



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PRPGP
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR

POLIANA MOREIRA DE MEDEIROS CARVALHO

O EFEITO MIORELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia alba E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO
CITRAL SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA
DE RATOS WISTAR.

CRATO – CE

2014

POLIANA MOREIRA DE MEDEIROS CARVALHO

O EFEITO MIORELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia Alba E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO
CITRAL SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA
DE RATOS WISTAR.

Projeto apresentado ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial de defesa de dissertação do Mestrado em Bioprospecção Molecular (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientadora: Roseli Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. José Henrique
Leal
Cardoso

CRATO – CE

2014

Carvalho, Poliana Moreira de Medeiros.
C331e O Efeito miorelaxante do óleo essencial de *Lippia alba* e seu constituinte majoritário citral sobre a musculatura lisa da traqueia de ratos wistar/ Poliana Moreira de Medeiros Carvalho. – Crato, 2014
68p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Orientadora: Profª. Dra. Roseli Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

1. *Lippia alba*; 2. Traqueia; 3. Musculatura lisa;
4. Contratilidade; 5. Citral. I. Título.

CDD: 615

POLIANA MOREIRA DE MEDEIROS CARVALHO

O EFEITO MIORELAXANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Lippia alba E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO
CITRAL SOBRE A MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA
DE RATOS WISTAR.

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular, Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Roseli Barbosa – Orientadora
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça – Avaliador Interno
Universidade Regional do Cariri - URCA

Profa. Dra. Rhowena Jane Barbosa de Matos – Avaliador Externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Henrique Douglas - Suplente
Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico ao meu filho Arthur Medeiros de
Carvalho
e Meu esposo Dalmir Teixeira de Carvalho,
pordemostrarem o verdadeiro valor da vida .

AGRADECIMENTOS

A Deus, por permitir que eu alcance todos os meus objetivos e sonhos, por me dar força e coragem para enfrentar todas as adversidades e obstáculos.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a. Roseli Barbosa, por todos os inestimáveis ensinamentos e por despertar em mim o amor pela ciência. Pela paciência, pelas oportunidades oferecidas e por acreditar e confiar em mim, mesmo em momentos adversos.

A Prof^a Dr^a Marta Regina Kerntopt , pela dedicação e por aperfeiçoar o meu trabalho com sua experiência e sabedoria.

Ao Prof^o Dr. Irwin Rose Alencar de Meneses por todo tempo dedicado as análises e melhoria dos nossos protocolos.

Ao Prof^o Dr. José Henrique Leal Cardoso pela co-orientação e a disponibilidade do seu Laboratório de Fisiologia da UECE, pela gentileza em ceder algumas drogas e, principalmente, por contribuir com sua experiência e sabedoria para melhorar o meu trabalho.

Aos meus pais, Regina Moreira de Medeiros e Cícero Fernandes Medeiros, pelo amor incondicional e pelo exemplo de vida, dignidade, respeito e educação. Pelo valioso apoio, pelas palavras de incentivo e motivação na minha vida.

Ao meu esposo Dalmir e meu filho Arthur, pela paciência e o amor, dedicado a mim.

Às minhas irmãs, Patrícia Moreira de Medeiros e Paloma Moreira de Medeiros, pelo exemplo de vida e o apoio durante toda esta jornada.

Aos meus amigos Antônio José Barbosa, Luis Pereira Morais, Severino Denício Gonçalves de Sousa, Demontier Feitosa de Matos, Andressa de Alencar Silva, Renata Evaristo Rodrigues da Silva, Damiana Gonçalves de Sousa, José Weverton Almeida Bezerra que me acompanham desde o início do mestrado, realizando comigo todos os experimentos, me alegrando com sua amizade e companheirismo. Obrigada pelo apoio e incentivo; por ter me dado oportunidades ímpares, entre as quais a chance de participar do laboratório de farmacologia.

À minha amiga Cinara Vidal, obrigada pela amizade e cumplicidade, pelas palavras de incentivo, pelo carinho e atenção dispensados a mim.

A colega Luzia Paulo da Cruz, pela atenção e dedicação no laboratório, cuidando dos animais do biotério em meu lugar.

Aos demais colegas do Laboratório de Farmacologia, pela boa convivência.

As secretárias Lenira e Andeciele pela atenção e carinho.

À Universidade Regional do Cariri - URCA e a Universidade Estadual do Ceará- UECE, que proporcionaram a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento a pesquisa FUNCAP e CNPQ .

Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela ocorre por nossa conta.
Chico Xavier

RESUMO

A *Lippia alba* tem uma ação sedativa, antidepressiva, analgésica e antiespasmódica na musculatura lisa gastrointestinal. A *Lippia Alba* pela sua ação espasmolítica torna-se grande alvo de estudo para as doenças respiratórias, devido à grande incidência de DPOC na população. O objetivo desse estudo é elucidar o efeito do óleo essencial *Lippia alba* (OELA) e do citral (componente majoritário), sobre a contração da musculatura lisa da traqueia de ratos. Para a realização dos experimentos utilizou-se 62 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 180-300 gramas, mantidos com livre acesso à água e ração. Os animais foram sacrificados em atmosfera de CO₂ seguida de pneumotórax para que ocorresse a dissecação da traqueia. Após a dissecação os anéis da traqueia foram colocados nas cubetas do banho de órgão onde continha 10 ml Tyrode modificado, com pH ajustado para 7.4 e temperatura de 37°C, onde permaneceram por 1 hora para a estabilização. Em seguida foi feita a administração dos agentes contraturante: KCl na concentração de 60mM (via eletromecânica) e ACh 10µM (via farmacomecânica). Após a aplicação dos agentes contraturantes foram administradas concentrações crescentes e cumulativas de OELA e citral (1–10.000 µg/ml). Verificou-se um relaxamento da musculatura lisa traqueal que foi estatisticamente significativo quando utilizou o KCl como agente contraturante. O OELA foi mais potente do que seu constituinte majoritário citral, tendo como IC₅₀ 651,2 µg/ml e o citral apresentou IC₅₀ 3.741 µg/ml, demonstrando que o óleo é mais potente do que o citral. Sabe-se que a despolarização por KCl na musculatura lisa (via eletromecânica) promove a ativação de canais catiônicos operados por voltagem os (VOCCs), dentre eles temos os canais para cálcio do tipo L, que uma vez ativado promove um influxo de cálcio através da membrana, este influxo medeia à liberação de cálcio induzida pelo RS, que resulta na força da contração, essa resposta foi confirmada utilizando-se a nifedipina (bloqueador de canais para cálcio do tipo L) no qual resultou em um relaxamento total da musculatura lisa da traqueia. Essa resposta também indica que o óleo e o citral possam agir pela mesma via. Quando foi utilizado a ACh observou-se que OELA e o citral não promoveram um relaxamento, estatisticamente significativo na musculatura lisa traqueal, mostrando que o OELA e o citral não age sobre a via farmacomecânica. O OELA e o citral também não demonstraram resultados estatisticamente significativo para o tônus muscular. Em conclusão, verificamos que o OELA e o citral apresentam um efeito relaxante na musculatura lisa da traqueia de ratos. Esse efeito se dá pelo acoplamento eletromecânico e pelo fato de não ter efeito relaxante sobre o tônus, o OELA e o citral tornam-se um potencial agente terapêutico.

Palavras-chaves: *Lippia alba*, Traqueia, Musculatura lisa, Contratilidade, Citral.

ABSTRACT

Lippia alba has a sedative, antidepressant, analgesic and antispasmodic action on the gastrointestinal smooth muscle. *Lippia alba*, by its spasmolytic action, becomes big target for study of respiratory diseases due to the high incidence of COPD in the population. This study aims to elucidate the effect of *Lippia alba* essential oil (OELA) and citral on the contraction of smooth muscles of the rats trachea. We used 62 male wistar rats, weighing 180-300 g, maintained with free access to food and water. The animals were sacrificed in CO₂ atmosphere then pneumothorax occurred to dissection of the trachea. After dissection, the trachea rings were placed in buckets of organ bath containing 10 ml modified Tyrode, pH adjusted to 7.4 and temperature 37 ° C, where they remained for 1 hr for stabilization. Then the dosage of contracture agents was made: KCl concentration of 60 mM (electromechanical pathway) and 10 mM ACh (pharmacomechanical pathway). After application of the agents contracturantes, increasing and accumulative concentrations of citral and OELA (1-10000 µg / ml) were dosed. There was a relaxation of tracheal smooth muscle which was statistically significant when used as the KCl contracture agent. OELA was more potent than its major constituent citral, whose IC₅₀ 374 µg / ml showed IC₅₀ citral and 651.2 µg / ml, indicating that citral is more potent than oil. It is known that depolarization by KCl smooth muscle (electromechanical pathway) promotes the activation of cationic channels operated by the voltage (VOCCs), including calcium channels of L-type, that once activated promotes the influx of calcium through membrane, this influx mediates the release of calcium induced by RS, which results in the force of contraction. This response was confirmed using nifedipine (calcium channel blocker for L-type) which resulted in the total relaxation of smooth muscle of trachea, which response also indicates that oil and citral can act the same way. When ACh was used, it was observed that OELA and citral did not promote relaxation statistically significant in tracheal smooth muscle, showing that OELA and citral do not act upon pharmacomechanical pathway. OELA and citral did not show statistically significant results for the muscle tone. In conclusion, we found that citral and OELA have a relaxing effect on smooth muscles of the trachea of rats and this effect is caused by the electromechanical coupling, this mechanism is effective and specific, whereas a therapeutic agent should not alter the intrinsic tone.

Keywords: *Lippia alba*, Trachea, Smooth Muscle, Contractility, Citral

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i - Concentração intracelular de cálcio
0Ca²⁺ - Solução de Tyrode isenta de cálcio
AE – Agente em estudo
ACh - Acetilcolina
ANOVA - Análise de variância
Ca²⁺ -Cálcio
CCE – Concentração-efeito
ClCa - Cloreto de cálcio
CE50 - Concentração que produz 50% do efeito máximo
DAG - Diacilglicerol
DHP – Diidropiridina
DPOC- Doença pulmonar obstrutiva crônica
EGTA - Ácido etileno-bis (b-amino-etil-éter)-N,N,N',N'-tetracético
GDP - Guanosina difosfato
GTP - Guanosina trifosfato
IP3 - Trifosfato de inositol
KCl -Cloreto de potássio
K60 – Cloreto de potássio 60mM
K⁺-Potássio
μM – Micromolar
μm – Micrômetro
MLCK - Cinase da cadeia leve da miosina
MLCP -Fosfatase da cadeia leve da miosina
MLVA – Musculatura lisa das vias aéreas
MYPT1- Subunidade ligada à miosina
N – Número de experimentos
OELA - Óleo essencial de *Lippia alba*
OMS - Organização mundial de saúde
PKC - Proteína cinase C
PLC -Fosfolipase C
RS - Retículo sarcoplasmático
SERCA – Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
RhoK -Rhocinase
TM -Tyrode modificado
ROCCs - canais catiônicos operados pelo receptor
RYR- rianodina
SOCCS - canais catiônicos não seletivos
TM – Tyrode modificado
VOCCs - canais dependentes de voltagem

TABELAS

Tabela 01-Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	38
Tabela 02-Efeito do OELA sobre relaxamento da MLVA	41
Tabela 03-Efeito do OELA e citral sobre a curva dose repostada do BaCl ₂	49

FIGURAS

Figura 01 – <i>Lippia alba</i>	17
Figura 02 – Fórmula estrutural do geranial, neral e citral	18
Figura 03 – Corte transversal da traqueia humana.	19
Figura 04 – Mecanismo de contração do MLVA	23
Figura 05 – Mecanismo de relaxamento do MLVA	24
Figura 06 – Sistema de aquisição das respostas musculares mecânicas.....	31
Figura 07 – Esquema ilustrativo da via eletromecânica	33
Figura 08 -Esquema ilustrativo da via farmacomecânica	34
Figura 09 - Esquema ilustrativo do tônus muscular	34
Figura 10 - Esquema ilustrativo dose resposta induzida por BaCl ₂	35
Figura 11 - Esquema ilustrativo da exposição da nifedipina e OELA	36
Figura 12 – No painel A: traçado representativo da via eletromecânica..... No painel B: Curva dose resposta do OELA e do citral	40
Figura 13 –Gráficoda IC50 do OELA e do citral.....	42
Figura 14 - No painel A: traçado representativo da via farmacomecânica. No painel B: Curva dose resposta do OELA e do citral.....	44
Figura 15 - No painel A: traçado representativo do tônus muscular. No painel B: curva dose resposta do OELA e do citral	46
Figura 16 - No painel A: traçado representativo mostrando que o tempo de exposição influencia na contração induzida por BaCl ₂ 30 µM. No painel B: curva dose-resposta BaCl ₂ , OLEA e citral	47
Figura 17 - No painel A: traçado representativo da exposição da nifedipina. No painel B: gráfico representativo da contração induzida pelo BaCl ₂ na presença da nifedipina	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 ÓLEO ESSENCIAL	15
1.2 GÊNERO LIPPIA SP	16
1.3 CITRAL: GERANIAL E NERAL	17
1.4 FUNÇÕES DO SISTEMA RESPIRATÓRIO:TRAQUEIA	18
1.4.1 Traqueia de ratos	20
1.5 MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO..	20
1.6 MECANISMO CONTRÁTIL NO MÚSCULO LISO	21
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4. METODOLOGIA	29
4.1 MATERIAIS	29
4.1.1 Sais e fármacos	29
4.1.2 Soluções	29
4.1.3 Material botânico	30
5. MÉTODOS	31
5.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
5.1.1 Efeito relaxante do OELA e do citral em contrações sustentada por K60....	32
5.1.2 Efeitos inibitórios do OELA e do citral em contrações sustentada por ACh	33
5.1.3 Efeitosdo OELA e do citral sobre o tônus intrínseco ou basal	34
5.1.4 Efeito do OELA e do citral na curva dose resposta do BaCl ₂	35
5.1.5 Efeito do OELA sobre o bloqueio da nifedipina	36
5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6. RESULTADOS	38
6.1 ANÁLISE QUÍMICA DO OELA	38
6.2 EFEITO RELAXANTE DO OELA E O CITRAL SOBRE CONTRAÇÃO INDUZIDA POR K60	39
6.3 IC ₅₀ DO OELA E CITRAL SOBRE A CONTRAÇÃO MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA	42
6.4 EFEITO DO OELA E DO CITRAL SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR ACH	43
6.5 EFEITO DO OELA E DO CITRAL SOBRE O TÔNUS MUSCULAR	45
6.6 EFEITO DO OELA E DO CITRAL SOBRE A CURVA DOSE RESPOSTA DO BACL ₂	47
6.7 EFEITO DO OELA SOBRE O BLOQUEIO DA NIFEDIPINA	50
7. DISCUSSÃO	51
7.1 EFEITO SOBRE ACOPLAMENTO ELETROMECHANICO	52
7.2 EFEITO SOBRE O ACOPLAMENTO FARMACOMECHANICO	54
7.3 EFEITO SOBRE O TÔNUS INTRÍNSECO	54
7.4 EFEITO DO OELA E DO CITRAL SOBRE O BLOQUEIO DA NIFEDIPINA ...	55
8. CONCLUSÃO	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO:

O interesse pela natureza como fonte de agentes quimioterapêuticos potenciais ainda é muito grande. Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo. Os óleos essenciais como o timol, extraído do tomilho, e o mentol, da menta, são comuns na fórmula de remédios antigripais e produtos para a assepsia da boca e da garganta. Alguns óleos essenciais são indicados para o tratamento de doenças da pele, outros combatem inflamações e reduzem a febre. São numerosos os que, por sua fragrância, encontram aplicação na produção de perfumes e cosméticos, foram também derivadas de plantas, anti-hipertensivos e alcalóides (GURIB-FAKIM, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Observa-se um interesse crescente em torno dos fitomedicamentos, mostram inúmeras vantagens frente a terapêutica convencional, quando se questiona os efeitos colaterais, toxicidade diminuída, baixo custo e o fato do Brasil apresentar vasta flora nativa em seu território (SANTOS *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2013; ARRUDA *et al.*, 2013).

