



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

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS NO NERVO
ISQUIÁTICO DE RATOS, PRODUZIDAS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*
E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO CITRAL.**

DAMIANA GONÇALVES DE SOUSA

CRATO - CEARÁ

2013

DAMIANA GONÇALVES DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS NO NERVO
ISQUIÁTICO DE RATOS, PRODUZIDAS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*
E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO CITRAL.**

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.

Orientadora: Profa. Dra. Roseli Barbosa

Coorientador: Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso

CRATO – CEARÁ

2013

DAMIANA GONÇALVES DE SOUSA

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS NO NERVO
ISQUIÁTICO DE RATOS, PRODUZIDAS PELO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba*
E SEU CONSTITUINTE MAJORITÁRIO CITRAL.**

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.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso – Coorientador
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe – Avaliador externo
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes – Avaliador interno
Universidade Regional do Cariri- URCA

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça – Suplente
Universidade Regional do Cariri- URCA

A meus pais, Antônio Soares de Sousa e Maria Gonçalves de Sousa, e a meus irmãos, Damião Gonçalves de Sousa, Severino Denicio Gonçalves de Sousa e Dairla Laris Gonçalves de Sousa, aqueles que todos os dias me mostram que ter um lar é um tesouro.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que colocou em meu caminho, por estar comigo em todas as circunstâncias, por renovar sempre as minhas esperanças e me fortalecer. Essa dissertação é dEle, por Ele e para Ele.

A meus pais, Antônio Soares de Sousa e Maria Gonçalves de Sousa (Laís), pelo exemplo de vida, por serem os melhores pais que eu poderia ter, pelo amor incondicional, cumplicidade, apoio, incentivo e presença constante.

A meus irmãos, Damião, Denicio e Dairla, que, simplesmente pelo fato de existirem, já me fazem uma pessoa de sorte, que mesmo à distância estiveram sempre presentes acompanhando cada passo, dando força e me mostrando o quão sólida é nossa união.

A Ricardo Aquino, por compreender minha ausência e me incentivar a seguir sempre em frente, pelo apoio, incentivo, amizade e carinho que contribuíram imensamente para a realização deste sonho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Roseli Barbosa, profissional de uma capacidade sem limites, realizadora, sempre disposta a ajudar, enfrentar e vencer desafios, que durante esse período se tornou para mim um exemplo de profissional e de pessoa, sou-lhe muito grata pela orientação, por me apresentar o fabuloso mundo da eletrofisiologia, por acreditar em mim e no meu trabalho, por toda paciência, confiança, companheirismo e pelo privilégio de ter sido sua aluna.

Ao meu brilhante coorientador, Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso, cientista na mais pura acepção da palavra, por me abrir as portas do seu laboratório possibilitando a realização da pesquisa, por me orientar, apoiar, incentivar, por ter passado a mim tanto conhecimento, por ter tido muita paciência e por sempre fazer com que eu me sentisse membro do LEF. A ele, toda a minha admiração, respeito e meu sincero muito obrigado.

A Msc. Kerly Shamyra e ao Prof. Dr. Walber Ferreira, pelo imensurável auxílio, valiosa amizade, paciência, companheirismo, incentivo, por toda prontidão e boa vontade em me ajudar e por sempre me mostrarem um caminho, uma solução, meu interminável agradecimento.

Ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pelos ensinamentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional, por sua disponibilidade em me orientar durante a iniciação científica, experiência essencial para que eu trilhasse o caminho da pesquisa.

A Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça, profissional ímpar, por suas valiosas sugestões, por sempre estar disposta a ajudar no que fosse preciso, pelos ensinamentos durante a graduação e depois desta, e por me apresentar tão bem ao mundo da experimentação, agradeço.

A Profa. Msc. Maria Ivaneide Rocha, minha amiga, pessoa muito importante no meu crescimento pessoal e profissional, agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho.

Aos Professores Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe, Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, Dr. José Henrique Leal Cardoso e Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça por aceitarem participar da banca examinadora, pelos valiosos comentários, sugestões e conhecimentos que aprimoram este trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Horta pelo fornecimento do óleo essencial de *Lippia alba*.

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, por toda sua acessibilidade e pela disponibilização do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) sempre que necessário.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri pelos conhecimentos adquiridos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pelos conhecimentos repassados, experiências transmitidas e exemplo profissional, fundamental para minha formação.

A Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, por realizarem de forma cuidadosa e atenciosa seu trabalho junto à secretaria do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular.

Aos funcionários da Universidade Estadual do Ceará (UECE), em especial a Frank, Dedé, Sr. Rocha e Sr. Ivan por serem os excelentes profissionais que são.

Aos funcionários da Universidade Regional do Ceará (URCA), em especial a Sr. Luis, Fernando e Marcos, por todo auxílio e amizade.

Aos meus amigos do Laboratório de Eletrofisiologia (LEF) da UECE: Professor Henrique, Kerly, Walber, Camille, Thiago, Luis, Carol, Klausen, Welton, Flávio, Morgana, Katarine, Ana Paula, Sergivanda, Celito, Manu, Gustavo, Átila, Alan, Kleyane, Edilberto, às Valérias (Valéria Maria e Valéria Freitas), Nathalia, Thayane, Marcos e Pedro Militão, pela ótima convivência, receptividade e pelos momentos de descontração e amizade, obrigado por terem me recebido de braços abertos.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) da URCA em especial à Prof.^a Roseli, Prof. Irwin, Prof.^a Marta, Daniele, Laura, Renata, Anita, Luiz Jardelino, Poliana, Demontiê e Luiz Pereira, por todo incentivo e amizade.

A Severino Denicio Gonçalves de Sousa (aluno de iniciação científica e meu irmão), por sua colaboração primordial em tudo o que foi possível.

À Professora Ivanisa Dias de Sales pela revisão da dissertação, meu muito obrigado.

Aos amigos:

Artur Bruno, pelos momentos de descontração, e crescimento cultural que me proporcionou;

Ana Carolina (Carol) pela presença parceira em dias de experimento e caronas mais que oportunas;

Camille Holanda, Átila Pereira, Ana Carolina e Alan Avelino pelos momentos de descontração e risadas gostosas que tornaram os dias mais alegres, Obrigada pela demonstração de amizade;

Gesuina Landim, Daniele Oliveira, Laura Hévila, Renata Sampaio e Anita Oliveira pelo companheirismo, amizade e encorajamento mútuo.

Em especial, ao meu amigo Loeste Arruda, pessoa digna de toda minha admiração e respeito, que durante esse tempo de convivência muito me ensinou. Agradeço por todo apoio, auxílio, incentivo e amizade.

Ao CNPq, FUNCAP e CAPES, pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a cada animal que deu sua vida em favor da realização dessa pesquisa. E à minha *Lippia alba*, por ter perfumado o meu ambiente de trabalho com o seu óleo essencial, o qual sempre rendeu muitos elogios de todos os companheiros de trabalho.

