, p. 169-77, Apr 2008. ISSN 1472-8206.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. et al. **Medicianl Plants**. University Press. UFV-Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 220p, 1995.

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

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

MAYNARD, L.G.; SANTOS, K.C.; CUNHA, P.S. 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**, n.43, v.6, p.694-698, 2011.

MITA, M.; YANAGIHARA, H.; HISHINUMA, S.; SAITO, M.; WALSH, M.P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rhoassociated kinase. ***Biochem J*** 364: 431–440, 2002.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **J Physiol,** v. 435, p. 123-44, Apr 1991. ISSN 0022-3751.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO,E. et al. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 24, n. 3, p. 341-50, Jun 2010. ISSN 1472-8206.

PEREZ-VISCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, p. 473-494, 2010.

PIASCIK, M. T.; BABICH, M. The facilitative actions of Bay K 8644 on norepinephrine and KCl-induced contractures of rabbit aortic rings. **Life Sci,** v. 38, n. 8, p. 725-34, Feb 1986. ISSN 0024-3205.

PINHO-DA-SILVA, L. Ação antiespasmódica do trans-cariofileno e o bloqueio de canais para ca2+ em músculo liso traqueal de rato. 2010. 1v. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

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

RAPOPORT, R. M.; ZUCCARELLO, M. **Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross talk in endothelin-1-induced contraction of smooth muscle**. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2012, v. 60, n. 5, p. 483-94.

REMBOLD, C.M.; MURPHY, R.A. Myoplasmic [Ca++] determines myosin phosphorilation in agonist stimulated swine arterial smooth muscle. *Circ Res* 63: 593-603, 1988.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of Hyptis fruticosa essential oil in rats. **Fitoterapia** 78: 186-191, 2007.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SGIMOTO. N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y. Ca2+-dependent ctivation of Rho and Rho kinase in membrane depolarizationinduced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* 93: 548–556, 2003.

SATHER, W. A.; MCCLESKEY, E. W. Permeation and selectivity in calcium channels. **Annu Rev Physiol,** v. 65, p. 133-59, 2003. ISSN 0066-4278.

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

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. ***J Pharmacol Exp Ther*** 159:129-145, 1968.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of Lippia alba and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015.

TOSUN, M.; PAUL, R. J.; RAPOPORT, R.M. Role of Extracellular Ca11 Influx via LType and Non-L-Type Ca++ Channels in Thromboxane A2 Receptor-Mediated Contraction in Rat Aorta. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** V. 284, p. 921–928, 1998.

WANG, Y.; YOSHIOKA, K.; AZAM, M.A.; TAKUWA, N.; SAKURADA, S.; KAYABA, Y.; SUGIMOTO, N.; INOKI, I.; KIMURA, T.; KUWAKI, T.; TAKUWA, Y. Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. ***Biochem J.*** 394:581-92, 2006

WATANABE, C.; YAMAMOTO, H.;HIRANO, K.;KOBAYASHI, S.;KANAIDE H.; **Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle.** Journal of Physiology (1992), 456, pp. 193-213.

WATANABE, H., MURAKAMI M., OHBA T., TAKKAHASHI Y., ITO H. TRP channel and cardiovascular disease. **Pharmacology e Therapeutics;** v.118, p. 337-351, 2008.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

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

ZETOLA, M.; DE LIMA, T.; SONAGLIO, G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.; PETROVICK, P. e BASSANI, V. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian *false melissa*)- **J. Ethnopharmacology**; v. 82, p. 207-215, 2002.

ZHANG, S., CUI, N., LI, S., GUO, L., WU, Y., ZHU, D., JIANG, C., Interception of the endotoxin-induced arterial hyporeactivity to vasoconstrictors, Vascul. Pharmacol. v. 62, n. 1, p. 15-23, Jul 2014.

Conclusão

5. Conclusão

- O OELa não interferiu no tônus basal da aorta isolada de rato.

- OELa, citral e limoneno possuem efeito vasorrelaxante sobre aorta isolada de rato.

- O OELa, o citral e o limoneno foram capazes de interferir tanto no acoplamento eletromecânico, quanto no farmacomecânico.

- A ação do OELa e do citral são potencializados pelos fatores relaxantes derivados do endotélio, principalmente NO e as prostaciclinas;

- O limoneno possui efeito bifásico nas contrações evocadas por fenilefrina (acoplamento farmacomecânico).

- A ação do OELa e do citral, envolvem possivelmente os canais de cálcio operados por voltagem.

- Os efeitos do OELa foram mais pronunciados que os do citral e do limoneno, sugerindo um possível sinergismo dos compostos que formam o OELa.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Survey of medicinal flora of Paraíba and phytochemical screening. **Brazilian Journal of Pharmacy**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 3, p. 72-76, 1990.

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C. et al. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v. 18, n.3, p. 436-440,2008.

AIRAKSINEN, K. E. J.; SALMELA, P. I.; LINNALUOTO, M. K.; ILAHEIMO, M. J.; AHOLA, K.; RYHANEN, L. J. Diminished arterial elasticity in diabetes: association with fluorescent advanced glycosylation end products in collagen. Cardiovasc. Res.V. 27, p. 942–945, 1993.

ALMEIDA, M. D.; BOTURA, M. B.; SANTOS, M. M.; ALMEIDA, G. N.; LUCIANA, F. D.; COSTA, S. L. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capimaçu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 12(3): 125-129; 2003.

AMARAL, V.A.; CRUZ, M.E.S.; SANTOS, P. et al. **Produção de mudas: primeiros passos para o sucesso na obtenção de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. In: IV Fórum de Extensão e Cultura da UEM: perspectivas da extensão universitária e da prestação de serviços, 2006.

ANDREGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; SILVA, A.C. et al. Antiviral evalution of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Phytotherapy,** n. 76, p. 374-378, 2005.