O relato sobre a utilização de plantas para o tratamento de enfermidades remonta às sagradas escrituras e o papiro de Ebers, onde estão descritas diversas doenças e muitas preparações de origem animal e vegetal. Diversos achados arqueológicos demonstram que o uso de substâncias de origem vegetal é amplo em diversas culturas (MOURÃO *et al.*, 2009; ASCARI *et al.*, 2013).

A utilização das plantas medicinais para o tratamento de doenças começou de forma empírica e, durante muitos anos, elas constituíram a única alternativa terapêutica para o homem. Ainda hoje, em feiras livres ou mercados populares, verifica-se a utilização de plantas para o tratamento e a cura de enfermidades. Tal fato é oriundo das observações populares e da

divulgação sobre os efeitos dessas plantas que foram passando de geração em geração durante séculos (LOPES, 2009; LINS *et al.*; 2013).

Com o crescimento de pesquisas na área farmacêutica, as plantas medicinais passaram a ser um importante objeto de estudo, deixando de se fundamentar apenas no uso tradicional e passando a se apoiar em aspectos de qualidade, eficácia e segurança. Atualmente são bastante utilizadas como fonte de substâncias para a síntese de fitoterápicos (BARBOSA *et al.*, 2013).

O estímulo ao desenvolvimento e a utilização de fitoterápicos tem crescido nos últimos anos com o objetivo de prevenir, curar ou amenizar os sintomas de diversas doenças, sendo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde. Aliado a isto, os fitoterápicos possuem como vantagens: vários compostos com efeitos similares; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes; menores riscos de efeitos colaterais, pois os compostos ativos estão presentes em concentrações reduzidas nas plantas e demandam menores custos para a pesquisa. Entre os agentes terapêuticos oriundos de plantas medicinais podemos encontrar os óleos essenciais (ZUCCHI *et al.*; 2013).

A nossa flora brasileira brota uma vasta ferramenta de biotecnologia, como a bioprospecção molecular, que proporciona uma facilidade para pesquisa, a aplicação, sustentabilidade e a preservação de todo aquilo que deriva do meio ambiente. A importância das plantas medicinais para nossa indústria nacional possibilita um crescimento do nosso arsenal terapêutico (ESCOBAR *et al.*, 2010, SOUSA, 2013; SOUZA *et al.*, 2013).

1.1. ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de uma planta é o conjunto de substâncias voláteis que produz o aroma da planta. Na sua composição incluem-se substâncias de diferentes grupos químicos como hidrocarbonetos, alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, terpenos, etc (COSTA, 1977). Os óleos essenciais têm sido usados com finalidade terapêutica há mais de três mil anos. Recentemente, além do seu vasto uso industrial em perfumaria, eles têm sido muito utilizados com finalidade médica na aromaterapia, por administração do óleo essencial por via oral ou por aplicações à superfície do corpo acompanhadas

de massagens. Além da aromaterapia, seu uso por médicos da medicina ortodoxa tem aumentado muito na Europa, com bons resultados, em casos em que falharam os outros tratamentos preconizados com a farmacologia clássica. As moléculas dos constituintes ativos dos óleos essenciais têm servido como modelos de estudos de relação entre estrutura química e ação farmacológica, a partir do qual se desenvolvem novos fármacos com maior eficácia e seletividade (SIMÕES, 1999).

Os óleos essenciais podem ser extraídos das plantas por diferentes processos, tais como destilação a vapor, extração por solventes orgânicos voláteis, por gorduras a frio ou a quente, adsorventes (sílica, carvão ativado) ou por pressão (expressão). Algumas substâncias, quando possuem valor comercial elevado, podem ser isoladas do óleo que a contém ou mesmo sintetizado em laboratório, como o caso do mentol das espécies de *Mentha*. (SIXEL & PECINALLI, 2005).

Apesar de todos os órgãos de uma planta poder acumular óleos essenciais, sua composição química, caracteres físico-químicos e odores podem variar segundo a localização da planta. Embora seja controlada geneticamente, a biossíntese dos constituintes de uma planta é fortemente afetada pelo ambiente, colheita e pós-colheita (DELAQUIS *et al.*, 2001). Um número crescente de estudos tem demonstrado que os óleos essenciais de plantas derivadas exibem uma variedade de propriedades biológicas, tais como +analgésico (JULIÃO *et al.*, 2003; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2013), hipotensor e atividades anticonvulsivantes.

1.2. GÊNERO LIPPIA SP

O gênero *Lippia* sp inclui aproximadamente 200 espécies de plantas de regiões tropicais da África, América do sul e Central pertencente a família Verbenacea. As infusões das folhas, parte aérea e flores são tradicionalmente utilizadas como loção tópica para tratamentos de pele, transtornos respiratórios e gastrointestinais (MATOS, 2000). Na medicina tradicional brasileira, a espécie de *Lippia alba* é vulgarmente conhecida como erva-cidreira, chá-do-tabuleiro e limão salsa (MATOS, 2000). Subarbusto de morfologia variável, alcançando até um metro e meio de

altura, raramente dois metros, de ramos finos, esbranquiçados, arqueados e quebradiços, portanto folhas opostas, elípticas de largura variável, com bordos serrados e ápice agudo (MATOS, 2001). No território brasileiro, esta planta pode ser localizada em quase todas as regiões, crescendo em terras arenosas nos leitos de rios e a margem de lagos, em área onde predomine o clima tropical e subtropical (BARATTA,1998;LAVABRE,1993).

O óleo essencial da *Lippia alba* (OELA) pode ter grandes variações na sua composição, por isso foi sugerido a nomenclatura de quimiotipos I,II e III, separados por seus elementos predominantes no óleo essencial: citral, a carvona e o limoneno (LAVABRE,1993;MATOS,1996).

Na literatura são citadas as ações biológicas para OELA com atividade antiviral, antimicrobiana, citotóxica e antifúngica, antioxidante, sedativa, anticonvulsivante, e antiespasmódica (ARANGO *et al*,2009) (SIXEL,2005)(TAMPIERE,2005), (figura 1).



Figura 1: *Lippia alba* Fonte: planetasustentavel.abril.com.br

1.3. CITRAL : GERANIAL E NERAL

O geranial e neral são constituintes presentes no OELA e a junção desses dois constituintes origina-se o citral. O citral, ou 3,7-dimetil-2,6-octadienal, está entre os mais importantes monoterpenos de cadeia aberta. Do ponto de vista químico, o citral é uma combinação de dois isômeros, o trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, também chamados citral A – geranial e citral B – neral, ambos possuem fórmula molecular igual $C_{10}H_{16}O$, porém são estruturalmente desiguais, apresentando-se na constituição dos óleos essenciais de muitos vegetais (ARANEDA et al., 2004; GLAMOCLIJA, 2011; SOUSA, 2013), (Figura 2).

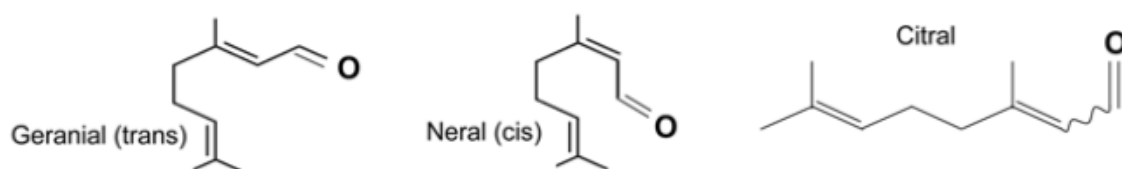


Figura 2- Fórmula estrutural do geranial, neral e citral respectivamente.
Fonte: Adaptada de Stotz et al., 2008.

Um intenso aroma de limão é exalado do citral, possuindo aplicabilidade na indústria alimentícia, presente em especial na cozinha do Sudeste Asiático. É aplicado também na preparação de perfumes e em formulações de detergentes (OPDYKE, 1979; RESS et al., 2003; ARANEDA et al., 2004). O citral possui também ações farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, sedativa, inseticida, desodorizante, expectorante, indutora do apetite, espasmódica e diurética (CARLINI et al., 1986; CARBAJAL et al., 1989; RICE e COATS, 1994; VALE et al., 1999; DO VALE et al., 2002; FISHER e PHILLIPS, 2006; KIM et al., 2006; SANTORO et al., 2007; RAMACHANDRAN et al., 2008).

Este composto coíbe a gênese de óxido nítrico em lipopolissacarídeo (LIN et al., 2008). Age também (em altas concentrações) no retardamento do efeito ansiogênico (DO VALE et al., 2002). Detém ainda ação antiinflamatória e antinociceptiva (LIN et al., 2008; ORTIZ et al., 2010). Indícios apontam para uma possível ação deste sobre a síntese do ácido retinóico, comprometendo a memória espacial (DI RENZO et al., 2007;

KIKONYOGO et al, 1999). A literatura também faz menção ao Citral como irritante, alérgeno e sensibilizador da pele (BASKETTER et al., 1992; 1994; ALLENBY et al., 1993; FROSCHE et al., 2002; SOUSA, 2013).

1.4. FUNÇÕES DO SISTEMA RESPIRATÓRIO: TRAQUEIA

O sistema respiratório humano pode ser subdividido numa porção condutora e outra respiratória. A porção condutora é formada pela nasofaringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. A porção respiratória é formada pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos. A diminuição no calibre destes condutos também é acompanhada por uma transformação nas características histológicas que a princípio são semelhantes aquelas observadas na traqueia (BERNE *et al.*, 2004), (Figura 3).

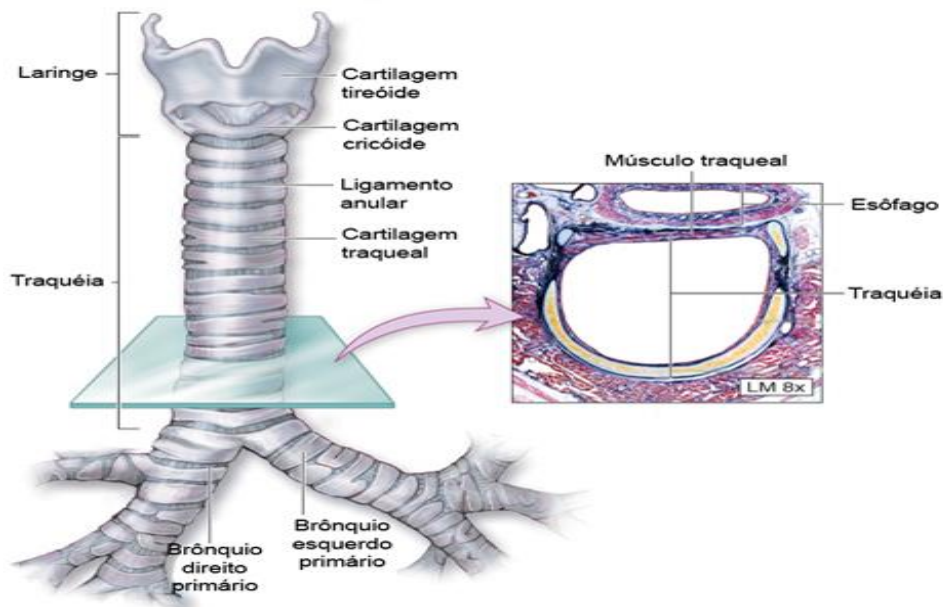


Figura 3: Corte transversal da traqueia humana. Fonte: ondonup.com.br

A traqueia humana se bifurca em dois brônquios principais. Esses brônquios principais se ramificam nos brônquios segmentares e em seguida, em ramos cada vez menos calibrosos (bronquíolos) até chegarem aos alvéolos (BERNE & LEVY, 2009).

A traqueia humana apresenta duas porções, uma cervical e outra torácica, apresentando com característica um número variável de anéis

cartilagosos (variando de 16 a 20) semi-âneos cartilagosos sobrepostos em forma de C cujas extremidades livres estão voltadas para a região dorsal. Embora esteja claro que existam diferenças quanto a fonte principal de resistência local e local de maior pressão (vias aéreas mais centrais) muitos estudos de contração ao nível celular e bioquímico da musculatura lisa das vias aéreas (MLVA) empregam o músculo liso traqueal de várias espécies com um sistema modelo. A resposta a agonistas, o desenvolvimento de tensão máxima e a organização mecânica de cartilagens e células de músculo liso para estudos bioquímicos e biofísicos dos elementos contráteis (GERTHOFFER *et al.*, 1991).

Devido a esses anéis cartilagosos a extensão da cabeça do rato pode resultar em um alongamento de até 50% do tamanho da traqueia sem o decaimento do seu diâmetro luminal (GATTO & HOUCK, 1989). Dessa forma a traqueia age como a porção condutora inicial do trato respiratório que se ramifica em um sistema arborescente de túbulos que culminam nos bronquíolos terminais.

1.4.1. Traqueia de Ratos

Na traqueia de ratos, as cartilagens em C são hialinas e suas extremidades livres estão voltadas para o lado posterior. Ligamentos fibroelásticos de colágeno e feixes de músculo liso prendem-se ao pericôndrio e unem às porções abertas das peças cartilagosas em forma de C. Os ligamentos impedem a excessiva distensão do lúmen e os feixes musculares possibilitam sua regulação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O músculo liso é associado também à mucosa por tecido conectivo frouxo contínuo com a lâmina própria.

Internamente a traqueia é revestida por epitélio do tipo respiratório. Ela apresenta uma barreira de muco e também um sistema de defesa representado pela barreira linfocitária, de função imunitária, que se distribui ao longo de toda sua estrutura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Como em outras espécies, o tipo de epitélio traqueal do rato é predominantemente ciliado pseudo-estratificado, embora células basais e

serosas também estejam presentes. Células globulares são encontradas em maior número no trato respiratório superior com relação a outras áreas do trato respiratório. Camadas de mucosa e submucosa são relativamente distintas e, juntas, têm uma largura de aproximadamente 27,5 µm em rato adulto. Glândulas seromucosas são abundantes, mas são limitadas à porção proximal da traqueia (BARNES, 2001).

1.5. MECANISMO DE CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DO MÚSCULO LISO

O músculo liso de cada órgão é diferente do da maioria dos outros órgãos em vários aspectos: dimensões físicas, organização em feixes e lâminas, resposta aos diferentes tipos de estímulos, características de inervação e função. No mecanismo do músculo liso contém filamentos tanto de actina quanto de miosina, com características químicas semelhantes às dos filamentos de actina e de miosina do músculo esquelético. Porém, não contém complexo normal de troponina, que é necessário para o controle da contração do músculo esquelético, o que torna diferente o mecanismo para o controle da contração (GYTON, 2011).

6. MECANISMO CONTRÁTIL NO MÚSCULO LISO: BASE QUÍMICA PARA A CONTRAÇÃO DO MÚSCULO LISO.

Tanto a contração quanto o relaxamento no músculo liso estão relacionados, respectivamente, com o aumento e a diminuição da concentração citoplasmática de cálcio. Entretanto, para que isso ocorra, é preciso que haja o acoplamento excitação-contração, ou através de mecanismos que envolvem o potencial transmembrana (acoplamento eletromecânico) e pela ativação receptora e seus agonistas (acoplamento farmacomecânico) (SOMLYO, 2000).