*“... O que faço aos meus servos é isto: eu lhes dou a vitória.” O Senhor falou.
Isaías, 54:17.*

RESUMO

Lippia alba é um vegetal aromático, encontrado em praticamente todo Brasil. Conhecido popularmente como erva cidreira, suas folhas são utilizadas empiricamente em infusões, macerados, compressas, banhos e extratos alcoólicos por apresentarem atividade calmante, analgésica, sedativa, ansiolítica entre outras. Citral, o principal constituinte do óleo essencial extraído das folhas de *Lippia alba* (OELa), que é uma mistura do trans-isômero geranial e o cis-isômero neral, apresenta muitas ações biológicas como: analgésicas, ansiolíticas, anticonvulsivante e sedativa. Contudo, pouco se sabe sobre a ação do OELa e do constituinte Citral no sistema nervoso periférico. Esse estudo objetivou avaliar as alterações produzidas pela ação do OELa e do Citral sobre a excitabilidade e condutibilidade neural do nervo isquiático de ratos. Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* (Wistar) de ambos os sexos, com massa corpórea variando entre 200-250 g, de onde foram dissecados os nervos isquiáticos, mantidos a uma temperatura entre 18° C e 24° C, numa solução de Locke com pH = 7,4. No nervo isquiático, foi realizado o registro do potencial de ação composto (PAC) evocado por pulso de onda quadrada, com amplitude de 40 V, duração de 100 µs a uma frequência de 0,2 Hz. O PAC apresentou dois picos positivos de ondas que denominamos de 1° e 2° componente. O OELa e o Citral inibem o PAC de maneira concentração-dependente. As concentrações trabalhadas foram 3, 10, 30, 60, 100 e 300 µg/mL. As amplitudes positivas do PAC foram bloqueadas significativamente a partir de 10 µg/mL do OELa e do Citral. Para o primeiro e segundo componente, a concentração em que se desenvolveria 50% do efeito do OELa foi de 51,34 µg/mL e 31,29 µg/mL, respectivamente. Enquanto para o Citral, essas concentrações foram para o primeiro e segundo componentes respectivamente 36,78 µg/mL e 16,70 µg/mL. A amplitude pico-a-pico (APP) foi bloqueada de forma significativa pelo OELa, a partir da concentração de 30 µg/mL e pelo Citral em 10 µg/mL. Tomando por base a CI₅₀ % da APP, verificamos que existem alterações na reobase e cronaxia utilizando a concentração de 60 µg/mL do OELa e 30 µg/mL do Citral. A duração do 1° componente do PAC foi alterada a partir da concentração de 60 µg/mL do OELa e de 3 µg/mL do Citral. O 2° componente sofreu modificação na concentração de 30 µg/mL do OELa e do Citral. A velocidade de condução de ambos os componentes também foi inibida a partir de 10 µg/mL do OELa, enquanto no Citral, em todas as concentrações para ambos os componentes, a inibição foi estatisticamente significativa. Esse estudo mostra que o OELa e seu constituinte majoritário, o Citral, inibem a excitabilidade do nervo isquiático de ratos. O efeito depressor do PAC é demonstrado em menor concentração que em outros óleos essenciais, e constituintes com potencial anestésico, descritos na literatura. Diante do exposto, concluímos que o OELa e o Citral podem ser fármacos em potencial para a indústria farmacêutica.

Palavras chaves: Citral, *Lippia alba*, nervo isquiático, óleo essencial, potencial de ação composto.

ABSTRACT

Lippia alba is an aromatic plant found in almost all Brazilian territory. Popularly known as erva cidreira, its leaves are used empirically in infusions, macerated, compresses, baths and alcoholic extracts because of its sedative, antidepressant, anxiolytic and analgesic properties. Citral, the main constituent of the essential oil extracted from the leaves of *Lippia alba* (OELa), which is a mixture of trans-isomer geranial and the cis-isomer neral, It presents many biological actions as: analgesic, sedative, anticonvulsant, and anxiolytic. However, little is known about the action of OELa and the Citral constituent in the peripheral nervous system. This study aimed to evaluate the changes produced by the action of OELa and Citral on neural excitability and conductivity of the sciatic nerve of rats. It was used rats *Rattus norvegicus* (Wistar) of both sexes, with body mass varying between 200-250 g, from which the sciatic nerves were dissected, maintained at a temperature from 18° C to 24° C, in Locke's solution with pH = 7.4. In the sciatic nerve, was done the record of the Compound Action Potential (CAP) evoked by square wave pulse with amplitude of 40 V, 100 µs duration to a frequency of 0.2 Hz. The PAC presented two positive peaks of waves called 1° and 2° components. The OELa and the Citral inhibit the PAC in a concentration-dependent way. The worked concentrations were 3, 10, 30, 60, 100 and 300 µg/mL. The positive CAP ranges have been blocked significantly from 10 µg/mL of the OELa and from 10 µg/mL of Citral. For the first and second component, the concentration in which would be developed 50 % from OELa effect was 51,34 µg/mL and 31,29 µg/mL, respectively. While for Citral, these concentrations were for the first and second components respectively 36,78 µg/mL and 16,70 µg/mL. The peak-to-peak amplitude (PPA) has been blocked significantly by OELa, from the concentration of 30 µg/mL and Citral in less from 10 µg/mL. Based on a IC50 of APP, we observed that there are changes in the rheobase and chronaxia using the concentration of 60 µg/mL of OELa and 30 µg/mL of Citral. The duration of the 1° component of the CAP has changed from the concentration from 60 µg/mL of OELa and 3 µg/mL of Citral. The 2° component suffered change in concentration from 30 µg/mL of OELa and from Citral, in the same concentration. The conduction speed of both components has also been inhibited from 10 µg/mL of OELa, while the Citral, in all concentrations for both components, the inhibition was statistically significant. This study shows that the OELa and the Citral its majority constituent, inhibit the excitability of sciatic nerve of rats. The CAP depressor effect is shown in a smaller concentration than on other essential oils, and anesthetic potential constituents, described in the literature. Because of the results, we conclude that the OELa and the Citral can be potential drugs for the pharmaceutical industry.

Keywords: Citral, compound action potential, essential oil, *Lippia alba*, sciatic nerve.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do Isopreno	20
Figura 2 – <i>Lippia alba</i>	22
Figura 3 – Fórmula estrutural do Geranial, Neral e Citral	26
Figura 4 – Estrutura da fibra nervosa	27
Figura 5 – Alterações na permeabilidade da membrana originam o potencial de ação	29
Figura 6 - Nervo isquiático e seus ramos	40
Figura 7 - Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do Potencial de Ação Composto	41
Figura 8 - Traçado ilustrativo do cálculo da amplitude positiva do 1º e 2º componentes	42
Figura 9 - Traçado ilustrativo do cálculo da amplitude pico-a-pico	43
Figura 10 - Câmara de Harvard	43
Figura 11 - Traçado ilustrativo do cálculo da velocidade de condução do 1º e 2º componentes	44
Figura 12 - Curva de Excitabilidade	45
Figura 13 - Traçados representativos do efeito do OELa e do Citral na concentração de 300 µg/mL sobre o PAC de nervo isquiático de ratos	49
Figura 14 - Traçados representativos do efeito do OELa e do Citral na concentração de 60 µg/mL sobre o PAC de nervo isquiático de ratos	50
Figura 15 - Tempo de curso efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC	52
Figura 16 - Tempo de curso efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do segundo componente do PAC	53
Figura 17 - Curva concentração resposta do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC	56
Figura 18 - Curva concentração-efeito do OELa e do Citral sobre a APP do PAC.	58
Figura 19 - Equação logística de quatro parâmetros	59