ANGELUCCI, M.E.M.; CORDAZZO, S.N.; FORTES, V.A. Efeitos farmacológicos do extrato de *Lippia alba* (Mill.) N.E.B. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 11**., 1990, João Pessoa. Resumos. João Pessoa: SBPM, 1990. PN 4.12.

AQUINO, L.C.L.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.B.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BALNK, A.F.; CARVALHO, L.M**. Antimicrobial activity of essential oils of cidreira-herb and basil against bacteria from bovine meat.** Alim. Nutr., Araquara**, v. 21, n.4, p. 529-535, out/dez. 2010.**

AQUINO, C. F.; SALES, N. D. L. P.; SOARES, E. P. S.; MARTINS, E. R. Chemical characterization and action of essential oils in the management of anthracnose on passion fruits. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34(4): 1059-1067; 2012.

ARAMBARRI, A.; FREIRE, S.; COLARES, M.; BAYON, N.; NOVOA, M.; MONTI, C.; STENGLEIN, S. Leaf anatomy of medicinal shrubs and tree from gallery forest of the paranaense province (Argentina). Part 1. **Bulletin of the Argentina Botany** , v.41, n. 3-4, p. 233-268, 2006.

ARCHER, L.S.; GRAGASIN, F.S.; WU, X.; WANG, S.; McMURTRY, S.; KIM, D.H.; PLATONOV, M.; KOSHAL, A.; HASHIMOTO, K.; CAMPBELL, W.B.; FALCK, J.R.; MICHELAKIS, E.D. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal

Mammary Artery Is 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acidan Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BKca Channels. **American Heart Association,** v. 107, p.769-776, 2003.

ARNAUD, M. J.; **The pharmacology of caffeine.** Progress in Drug Research, 1986, 31, 273-317.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.307-311, 2006.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essencial oils-a review. **Food Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARBOSA, F.F.; BARBOSA, L.C.A.; MELHO, E.C. et al Effect of drying air temperature upon the content and chemical composition of the essential oil from *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. **New Chemistry**, n. 29, p. 1221-1225, 2006.

BARBOSA-FILHO, J.M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M.F.F.M. et al natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n.16, p. 258-285, 2006.

BAROCELLI, E.; CALCINA, F.; CHIAVARINI, M. et al Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon "Grosso" essential oil. **Life Science**, v. 76(2), n. 26, p. 213-223, 2004.

BASTOS, J.F.; MOREIRA, I.J.; RIBEIRO, T.P. et al. Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology,** n. 106, v.4, p.331-337, 2009.

BELETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932-6938, 2004.

BERGER, R. G.; KRINGS, U.; ZORN, H. Em ***Food Flavour Technology***; Taylor A. J., ed.; cap. 3, 2002.

BICAS, J.L.; PASTORE, G.M. Isolation and screening of d-limonene resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology** 38:563-567, 2007.

BIASI, L.A.; COSTA,G. Vegetative propagation of *Lippia alba.* **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.3, p. 455-459, 2003.

BLAUSTEIN, M. P.Sodium-calcium exchange in mammalian smooth muscles. In: ALLENT T. J. A.; NOBLE D.; REUTER H. Sodium-calcium Exchange. New York: Oxford University Press, p. 208-232, 1989.

BOLTON, T. B.; PRESTWICH, S. A.; ZHOLOS, A. V.; GORDIENKO, D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 85-115, 1999.

BOTRE, D.A.; SOARES, N.F.F.; EPITIA, P.J.P.; SOUSA, S.; RENHE, I.R.T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**; **57** (3), 283-291, 2010.

BORGES, PCS.;CAETANO, JC. Abandono do tratamento da hipertensão arterial sistêmica dos pacientes cadastrados no Hiperdia/MS em uma unidade de saúde do município de Florianópolis-SC. **Arquivos Catarinenses de Medicina** v. 34, n. 3, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC n° 14, de 31 de março de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**.

BRASIL. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 jun. 2006a.

BURDOCK, G. A.; *Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients*, 3rd ed., CRC:Boca Raton, 1995.

CÁCERES, A.; ALVAREZ, A.V.; OVANDO, A.E.O.; SAMAYOA, B..E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1.Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, n.31, p.193-208, 1991.

CALIXTO, J. B; Braz. **Journal Medical Biology Research,** v.33, p.179-189, 2000.

CAMÊLO, L. C. A. et al. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de erva cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-8, 2011.

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRATT, P. F.; HARDER, D.R. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. **American Heart Association**, v. 78, p.415-423, 1996.

CARAFOLI E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**. v. 99:1115–1122, 2002.

CARDOSO, T. H.; GONÇALVES, B. N. **Ensaios sobre a desidrogenação do limoneno,** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1995.

CASTRO, D.M.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M.. Biomass production and chemical composition of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown Britt & Wilson in leaves on different plant parts in different seasons. Acta Hort. (ISHS*)* 569, 111-115, 2002.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A. .; SILVA, D.J.H. And MOSQUIM, P. R. Secondary metabolites: contribution to the study of medicinal plants. **Publisher Independent**, 2ª Ed, 2004. 113 p.

CAVALCANTI, YURI WANDERLEY; ALMEIDA, LEOPOLDINA DE FÁTIMA DANTAS DE; PADILHA, WÍLTON WILNEY NASCIMENTO. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de candida. **Odontologia Clínico-Científica (Online)**, v. 10, n. 3, p. 243-246, 2011.

CÂMARA, C.C.; NASCIMENTO, N.R.; MACÊDO-FILHO, C.L.; ALMEIDA F.B.; FONTELES, M.C. Antispasmodic effect of the essential oil of Plectranthus barbatus and some major constituents on the guinea-pig ileum. **Planta Med**. V. 69, p. 1080- 1085, 2003.

CHATTERJEE, T.; BHATTACHARYYA, D. K.; ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** 2001, *55*, 541.

CHIWORORO, W. AND J.A. OJEWOLE. Biphasic effect of Psidium guajava Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract on rat isolated vascular smooth muscles. **J. Smooth Muscle Res**. 44: 217-229, 2008.