Para acoplamento eletromecânico da musculatura lisa traqueal é necessário a entrada de cálcio via canais catiônicos operados por voltagem – (VOCC) (principalmente canais para cálcio do tipo L). Esses canais por sua vez são abertos por concentrações altas de potássio intracelular no qual

despolariza a membrana. Após a despolarização da membrana por potássio os VOCCs são ativados promovendo o influxo de cálcio através da membrana, este influxo medeia à liberação de cálcio induzida pelo retículo sarcoplasmático (RS), que resulta na força da contração. Quando o cálcio é liberado no meio intracelular intercede na ação das correntes de cloro (Cl⁻ dependentes de cálcio) e de cátions não seletivos, como na supressão das correntes de potássio (K⁺) (JANSSEN, 2002).

Na contração farmacomecânica ocorre através da ativação de um agonista ao receptor de membrana. Frequentemente, esse receptor de membrana encontra-se ligado a uma proteína G (proteínas heterotriméricas que se ligam ao GTP ou proteínas ligantes de GTP) que atua como reguladora de muitas atividades intracelulares. Ela possui a capacidade de ligar-se e modificar-se atividade de certas enzimas que desempenham papéis importantes no meio intracelular, além de atuar sobre a atividade de certos canais iônicos. As três subunidades (alfa, beta e gama) que constituem a proteína G funcionam como intermediadoras entre o receptor de membrana e diversas substâncias reguladoras extracelulares além de diversos processos intracelulares (BERNE *et al.*, 2004).

Na presença do complexo agonista-receptor, ocorre a interação entre o receptor e a proteína G, fazendo com que sua subunidade alfa seja ativada. Por possuir maior afinidade por guanosina trifosfato (GTP), quando se torna ativa, a subunidade alfa libera a guanosina difosfato (GDP), liga-se ao GTP e se dissocia das outras unidades beta e gama. Tal mecanismo ativará uma enzima de membrana para continuar o processo e favorecer o aumento do cálcio livre no meio intracelular através do retículo sarcoplasmático (RS) (RANG, 2004).

Embora existam mecanismos distintos para a contração musculatura lisos das vias aéreas (MLVA), um dos mecanismos mais bem descritos na via farmacomecânica se dá pela ativação de uma enzima fosfolipase C, que cliva o bifosfanato-4-5-fosfatidilinositol (PIP₂) em trifosfato-1-4-5 inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG), ambos considerados segundos mensageiros. O IP₃ sinaliza para os receptores de membrana do retículo sarcoplasmático que são canais iônicos ativados por ligantes (receptor de inositol trifosfato – IR₃R) que irá liberar o Ca²⁺ estocado no retículo sarcoplasmático para o

citosol, aumentando assim a concentração do cálcio intracelular. O diacilglicerol (DAG) é um segundo mensageiro e permanece na membrana e juntamente com o Ca^{2+} é capaz de ativar a proteína quinase (PKC) (WEEB, 2003).

No músculo liso existem várias isozimas de proteína cinase C (PKC) e cada um apresenta um papel específico. Em vários casos, a PKC é capaz de promover a contração, pela sua capacidade de fosforilar os VOCCS ou outras proteínas que podem regular o ciclo das pontes cruzadas (KATZUNG, 2003).

No retículo sarcoplasmático os receptores de rianodina (RyR), também são capazes de permitir a liberação de cálcio dos estoques intracelulares. Os RyR são ativados por correntes de Ca^{2+} oriundas tanto dos VOCCs quanto dos IP_3R e dessa forma liberando Ca^{2+} e contribuindo também para seu aumento do Ca^{2+} citosólico (WEEB, 2003). Por isso, já foi relatado que embora o IP_3 como segundo mensageiro, seja importante para iniciar as oscilações do Ca^{2+} , no músculo liso das vias aéreas, a manutenção delas parece necessitar dos RyR (BERNE & LEVY, 2009).

Independente da via de ativação, no mecanismo de contração, a interação das cabeças de miosina com a actina depende de um processo cíclico de fosforilação e desfosforilação das cadeias leves de miosina. Esse processo ocorre quando o complexo cálcio-calmodulina ($4\text{Ca}^{+2}/\text{CaM}$) ativa a cinase da própria cadeia leve de miosina (MLC), permitindo que esta se desloque até o sítio de ligação da actina para miosina, culminando o acoplamento. Em decorrência de sua capacidade de ligação com a calmodulina, o cálcio é capaz de desempenhar um controle sobre diversas funções celulares (WEEB, 2003), (Figura 4).

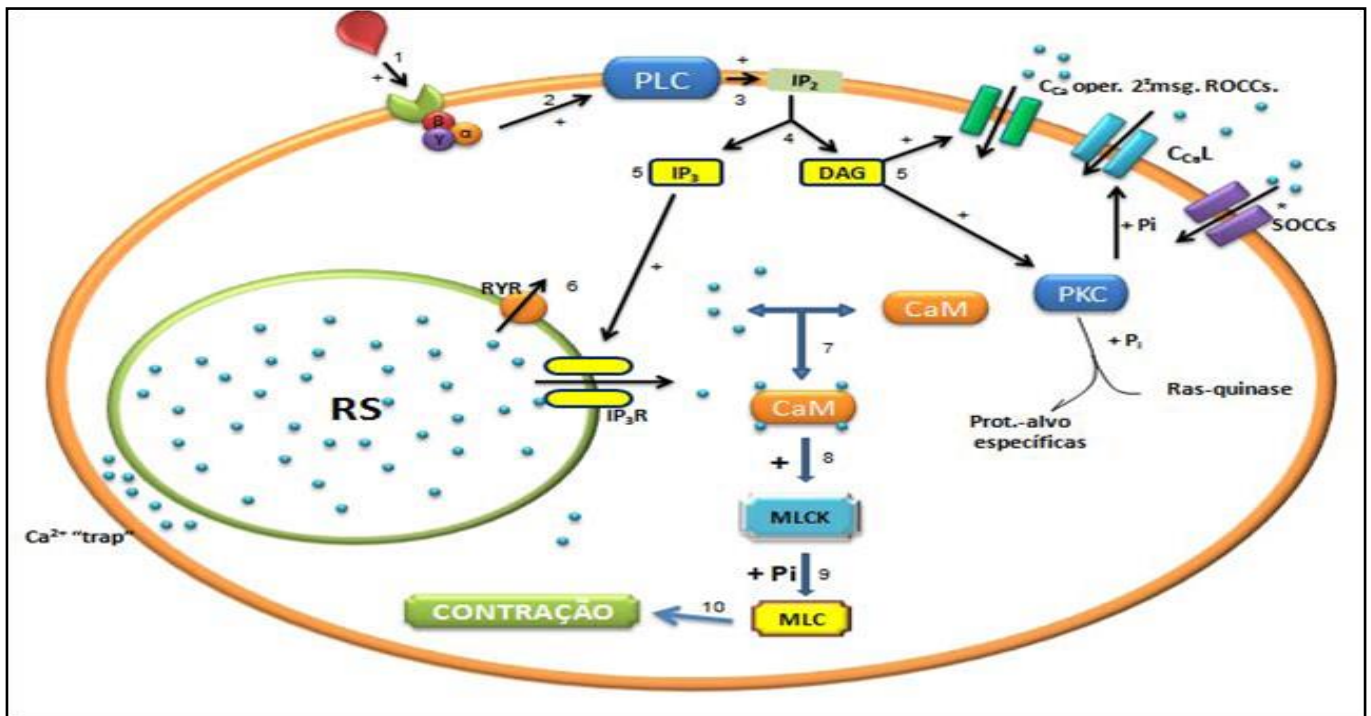


Figura 4. Mecanismo de contração do músculo liso das vias aéreas, pela proteína G. Esquema representativo da contração em músculo liso das vias aéreas. **1.** Ligação do agonista ao receptor de membrana. **2.** Estimulação da fosfolipase C pela subunidade α do receptor. **3.** Estimulação do lipídio de membrana e IP_2 pela enzima PLC. **4.** Catálise do IP_2 em IP_3 e DAG. **5.** Ligação do IP_3 a receptores específicos no RS (IP_3R) resultando na liberação de Ca^{++} para o citosol. O DAG permanece na membrana, ativa os canais para Ca^{++} operados por segundos mensageiros (ROCCs) e junto com o Ca^{++} também ativa a proteína quinase C (PKC). A PKC fosforila proteínas-alvo específicas, canais para Ca^{++} dependentes de voltagem (CCaL) e a via da Ras-quinase regulada pelo sinal extracelular (Ras-ERK). ROCCs, CCaL e IP_3R deixam vaziar o Ca^{++} para o citosol aumentando a concentração desse íon. **6.** O aumento do Ca^{++} citosólico estimula a abertura dos canais receptores de rianodina (RyR). **7.** Ca^{++} ligando-se à CaM. **8.** Complexo CaM- $4Ca^{++}$ ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). **9.** MLCK fosforila a cadeia leve de miosina (MLC). **10.** A fosforilação da MLC acarreta a atividade ATPase da cabeça da miosina e promove o deslizamento dos filamentos finos (actina) sobre os filamentos grossos (miosina) – CONTRAÇÃO. FONTE: HOLANDA, C., 2009

Imediatamente após a formação das pontes cruzadas, ocorre o movimento de alavanca tracionando o filamento fino em direção ao centro do filamento grosso, gerando uma força. Nesse momento o ADP (difosfato de adenosina) e o PI (fosfato) são liberados o que permite a ligação do ATP. Como o ATP tem a capacidade de diminuir a afinidade da miosina pela actina ocorre então o desligamento entre os filamentos, ocasionando o relaxamento (BERNE *et al.*, 2004).

O relaxamento do músculo liso pode ocorrer em resposta à remoção do estímulo que causa a contração (ex.: se desfaz o complexo agonista

receptor), ou pela ação de algumas substâncias que estimulem a inibição do mecanismo contrátil (WEEB, 2003), (Figura 5).

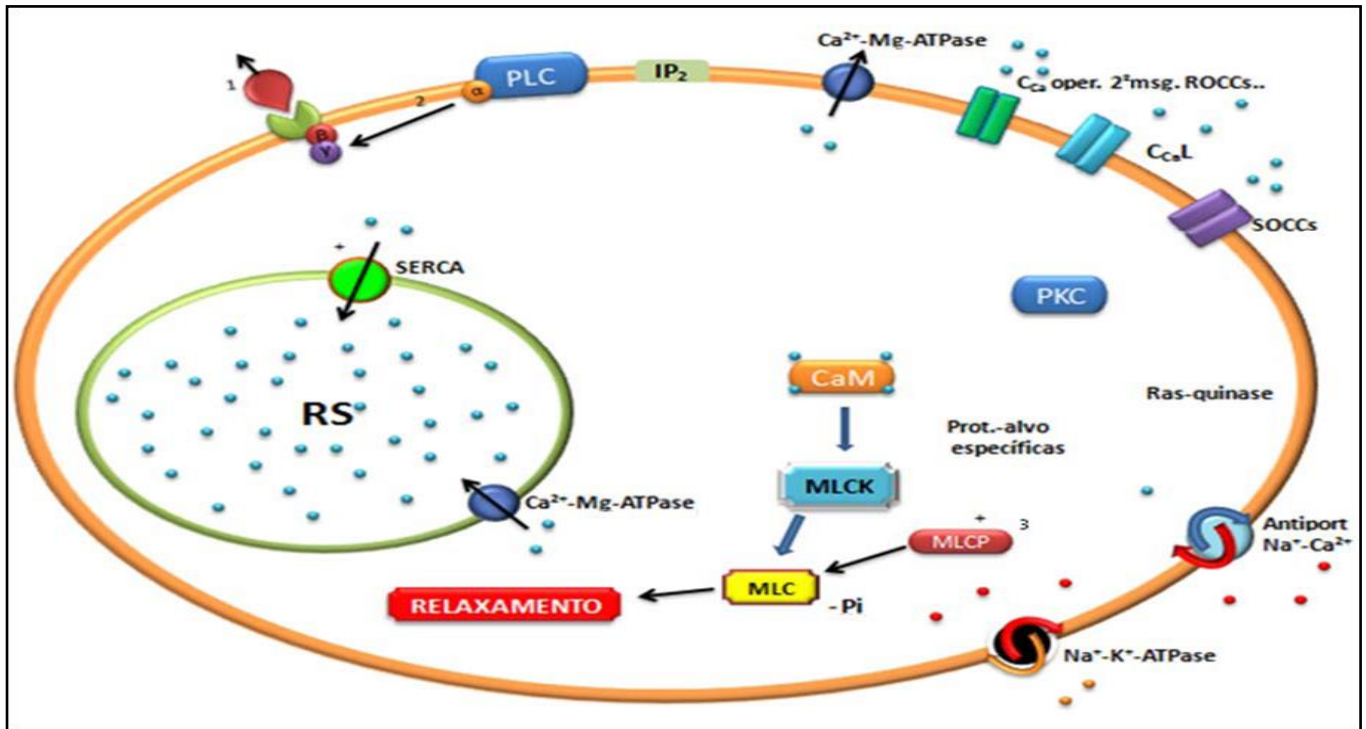


Figura 5. Mecanismo do relaxamento do músculo liso das vias aéreas (sensibilização), pelo mecanismo da proteína G. 1. Dissociação do agonista do receptor de membrana. 2. Retorno da subunidade α . Os canais para membrana fecham-se em resposta à diminuição dos estímulos contráteis. Antiportador $\text{Na}^+\text{-Ca}^{++}$, bombas de Ca^{++} da membrana celular e do retículo sarcoplasmático retiram o Ca^{++} do citosol. $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ restabelece o potencial de membrana. Os estoques intracelulares do Ca^{++} são repostos. 3. Fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) desfosforila a MLC – RELAXAMENTO. FONTE: HOLANDA, C., 2009.

Certamente, assim como ocorre nos demais músculos, o relaxamento do músculo liso das vias aéreas requer mecanismos capazes de reduzir a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Esse evento de redução da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ favorece a ativação da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP), que é responsável por desfosforilar a cadeia leve reguladora, tornando-a inativa (WEEB, 2003).

Está bem aceito e consolidado, que a estimulação dos receptores adrenérgicos ativa a cascata da adenilil ciclase, via proteína G, gerando um aumento nos níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) mediando o relaxamento da célula muscular lisa. Uma vez formado, o AMPC ativa a proteína cinase A (PKA) que promove o relaxamento da célula através de

seus efeitos sobre os canais de K^+ e bomba Na^+/K^+ -ATPases (WEEB, 2003).

Além disso, o AMPc ainda pode promover os seguintes efeitos: 1) inibir a reação de hidrólise do PIP_2 e, por consequência, o influxo de Ca^{2+} ; 2) promover a fosforilação do IP_3R reduzindo a afinidade desse receptor pelo IP_3 e limitando a mobilização de mais Ca^{2+} ; 3) fosforilar a MLCK diminuindo sua afinidade pelo complexo Ca^{2+}/CaM o que reduz a atividade e a fosforilação da MLC (esse processo ocorre quando a $[Ca^{2+}]_i$ diminui para valores menores do que $1 \mu M$ (CUTHBERT, 1994)) e 4) fosforilar canais de potássio ativado por cálcio (KCa^{2+}) promovendo hiperpolarização por aumentar a probabilidade de seu estado aberto e portanto o efluxo dos íons potássio (BARNES, 2001).

Dentre os outros mecanismos capazes de favorecer a redução dos níveis de cálcio intracelular temos a Ca^{2+} -Mg-ATPase presente, tanto na membrana do RS como na membrana celular. Quando fosforilada essa enzima é capaz de se ligar a dois íons cálcio e promover sua remoção do citosol, seja para fora da célula ou para dentro do retículo sarcoplasmático (WEEB, 2003) (Figura 5). A atividade do trocador sódio/cálcio (Na^+/Ca^{2+}) que possui capacidade de colocar três íons sódio para dentro da célula para cada íon Ca^{2+} colocado para fora (BERNE *et al*, 2004) (Figura 5). Esse mecanismo compete com a bomba de Ca^{2+} -ATPase do Retículo Sarcoplasmático (SERCA), que se encontra na membrana do RS capaz de promover o seqüestro do cálcio do citosol para o interior do RS (BERNE *et al.*, 2004).