- Figura 20** - Efeito e recuperação do OELa sobre a reobase e cronaxia do PAC. **60**
- Figura 21** - Efeito e recuperação do Citral sobre a reobase e cronaxia do PAC. **61**
- Figura 22** - Efeito do OELa e do Citral sobre a duração dos componentes do PAC. **63**
- Figura 23** - Efeito do OELa e do Citral sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC. **65**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das fibras nervosas de mamíferos.	32
Tabela 2 – Análise química do óleo essencial	47
Tabela 3 – Tabela de valores controle	48
Tabela 4 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude positiva do 1º componente	90
Tabela 5 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude positiva do 2º componente	91
Tabela 6 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude positiva do 1º componente	92
Tabela 7 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude positiva do 2º componente	93
Tabela 8 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude pico-a-pico	94
Tabela 9 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude pico-a-pico	95
Tabela 10 – Efeito e recuperação do OELa sobre a duração da onda do 1º componente do PAC	96
Tabela 11 – Efeito e recuperação do OELa sobre a duração da onda do 2º componente do PAC	97
Tabela 12 – Efeito e recuperação do Citral sobre a duração da onda do 1º componente do PAC	98
Tabela 13 – Efeito e recuperação do Citral sobre a duração da onda do 2º componente do PAC	99
Tabela 14 – Efeito e recuperação do OELa sobre a velocidade de condução do 1º componente do PAC	100
Tabela 15 – Efeito e recuperação do OELa sobre a velocidade de condução do 2º componente do PAC	101
Tabela 16 – Efeito e recuperação do Citral sobre a velocidade de condução do 1º componente do PAC	102
Tabela 17 – Efeito e recuperação do Citral sobre a velocidade de condução do 2º componente do PAC	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A/D – Analógico digital.

ANOVA – Análise de variância.

APP – Amplitude pico-a-pico.

CI₅₀ – Concentração inibitória média.

CEUA – Comitê de Ética para o Uso de Animais.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

HCL – Ácido clorídrico

Hz – Hertz.

ISCB – Instituto Superior de Ciências Biomédicas.

K⁺ – Íon potássio.

LEF – Laboratório de eletrofisiologia.

LFQM – Laboratório de farmacologia e química molecular.

mg/Kg – Miligrama por quilo de peso.

mM – Milimolar.

ms – Milissegundo.

mV – Milivolt.

n = Número de experimentos.

Na⁺ – Íon sódio.

NaOH – Hidróxido de sódio

OEAz – Óleo essencial de *Alpina zerumbet*.

OEcn – Óleo essencial do . *Cróton nepetaefolius*.

OELa – Óleo essencial de *Lippia alba*.

OELs – Óleo Essencial de *Lippia sidoides*.

PA – Potencial de ação.

PAC – Potencial de ação composto.

PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico.

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório.

SNC – Sistema nervoso central.

TRIS – Tris-hidroximetil-aminometano.

TRP – Receptor de potencial transitório.

TRPM8 – Receptor de potencial transitório tipo melastatina subtipo 8

TRPA1 – Receptor de potencial transitório tipo anquirina subtipo 1

TRPV1 – Receptor de potencial transitório tipo vanilóide subtipo 1

TRPV3 – Receptor de potencial transitório tipo vanilóide subtipo 3

TRPV4 – Receptor de potencial transitório tipo vanilóide subtipo 4

UECE – Universidade Estadual do Ceará.

UFC – Universidade Federal do Ceará.

URCA – Universidade Regional do Cariri.

USA – Estados Unidos da América.

V – Volts.

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro.

μm – Micrômetros.

μs – Microssegundos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Plantas medicinais e Bioprospecção.....	19
1.2 Óleos essenciais.....	20
1.3 <i>Lippia alba</i>	21
1.3.1 Descrição botânica.....	22
1.3.2 Importância econômica.....	23
1.3.3 Nomes populares	23
1.3.4 Usos populares.....	23
1.3.5 Atividades biológicas	24
1.3.6 Constituintes químicos	24
1.4 Citral	25
1.5 Nervos Periféricos e fibras nervosas	26
1.6 Potencial de ação	27
1.7 Potencial de ação composto.....	30
2. RELEVÂNCIA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Aspectos éticos da pesquisa.....	38
4.2 Delineamento da pesquisa	38
4.3 Óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	38
4.4 Citral	38
4.5 Animais.....	38
4.6 Solução nutritiva.....	39

4.7 Drogas.....	39
4.8 Obtenção do tecido	39
4.9 Registro extracelular.....	40
4.10 Análise Eletrofisiológica	42
4.10.2 Amplitude Pico-a-Pico (APP)	43
4.10.3 Velocidade de Condução	43
4.10.4 Reobase.....	44
4.10.5 Cronaxia	44
4.11 Análise estatística dos dados	45
5. RESULTADOS	47
5.1 Análise química do óleo essencial.....	47
5.2 Valores controle dos parâmetros eletrofisiológicos do nervo isquiático.....	48
5.3 Efeitos do OELa e Citral sobre o PAC do nervo isquiático de ratos.....	49
5.4 Efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC.	51
5.5 Efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do segundo componente do PAC.	53
5.6 CI_{50} % do efeito do OELa e do Citral sobre os componentes do PAC.....	55
5.7 Efeito e recuperação do OELa e do Citral sobre a APP do PAC.	57
5.8 Efeito do OELa e do Citral sobre a reobase e cronaxia do PAC.	59
5.9 Efeito do OELa e do Citral sobre a duração dos componentes do PAC.	62
5.10 Efeitos do OELa e do Citral sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.	64
6. DISCUSSÃO	68
6.1 Efeito do OELa e Citral sobre o PAC.	68
7. CONCLUSÕES.....	74
8. REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais e Bioprospecção

Os primeiros conhecimentos acerca da fitoterapia datam da pré-história. Há indícios do uso de plantas por povos do período Paleolítico, há cerca de 80.000 anos (COWEN, 1994). O conhecimento acumulado desde então, vem sendo repassado às gerações posteriores, chegando de forma consistente à sociedade atual.

Hoje, plantas medicinais são postas à venda em feiras livres, mercados populares e cultivadas em quintais residenciais. Este é, em alguns casos, o único recurso terapêutico a que certas comunidades e grupos étnicos têm acesso (MACIEL et al., 2002).

Do ponto de vista químico/farmacológico, grande parte da flora medicinal ainda é ignorada, porém, o conhecimento popular a ela associado é fortemente incutido nos países em desenvolvimento (SILVA, N. et al., 2006). O saber empírico contribui de forma significativa para o entendimento científico, apesar da falta de conhecimento sobre os constituintes químicos destes vegetais (MACIEL et al., 2002).