COELHO, EB,; NOBRE, .F. Recomendações práticas para se evitar o abandono do tratamento anti-hipertensivo. **Rev Bras Hipertens** v.13(1): 51-54, 2006.

CONDE, J.; CORREA, V.S.; CARMONA, F. et al. Chemical composition and therapeutic effects of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown leaves hydro-alcoholic extract in patients with migraine. **Phytomedicine**, n. 15, v.18(14), p. 1197-1201, 2011.

COSTA, D.C.; VERMELHO, A.B.; ALMEIDA, C.A. et al. Inhibitory effect of linalol-rich essential oil from Lippia alba on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2013.

COTECCHIA, S. The α1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. **J Recept Signal Transduct Res,** v. 30, n. 6, p. 410-9, Dec 2010. ISSN 1532-4281.

CUNHA, F.F; REGO L. P.; VILHENA A.O. Medicamentos como fatores de risco para hipertensão arterial secundária: um saber necessário para a enfermagem. **Revista Brasil,** São Paulo, v**.**11, n.6, 2012.

CRACKOWER, M. A.; SARAO, R.; OUDIT, G. Y.; YAGIL, C.; KOZIERADZKI, I.; SCANGA, S. E.; SANTOS, A. J. O; COSTA, J.; ZHANG, L.; PEI, Y.; SCHOLEY, J.; FERRARIO, C. M.; MANOUKIAN, A. S.; CHAPPELL, M. C.; BACKX, P. H.; YAGILQ, Y.; PENNINGER, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature,** v.417, n.20, pp.822-828, 2002.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba:* A new anesthetic for silver catfish, Rhamdia quelen. **Aquaculture**, v. 306, p. 403-406, 2010.

DANTAS RCO. Saúde do homem e o controle da pressão arterial em usuários hipertensos no nível da atenção primária a saúde [dissertação]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2013.

DEMYTTENAERE, J.; Kimpe, N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.*,11,265, 2001.

DESHMUKH A, KUMAR G, KUMAR N, et al. Effect of joint national committee VII report on hospitalizations for hypertensive emergencies in the United States. **Am J Cardiol**. 2011; 108(9):1277-82.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Medicinal plants in the Amazon and Atlantic Forest**. 2.ed. Sao Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DRESEL, P. E.;KNICKLE, L.; **Cytochalasin-B and phloretin depress contraction and relaxation of aortic smooth muscle.** European Journal of Pharmacology, 144, 1987, 153-157.

DUDAI N, WEINSTEIN Y, KRUP M, RABINSKI T, OFIR R. Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Med 71*: 484-488, 2005.

ENDEMANN DH, SCHIFFRIN EL. Endothelial dysfunction. **J Am Soc Nephrol**. 15(8):1983-92; 2004.

EHLERT, P.A.D. et al. Effect of harvest time on carvone and limonene of "erva cidreira brasileira" essential oil. **Brazilian horticulture**, Brasília 21.2 (2003).

EXTON, J. H. New Developments in phospholipase D. J. **Biol. Chemistry**. V. 272, n.25, p. 15579-15582, 1997.

FACEMIRE, C. S.; ARENDSHORST, W. J. Calmodulin mediates norepinephrineinduced receptor-operated calcium entry in preglomerular resistance arteries. **Am J Physiol Renal Physiol.** V. 289, p. F127–F136, 2005.

FARIAS, M. R. et al. Assessment of quality of raw vegetables. **Pharmacognosy: the plant drug**, v. 5, p. 262-288, 2003.

FEIJÓ, A. M; BUENO, M. E. N; CEOLIN, T; LINCK, C. L; SCHWARTZ, E; LANGE, C; MEINCKE, S. M. K; HECK, R. M; BARBIERI, R. L; HEIDEN, G. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença**. Revista Brasileira Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, p.50-56, 2012.

FERRARINI, S. R.; GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R. F. S.; DIAS, D. O.; ROSA, R. G.; MADEIRA, M. F.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of limonene β- amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, 2008.

FILIPSSON, Dr. A. Falk et al. Limonene. World Health Organization, Geneva, 1998.
FLEMING I, BUSSE R Signal transduction of eNOS activation. ***Cardiovasc Res*** 43: 532-41, 1999.

FRANZ, A. R.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus)(Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia,** 55(1): 116-120; 2011.

FREITAS, F. P.; FREITAS, S. P.; LEMOS, G.; VIEIRA, I. J.; GRAVINA, G. A.; LEMOS, F. J. Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. **Chemistry & biodiversity**, 7(11): 2801-2807; 2010.

FURTADO, R. F.; DE LIMA, M. G.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N.; SILVA, M. G. D. V. Larvicidal activity of essential oils against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, 34(5): 843-847; 2005.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Muscle contraction. In:Molecular aspects of cell biology. Phyladelphia, Saunders, p. 1156-1179, 1995..

GAZOLA, R.; MACHADO, D.; RUGGIERO, C. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous-extracts on the isolates hearts of rats. **Pharmacological Research**, n.50, p. 477-480, 2004.

GAZZANEO, L.R.S., DE LUCENA, R.F.P., DE ALBUQUERQUE, U.P.,Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in a region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 1, 1–8, doi:10.1186/1746- 4269 -1-9. 2005.

GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 173-187, 1991.

GOMEZ, L.A.; STASHENKO, E.; OCAZIONEZ, R.E. Comparative study on in vitro activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever virus. **Natural Product Communications**, n.8, v.2, p. 249-252, 2013.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

GRAEBIN, C. S. et al. The use of Limonene and Limonene Oxide as building-block for Solid- Phase Combinatorial Synthesis (SPCS). In: BRAZILIAN SIMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY, 2, 2004. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Química, . p.1, 2004.

GUIMARÃES, L. G. D. L.; CARDOSO, M. D. G.; DE SOUSA, P. E.; DE ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, 42(2): 464-472; 2011.