A atividade contrátil do músculo liso pode ser controlada por numerosos fatores, incluindo os hormônios, os nervos autônomos, a atividade do marcapasso e a utilização de muitos fármacos. Como no músculo esquelético ou cardíaco a contração do músculo depende de Ca^{2+} e os agentes já listados provocam-na por meio do aumento da concentração deste íon intracelular, os potenciais de ação, no músculo liso, são extremamente variáveis e, nem sempre, necessários para iniciar a contração. Com o aumento do $[Ca^{2+}]_i$ intracelular e, assim, contrair o músculo liso sem alteração no potencial de membrana. No músculo liso, o potencial de ação pode associar-se à resposta lenta do tipo abalo e as forças desses

abalos podem-se somar durante períodos de potenciais de ação repetitivos (BERNE & LEVY, 2009). Os Ca^{2+} controlam diversas funções celulares, abrangendo respostas de curta duração como a contração muscular e a secreção, como também respostas de longa duração tais como a transcrição, divisão e morte celular.

A regulação neural da contração do músculo liso depende do tipo de inervação e dos neurotransmissores liberados, da proximidade para os nervos às células musculares e do tipo de distribuição dos receptores para os neurotransmissores nas membranas da célula muscular. Em geral, o músculo liso é inervado pelo sistema nervoso autônomo (BERNE & LEVY, 2009). O controle neural do MLVA é de grande interesse, especialmente porque estes constituintes neurais estão relacionados com doenças respiratórias como a asma (BARNES, 2001).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças respiratórias crônicas afetam todas as idades e representam uma carga substancial tanto para o indivíduo como para a sociedade. No Brasil, 15 milhões de pessoas são afetadas por asma, 20 milhões têm rinite alérgica e cinco milhões de brasileiros com idade acima de 40 anos apresentam deficiência pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Esses números demonstram que 2 em cada 10 brasileiros são afetados por uma doença respiratória crônica (LIMA,2011).

Recentemente, tem havido um interesse crescente em plantas medicinais como alternativas aos medicamentos sintéticos, devido ao aumento de agentes patogênicos associados com doenças infecciosas para as comuns utilizadas na prática clínica (GLAMOCLIJA *et al.*, 2011).

De um ponto de vista farmacológico, *L. alba* é, provavelmente, a espécie mais estudada do gênero *Lippia* (Hennebelle et al. de 2008). Apesar dos diversos achados sobre a *Lippia alba* como: antiviral, antifúngica, antioxidante, sedativa, anticonvulsivante, vasorelaxante e antiespasmódica intestinal (MONTEIRO.,2007). Entretanto não há relatos anteriores que demonstram sua atividade na musculatura lisa da traqueia. Portanto, acreditamos que esse estudo possa nos levar a um melhor entendimento do mecanismo de ação do óleo essencial da *Lippia alba* sobre a musculatura lisa da traqueia e descoberta de um potencial fármaco.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do óleo essencial *Lippia alba* e seu componente majoritário citral, sobre o relaxamento da musculatura lisa de traqueia de ratos wistars.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elucidar a ação do óleo de *Lippia alba* na musculatura lisa na traqueia de ratos wistars. Demonstrando ação local;
- Elucidar o efeito do óleo de *Lippia alba* e seu componente majoritário citral sobre o tônus intrínseco do músculo liso da traqueia;
- Elucidar o efeito inibitório do óleo de *Lippia alba* e seu componente majoritário citral, em contrações induzidas pelo potássio e acetilcolina na traqueia.
- Comparar o efeito do óleo de *Lippia alba* constituinte majoritário citral sobre a musculatura lisa da traqueia de ratos wistars.
- Elucidar a influência do influxo de Ca^{+2} sobre o efeito do óleo da *Lippia alba* e seu componente majoritário citral em contração induzida por cloreto de potássio.

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Sais e fármacos

Os sais utilizados no preparo das soluções fisiológicas foram de grau de pureza analítica, obtidos das companhias Sigma Chemical Corporation (St. Louis, (Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Br). 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), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), cloreto de magnésio (MgCl₂), cloreto de cálcio (CaCl₂), glicose (C₆H₁₂O₆), fosfato de sódio (NaH₂PO₄), carbonato de sódio (NaHCO₃) o citral foi adquiridos da Sigma Chemical Corporation.

4.1.2. Soluções

A solução nutritiva de Tyrode modificada (TM ou Tyrode) teve a seguinte composição em mM: NaCl=136; KCl=5,0; MgCl₂=0,98; NaH₂PO₄=0,36; NaHCO₃=11,9; CaCl₂=2,0 e C₆H₁₂O₆ =5,5. A solução nutritiva foi mantida constantemente com aeração constante, à temperatura de 37° C e o pH ajustado para 7,4 através de HCl 1M e/ou NaOH 1M.

O óleo da *Lippia alba* na forma de soluções preparadas, diluídas diretamente em Tyrode e tween (0,02%) seguido de agitação em aparelho, vórtex mixers. A administração do citral, como também do KCl e ACh, foram feitas de forma hipertônicas, das quais foram adicionadas volumes específicos diretamente no banho para atingir as concentrações finais desejadas nas câmaras do banho de órgão isolado. A solução livre de cálcio ou “zero cálcio” (0Ca²⁺) foi produzida com a omissão do CaCl₂ da solução de Tyrode e adição de 0,2 mM de EGTA.

Animais:

Os animais utilizados foram ratos albinos machos da linhagem wistar, pesando entre 180-300 gramas, mantidos com acesso a água e ração, “Ad libitum”, provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Carri- URCA. Os animais foram tratados seguindo 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.

O projeto foi submetido para aprovação no comitê de ética da Universidade Regional do Carri (CEUA), e foi aprovado em 03 de Abril de 2013, processo n^o 24/2012.2 /2012. A pesquisa realizada é de cunho experimental randomizada e quantitativa. Modelos animais foram os veículos para a aquisição de informações relativas à ação farmacológica das substâncias examinadas.

4.1.3. Material Botânico

Material fornecido pelo Dr. Sergio Horta (fazenda experimental da UFC) e analisados no Laboratório de Produtos Naturais e do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (Padetec) da UFC.

5. MÉTODOS

Os animais foram sacrificados por gás CO₂, seguido por pesagem e dissecação. Foi promovida a abertura da face ventral do tórax, seguida da remoção da traqueia. A traqueia foi removida e transferida para uma placa de Petri contendo Tyrode modificado (TM), possibilitando o manuseio para eliminação dos tecidos anexos e secção de segmentos transversos circulares de 4 - 5 mm de comprimento. Os segmentos de traqueia foram montados em banho para órgão isolado com capacidade para 10 ml de Tyrode modificado (TM) contínua aeração, regulação da temperatura em 37° C e pH 7,4. A preparação teve uma extremidade conectada a um transdutor de força através de hastes de aço inoxidável, e a outra extremidade a uma base fixa do equipamento. As respostas musculares mecânicas (geração de força ou relaxamento) foram transformadas pelo transdutor em sinal elétrico.

O transdutor foi conectado a um amplificador diferencial (DATAQ, modelo PM-1000, USA), e este à entrada de uma placa conversora analógica digital (DATAQ DI-200) instalada num computador, cujos dados coletados foram convertidos em traçados e armazenados em arquivos através do software WINDAQ (DATAQ Instrumentos, Inc. USA), para análise posterior.

Após a montagem da preparação, os segmentos isolados da traqueia foram submetidos a uma tensão de estabilização de 1 grama e mantida por um período de 1 hora, tempo necessário para a adaptação da preparação às novas condições. Ao final da estabilização, considerar-se-á que a preparação atingiu seu tônus basal de repouso (Figura 6).

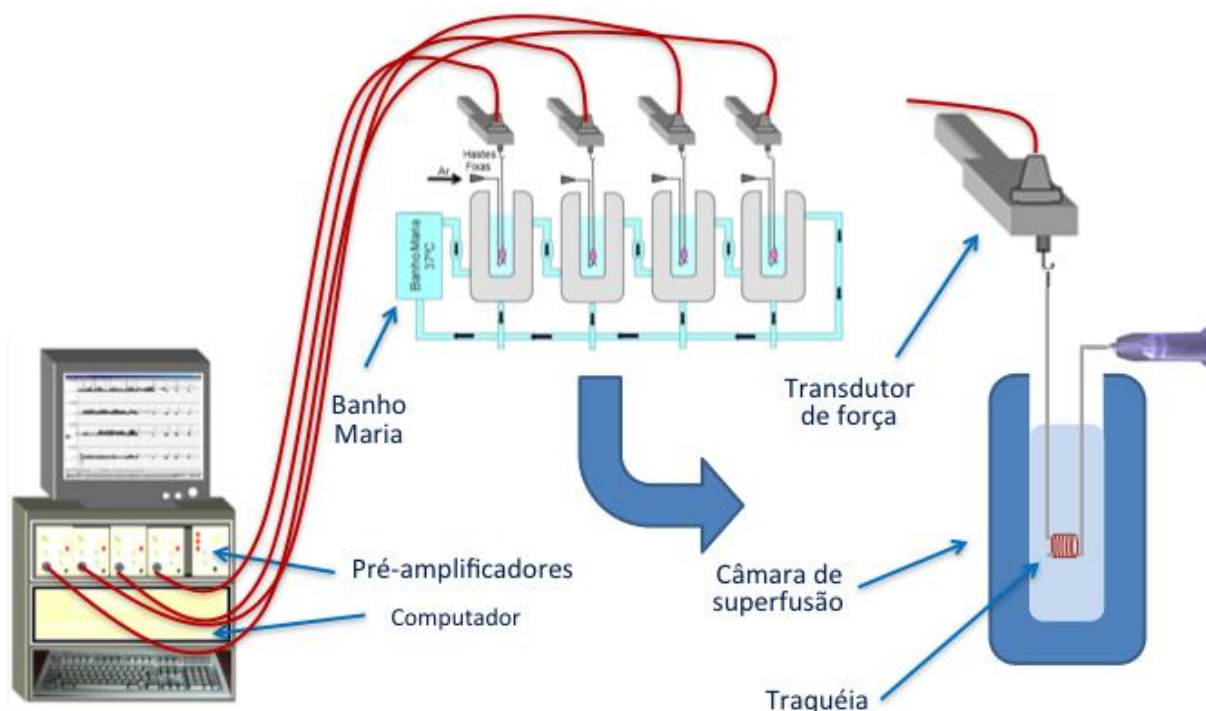


Figura 6: Sistema de aquisição das respostas musculares mecânicas. Os anéis traqueais eram montadas em um “set-up” composto por 4 transdutores de força (GRASS, modelo FT03), pré-amplificador (DATAQ, modelo PM1000), computador Pentium com placa conversora analógico-digital, banho-maria e 4 câmaras de banho de perfusão para órgão isolado.

5.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram realizadas várias séries experimentais abaixo discriminadas que objetivaram determinar as ações farmacológicas do OELA e o citral, bem como estudar o mecanismo de ação da resposta observada no músculo liso traqueal de ratos wistars.

Aspectos comuns a todos os protocolos, após o período de estabilização de uma hora, foram induzidos, três contrações subseqüentes, evocadas por 60 mM de K^+ (K60) administrado direto no banho através de solução hipertônica para avaliar a viabilidade da preparação, a reprodutividade e integridade da resposta biológica do ensaio. Somente experimentos com contrações reproduzíveis foram utilizados.

Os protocolos foram realizados pareadamente, de forma que em cada experimento, cada câmara era destinada para uma agente em estudo, de modo que todos eles atuassem sob condições mais semelhantes

possível. Em cada experimento um animal, representando o número de experimento(n). A maioria dos resultados foi expressa em percentual de contração inicial aferida como controle. Ao final de cada experimento foi feita a lavagem do tecido por três vezes no intervalo de cinco em cinco minutos, até demonstrar recuperação ou por um tempo total de mais de vinte minutos (caso não houvesse recuperação).

5.1.1. Efeito relaxante do OELA e seu componente majoritário citral sobre as contrações induzidas e sustentadas por potássio em traqueia de ratos wistars.

Para avaliar o efeito do OELA e seu componente majoritário citral foi, seguir-se-á o protocolo de colher o valor do parâmetro antes da exposição ao OELA (controle inicial), (Figura 7). Curva concentração-resposta foi obtida pela exposição das preparações a concentrações crescentes não-cumulativa das substância contraturante K60 adicionadas no banho e mantidas por 5 minutos, três vezes distintas ou até que se atinja o platô da contração, provando a viabilidade do tecido para dar continuidade. Em seguida foi acrescentando doses subseqüentes do OELA e Citral, doses cumulativas utilizadas concentrações 1,3,10,30,100,300,1.000,3.000 e 10.000 g/ml, depois em presença dessas substâncias e após lavagens sucessivas com TM até demonstrar-se a recuperação (controle posterior). A resposta máxima e a concentração que provoca uma contração submaximal (que apresenta ~ 70 a 80% da resposta máxima) foram determinadas através da análise da curva concentração-resposta de cada uma das substâncias utilizadas.

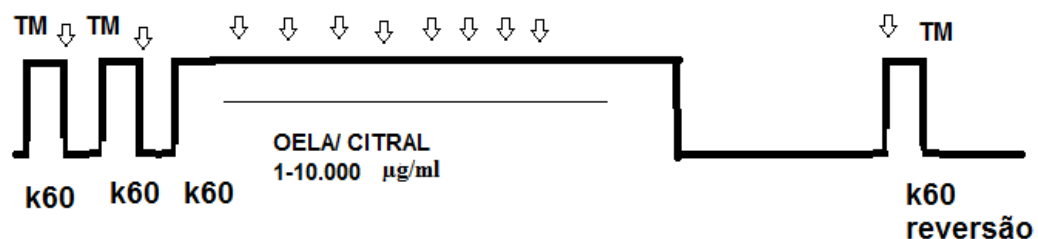


Figura 7: Esquema ilustrativo da via Eletromecânica. Adição de 60mM de cloreto de potássio; as primeiras setas indicam a adição do k60, as setas subseqüentes indicam a adição do agente em estudo; Reversão indica a recuperação do tecido, pela adição de 60mM de cloreto de potássio. A barra fina indica as várias concentrações e o tempo de exposição.

5.1.2. Efeito inibitório do OELA e seu componente majoritário citral sobre as contrações induzidas e sustentadas por ACh em traqueia de ratos wistars.

Após a viabilidade do tecido testado, as contrações foram induzidas por K60 de cinco em cinco minutos seguido de lavagens com Tyrode modificado (TM), concentrações não cumulativas eram administradas para garantir a viabilidade do tecido, em seqüência foi induzida a contração por Acetilcolina (ACh – 10 μ M) adicionada diretamente na solução de Tyrode de forma não cumulativa. Em seguida foi acrescentando doses subseqüentes do OELA e citral, doses cumulativas utilizadas concentrações 1,3,10,30,100,300,1.000,3.000 e 10.000 μ g/ml depois em presença dessas substâncias e após lavagens sucessivas com TM até demonstrar-se a recuperação.

Após a adição da última concentração, as preparações foram lavada sucessivamente com solução de TM pó três vezes no intervalo de 5 minutos, em seguida foi adicionado diretamente na câmara K60 para avaliar a recuperação do tecido.

A resposta máxima e a concentração que provoca uma contração submaximal (que apresenta ~ 70 a 80% da resposta máxima) foram determinadas através da análise da curva concentração-resposta de cada uma das substâncias utilizadas. Os dados foram então, expressos como porcentagem do valor máximo obtido pela contração evocada por ACh.