O crescimento na procura por fármacos provenientes de plantas medicinais tem se acentuado em todo o mundo, nos últimos anos. Como uma opção mais saudável, ou menos nociva, para a terapia medicamentosa nos países desenvolvidos, ou ainda pela inacessibilidade a medicamentos farmacocímicos nos países em desenvolvimento (FREITAS, 2007).

Em contrapartida, o uso impróprio de drogas fitoterápicas, na automedicação, pode acarretar uma gama de efeitos adversos ou colaterais, entre os quais estão as hipersensibilidades, toxicidades graves em muitos órgãos, e mesmo o desencadeamento de alguns tipos de neoplasias. Pesquisas em plantas na busca por novos fármacos são de grande importância, como fonte de instrução aos possíveis usuários sobre o risco/benefício do uso destes vegetais (MIGLIATO et al., 2006).

O Brasil é considerado o país com a mais diversificada genética vegetal do planeta: compreende de 15 a 25% de todas as espécies vegetais, exibindo alto grau de endemismo e distribuindo-se em seis biomas. Ao todo, 55.000 espécies catalogadas de um número estimado entre 350.000 e 550.000 existentes.

Em contrapartida, a riqueza e variedade desse banco genético e biomolecular ainda está em estágio inicial de conhecimento (CALIXTO, 2003; FUSELLI et al., 2003; SIMÕES et al., 2003).

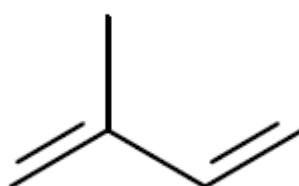
A variabilidade da flora brasileira oferece uma grande perspectiva de uso de ferramentas biotecnológicas como a Bioprospecção molecular, que oportuniza a pesquisa, a aplicação, a sustentabilidade e a preservação de tudo aquilo que deriva do meio ambiente. O exemplo disso é a importância das plantas medicinais para indústria farmacêutica nacional, que se esforça para encontrar substâncias ativas, que possibilitem o crescimento na produção de óleos essenciais (STEFANINI et al., 2002).

1.2 Óleos essenciais

A expressão óleo essencial é utilizada para identificar líquidos oleosos voláteis, extraídos de vários órgãos do vegetal, por meios específicos. Os óleos essenciais tem origem a partir do metabolismo secundário do vegetal, tendo muitas vezes um papel indispensável na sobrevivência da planta, apresentam constituição química complexa, havendo menção da existência de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, entre outros. Entretanto, em sua grande maioria, são formados de uma mistura de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, com a predominância dos últimos. Comumente os óleos essenciais são dotados de aroma agradável, sabor acre e picante e muitas vezes mostram-se farmacologicamente ativos. São instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor e umidade, possuindo aspecto incolor quando recém-extraídos. (MATOS e FERNANDES, 1978; CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; SIMÕES et al., 1999 apud SIMÕES et al., 2003; SIQUI et al., 2000; GONÇALVES et al., 2003; SILVA, A. et al., 2003; SANTURIO et al., 2007).

Os terpenóides são metabólitos secundários, cuja procedência biossintética se dá por meio de unidades isoprenicas (Figura 1). Plantas que apresentam em seus óleos essenciais derivados de isoprenos, têm sido utilizadas popularmente do mesmo modo que na terapêutica, como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes (PASSOS et al., 2009).

Figura 1 - Estrutura do Isopreno



Fonte: Reis, 2008.

Os terpenóides possuem a maior diversidade estrutural entre os produtos naturais advindos de vegetais, com aproximadamente de 29.000 compostos identificados (ADAM e ZAPP, 1998). Em contrapartida, certos eventos podem alterar a produção de tais metabólitos.

Gobbo-Neto e Lopes (2007) descrevem em sua revisão que certos fatores como: altitude, desenvolvimento, índice pluviométrico, temperatura, solo e sazonalidade estão correlacionados entre si e não agem de maneira isolada, podendo influenciar em conjunto na síntese de metabólitos.

As moléculas dos constituintes ativos dos óleos essenciais têm agido como modelo, para que, por meio de mudanças de grupamentos moleculares e análise de relação entre estrutura química e ação farmacológica, descubram-se novos fármacos, com maior eficácia e seletividade. Com a propagação da ciência e da tecnologia, o valor terapêutico das plantas medicinais tem sido estudado e comprovado, ao ponto de sua recomendação tornar-se cada vez mais constante por profissionais de saúde (LÓPEZ, 2006).

A extração dos óleos essenciais se dá, muitas vezes, por meio de arraste a vapor e, também, através da técnica de prensagem do pericarpo de frutos. Praticamente todas as partes do vegetal podem contribuir na sua produção como cascas, flores, folhas, frutos e rizomas, provendo compostos puros a exemplo do limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; BIZZO et al., 2009).

Sua aplicabilidade na indústria é ampla, estando presente na perfumaria, na cosmética, no ramo de alimentos e na farmacologia, especialmente nas áreas: dermatológica, antibiótica, analgésica, anti-inflamatória, neurológica e gastrointestinal. São usados frequentemente na terapêutica de patologias cardíacas, também como anticancerígenos (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; SILVA-SANTOS et al., 2008).

O uso dos óleos essenciais por médicos da medicina ortodoxa, em casos de ausência de responsividade de outros tratamentos preconizados pela farmacologia clássica, tem aumentado muito na Europa, com bons resultados (BARATTA et al., 1998; BURT, 2004).

1.3 *Lippia alba*

Pertencente à família Verbenaceae, incluso no gênero *Lippia*, a espécie *Lippia alba* (Figura 2) é um vegetal aromático que, proveniente dos Andes (Chile, Peru), é encontrado em todas as áreas tropicais e subtropicais da América do Sul, América Central, Ilhas Caribenhas e na região Sul dos Estados Unidos. No território brasileiro, esta planta pode ser encontrada em quase todas as regiões, crescendo em terras arenosas, nos leitos de rios e à

margem de lagos, em áreas onde predomina o clima tropical e subtropical (MORTON 1981; GUPTA, 1995; PASCUAL et al., 2001; ATTI-SERAFINI, 2002; JULIÃO et al., 2003; JANNUZZI et al., 2011; HENNEBELLE et al., 2008; MANICA-CATTANI et al., 2009).

O aroma exalado por *Lippia alba* tem relação direta com os constituintes majoritários encontrados em seu óleo essencial, que podem variar de maneira qualitativa e quantitativa, em função de diversos fatores, tais como: estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, resultante da precipitação, fatores geográficos e climáticos (CORRÊA, 1992; MATOS, 1998; TAVARES, E. et al., 2005).

Figura 2 – *Lippia alba*



Fonte: Coutinho Neto, 2007.

1.3.1 Descrição botânica

Lippia alba é uma espécie essencialmente perene, ramificada, de hábito arbustivo ou subarbustivo. Com altura variante entre 1,5 m e 2,0 m, esta planta exhibe ramos finos, de coloração esbranquiçada, arqueados e também quebradiços. As flores são agrupadas em inflorescências capituliformes de eixo curto, com tonalidade que abrange desde o azul ao violeta (GUPTA, 1995; MATOS, 1998; LORENZI e MATOS, 2002; BIASI e COSTA, 2003). No que diz respeito à propagação, cresce em terrenos arenosos e em leitos de lagos,

lagoas, rios, açudes, em áreas que apresentam altitude de até 1.800 metros e clima tropical, subtropical e temperado (CORRÊA JUNIOR, 1994; GUPTA, 1995).