GUSMÃO JL, GINANI GF, SILVA GV, ORTEGA KC, MION JÚNIOR D. Adesão ao tratamento em hipertensão arterial sistólica isolada. **Rev Bras Hipertens**. 2009;16(1):38-43.

GUYENET, P. G. The symphathetic control of blood pressure. **Nature,** v.7, pp.335-346, 2006.

GUYTON, A. C. Blood pressure control-special role of the kidneys and body fluids. **Science,** v.252, n.5014, p.1813-1816, 1991.

GUYTON, A. C.; HALL, J .E. Textbook of medical physiology. 11ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

HARBORNE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary**, 2ª ed., p.605 e 611,1999.

HATANO, V.Y.; TORRICELLI, A.S.; GIASSI, A.C. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* end (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , n.45, v.3, p.238-243, 2012.

HEINRICH, M., RIMPLER, H., BARRERA, N.A. Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. **Journal of Ethnopharmacology** 36, 63-80. 1992.

HEINTS, B.; GILLESSEN, T.; WALKENHORST, F.; VOM DAHL, J.; DORR, R.; KREBS, W.; HANRATH, P.; SIEBERTH, H. G. Evaluation of segmental elastic properties of the aorta in normotensive and medically treated hypertensive patients by intravascular ultrasound. J. Hypertens. V. 11, p. 1253–1258, 1993.

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

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C. et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry and Biodiversity**, n.3, p. 1116-1125, 2006.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; GRESSIER, B. et al. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba.* **Phytotherapy Research**, n.2, v.22, p. 256-258, 2008a.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H. et al. Ethnopharmacology of Lippia alba. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.211-222, 2008b.

HISAYAMA, T.; TAKAYANAGI, I. Some properties and mechanisms of thymolinduced release of calcium from the calcium-store in guinea-pig taenia caecum. **Jpn J Pharmacol**. V. 40, p. 69-82, 1986.

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

HOLLINGSWORTH RG. Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects.*Ecotoxicology*. .98:772–779; 2005.

HORI, M.; KARAKI, H. Regulatory mechanisms of calcium sensitization of contractile elements in smooth muscle. **Life Science,** v. 62, p. 1689-1633, 1998.

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S. et al. Thin layer chromatography three chemotypes of Lippia alba extracts (Mill) NE Br . **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.13, p. 36-38, 2003.

JÚNIOR, Mário Roberto Maróstica; PASTORE, Gláucia Maria. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Quím. Nova**, v. 30, n. 2, p. 382-387, 2007.

KARAKI H, OZAKI H, HORI H, MITSUI-SAITO M, AMANO KI, HARADA KI, MYAMOTO S, NAKAZAWA H, WON KJ; SATO, K. Calcium movements, distribution and functions in smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, 49:157–230, 1997.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia: Básica e Clínica.** 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KIMURA, K; ITO, M; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M. et al., Regulation of myosim phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-Kinases). **Science**, v. 273, p. 254-248, 1996.

KOMORI S, ITAGAKI M, UNNO T & OHASHI H. Caffeine and carbachol act on common Ca^{2+} stores to release Ca^{2+} in guinea-pig ileal smooth muscle. **European Journal Pharmacology** v. 277, p. 173–180, 1995.

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

LAHLOU, S.; GALINDO, C. A.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C.; DUARTE, G. P. Cardiovascular effects of the essential oil of Alpinia zerumbet leaves and its main constituent, Terpinen-4-ol, in rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Med,** v. 68, n. 12, p. 1097-102, Dec 2002. ISSN 0032-0943.

LALKO, J.; API, A.M.. Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay. **Food and Chemistry Toxicology**, 44: 739-746, 2006.

LEAL, Luiz Henrique Queiroz. **Ligantes Quirais via Arilação de Heck-Matsuda: Aplicação na Alquinilação Enantiosseletiva de Aldeídos Pró-Quirais e na Redução de Cetonas Pró-Quirais**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas.

LEE, C. R.; WATKINS, M. L.; PATTERSON, J. H.; GATTIS, W.; O'CONNOR, C. M.; GHEORGHIADE, M.; ADAMS, K. F. JR. Vasopressin: A new target for the treatment of heart failure. **American Heart Journal,** v.146, n.1, p.9-18, 2003.

LEIJTEN, P. A. & VAN BREEMEN, C.; **The effects of caffeine on the noradrenaline-sensitive calcium store in rabbit aorta.** Journal of Physiology 357, 1984, 327-339.
LIMA, C. B. N. et al. **Uso de plantas medicinais pela população da zona urbana de Bandeirantes-PR**. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, n.1, p. 600-602, Jul. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas.** Nova Odessa: Plantarum,2002.

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

MAMUN-OR-RASHID, A.N.M.; ISLAM, M.R.; DASH, B.K. In vitro Antibacterial Effect of Bushy Matgrass (*Lippia alba* Mill.) Extracts. **Research Journal of Medicinal Plant**, v.6, p. 334-340, 2012.

MAHANTA, J. J.; CHUTIA, M.; BORDOLOI, M.; PATHAK, M. G.; ADHIKARY, R. K.; SARMA, T. C. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of Pleurotus spp. spawns. **Flavour and fragrance journal**, 22(6): 525-530; 2007.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. et al. **Medicianl Plants**. University Press. UFV-Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 220p, 1995.
MARTINS, M. B. G.; MARTINS, A. R.; TELASCRÊA,M.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica da folha de Cymbopogon citratus (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 20-29, 2004.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W. The essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil** Research, v.8, p.695–698, 1996.

MATOS, F.J.A. **Medicinal Plants: Selection chart and employment plants used in phytotherapy in Northeast Brazil**. 2 ed. Fortaleza-CE. University Press, 346p., 2000.
MATTOS, S.H.; INNECCO, R.; MARCO, C.A.; ARAÚJO, A.V. **Medicinal and aromatic plants grown in Ceará: production technology and essential oils.** Fortaleza: Bank of Northeast Brazil, p. 61-63, 2007.