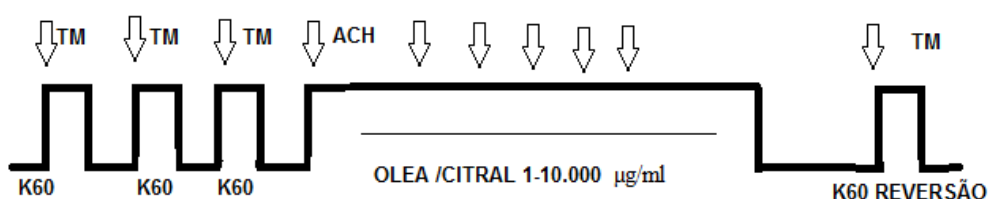


Figura 8: Esquema ilustrativo da via Farmacomecânica. Adição de 60mM de cloreto de potássio; as primeiras setas indicam a adição do k60, as setas subseqüentes indicam a adição do agente em estudo; e o Tyrode Modificado(TM), demonstram as lavagens. A seta junto a sigla ACh (Acetilcolina), indica o acréscimo da ACh 10, e reversão indica a recuperação do tecido, pela adição de 60mM de cloreto de potássio. Adição da ACh 10 μ M. A barra fina indica as várias concentrações e o tempo de exposição.

5.1.3. Efeito do OELA e seu componente majoritário citral sobre o tônus intrínseco ou basal, em traqueia de ratos wistars.

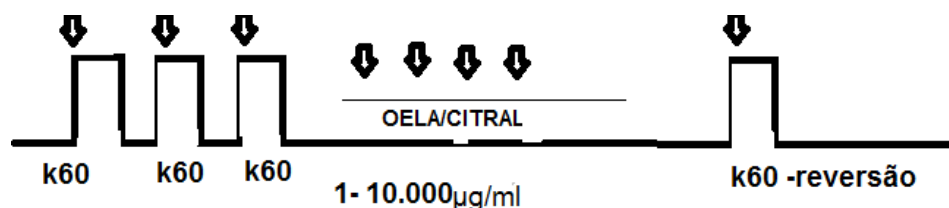


Figura 9: Esquema ilustrativo do tônus muscular. Adição de 60mM de KCl; as primeiras setas indicam a adição do k60, as setas subseqüentes indicam a adição do agente em estudo; reversão indica a recuperação do tecido, pela adição de 60mM de KCl. A barra fina indica as várias concentrações e o tempo de exposição.

Com a finalidade de avaliar o efeito do OELA e do seu componente majoritário citral sobre o tônus muscular foi confeccionada uma curva concentração-efeito (CCE), para cada agente isoladamente, em segmentos de traqueia na câmara para órgãos isolados.

Após a viabilidade do tecido testadas, foram utilizadas concentrações crescentes e cumulativas 1,3,10,30,100,300,1000,3000 e 10000 µg/ml, com intervalo de 5 minutos em cada concentração, ou até o surgimento do platô da resposta(contraturante ou relaxante) na solução (TM) que banhava o músculo liso traqueal, (Figura 9). Em paralelo, foi confeccionada CCE apenas na presença do veículo. Após a adição da última concentração, as preparações foram lavadas sucessivamente com solução de Tyrode modificado (TM), em intervalos de cinco em cinco minutos. A diferença entre o valor anterior e o posterior às respectivas concentrações de OELA e citral foram registrados como valores brutos em gramas depois foram transformados em percentual.

5.1.4. Efeito do OELA e seu componente majoritário citral na curva dose resposta do

BaCl₂ em traqueia de ratos wistars.

Esse teste teve a finalidade de avaliar os efeitos do OELA, citral sobre a contração induzida pela adição de BaCl₂, íons com passagem preferencialmente através dos VOCCs (CUTHBERT et al., 1994). Com o intuito de conhecer a concentração do BaCl₂ capaz de promover a resposta contraturante máxima realizou-se uma curva de concentração efeito (CCE

para o BaCl_2). Para tanto, após o teste de viabilidade do tecido a solução de TM foi substituída por uma solução de TM isenta de cálcio pela presença de EDTA (2 mM, neste caso, foi utilizada uma concentração maior que 0,2 mM para evitar a precipitação por excesso de cargas positivas na solução nutritora presente na câmara). Passado um período de 5 minutos, foi adicionado diretamente ao banho 60 mM de KCl e, somente após 5 minutos, iniciou-se a confecção das curvas de BaCl_2 pela adição desse íon (0,01 a 30 mM) também diretamente ao banho em intervalos de 5 minutos entre elas (Figura 10). Após a última concentração a preparação de BaCl_2 , as cubetas foram lavadas com solução de TM por 1 hora, de 5 em 5 minutos, e em seguida foi adicionado diretamente na câmara KCl a uma concentração de 60 mM buscando avaliar a recuperação do tecido. Após essa série observou-se que a resposta máxima foi obtida na concentração de 30mM de BaCl_2 .

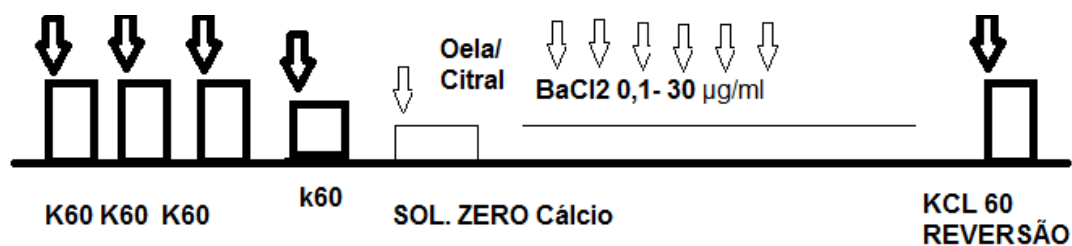


Figura 10: Esquema ilustrativa dose resposta induzida por BaCl_2 . Adição de 60 mM de KCl; as primeiras setas indicam a adição do k60, as setas subseqüentes indicam a adição do agente em estudo; adição do BaCl_2 (0,1- 30 μM); A barra fina indica as várias concentrações e o tempo de exposição. Reversão indica a recuperação do tecido, pela adição de 60mM de cloreto de potássio.

5.1.5. Efeito do OELA sobre o bloqueio da nifedipina em traqueia isolada de ratos wistars.

Com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual o OELA e o citral, agem sobre os VOCCs. Foi testada a viabilidade do tecido com a solução K60, e depois foi esgotado a fonte de cálcio extracelular, lavando-se com a solução TM zero cálcio e induziu contração com ACh 10 μM , as preparações foram incubadas previamente com a nifedipina (10 μM), um clássico bloqueador de VOCCs para garantir a não participação dos mesmos nos eventos contráteis, (Figura 11). Em seguida adicionou-se concentrações

crecipientes de $BaCl_2$ diretamente no banho (0,01 a 30 mM), incubadas por um período mínimo de 5 em 5 minutos de uma concentração para a outra. Após a adição da última concentração de $BaCl_2$, as preparações foram lavadas com solução de TM por uma hora de cinco em cinco minutos, e em seguida K60 para avaliar a reversão ou recuperação do tecido. Conseguindo a reversão ou recuperação do tecido, comprovando que tecido depois do teste ainda estava vivo.

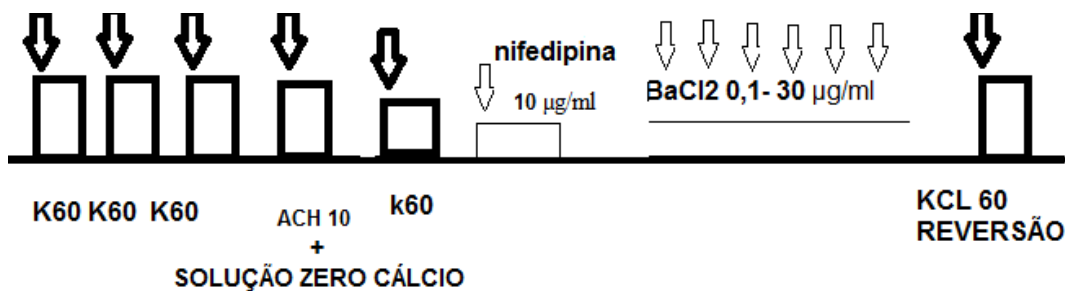


Figura 11: Esquema ilustrativo do experimento mostrando que o tempo de exposição a contração induzida por K60 e o esgotamento de cálcio é feito pela indução de ACh 10 µM em meio zero cálcio seguido da exposição nifedipina e OELA depois a contração foi induzida por BaCl₂ 0,1 – 30 µg/ml controle, nifedipina e OELA. Reversão indica a recuperação do tecido, pela adição de 60 mM de cloreto de potássio. A barra fina indica as várias concentrações e o tempo de exposição.

5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos dados foram apresentados como média ± erro padrão, onde n representará o número de experimentos. Os gráficos foram produzidos através do software Graphpad Prisma 6 para a análise estatística. Para comparação de dois grupos foi realizado o teste t student; para mais de dois grupos experimentais, ANOVA seguido de técnica de contraste (não paramétricos), conforme apropriado. Não foram considerados resultados estatisticamente significantes depois de 1.000 µg/ml (doses supraproximais).

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE QUÍMICA DO OLEA

A análise da composição química do OELA revelou a presença de 10 compostos, sendo o geranial (41.81%) e o neral (34.11%) seus constituintes majoritários (tabela 1).

Tabela 1– Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Lippia alba*.

TEOR (%)	COMPOSTO
41,81	GERANIAL
34,11	NERAL
9,85	1-LIMONENO
8,92	CARVONA
2,05	GAMMA-TERPENO
1,00	1-METIL – BENZENO
0,72	6-METIL-5-2-HEPTENO
0,58	ALFA-HUMANELO
0,50	LINALOL
0,47	BETA-PINENO

.2. EFEITO RELAXANTE DO OELA E CITRAL SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR K60 EM TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS WISTARS.

Na figura 12 A ilustra o traçado representativo dos experimentos feitos com o OELA e citral. Foram feitas três aplicações de k60 que são necessárias para testar a viabilidade do tecido. Depois da terceira aplicação e estabilização da contração da musculatura lisa, inicia-se aplicação de concentrações crescentes e cumulativas de OELA ou citral, no qual foi detectado um de relaxamento da musculatura lisa da traqueia para ambos, que foi estatisticamente significante, (** . $p < 0,01$ - citral e *** $p < 0,001$ - OELA, teste estatístico realizado one way, ANOVA). Após a lavagem foi feita aplicação de K60 mostrando que o tecido manteve-se preservado após os testes, (Figura B e Tabela 2).

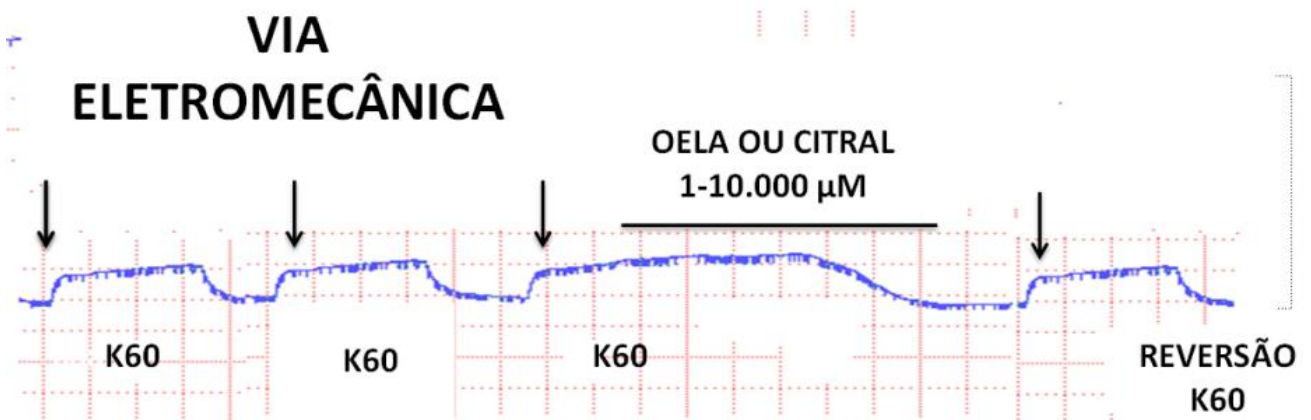
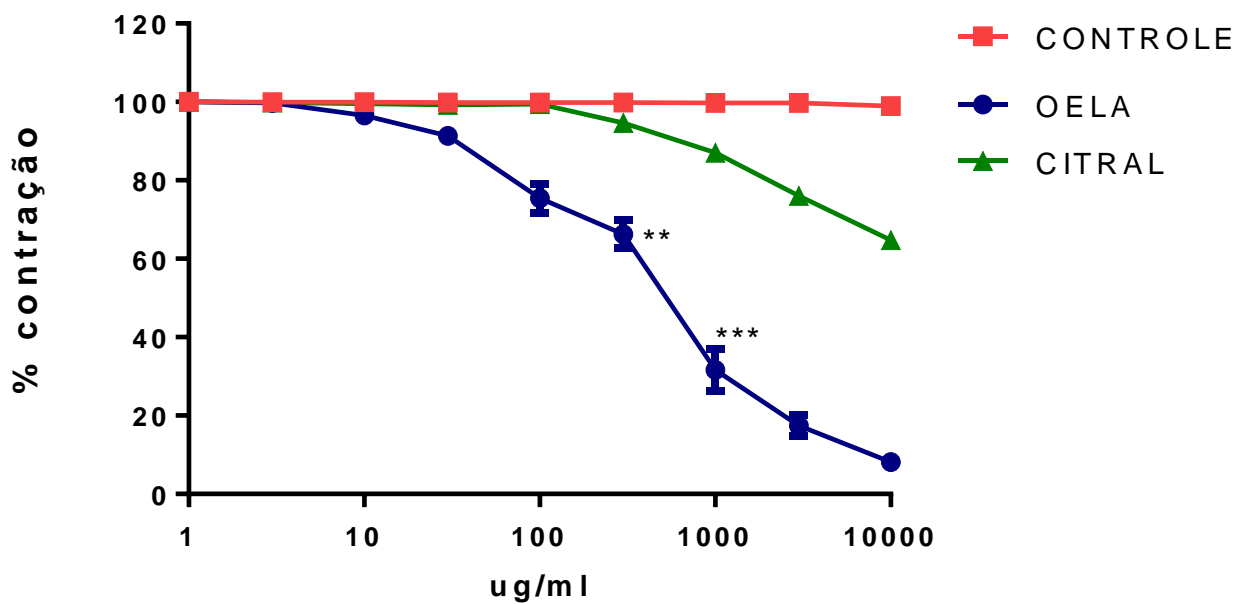
A**VIA
ELETROMECCÂNICA****B****Via Eletromecânica**

Figura 12: No painel A: traçado representativo da via eletromecânica, na presença do OELA e citral, mostrando o relaxamento após o contração induzida por K60. No painel B: Curva dose-resposta para OELA e o citral, controle (■), OELA (●), citral (▲). Os resultados foram estatisticamente significante, ** .p<0,01 e *** p<0,001 teste utilizado foi (one way ANOVA).

Tabela 2 - Efeito do OELA sobre o relaxamento da musculatura lisa traqueal, resultado expresso em porcentagem do controle.

CONCENTRAÇÕES($\mu\text{g/ml}$) OELA e o citral	PERCENTUAL (%) + ERRO PADRÃO – OELA (n=6)	PERCENTUAL (%) + ERRO PADRÃO - cital (n=6)
1	99,92 \pm 0,7	99,85 \pm 0,2
3	98,4 \pm 0,4	99,59 \pm 0,3
10	96,54 \pm 1,24	99,26 \pm 1,13
30	91,31 \pm 2,26	99,41 \pm 1,46
100	75,47 \pm 3,7	86,06 \pm 2,4
300	66,22 \pm 3,63	76,00 \pm 2,51
1000	31,70 \pm 5,48	64,72 \pm 3,28
3000	17,41 \pm 2,68	38,08 \pm 1,24
10000	8,18 \pm 0,75	32,79 \pm 0,92

6.3. IC50 DO OELA E CITRAL SOBRE A CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA LISA DA TRAQUEIA DE RATOS WISTARS.