1.3.2 Importância econômica

A potencialidade desta planta para a indústria está agregada às muitas possibilidades agroindustriais como a rudimentariedade, a alta velocidade de propagação, rápida proliferação vegetativa, diversificação proporcionada por sua condição de alogamia, ainda por florescer no decorrer de todo o ano e, também, por exibir vasta ambientação para muitos meios, graças à sua plasticidade fenotípica (YAMAMOTO, 2008).

1.3.3 Nomes populares

A denominação "cidreira" é usada pelo brasileiro para caracterizar vegetais de diversas famílias botânicas, cujas folhas exibem odor similar ao do limão, e entre essas "ervas-cidreiras" está a *Lippia Alba* (JULIÃO, 2003), que é identificada por uma extensa lista de designações comuns, a exemplo de erva-cidreira, erva-cidreira brasileira, salva-do-Brasil, cidreira-de-arbusto, cidreira brava, alecrim selvagem, alecrim do campo, cidró, falsa-melissa, chá-do-tabuleiro, salsa limão etc. (BRAGA, 1976; GUPTA, 1995; MARTINS et al., 1995; LORENZI e MATOS, 2002; BARBOSA et al., 2006).

1.3.4 Usos populares

Este vegetal pode ser usado para os mais diversos fins, inclusive terapêutico. Mostra legítima importância farmacológica, e geralmente se faz presente em programas voltados a fitoterapia. Existe uma larga utilização desta pela população, por apresentar atividade calmante, antiespasmódica leve, analgésica, sedativa, ansiolítica e sutilmente expectorante (MATTOS et al., 2007), no tratamento de patologias cardiovasculares, gastrointestinais (HENNEBELLE et al., 2008), moluscicida (PACIORNIK, 1990), diaforética e emenagoga (JULIÃO et al., 2003). Tavares, I. et al. (2011) relata uso pela ação anti-inflamatória, antipirética, sobre enfermidades da pele, hepáticas, e no tratamento da gonorreia e da sífilis.

As folhas são empregadas em forma de infusões, em chás, macerados, em preparação de compressa e banhos ou até em extratos alcoólicos. Possuem baixa toxicidade e sua eficácia é atribuída aos seus constituintes ativos, entre os quais está o óleo essencial (DI STASI et al.,

2002; JULIÃO et al., 2003). As raízes fazem-se presentes também na medicina popular sendo utilizadas na forma de infusões contra tosse e constipações (DI STASI et al., 2002).

1.3.5 Atividades biológicas

Na literatura muitas ações biológicas são citadas para óleo essencial de *Lippia alba*, como: a atividade antiviral (OCAZIONEZ et al., 2010), citotóxica e antifúngica (MESA-ARANGO et al., 2009), anti-mutagênica (RAMOS et al., 2003), antioxidante (STASHENKO et al., 2004; PARODI et al., 2012), antiulcerogênica (PASCUAL et al., 2001), anestésica (CUNHA et al., 2010; HELDWEIN et al., 2012; PARODI et al., 2012), ansiolítica (HATANO, et al, 2012), potencializadora da atividade antibiótica (VERAS et al., 2011), vasorrelaxante (MAYNARD et al., 2011), anticonvulsivante (VIANA et al., 2000), sedativa (DO VALE et al., 2002), antinociceptiva e antiedematogênica (VIANA et al., 1998).

1.3.6 Constituintes químicos

Pela ausência de uma padronização estabelecida para a diferenciação de quimiotipos em *Lippia alba*, muitos autores tem se fundamentado na semelhança entre os compostos majoritários presentes nos exemplares da espécie (JANNUZZI et al., 2010).

Hennebelle et al. (2006) mostra em seu estudo que, no oleo essencial de *Lippia alba*, compostos monoterpênicos como cânfora, cariofileno, carvona, β -cariofileno, 1,8-cineol, citral, estragol, limoneno, mirceno, tagetenone e γ -terpineno estão constantemente presentes.

A composição química do óleo essencial de *Lippia alba* é muito variável. Por conta disso, pode-se encontrar dentro da espécie vários quimiotipos, que são identificados e classificados de acordo com o seu constituinte majoritário, sendo possível que exemplares de quimiotipos diferentes apresentem também peculiaridades na morfologia, textura foliar, diâmetro e cor de suas flores (MATOS et al., 1996a; JULIÃO, 2003; HENNEBELLE et al., 2008).

Entre os quimiotipos mais conhecidos estão o carvona, 1,8-cineol, diidrocarvona, γ -terpineno, citral, limoneno, cânfora, β -cariofileno, linalol e piperitona (FESTER et al., 1954, 1961; CRAVEIRO et al., 1981; DELACASSA et al., 1990; FUN et al, 1990; GOMES et al., 1993; MATOS, 1996a,b; FRIGHETTO et al 1998; ZOGHBI et al., 1998).

Tal riqueza química pode ser avaliada como benéfica para as estratégias de melhoramento, visto que serve de base na escolha de vegetais que atendam à vasta demanda de

utilização de *Lippia alba*. Em contrapartida, esta diferença de tipos químicos pode ser vista como inquietante quando o foco é a fitoterapia, uma vez que aquele que faz uso sem conhecimento da composição química do vegetal poderá estar utilizando um material inadequado para alcançar o objetivo esperado, pondo em risco sua saúde. Esse tipo de equívoco é comumente diagnosticado no Brasil envolvendo uma gama de espécies de vegetais (JANNUZZI et al., 2010).

1.4 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-isomero 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 (Figura 3), apresentando-se na constituição dos óleos essenciais de muitos vegetais (OPDYKE, 1979; ARANEDA et al., 2004).

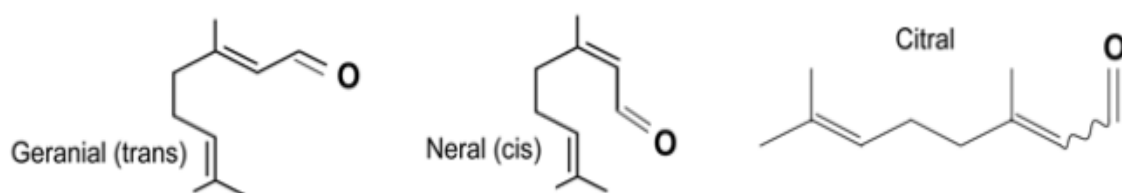
Um intenso aroma de limão é exalado do Citral, possuindo aplicabilidade na indústria alimentícia, presente em especial na cozinha do Sudeste Asiático. É aplicado também na preparação de perfumes e em formulações de detergentes (OPDYKE, 1979; RESS et al., 2003; ARANEDA et al., 2004).

O Citral possui também ação farmacológica, tal 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 anti-inflamatória 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 (ROTHENBORG et al., 1977; CARDULLO et al., 1989; BASKETTER et al., 1992; 1994; ALLENBY et al., 1993; FROSCHE et al., 2002).