MAYNARD, L.G.; SANTOS, K.C.; CUNHA, P.S. 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**, n.43, v.6, p.694-698, 2011.

MEDHORA, M.; NARAYANAN, J.; HARDER, D.; MAIER, K. G. Identifying endothelium-derived hyperpolarizing factor: recent approaches to assay the role of the epoxyeicosatrienoic acids. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 369-375, 2001.

MING, L. C. Influence of organic fertilization in biomass production and essential oil content of *Lippia alba*. **Brazilian horticulture**,, v. 12, p. 49-52, 1994.

MING, L. C. .Rooting of cuttings of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.. **Acta Horticulturae**, Leuven - Bélgica, v. 426, n.1, p. 643-646, 1996.

MION, D; SILVA GV; ORTEGA KC; NOBRE F. A importância da medicação antihipertensiva na adesão ao tratamento. **Rev Bras Hipertens.** vol 13(1): 55-58, 2006.

MITA, M.; YANAGIHARA, H.; HISHINUMA, S.; SAITO, M.; WALSH, M.P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rhoassociated kinase. ***Biochem J*** 364: 431–440, 2002

MOLDENKE, H.H.1973. Verbenaceae. In: Woodson. Jr., R.E. & Schery, R.W. (eds.).Flora of Panamá. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 60: 41-148, 1973.

MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; MOLEIRO, F.C. et al. Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. **Chemical-Biologial Interactions**, n. 14, v. 180(3), p. 499-505,2009.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells. **J Physiol,** v. 435, p. 123-44, Apr 1991. ISSN 0022-3751.

Organización Mundial de la Salud. **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005.** Genebra: Organización Mundial de la Salud; 2002

ORTIZ, M.I.; RAMIREZ-MONTIEL, M.L.; GONZÁLEZ-GARCIA, M.P. et al. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. **Archives of Pharmacal Research**, n.33, v.10, p. 1691-1697, 2010.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103–108, 2006.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* . H.B.K. **Food Chemistry**, v.101, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, E. A. F.; et al. Significado dos Grupos Educativos de Hipertensão Arterial na Perspectiva do Usuário de uma Unidade de Atenção Primária à Saúde. Rev APS 14 (3): 319 – 326 2011 jul./set.

OLIVEIRA SM, SANTOS JL, LEBRÃO ML, DUARTE YA, PIERIN AM. Hipertensão arterial referida em mulheres idosas: prevalência e fatores associados. Texto Contexto Enferm. 2008; 17(2):241-9.

OPIE, L. H. **The Heart-Physiology, from cell to circulation**. Philadelphia – New York, Raven, 1998.

PALÁCIO-LOPÉZ,K.; RODRÍGUEZ-LOPÉZ, N. Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (Verbenaceae) en respuesta a la disponibilidade hídrica em dos ambientes lumínicos. **Acta Biológica Colombiana,** v.12, n.5, p.187-198, 2007.

PAN, Z.; MA, J. Retrograde activation of store-operated calcium channel**. Cell Calcium**, v. 33, p.375-384, 2003;

PARANAGAMA P.A, ABEYSEKERA K.H, ABEYWICKRAMA K., NUGALIYADDE L.. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemon grass) against *Aspergillus flavus*Link. isolated from stored rice. **Lett Appl Microbiol**. 37:86–90;2003.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO,E. et al. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.201-214, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D.; LIMA, F. C.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J.; CECCATTO, V. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LEAL-CARDOSO, J. H. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol,** v. 24, n. 3, p. 341-50, Jun 2010. ISSN 1472-8206.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, 38(2): 326-328; 2004.

PEREIRA JC, BARRETO SM, PASSOS VM. O perfil de saúde dos idosos brasileiros precisa melhorar: estudo de base populacional. **Arq Bras Cardiol**.91(1):1-10; 2008.

PEREZ-VISCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular aspects of medicine**, v. 31, p. 473-494, 2010.

PIASCIK, M. T.; BABICH, M. The facilitative actions of Bay K 8644 on norepinephrine and KCl-induced contractures of rabbit aortic rings. **Life Sci,** v. 38, n. 8, p. 725-34, Feb 1986. ISSN 0024-3205.

PIERRE, P.M.O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. (Verbenaceae).** Tese (Mestrado) – UFLA, Lavras,. In: Souza, S.M.de. Bandeamento cromossômico em *Lippia alba*. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Lavras- UFLA, Lavras, 2004.

PINTO, E. de P.P.; AMOROZO, M.C. de M.; FURLAN, A. Folk knowledge about medicinal plants within rural communities in Atlantic Forest, Itacaré, Bahia State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.4, p.751-762, 2006.

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

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, C.A.; RODRIGUEZ, A.; RIVERO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241-246, 2003.

RAO, G.P.; SINGH, M.; SINGH, P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian Journal of Chemical Technology,** n.7, p. 332-335, 2000.

RAO, G.N; RAO, S.J; ANANTHANARAYANAN, K; SHAHI, S.K.; PATRA, M.; SHUKLA, A. C.; DIKSHIT, A.. Antifungical activity of some chemicals against human pathogenic fungi (dermatophytes), Proceedings of the National Academy of Sciences India, section B: **Biological Sciences,** 75 (4), 288-293; 2005.

RAPOPORT RM, MURAD F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circ Res** 52: 352-7, 1983.

RAPOPORT, R. M.; ZUCCARELLO, M. **Endothelin(A)-endothelin(B) receptor cross talk in endothelin-1-induced contraction of smooth muscle**. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2012, v. 60, n. 5, p. 483-94.

RATES, S. M. K . Plants as source of drugs. **Toxicon.** v. 39, p. 603- 613, 2001.