Análise da IC50 do OELA e de seu constituinte majoritário citral, onde utilizou-se para ambos as seguintes concentrações: 1,3,10,30,100,300,1.000,3.000 e 10.000 µg/ml. Verificou-se que o valor da IC50 do OELA é de 651.2 µg/ml, menor do que o valor do citral que foi de 3.741 µg/ml (Figura 13, n=6).

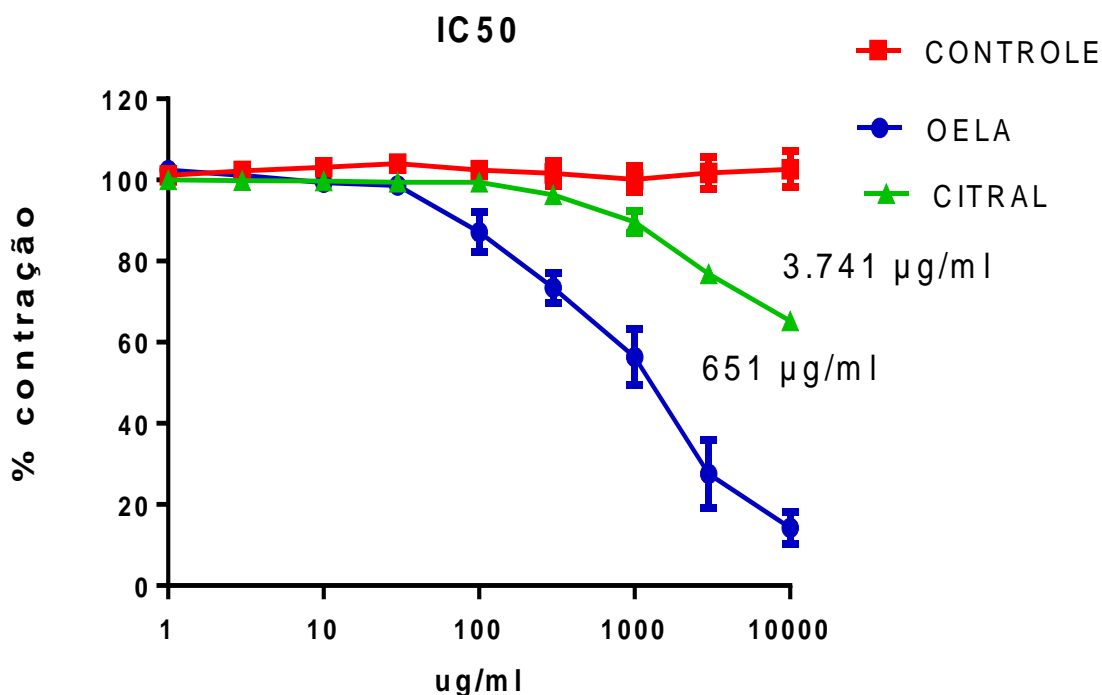


Figura 13: IC50 do OELA e do citral sobre a contração da musculatura lisa da traqueia de ratos. Curva dose-resposta do OELA e citral, mostrando a IC50 do controle (■), OELA (●) e o citral (▲).

6.4. EFEITO DO OELA E CITRAL SOBRE A CONTRAÇÃO INDUZIDA POR ACh 10 μ M EM TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS WISTARS.

Na figura 15 A, ilustra o traçado representativo dos experimentos feitos com o OELA e citral na presença do agente contraturante ACh 10 μ M. Foram feitas três aplicação de k60 para testar a viabilidade do tecido, seguida da aplicação da ACh, 5 minutos antes da aplicação do OELA e citral. Após a lavagem houve aplicação de K60 mostrando que o tecido manteve-se preservado após os testes.

Na figura 15 B - Verificou-se o efeito das crescentes de OELA e do citral nas concentrações crescentes de (1-10.000 μ M), sobre as concentrações induzidas pela ACh 10 μ M. Verificou-se que não houve inibição estaticamente significativa, comparada aos seus respectivos controles $p < 0,09$ teste utilizado foi one way ANOVA (Figura: 15 B, $n = 6$). Não consideramos resultados estatisticamente significantes em concentrações acima de 1.000 μ g/ml, pois são concentrações supramáximas.

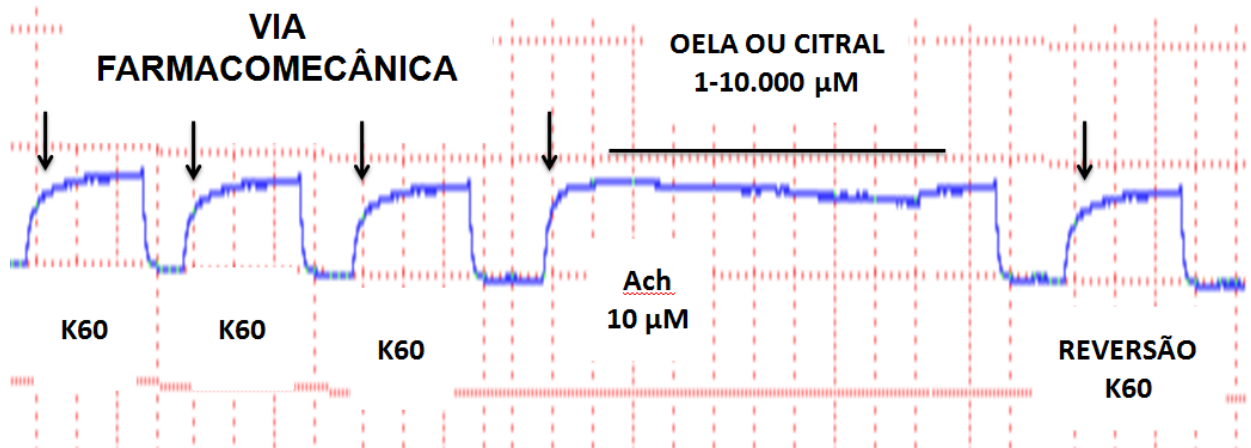
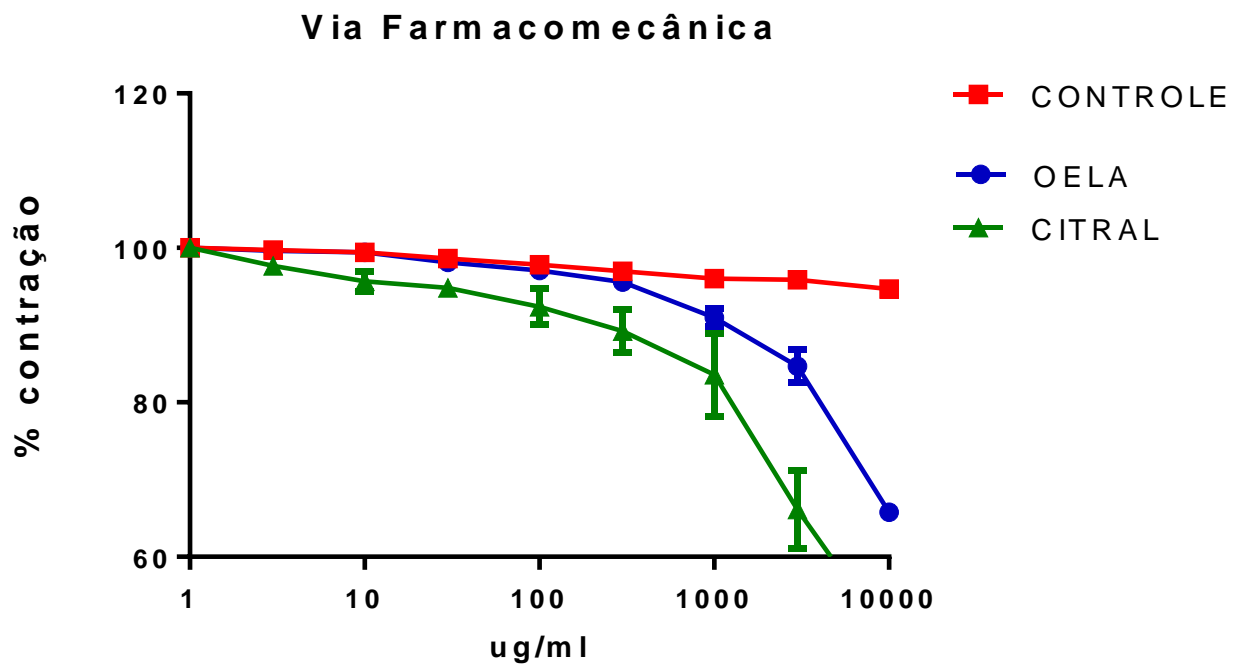
A**B**

Figura 14: No painel A: traçado representativo mostrando que o tempo de exposição não influencia na contração induzida por ACh 10 μ M. No painel B: Curva dose-resposta da via farmacomecânica com a contração induzida por ACh 10 μ M, controle (■), OELA (●) e citral (▲), $p < 0,09$ resultados não apresentam significância estatística, teste utilizado foi (one way ANOVA).

6.5. EFEITO DO OELA E CITRAL SOBRE O TÔNUS MUSCULAR EM TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS WISTARS.

Na figura 15 A, ilustra o traçado representativo dos experimentos feitos com o OELA e o citral. Foram feitas três aplicação de K60 para testar a viabilidade do tecido. Após a estabilização do tecido foram aplicadas concentrações crescentes (1-10.000 μM) e cumulativas de OELA ou citral sem a presença dos agentes contraturante. Após a lavagem foi feita a aplicação de K60 mostrando que o tecido manteve-se preservado. Nas figuras 15 A e B – verificou-se que não houve relaxamento da musculatura lisa da traqueia para ambos. $p < 0,07$, teste utilizado foi one way ANOVA (Figura 16 A e B). Não consideramos resultados estatisticamente significantes em concentrações acima de 1.000 $\mu\text{g/ml}$, pois são concentrações supramáxima.

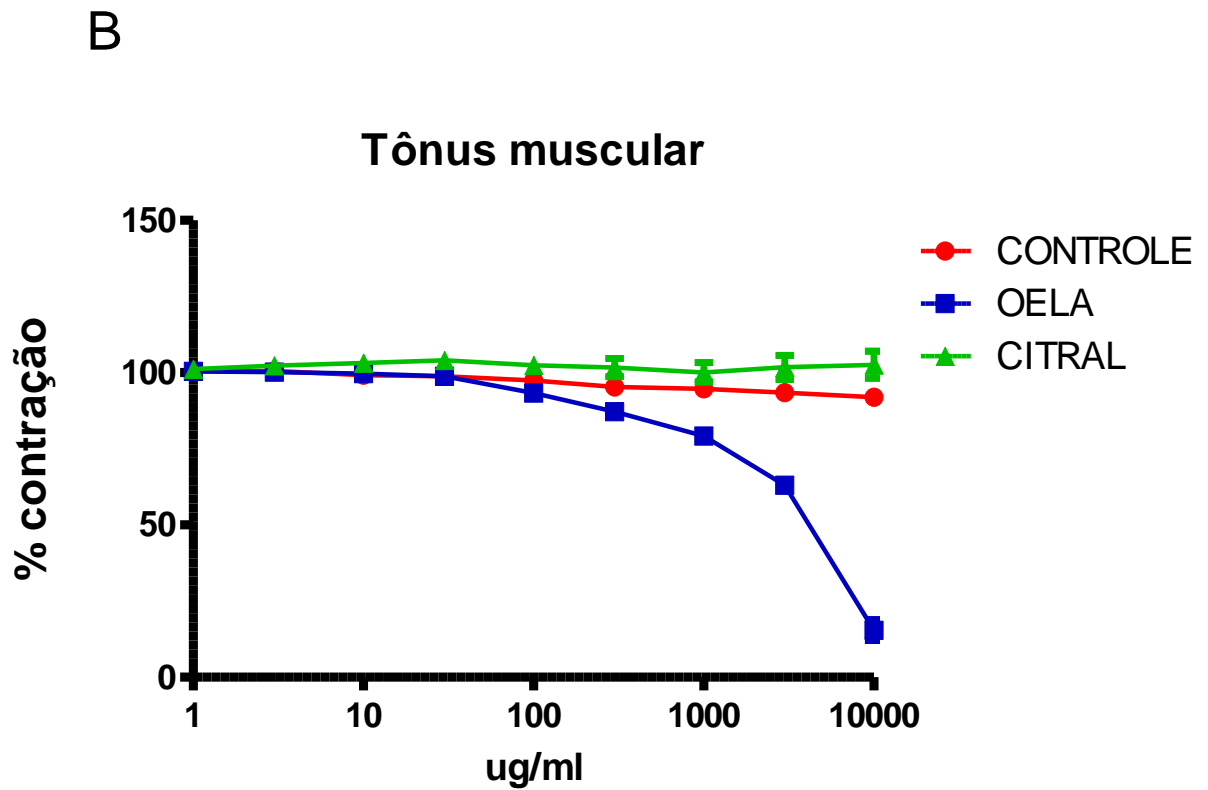
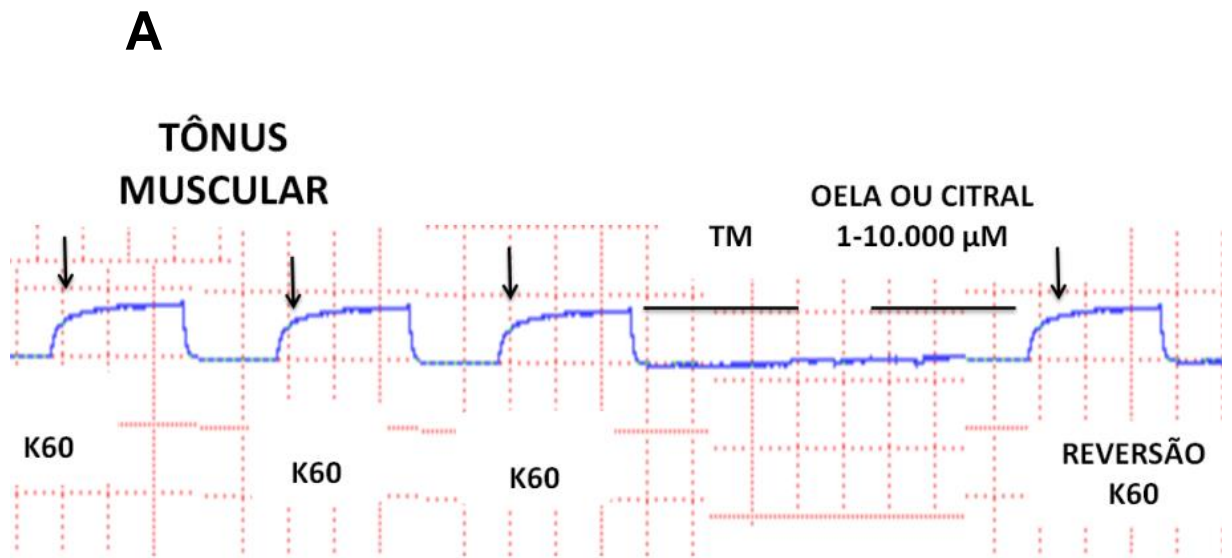


Figura 15: Efeito do OELA e do citral sobre o tônus muscular intrínseco da traqueia isolada de ratos. No painel A - Traçado representativo mostrando que o OELA e o citral relaxa o tônus basal, mas não tem significância estatística. No painel B curva dose-resposta do tônus muscular do OELA e do citral, controle (●), (■) OELA, citral (▲). Os valores não são estatisticamente significante. $p < 0,07$ teste utilizado foi (*one way ANOVA*).