Figura 3- Fórmula estrutural do Geranial, Neral e Citral respectivamente.



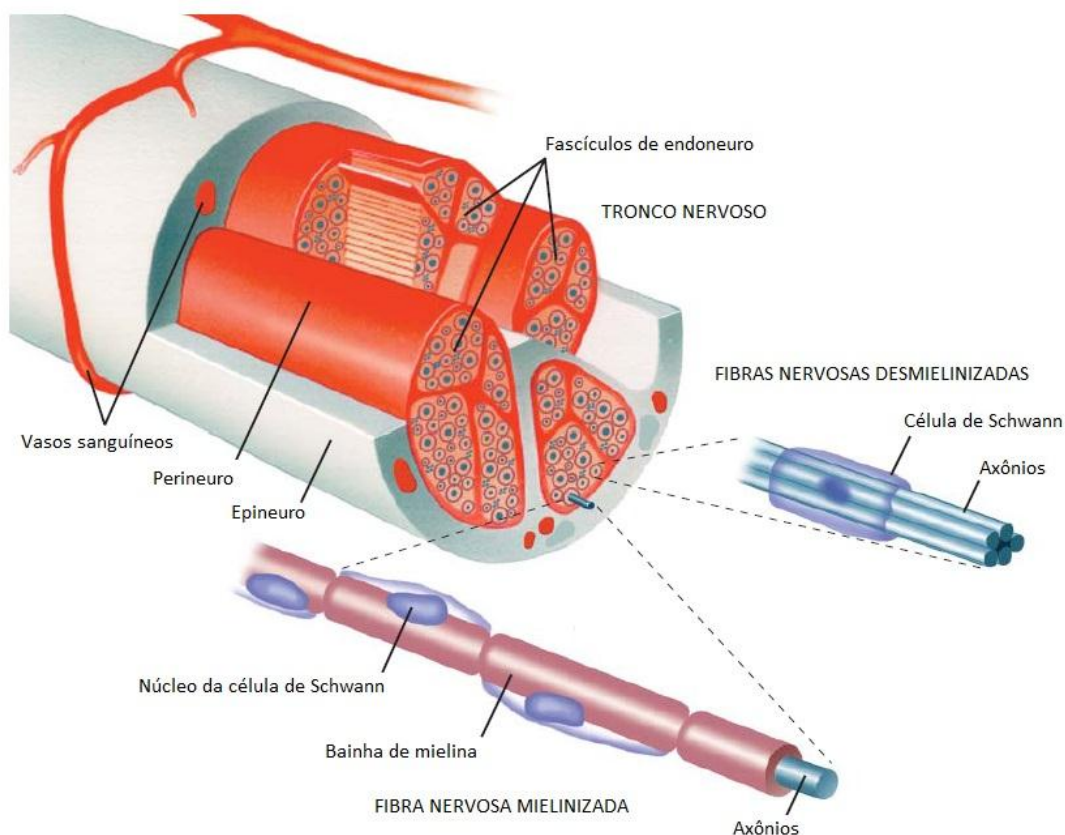
Fonte: Adaptada de Stotz et al., 2008.

Uma informação relevante para entender as ações farmacológicas no tocante ao mecanismo de ação do Citral consta no estudo de Stotz et al. (2008), que comprova a ação do Citral pela ativação dos canais TRP (potencial receptor transitório), subtipos TRPV1 e TRPV3, TRPM8, e TRPA1, inibição de longa duração sobre TRPV1-3 e TRPM8 e um bloqueio transitório para TRPV4 e TRPA1. O resultado propiciou ao autor sugerir que o Citral pode mostrar-se mais atuante que a capsaicina para alodinia, comichão, bem como outras categorias de dor que abrangem os nervos sensoriais e superficiais da pele.

1.5 Nervos Periféricos e fibras nervosas

Os nervos periféricos são na realidade prolongamentos do sistema nervoso central que integralizam as atribuições sensitiva e motora das margens do corpo. A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio formado por um corpo celular, fixado na medula ou no gânglio espinhal, e por seu prolongamento, a fibra nervosa (Figura 4), que é constituída pelo axônio e seu revestimento de bainha conjuntiva, chamado de endoneuro, que tem por dever resguardar as fibras de eventuais lesões mecânicas (FIGOLS, 2000).

Figura 4 – Estrutura da fibra nervosa



Fonte: Imagem obtida do site: www.medicinanet.com.br.

Podem ser encontrados neurônios cujos axônios são envolvidos por uma camada mielínica, gerada através de células de Schwann, nomeados como fibras mielinizadas, bem como aqueles desprovidos desta bainha de mielina, neurônios esses designados como fibras amielinizadas. Naqueles mielinizados existem interrupções entre uma célula de Schwann e outra, que são chamados de nó de Ranvier, que na verdade são regiões onde ocorrem as trocas iônicas no decorrer da condução saltatória do estímulo nervoso (FIGOLS, 2000).

Da coluna anterior da medula espinhal provêm as fibras motoras, enquanto as fibras sensitivas emergem da coluna e do gânglio posterior (KUMAR, 2008).