REMBOLD, C.M.; MURPHY, R.A. Myoplasmic [Ca++] determines myosin phosphorilation in agonist stimulated swine arterial smooth muscle. *Circ Res* 63: 593-603, 1988.

REMBOLD, C.M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: Bárany; M. Biochemistry of smooth contraction. San Diego. **Academic Press**, p. 227-239, 1996.

REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. The role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. Proc Natl Acad Sci. V. 86, p. 3375–3378, 1989.

ROCHA, JC. Prefácio In: NOBRE, F, PIERIN, AMG, MION, JD. Adesão ao tratamento: o grande desafio da hipertensão. São Paulo: **Lemos Editorial**; 2001.

RODRIGUES, A.C.C., GUEDES, M.L.S. Use of medicinal plants in town Sapucaia, Cruz das Almas - Bahia. **Brazilian Journal Medicinal Plants**. 8, 1–7. 2006.

ROJAS, J.; RONCEROS, S.; PALACIOS, O.; SEVILLA, C. Efecto anti-*Trypanosoma cruzi* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c. **Anales de la Facultad de Medicina** 73(1): 7-12; 2012.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.D.E.; M.; KUSHIMA, H. et al. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β-pinene: involvement of heat-snock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E2. **Chemico-Biological Interactions**, n.15, v. 189(1-2), p. 82-89, 2010.

ROZWALKA, L. C.; LIMA, M.; MIO, L. D.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, 38(2): 301-307; 2008.

RUBANYI, G.M.; ROMERO, J.C.; VANHOUTTE, P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol Heart Circ Physiol V. 250, p. H1145–H1149, 1986.

RUEDA, S.; CARDENAS, C.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E.; Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por destilación –solvente simultanéa, de hojas de *Lippia alba* (Fam: Verbenacea). **Scientia et Technica**, v. 13, n. 33, p. 83-85, 2007.

RUFFA, M.J.; WAGNER, M.L.; SURIANO, M. et al. Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, n.15, v.3, p. 153-159, 2004.

SALIMENA, F.R.G. News synonyms and typifications in Lippia sect Rhodolippia (Verbenaceae). **Darwiniana**, n. 1-4, p. 121-125, 2002.

SAMARASEKERA, R.; KALHARI, K. S.; WEERASINGHE, I. S. Insecticidal activity of essential oils of *Ceylon cinnamomum* and Cymbopogon species against *Musca domestica*. **Journal of Essential Oil Research**, 18(3): 352-354; 2006.

SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A.H.A.; SHABIH, F.; SANGWAN, R.S. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, V. 34, p. 3–21, 2001.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1,8-cineol, a food flavoring agente, prevents etanol-induced gastric injury in rats. **Digestive Diseases and Sciences**, n.46, v.2, p. 331-337, 2001.

SANTOS, J.C. et al. Adesão do idoso para hipertensão arterial e intervenções de enfermagem. **Rev. da rede de enfermagem do nordeste,** Fortaleza, v. 13. n. 2, 2012.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Cardiovascular effects of Hyptis fruticosa essential oil in rats. **Fitoterapia** 78: 186-191, 2007.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico de origem dos metabólitos secundário. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Eds. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.;. Petrovick, P.R. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. p. 821, 1999.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SGIMOTO. N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y. Ca2+-dependent ctivation of Rho and Rho kinase in membrane depolarizationinduced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* 93: 548–556, 2003.

SATHER, W. A.; MCCLESKEY, E. W. Permeation and selectivity in calcium channels. **Annu Rev Physiol,** v. 65, p. 133-59, 2003. ISSN 0066-4278.

SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; PETROVICK, Pedro Ros. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira (Org.) et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003, cap. 15, p. 371-400.

SCHOCKEN, N.R.L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de Lippia alba (MILL) N.E. Brown.** 2007.96f. Dissertação (Mestrado em Agricultura tropical e Subtropical)- Instituto agrônomo de pós-graduação-USP, campinas, 2007.

SENA FILHO, J.G.; MELO, J.G.S.; SARAIVA, A.M. et al. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 16, p. 506-509, 2006.

SILVA, M. G. V. Óleos essenciais: composição química, biossíntese, técnicas de extração, atividades farmacológicas e importância econômica. In: MORAIS, S. M.; BRAZ FILHO, R. (Org.). Produtos naturais: estudos químicos e biológicos. Fortaleza: Eduece, 2007. p. 91-104.

SILVA LR; PEREIRA RCA; BRAGA TR; BEZERRA FC; RODRIGUES THS. Produção e rendimento de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. no Ceará em função da época de corte. **Horticultura Brasileira** 30: S6075-S6080. 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRS/UFSC, cap. 18, p. 467-475, 2007.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSSMANN, G; MELLO, J. C; MENTZ, L. A; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento,** 6 ed. Porto Alegre: Ed-UFSC, 2010.

SINGH, G.; RAO, G.P.; KAPOOR, P.S. et al. Chemical constituents and antifungal activity of *Lippia alba* Mill. Leaf essential oil. **Journal of Medicinal and aromatic Plant Sciences (JMAPS),** v.22, p. 701-703, 2000.

SINGH, P.; SHUKLA, R.; PRAKASH, B.; KUMAR, A.; SINGH, S.; MISHRA, P.K.; DUBEY, N. K. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology** v. 48 p. 1734-1740, 2010.

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

SOARES, C. S. A.; SILVA, M.; COSTA, M. B.; BEZERRA, C. E. S. Ação inseticida de óleos essenciais sobre a lagarta desfolhadora *Thyrinteina arnobia* (Stoll)(Lepidoptera: Geometridae). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 6(2): 154 – 157; 2011.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. ***J Pharmacol Exp Ther*** 159:129-145, 1968.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. J Physiol. V. 15, p. 177-185, 2000.

SOUSA, D. G. et al. Essential oil of Lippia alba and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015.

SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia: Coletânea Científica**. Ouro Preto: Editora UFOP, 372 p. 2012.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTINEZ, J.R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundários volátiles de plantas de la família Verbenaceae. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v.27, p. 579-597, 2003.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTINEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography** A, n. 1025, p. 93-103, 2004.

STASI, J.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A. et al. Medicinal plants populary used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia,** v.73, p. 69-91, 2002.

STEFANINI, M.B.; RODRIGUES, S.D.; MING, L.C. Phytoregulators action in the growth of the erva-cidreira-brasileira. **Brazilian Horticulture**, v.20, p. 18-23, 2001.

STIEVEN, A.C.; MOREIRA, J.J.; SILVA, C.F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia piryformis cambess*): avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante. **Eclética Química. 34**(3), 7-13, 2009.

TAVARES, E.S.; JULIÃO, L.S.; LOPES, D. et al. Analysis of the essential oil from leaves of three *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) chemotypes cultivated on the same conditions. **Brazilian Journal of Pharmacognosy,** v.1, n. 15, 2005.

TAVARES, I. B.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. *Lippia alba*: estudos químicos, etnofarmacológicos e agronômicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 204–220, 2011.

TOSCANO-GONZÁLEZ, J.Y. Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare- Boyacá: un estudio preliminary usando técnicas cuantitativas. **Acta Biologica Colombiana** 11, 137–146. 2006.

TOSUN, M.; PAUL, R. J.; RAPOPORT, R.M. Role of Extracellular Ca11 Influx via LType and Non-L-Type Ca++ Channels in Thromboxane A2 Receptor-Mediated Contraction in Rat Aorta. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.** V. 284, p. 921–928, 1998.

WANG, Y.; YOSHIOKA, K.; AZAM, M.A.; TAKUWA, N.; SAKURADA, S.; KAYABA, Y.; SUGIMOTO, N.; INOKI, I.; KIMURA, T.; KUWAKI, T.; TAKUWA, Y. Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. ***Biochem J.*** 394:581-92, 2006

WATANABE, C.; YAMAMOTO, H.;HIRANO, K.;KOBAYASHI, S.;KANAIDE H.; **Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle.** Journal of Physiology (1992), 456, pp. 193-213.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.; DE LIMA, T.C. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal Ethnopharmacology**, n. 1, v. 67(2), p. 127-133, 1999.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 14(1): 57-67; 2012.

VARANDA, E. A. Atividade Mutagênica de Plantas Medicinais. **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, v.27, p.1-7, 2006.

VARGAS, F. S.; OLIVEIRA, C. F.; GIRO, E. M.; SACRAMENTO, L. V.; SPOLIDORIO, D. M.; COSTA, C. A. S. Efeito Antimicrobiano e Citotóxico do Óleo Essencial de *Cymbopogon citratus* sobre Células Odontoblastóides. **Revista Odontológica do Brasil Central**, 19(49): 101-107; 2010.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** v.18, p.308-313, 2008.
VI Diretrizes Brasileiras De Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia/ Sociedade Brasileira de Hipertensão/ Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Arq Bras Cardiol**. 2010; 95 Supl 1:1-51.

VIANA, G.S.B.; DO VALE, T.G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, n.36, p. 347-351, 1998.

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

VITTI, ANDREA M. SILVEIRA; BRITO, JOSÉ OTÁVIO. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos florestais**, v. 17, 2003.

YAMAMOTO, P.Y. **Interação Genótipo X Ambiente na Produção e Composição de Óleos Essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E.Br**. Dissertação (de Mestrado)- Instituto Agronômico (IAC), Campinas, 2006.

YANES, C. R. E. Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra *Tribolium castaneum* herbst (coleoptera: tenebrionidae). Tesis (Magíster en Toxicología) - Cartagena de Indias - Colombia - Universidad Nacional de Colombia Faculdade de Medicina departamento de toxicología Cartagena de Indias, 61p.;2011.

YASUNAGA T, IKEDA S, KOGA S, et al. Plasma pentraxin 3 is a more potent predictor of endothelial dysfunction than high-sensitive C-reactive protein. **Int Heart J**. 55(2):160-4; 2014.

ZANESCO A.; ANTUNES E. Células endoteliais. In: Carvalho HF, Buzato CBC. Células: uma abordagem multidisciplinar. 1. ed. Barueri: Manole. 2005.

ZETOLA, M.; DE LIMA, T.; SONAGLIO, G.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; LIMBERGER, R.; PETROVICK, P. e BASSANI, V. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from

Lippia alba – Verbenaceae (Brazilian *false melissa*)- **J. Ethnopharmacology**; v. 82, p. 207-215, 2002.

ZHANG, S., CUI, N., LI, S., GUO, L., WU, Y., ZHU, D., JIANG, C., Interception of the endotoxin-induced arterial hyporeactivity to vasoconstrictors, Vascul. Pharmacol. v. 62, n. 1, p. 15-23, Jul 2014.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

O projeto de mestrado possibilitou a formação multidisciplinar com estudos nas seguintes áreas: química, farmacologia e microbiologia dos produtos naturais, bem como o desenvolvimento e participação em atividades complementares para aprofundar e enriquecer o conhecimento e a formação do profissional.

Artigos publicados

- D.G. SOUSA, S.D.G. SOUSA, R.E.R. SILVA, K.S. SILVA-ALVES, F.W. FERREIRA-DA-SILVA, M.R. KERNTOPF, I.R.A. MENEZES3, J.H. LEAL-CARDOSO4 AND R. BARBOSA. Essential oil of Lippia alba and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. AHEAD, p. 00-00, 2015.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2015) 00(00): 1-6, http://dx.doi.org/10.1590/1414-431X20154710
ISSN 1414-431X Short Communication

Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves

D.G. Sousa[1,2,3], S.D.G. Sousa[1,2,3], R.E.R. Silva[1,2,3], K.S. Silva-Alves[4], F.W. Ferreira-da-Silva[4], M.R. Kerntopf[2,3], I.R.A. Menezes[2,3], J.H. Leal-Cardoso[4] and R. Barbosa[1,2,3]

[1]Laboratório de Fisiofarmacologia das Células Excitáveis, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil
[2]Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil
[3]Programa de Mestrado em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil
[4]Laboratório de Eletrofisiologia, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Capítulo de livro submetido para publicações

- Autoria do capitulo *Lippia alba* (Mill.)N.E.Brown e participação no capítulo *Caryocar coriaceum* Wittm , para o livro Medicinal and Aromatic Plants of South America – (em fase de correções para publicação).

Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos

- EFEITO MIORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO CITRAL SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUÉIA DE RATROS WISTAR. SILVA, A.A.; CARVALHO, P.M.M.; MORAIS, L.P.; MATOS, D.F.; SOUSA, D. G.; SOUSA, S.D.G.; SILVA, R.E.R.; MENEZES, I. R.A.; KERNTOPF, M.R.; BARBOSA, R.; apresentado sob a forma de painel na IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizado no Centro de Convenções do Hotel Tropical Tambaú, João Pessoa-PB, de 29 a 31 de maio de 2014.

- BLOQUEIO DA EXCITABILIDADE DO NERVO ISQUIÁTICO DE RATOS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* E SEU COSNTITUINTE MAJORITÁRIO CITRAL. MORAIS, L.P.; SOUSA, D. G.; SOUSA, S.D.G.; ALVES, K.S.S.; SILVA, F.W.F.; SILVA, R.E.R.; MATOS, D.F.; SILVA, A.A.; MENDONÇA, M.R.K.; MENEZES, I. R.A.; LEAL-CARDOSO, J.H.; CARVALHO, P.M.M.; BARBOSA, R.; apresentado sob a forma de painel na IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizado no Centro de Convenções do Hotel Tropical Tambaú, João Pessoa-PB, de 29 a 31 de maio de 2014.

- ATIVIDADE TOCOLÍTICA DO LIMONENO EM ÚTERO ISOLADO DE RATA, do(s) autor(es), LUIS PEREIRA DE MORAIS, RENATA EVARISTO RODRIGUES DA SILVA, TIAGO FEITOSA RIBEIRO, CÍCERO ANDRÉ FERREIRA MACÊDO, ANDRESSA DEALENCAR SILVA, ROSELI BARBOSA foi apresentado no formato de pôster durante o(a) III Workshop de Etnobiologia e Conservação da Natureza e I Simpósio de Bioprospecção Molecular do Cariri, realizado(a) no período de 27 a 29 de maio de 2015 pela Universidade Regional do Cariri – URCA, em Crato-CE.

- ATIVIDADE VASORRELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA ALBA E SEUS COMPONENTES MAJORITÁRIOS CITRAL E LIMONENO EM AORTA ISOLADA DE RATO, do(s) autor(es), RENATA EVARISTO RODRIGUES DA

SILVA, LUIS PEREIRA DE MORAIS, ANDRESSA DE ALENCAR SILVA, TIAGO FEITOSA RIBEIRO, CICERO ANDRÉ FERREIRA MACÊDO, KARINE DIAS LACERDA, ROSELI BARBOSA foi apresentado no formato Pôster durante o(a) III Workshop de Etnobiologia e Conservação da Natureza e I Simpósio de Bioprospecção Molecular do Cariri, realizado(a) no período de 27 a 29 de maio de 2015 pela Universidade Regional do Cariri – URCA, em Crato-CE.

Participação em eventos científicos

- IX Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizado no Centro de Convenções do Hotel Tropical Tambaú, João Pessoa-PB, de 29 a 31 de maio de 2014.

Minicurso/Palestras ministrados

- Ministrou a oficina intitulada PLANTAS MEDICINAIS: PREPARAÇÃO DE FITOTERÁPICOS; UMA HOMENAGEM AO PROF. FRANCISCO JOSÉ DE ABREU MATOS, O GRANDE IDEALIZADOR DO PROJETO FARMÁCIAS VIVAS no III WORKSHOP SOBRE ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA & I SIMPÓSIO DE BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR DO CARIRI realizados no período de 27 a 29 de maio de 2015 na Universidade Regional do Cariri - URCA, Campus Pimenta, Crato/CE.

- Ministrou o minicurso intitulado USO DA BIODIVERSIDADE NA BUSCA DE SUBSTÂNCIAS POTENCIALMENTE ATIVAS NA NOCICEPÇÃO E SUPRESSÃO DA DOR no III WORKSHOP SOBRE ETNOBIOLOGIA E CONSERVAÇÃO DANATUREZA& I SIMPÓSIO DE BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR DO CARIRI realizados no período de 27 a 29 de maio de 2015 na Universidade Regional do Cariri - URCA, Campus Pimenta, Crato/CE.

- Participou como PROPONENTE do MINICURSO Conhecimento Popular X Conhecimento Científico na busca por novas possibilidades: Construção de quintais e

hortas comunitárias. Durante a I Semana do Meio Ambiente do Instituto de Formação de Educadores, Universidade Federal do Cariri – UFCA, campus Brejo Santo. Realizada em 02 de Junho de 2015.

Participação em bancas

- "Efeito do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown e seus constituintes citral e limoneno sob as contrações da musculatura lisa traqueal de ratos Wistar" da Aluna: Andressa de Alencar Silva do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas; (03/2015)

Anexos

UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI

Comissão de Experimentação e Uso de Animais

DECLARAÇAO

Declaramos para os devidos fins que o projeto intitulado: "Atividade vasorrelaxante do óleo essencial de *lippia alba* e seus componentes majoritários citral e limoneno sobre a contratilidade de aorta isolada de rato" Processo-00084/2014.2 foi **APROVADO** pela Comissão de Experimentação e Uso de animais- CEUA-URCA.

Marta Regina Kerntopf

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf

Vice-Presidente do CEUA/URCA