6.6. EFEITO DO OELA E CITRAL SOBRE O CURVA DOSE RESPOSTA DO $BaCl_2$ EM TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS WISTARS.

Na figura 16 A mostra o traçado representativo do OELA e o citral em contração induzida por $BaCl_2$ 30 μ M. Na figura 17 B verifica-se um efeito miorelaxante pelo OELA e citral que é concentração-dependente, sendo os resultados estatisticamente significante para ambos (**, $P < 0,01$, teste utilizado- one way ANOVA). Após a lavagem foi induzida a contração da musculatura lisa com K60 voltando as condições iniciais (Tabela 3).

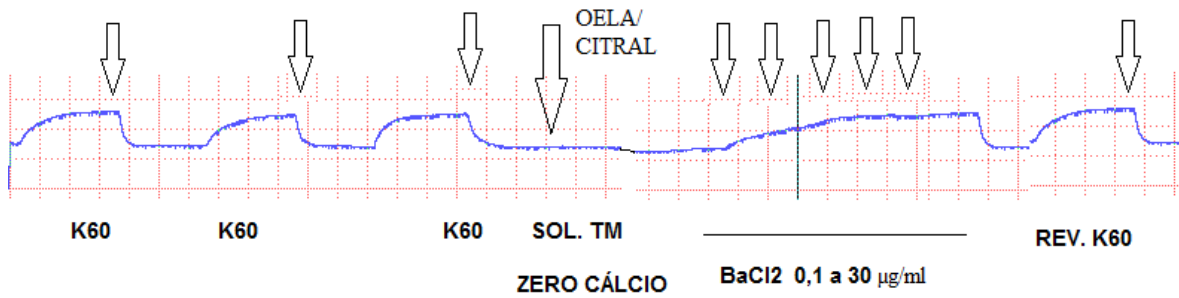
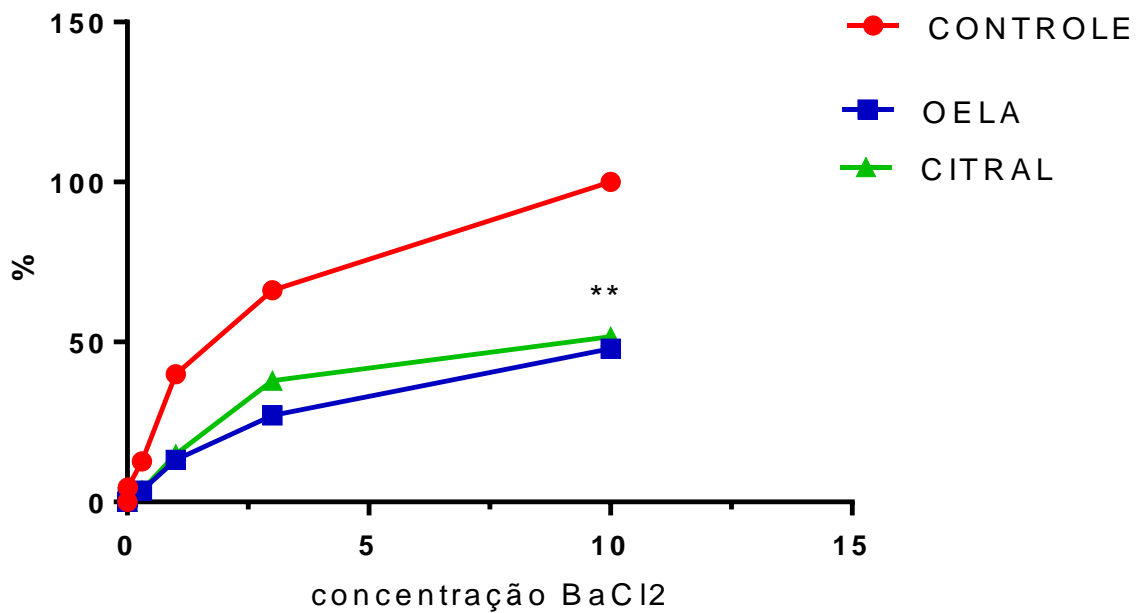
A**B**

Figura 16: No painel A: traçado representativo mostrando que o tempo de exposição influencia na contração induzida por BaCl₂ 30 µM. No painel B: Curva dose-resposta BaCl₂ 30 µM, controle (■), OELA 30 µM (●) e Citral 300 µM (▲). Os resultados foram estatisticamente significantes, $p < 0,05$ teste utilizado foi *one way ANOVA*.

Tabela 3 - Efeito do OELA e citral sobre o curva dose resposta do BaCl₂ em traqueia de ratos wistars.

CONCENTRAÇÕES(µg/ml) BaCl₂	PERCENTUAL (%) + ERRO PADRÃO – OELA (n=6)	PERCENTUAL (%) + ERRO PADRÃO - citral(n=6)
0,1	0	0
0,3	12±0,5	15±0,72
1	14±1,0	16±0,82
3	15±0,6	17±0,77
10	19±1,0	18±0,88
30	29±0,8	19±0,82

6.7. EFEITO DO OELA SOBRE O BLOQUEIO DA NIFEDIPINA EM TRAQUEIA ISOLADA DE RATOS WISTARS.

Na figura 17 A, mostra o traçado representativo do OELA, onde a contração foi mantida por K60 após esgotamento de cálcio intracelular por ACh 10M. Observou-se que o OELA e a nifedipina foram capazes de relaxar musculatura lisa da traqueia com os valores respectivamente $54 \pm 2.6\%$ e $52 \pm 3,5\%$ em comparação ao controle. Os dados apresentaram resultados estatisticamente significante (** $P < 0,0001$, teste utilizado *one way*, ANOVA) (Figura 17 B).

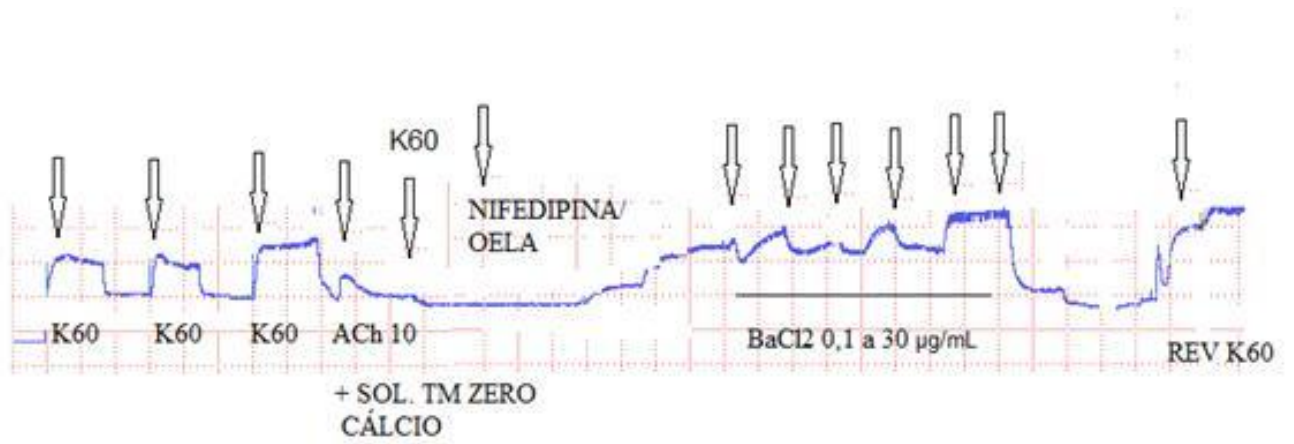
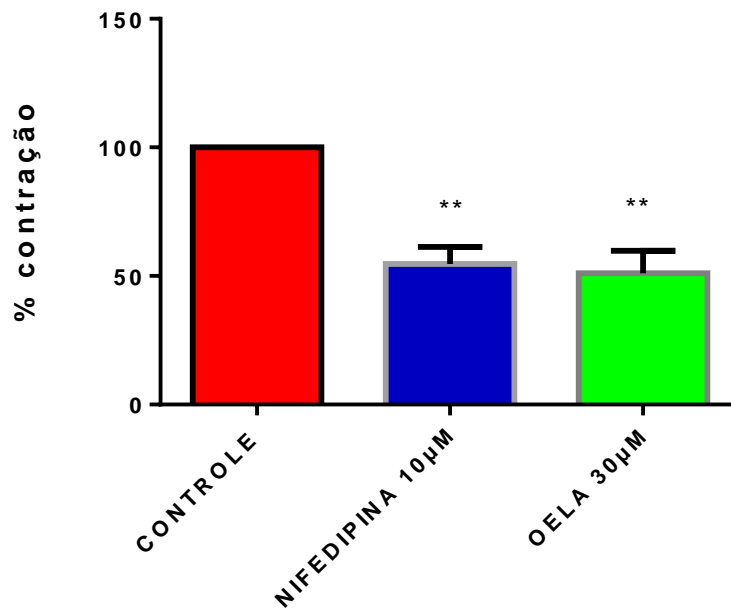
A**B**

Figura 17: No painel A: traçado representativo mostrando que o tempo de exposição a contração induzida por K60, após o esgotamento de cálcio, que foi feito pela indução de ACh 10 μM em meio zero cálcio, adicionando em seguida a nifedipina e o OELA em cubetas distintas. No painel B: Gráfico representativo contração induzida por BaCl₂ 30 μM controle, nifedipina e OELA. Os resultados apresentados foram estatisticamente significante (**, p < 0,005) (test t student seguido de one way ,ANOVA).

7. DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstrou-se que OELA e o citral possuem efeito relaxante sobre a musculatura lisa da traqueia de ratos. Observou-se que o relaxamento da musculatura lisa ocorre pela via eletromecânica, pois quando utilizou-se K60 como agente contraturante, verificou-se um relaxamento que foi estatisticamente significativo. Ao contrário da via farmacomecânica quando se utilizou a ACh como agente contraturante não se observou um resultado estatisticamente significativo no relaxamento da musculatura lisa tanto pelo OELA, quanto pelo citral.

Nesse estudo utilizou-se o constituinte citral que representa 75% do OELA. Os outros constituintes por serem minoritários não foram avaliados, como: 1-limoneno (9,85%), carvona (8,92%), gama-terpeno (2,05%), Benzeno(1,00%),6-metil-5-Hepteno-2-1, linalol (0,5%), beta-pineno (0,47%). Tendo em vista que o citral foi menos potente do que o óleo essencial, poderia ser que algum desse constituinte possam ter um efeito sinérgico com o citral justificando o efeito de relaxamento do OELA, uma outra hipótese seria que outro constituinte mesmo em menor concentração teria um melhor efeito do que o citral, como o limoneno, que já há relatos da literatura mostrando a sua potencia (JÚNIOR et al, 2007).

Relatos na literatura demonstram que o OELA e o citral promovem atividade antiespasmótica em musculatura lisa intestinal (MONTEIRO et al.,2007), o que corrobora com os nossos achados sobre a musculatura lisa traqueal, onde o OELA e o citral promovem o relaxamento. Os dados obtidos nesse trabalho são inéditos demonstrando que OELA e o citral têm grande potencial farmacológico para o uso de doenças respiratórias(LEAL-CARDOSO *et al.*,2002).

7.1. EFEITO SOBRE O ACOPLAMENTO ELETROMECÂNICO

Ao utilizar-se o K60 para avaliar o efeito do OELA e do citral sobre a contração da musculatura lisa traqueal. Verificou-se que o OELA promoveu um relaxamento a partir da concentração de 30 µg/ml e o citral apresentou o relaxamento na concentração de 300 µg/mL. Com base na literatura de

outros óleos essenciais, a espécie *Pterodon polygalagente de estudoflorus*, que contém no seu óleo essencial o carofileno, e o eugenol apresentaram a mesma resposta na musculatura lisa da traqueia (LIMA, 2011).

Verificou-se que o relaxamento se dá por via do bloqueio dos VOCCs. Pois estes canais são despolarizados pelo K^+ , que por sua vez promovem o influxo de cálcio através da membrana, este influxo medeia a liberação de cálcio induzida pelo retículo sarcoplasmático (RS) ativados IP_3 . O aumento de cálcio intracelular irá resultar na ativação da contração muscular. Uma vez que esses canais são bloqueados conseqüentemente não ocorrerá à contração (RANG *et al.*, 2004). De forma semelhante poderá ocorrer com os resultados obtidos neste trabalho, onde o bloqueio destes canais promoveram um relaxamento da musculatura lisa da traqueia.

O acoplamento eletromecânico se baseia na abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem pela despolarização da membrana sarcoplasmática e conseqüente aumento do (Ca^{2+}) (SOMLYO & SOMLYO, 1968). Com uma etapa muito frequentemente afetada pelas substâncias que bloqueiam esse acoplamento é a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.

Outro dado interessante observado foi na potencia do OELA cujo IC_{50} 651.2 $\mu g/ml$ que é menor que IC_{50} do citral que foi de 3.741 $\mu g/ml$. Esses dados demonstram que o efeito do OELA é mais potente do citral. Portanto não podemos relacionar que o relaxamento da musculatura lisa da traqueia pelo OELA, seja somente por seu constituinte majoritário citral, e sim por outros constituintes presentes no OELA. Entretanto, para isso, serão necessários maiores estudos.

A via eletromecânica há abertura de canais catiônicos regulados por voltagem (VOCCs), dentre esses canais catiônicos temos o canais para cálcio dependentes de voltagem cujo os principais tipos são: canais tipo L, tipo N, tipo T, Tipo P/Q e tipo R. Somente o canal tipo L tem alto limiar de ativação; e uma inativação lenta. Localizados na membrana plasmática, constituindo a principal fonte de Ca^{2+} para contração do músculo liso (RANG *et al.*, 2004). Diferente do canal do tipo L, os outros tipos possuem baixo limiar de ativação mostrando que este mecanismo possui menor ação sobre a contração da musculatura lisa. Nos resultados apresentados nesse

trabalho onde utilizou-se técnicas farmacológicas para demonstrar o envolvimento dos canais para cálcio na contração da musculatura lisa. No futuro pretendemos continuar com a investigação utilizando técnica de eletrofisiológicas como o: path-clamp que permitirá analisar as correntes que passam pelos VOCCS através da fixação de voltagem (RANG *et al*,2004).

7.2. EFEITO SOBRE O ACOPLAMENTO FARMACOMECÂNICO

Nesse estudo verificamos que o OELA e o citral não promoveram o relaxamento da musculatura lisa da traqueia de ratos no acoplamento excitação-contração farmacomecânica. Diferentemente de outros relatos da literatura que óleos essenciais seus constituintes tem uma ação tanto na via eletromecânica quanto na farmacomecânica (LIMA *et al.*, 2011, PINHO *et al.*, 2012). No acoplamento farmacomecânico, ACh ativa do segundos mensageiros (IP₃) e o diacilglicerol (DAG), promovendo o influxo de cálcio através dos canais para cálcio dependentes de ligante (SOCCs e ROCCs). O cálcio oriundo do influxo pelos canais de cálcio e dos estoques intracelular, liga-se ao complexo cálcio-calmodulina, que por sua vez ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Consequentemente formando o ciclo de ponte de miosina fixa ao filamento de actina, a ponte cruzada sofre uma ação de alavanca, tracionando o filamento fino em direção ao centro do filamento grosso gerando a contração (WEBB, 2003, GUYTON 2011).

Os resultados até o momento nos levam a crer que o relaxamento ocorre pela via eletromecânica a qual há um influxo de cálcio pelos VOCCs, canais esses que são ativados pela via eletromecânica. Ao contrário dos dados da literatura, nossos dados mostraram que ao OELA e o citral não promoveram o influxo de cálcio pelos canais operados por ligante os SOCCs e ROCCs, que são ativados pela via farmacomecânica.