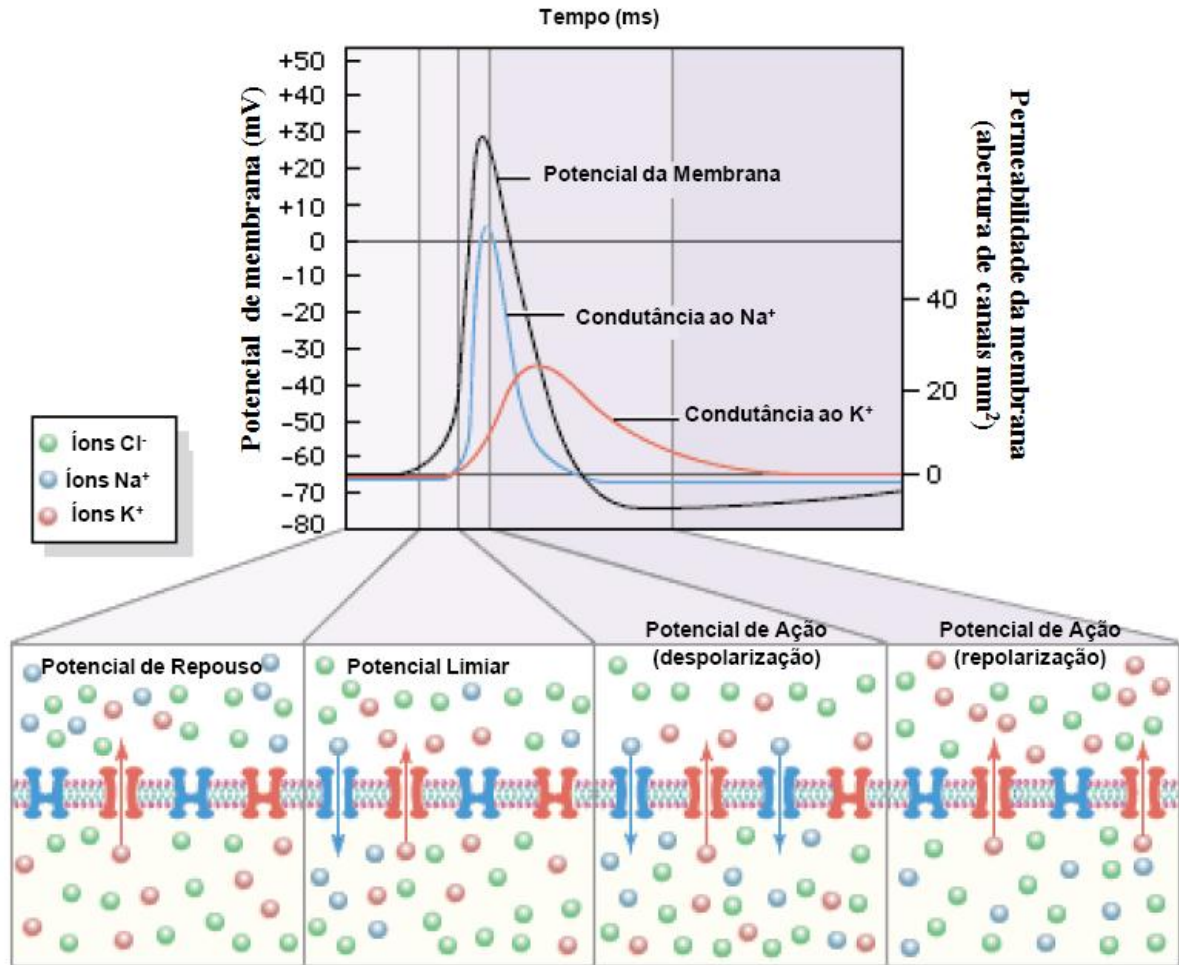
1.6 Potencial de ação

O potencial de repouso de todas as células, inclusive os neurônios, apresenta-se geralmente em torno de -70 mV. Uma das características mais significativas dos neurônios é a capacidade de alterar rapidamente seu potencial de repouso em resposta a um estímulo apropriado, e a resposta principal é o potencial de ação (KOEPPEN e STANTON, 2009).

O potencial de ação é definido como uma alteração rápida do potencial de membrana, com característica tudo ou nada e com posterior retorno ao potencial de repouso da membrana (Figura 5). A geração do potencial de ação acontece pela rápida abertura e seguida inativação dos canais de Na^+ dependentes de voltagem e também pela lenta abertura e fechamento dos canais de K^+ dependentes de voltagem. Os potenciais de ação são conduzidos ao longo da célula através de circuitos locais de corrente, sendo assim propagado e regenerado a medida que percorre o axônio, preservando, deste modo a forma e a amplitude ao passo que é conduzido (KOEPPEN e STANTON, 2009).

A base deste fenômeno é a permeabilidade seletiva da membrana a alguns íons. Em repouso, a membrana é mais permeável aos íons K^+ , onde os valores de potencial de membrana (mV) se aproximam do valor do potencial de equilíbrio eletroquímico deste íon. Uma vez excitada, essa permeabilidade seletiva pode modificar-se, acarretando uma inversão da polaridade da membrana e aumento de sua permeabilidade aos íons Na^+ . Este último estado propicia que o valor do potencial de membrana se aproxime do valor do potencial de equilíbrio eletroquímico do Na^+ . Porém, a condutância elevada aos íons Na^+ logo termina e a condutância da membrana aos íons K^+ é então aumentada, proporcionando o retorno do potencial de membrana ao seu estado inicial de negatividade por meio do efluxo de K^+ e, especialmente, por meio de um processo denominado “inativação do canal para Na^+ ” (HODGKIN e HUXLEY, 1939; HODGKIN e KATZ, 1949).

Figura 5- Alterações na permeabilidade da membrana originam o potencial de ação.



Esquerda - potencial da membrana (gradação em milivolts). Direita - permeabilidade da membrana (gradação em abertura de canais por milímetro quadrado). Permeabilidade da membrana durante o potencial de repouso, no potencial limiar de excitação, potencial de ação (despolarização) e repolarização. Figura modificada da Encyclopedia Britannica, Inc. 2002© *Apud*: Silva-Alves, (2009).

1.7 Potencial de ação composto

Nervos periféricos e várias vias centrais são constituídos por muitos axônios de vários diâmetros, alguns mielinizados, outros não, em consequência disso às velocidades de propagação dos potenciais de ação também variam, por tanto o registro do nervo revela uma série de picos que variam com o tempo (representando a velocidade de condução de conjuntos de axônios) e a amplitude do pico (representando o número de axônios em cada grupo de velocidades). Isso é denominado potencial de ação composto (PAC) (KOEPPEN e STANTON, 2009).

Os grupos de axônios de um determinado nervo influenciam no formato do PAC. O PAC apresenta natureza bifásica, que é decorrente do registro realizado com um par de eletrodos diferencial. Ao passo que o PAC se propaga através do nervo, cada eletrodo registra a alteração de voltagem em relação ao outro eletrodo acarretando as fases ascendentes e descendentes. (JUNGE, 1976).

Erlanger e Gasser apud Best e Taylor, (1990) comprovaram que o registro do potencial de ação composto (PAC) exibe a presença de até três componentes α , β e γ , que mostram a ação de diferentes tipos de fibras nervosas. As fibras dos nervos periféricos foram nomeadas como grupos A, B e C, onde são considerados aspectos relativos às suas velocidades de condução, diâmetro e amplitude de resposta (Tabela 1). As fibras de diâmetros maiores possuem uma velocidade de condução mais elevada, maior amplitude de resposta elétrica, menor limiar de excitação e curta duração da resposta e do período refratário (HURSH, 1939; GASSER, 1943).

As fibras consideradas mais calibrosas são as fibras A, e as fibras C as mais delgadas. A velocidade de condução para as fibras menores se situa entre 5 m/s ou menos, enquanto para as maiores pode atingir até 120 m/s. Essas fibras mais calibrosas detêm maior amplitude de resposta, reduzido limiar de excitação, menor duração de resposta e período refratário igualmente curto. Este grupo de fibras é o que de forma quantitativa, mais colabora para o potencial de ação composto (BEST E TAYLOR, 1990). Tais fibras podem ser encontradas em nervos somáticos como o isquiático e o safeno.

As fibras A são todas mielinizadas e subdivididas em fibras alfa (13-20 μm), fibras beta (6-13 μm), fibras gama (3-8 μm) e fibras delta (1-5 μm). As fibras C têm uma espessura variante entre de 0,5-1 μm e velocidade de condução de 0,5 a 2 m/s. O tipo de impulso transmitido também está relacionado com o tipo de fibra que o transmite. Fibras de condução rápida, como A alfa, A beta e A gama, conduzem estímulos de propriocepção, tato entre

outros, enquanto fibras A delta e C, que são mais lentas, conduzem estímulos dolorosos. Sendo possível também que a condução de impulsos táteis e térmicos intensos de frio e calor sejam conduzidos por fibras A delta e estímulos químicos, coceira e térmicos de calor e frio sejam conduzidos por fibras C (OKESON, 2005). As fibras do tipo B são mielinizadas, possuem diâmetros entre 1 a 3 μm e velocidade de condução de 3 a 15 m/s. São essencialmente dos nervos autonômicos pré-ganglionares. As fibras do tipo C não são mielinizadas, exibem diâmetros inferiores a 1 μm e velocidades de condução de cerca de 2 m/s, sendo geralmente identificadas em nervos cutâneos e viscerais (BEST E TAYLOR, 1990).