7.3. EFEITO SOBRE O TÔNUS INTRÍNSECO:

Adicionados cumulativamente, OELA e citral, nas concentrações de 1 a 10.000 µM, não teve alteração estatisticamente significativa no tônus do

músculo liso traqueia. Nosso estudo apresentou resultados semelhantes ao trabalho (LIMA *et al*, 2011), onde o óleo essencial e seu constituinte, metil-eugenol não relaxou de maneira reversível o tônus basal da MLVA de ratos. Esses achados tornam-se vantajosos considerando que um agente terapêutico não deve alterar o tônus intrínseco, e sim que atue revertendo um broncoespasmo, por exemplo (SKOGVALL,2007;SKOGVALL,2008).

7.4. EFEITO DO OELA E DO CITRAL SOBRE A CURVA DOSE RESPOSTA $BaCl_2$ NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DA NIFEDIPINA.

Para investigar, se o relaxamento da musculatura lisa da traqueia induzido pelo OELA e o citral ocorre via canais para cálcio tipo L, utilizou-se o $BaCl_2$ 30 mM como agente contraturante, que é um íon com seletividade para os VOCCs (MURRAY E KOTLIKOFF,1991). Os resultados demonstraram que o OELA e o citral bloquearam o influxo de $BaCl_2$ pelos VOCCs, não ocorrendo a contração. Verificou-se que OELA foi mais potente do que o citral, coincidindo com os dados previamente obtidos. Reforçando a hipótese de outro constituinte está agindo sobre o relaxamento da musculatura lisa.

Para confirmar esses achados utilizou-se o bloqueado de canais para cálcio do tipo L a da nifedipina como controle positivo. Obteve-se como resposta um relaxamento da musculatura lisa da traquéia pelo OELA semelhante ao da nifedipina, resultados foram estatisticamente significante comparado com o controle. Confirmando assim, que a via na qual o OELA e seu constituinte majoritário citral utiliza para relaxar a musculatura lisa é eletromecânica e utiliza os VOCCs para que ocorra o influxo de cálcio.

8. CONCLUSÃO

O OEEL e o citral apresentam efeito miorelaxante.

O OEEL e o citral agem via acoplamento eletromecânico do músculo liso da traqueia de ratos, mas não apresentaram efeito na via farmacomecânica.

O OEEL e o citral não alteraram o tônus intrínseco da traqueia isolada de ratos wistars.

O efeito do óleo de *Lippia alba* é mais potente do que o seu constituinte majoritário citral sobre a musculatura lisa da traqueia de ratos wistars.

O OEEL e o citral promovem o relaxamento via VOCCs,

9. REFERÊNCIAS

AUGUSTO C. I. M.; RITA C. A.; TOSTES. Receptores nucleares, receptores de membrana e mensageiros secundário. **Rev. Bras. Hipertensão**. Vol. 12(2): p. 84-88,2005.

ALLENBY, C. F.; BASKETTER, D. A.; DICKENS, A.; BARNES, E. G.; BROUGH, H. C. An arm immersion model of compromised skin (I). Influence on irritation reactions. **Contact Dermatitis**. v. 28, n. 2, p. 84 – 88, 1993.

ARANEDA, R. C.; PETERLIN Z, Z. X.; CHESLER, A.; FIRESTEIN, S. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. **The Journal of Physiology**. v. 555, n. 3, p. 743 – 756, 2004.

ARANGO; RAMOS, A. C; AND E. S. **Quimiotipos citral e carvona a partir dos óleos essenciais de colombiano *Lippia Alba* (Mill.) NE Brown: citotoxicidade, composição e atividade antifúngica**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.104 nº 6. Rio de Janeiro. Sept. 2009.

ARRUDA, J. T.; APPROBATO, F. C.; MAIA, M. C. S.; SILVA, T.M.; APPROBATO, M.S. Efeito do extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita* L.) na prenhez de ratas e no desenvolvimento dos filhotes. **Rev. bras. plantas med.** 15(1): 66-71, 2013. ilus, tab.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D., **Aspectos fitoquímicos e biológicos da família Caryocaraceae**: Rev. bras. plantas med; 15(2): p. 293-308, 2013. tab.

BARBOSA, F.S.; LEITE, G.L.D.; MARTINS, E.R.; D'AVILA, V.A.; CERQUEIRA, V.M. **Extratos de plantas medicinais no controle de *Diabrotica speciosa*** (Coleoptera: Chrysomelidagente em estudo) *Rev. bras. plantas med*; 15(1): 142-149, 2013. ilus.

BARATTA, M. T. : DORMAN. H.J.D.: DEANS, S.G.: FIGUEREDO, A. C.: BARROSO, J. G. ; RUBERTO, G. **Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essencial oils**.: Flavour Fragrance j. 13: p. 235-244,1998.

BASKETTER, D. A.; SCHOLLES, E. W. **Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens**: Food and Chemical Toxicology, v. 30, n. 1, p. 65 – 69, 1992

BERNE, R.M.; LEVY, M.N., **Fisiologia**, editores Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton: (tradução Adriana Pitella Sudré...(et al.) – Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

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

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. D. P.; SIVA-FILHO, A. R.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; F BARNES, P.J. **Neurogenic inflammation in the airways:** *Respiration Physiology*, v. 125, p. 145– 154. 2001.

ROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F. A. **Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* stapf) effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals:** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 17, n. 1, p. 37 – 64, 1986

COSTA, A. F. **Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. P. 523-524.**

CUTHBERT, N. J.; GARDINER, P. J.; NASH, K.; POLL, C. T. **Roles of Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea.** *American: Journal of Physiology*, v. 266, p. 620-627, 1994.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste:** Fortaleza: Edições UFC, 1981.

DELAQUIS, P. J. et al. **Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils:** *International Journal of Food Microbiology*. v. 74, n. 1-2, p. 101-109, 2001.

DI RENZO, F.; BROCCIA, M. L.; GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. **Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, attenuates the frequency and severity of branchial arch abnormalities induced by triazole-derivative fluconazole in rat embryos cultured in vitro:** *Reproductive Toxicology*, v. 24, p. 326 – 332, 2007.

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

ESCOBAR, LEAL, J. R. AND E. S., **Composição química e atividades antiprotozoários de colombianos óleos *Lippia* spp essenciais e seus constituintes:** Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.105 n^o 2 . Rio de Janeiro. Mar 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. A. **The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter***

jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems: Journal of Applied Microbiology, v. 101, p. 1232 – 1240, 2006.

FROSCH, P. J.; JOHANSEN, J. D.; MENNÉ, T.; PIRKER, C.; RASTOGI, S. C.; ANDERSEN, K. E.; BRUZE, M.; GOOSSENS, A.; LEPOITTEVIN, J. P.; WHITE, I. R. **Further important sensitizers in patients sensitive to fragrances. Contact Dermatitis:** v. 47, p. 78 - 85, 2002.

GATTO, L.A.; HOUCK, B.M. **Mucociliary transport and epithelial morphology with elongation and collapse in rat trachea:** Experimental Lung Research, v. 15 p. 239-51, 1989.

GERTHOFFER, W.T. **Regulation of the contractile element of airway smooth muscle. American:** Journal of Physiology, v. 261, n. 2, p. 15-28, 1991.

GLAMOCLIJA, SOKOVIC, J. M. **.Caracterização química de Lippia alba óleo essencial: uma alternativa para controlar bolores verdes Braz:** J. Microbiol. vol.42 no.4 São Paulo Oct. / dezembro 2011 .

GURIB-FAKIM, A. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow:** Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93, 2006.

JANSSEN, L. J. **Ionic mechanisms and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma?** American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology, v. 282, p. 1161-1178, 2002.

JUNQUEIRA, LUIZ C. U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JULIÃO, L. S.; TAVARES, E.S., LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G., **Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de Lippia Alba (Mill) N.E.R. (Erva cidreira):** Revista Brasileira de Farmacognosia, p.36 -38, 2003

JÚNIOR M.R.R., PASTORE G.M., **Biotransformação de Limoneno: Uma Revisão das principais rotas metabólicas:** Química Nova vol. 30, número 2, pag 382-387, 2007.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica, 8 ed.:** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KIKONYOGO, A.; ABRIOLA, D. P.; DRYJANSKI, M.; PIETRUSZKO, R. **Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist:** European Journal of Biochemistry, v. 262, p. 704 – 712, 1999.

KIM, J. M.; MARSHALL, M. R.; CORNELL, J. A.; PRESTON III, J. F.; WEI, C. I. **Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against**

Salmonella typhimurium in Culture Medium and on Fish Cubes. Journal of food science: v. 60, p. 1364 - 1368, 2006.

LEAL-CARDOSO, J.H. ; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDLLE, D. N. SANTOS, M. A., MAGALHÃES, P. J. **Inibitory actions of eugenol on rat isolated ileum:** Journal Physiology, v. 80, n. 9, p. 901-906, 2002.

LIMA, C.C.; CRIDLE, D.N.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; MONTE, F.J.; J.F.; JAFFAR, M.; LEAL-CARDOSO, J.H. **Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum:** Planta Medica, v. 66 n. 5, p. 408-411,2011.

LINS, R.; VASCONCELOS, F.H.P.; LEITE, R.B.; COELHO-SOARES, R.S.; BARBOSA, D.N..**Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (Schinus terebinthifolius) e Camomila (Matricaria recutita L.) sobre a placa bacteriana e a gengivite:** *Rev. bras. plantas med;* 15(1): 112-120, 2013. *ilus, tab.*

LOPES, A. C., **Tratado de Clínica Médica:** Volume II, 2 edição – 2009. Editora Roca. São Paulo.

LAVABRE M.. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais:** 2ed.: Rio de Janeiro: Record, 1993.

LIMA, F. C. ; PEIXOTO-NEVES, DIÊNIFER ; GOMES, M. D ; COELHO-DE-SOUZA, A. N. ; LIMA, C. C. ; ZIN, W. A. ; MAGALHAGENTE EM ESTUDOS, P. J. C. ; LAHLOU, S. ; LEAL-CARDOSO, J. H. . **Antispasmodic effects of eugenol on rat airway smooth muscle:** Fundamental & Clinical Pharmacology, v. 25, p. 690-699, 2011.

LIN, C. T.; CHEN, C. J.; LIN, T. Y.; TUNG, J. C.; WANG, S. Y. **Anti-inflammation activity of fruit essential oil from Cinnamomum insularimontanum Hayata:** Bioresource Technology. v. 99, p. 8783 – 8787, 2008.

MATOS, F.J.A., **As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de Lippia Alba (Mill.) N.E. Brown(Verbanaceagente em estudo) Parte II _ Farmacoquímica:** *Ver. Bras. Farm.* V.77, n. 4, p. 137-141,1996.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas:** Fortaleza, Edições UFC. 1994.

MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas, Fortaleza, Edições UFC. 1994. MATOS, F.J.A. Plantas Medicinais: Guia Fitoterápico.** 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2001.

MONTEIRO, M.V.; DE MELO LEITE, A.K.; BERTINI, L.M.; DE MORAIS, S.M.;
NUNES-PINHEIRO, D.C. **Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of Lippia sidoides Cham. leaves.** *J Ethnopharmacol* 111(2):378-82, 2007.

MOURÃO, C. A., ABRAMOV. **Fisiologia Essencial, Edições Guanabara Koogan** PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. **Antifungal activity of the clove essential oil from Sisygium aromaticum (Eugenia caryphyllus) on Candida, Aspergillus and dermatophyte espécies:** *Journal of Medical Microbiology*, 2009.

MURRAY, R. K.; KOTLIKOFF, M. I. **Receptor-activated calcium influx in human airway smooth muscle cells:** *Journal of Physiology*, v. 435, p. 123-144, 1991.

NAZARETH, Jesus Cristh. **The New Testament:** Holly Bible, v.1, p. 01-99, 0001.

OLIVEIRA J.V., CERVERA T.G., FERNANDEZ J.G., COLORADO J.B., **A composição química e arividades antioxidants dos óleos essenciais isolados de plantas colombianas:** *Rev bras farmacognosia* vol 20 número 4 curitiba agosto/setembro 2010.

ORTIZ, M. I.; RAMIREZ-MONTIEL, M. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. P.; PONCE-MONTER, H. A.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; CARIÑO-CORTÉS, R. **The Combination of Naproxen and Citral Reduces Nociception and Gastric Damage in Rats:** *Archives of Pharmarcal research*, v. 33, p. 1691 - 1697, 2010.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K., **Farmacologia:** e^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2004.

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

RICE, P. J.; COATS, J. R.; **Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae):** *J. Econ. Entomol*, v. 87, p. 1172–1179, 1994.

SANTOS, F. A. et al. **Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice** *Life Sciences* v.77, p.2953-2963,2006.

SANTORO, G. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARAES, L. G.; FREIRE, J. M.; SOARES, M. J. **Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida).** *Parasitology*: v. 134, p. 1649 – 1656, 2007.

SIXTEL, P.J.; PECINALLI, N.R. **Características farmacológicas gerais das plantas medicinais:** *Pharmacia Brasileira*. 16 (5): 74-7, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento:** Porto Alegre. Ed. Universidade UFRGS, p. 821, 1999.

SOUSA, D.G., **Alterações Eletrofisiológicas no Nervo Isquiático de ratos, produzidas pelo óleo essencial de *Lippia alba* e seu constituinte citral.** 2013: Dissertação (mestrado em Bioprospecção Molecular) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Ceará, Ceará.

SOUZA, C.M.P; BRANDÃO, D.O.; SILVA, M.S.P.; PALMEIRA, A.C.; SIMÕES, M.O.S.; MEDEIROS, A.C.D.. **Utilização de plantas medicinais com atividade antimicrobiana por usuários do serviço público de saúde em Campina Grande – Paraíba:** *Rev. bras. plantas med*; 15(2): 188-193, 2013. *tab*.

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

STOZ, S. C.; VRIENS, J.; MARTUN, D.; CLARDY, J.; CLAPHAM, D. E.,;2008. **Citral sensing by transient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons.** *Plos One*: v.3,2008.

SKOGVALL, S.; BERGLUNG, M.; DALENCE-GUZMÁN, M.F.; SVENSSON, K.; JONSSON, P.; PERSSON, C.G.; STERNER, O. **Effects of capsazepine on human small airway responsiveness unravel a novel class of bronchorelaxants:** *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 20, p. 273-280, 2007.

SKOGVALL, S.; BERGLUNG, M.; DALENCE-GUZMÁN, M.F.; SVENSSON, K.; JONSSON, P.; PERSSON, C.G.; STERNER, O. **Discovery of a potent and log-acting bronchorelaxing capsazepinoid:** *RESPIR4-95. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v. 21,N. 1, p. 125-0, 2008.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. **Características farmacológicas Gerais das plantas medicinais**: Infarma, Brasília, v. 16, n.13-14, p. 74-77, 2005.

SOUSA, LINARD, A. C., A. N. AND J.H., **Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice**: Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2009) 42: 655-659

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. **Signal transduction and regulation in muscle**: Nature, v. 372, n. 6503, p. 231-236.1994.

SOMLYO, A. P.; WU, X.; WALKER, L.A.; SOMLYO, A. V. **Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases**: Physiology Biochemical Pharmacology, v. 134, p. 201-234.1999.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. **Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II**: Journal Physiology , v. 522, n. 2, p. 177-185.2000.

TAMPIERE, M.P.; GALUPPI, R.; MACCHIONI, F.; CARELLE, M. S.; FALCONI, L.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. **The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components**: Mycopathologia, v.159, p. 339-345, 2005.

VALE, T. G.; MATOS, F. J.; DE LIMA, T. C.; VIANA, G. S. B. **Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes**. Journal of Ethnopharmacology, v. 67, p. 127 – 133, 1999.

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

ZUCCHI, M.R.; OLIVEIRA JÚNIOR, V.F.; GUSSONI, M.A.; SILVA, M.B.; SILVA, F.C.; MARQUES, N.E.. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO**: Rev. bras. plantas med; 15(2): 273-279, 2013. tab