TABELA 1 – Classificação das fibras nervosas de mamíferos. A classificação do grupo I a IV emprega-se exclusivamente a fibras sensoriais.

Tipo	Grupo	Diâmetro (μm)	Velocidade de Condução (m/s)	Função
A α		15-20	50-120	Fibras motoras para músculo esquelético
A α	Ia	15-20	70-120	Terminações primárias no fuso muscular
A α	Ib	12-20	70-120	Aferentes no órgão tendinoso de Golgi
A β	II	5-10	30-70	Terminações secundárias nos fusos musculares, tato, pressão
A γ		3-6	15-30	Inervação motora dos fusos musculares
A δ	III	2-5	5-25	Receptores de pressão e dor rápida e aguda e temperatura
B		3	3-15	Pré-ganglionares autonômicas
C		0.5-1	0.5-2	Pós-ganglionares autonômicas (não-mielinizadas)
C	IV	0.5-1	0.5-2	Dor lenta e difusa e temperatura (não-mielinizadas)

Fonte: AIDLEY, 1998.

RELEVÂNCIA

2. RELEVÂNCIA

A necessidade de descobrir novos compostos que venham a curar, amenizar ou prevenir enfermidades que acometem a humanidade, instiga a indústria farmacêutica a buscar nos vegetais, compostos para a produção de novas drogas.

O Brasil é, reconhecidamente, uma fonte de riquezas naturais. Sua flora abriga espécies de caráter medicinal, como é o caso da *Lippia alba*, que é um vegetal presente na fitoterapia popular por apresentar uma vasta diversidade de ações medicinais. Na literatura, encontramos confirmação da eficácia do óleo essencial extraído de suas folhas frente a vários distúrbios que acometem o sistema nervoso central. Contudo, estudos que envolvam a ação desse óleo sobre o sistema nervoso periférico ainda são escassos. Assim, torna-se importante analisar a ação tanto do óleo essencial da *Lippia alba* quanto do Citral (constituente majoritário do vegetal a ser estudado) sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo isquiático.

Como afirma Bennett e Xie, (1998) o nervo isquiático é muito utilizado para estudos que envolvem nocicepção, mais precisamente dor neuropática. Além do mais, a ação do Citral sobre canais TRP confirmada por Stotz e colaboradores, (2008), dá margem a pesquisas focadas na fibra nervosa, visto que o autor centrou o seu trabalho no gânglio da raiz dorsal (local onde se concentram os corpos neurais), não observando a atividade do composto sobre os axônios.

De acordo com Stotz et al., (2008) o constituinte Citral pode confirmar sua superior utilidade se comparado a capsaicina no tocante a alodinia, comichão, ou outros tipos de dor que afetam os nervos sensoriais e superficiais da pele.

Por fim, ante os dados disponíveis, fica demonstrada a relevância da proposta, que visa contribuir para melhor avaliar das ações do óleo essencial de *Lippia alba*, e do Citral sobre o sistema nervoso periférico ao estudar as alterações na condutibilidade e excitabilidade neural no nervo isquiático.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as alterações produzidas pela ação do óleo essencial de *Lippia alba* (OELa) e do Citral sobre a excitabilidade e condutibilidade neural.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar o efeito do OELa e Citral sobre a amplitude pico-a-pico, amplitude positiva, duração e velocidade de condução dos componentes do PAC de nervo isquiático de ratos;

Determinar a concentração que inibe 50% da amplitude pico-a-pico do PAC (CI_{50}) tanto para OELa quanto para o Citral e verificar os efeitos desta concentração sobre os parâmetros de cronaxia e reobase;

Comparar os efeitos do OELa nos parâmetros eletrofisiológicos: reobase, cronaxia, amplitude pico-a-pico, amplitude positiva, duração e velocidade de condução dos componentes do PAC em nervo isquiático com os efeitos de seu constituinte majoritário.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos da pesquisa

O projeto com protocolos relativos à pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais com parecer nº 01/2013.1. Todos os procedimentos estão em conformidade com os princípios regidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

As metodologias experimentais foram efetivadas nas dependências do Laboratório de Eletrofisiologia localizado no Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.2 Delineamento da pesquisa

A pesquisa realizada é de cunho experimental randomizada e quantitativa. Modelos animais foram veículos para a aquisição de informações relativas à ação farmacológica das substâncias examinadas.

4.3 Óleo essencial de *Lippia alba*

O óleo essencial de *Lippia alba* foi fornecido pelo Prof. Dr. Sergio Horta e analisado por meio da técnica de cromatografia gás-líquida acoplada a espectrometria de massa sob responsabilidade do Dr. Craveiro no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.4 Citral

O Citral, o agente solubilizante, assim como todos os sais empregados no preparo das soluções, foram obtidos junto a Sigma-Aldrich (St. Louis-EUA).

4.5 Animais

Para a efetivação dos experimentos, foram utilizados ratos da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, com massa corporal entre 200 e 350g, de ambos os sexos, escolhidos

randomicamente, oriundos do biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará.

Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas com livre acesso à água potável e ração específica para roedores, como orientam as diretrizes bioéticas (BAZZANO, 2006) e as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios (CARDOSO, 1998-2001).

4.6 Solução nutritiva

No intuito de nutrir o tecido nervoso fez-se uso de solução de Locke modificada com composição em milimolar (mM): - NaCl: 140, KCl: 5,6, MgCl_2 : 1,2, CaCl_2 : 2,2, Tris-Hidroximetil-Aminometano (TRIS): 10, Glicose: 10. O pH da solução de Locke foi ajustado para $7,4 \pm 0,01$ utilizando Hidróxido de sódio (NaOH) ou Ácido clorídrico (HCl) à temperatura ambiente.

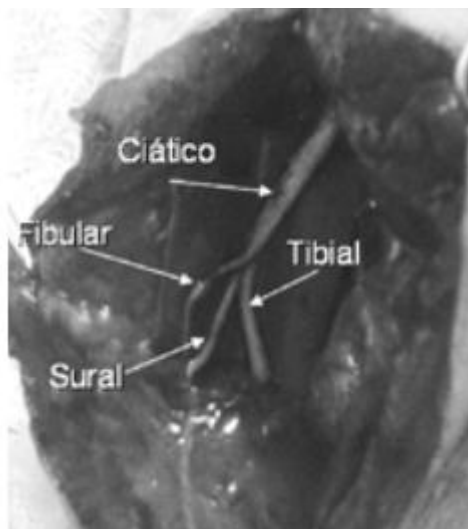
4.7 Drogas

Para a preparação do óleo essencial *Lippia alba* e do Citral, ambos de consistência oleosa, foi necessário, inicialmente, solubilizá-lo em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,2% da totalidade da solução e em seguida diluí-lo em solução de Locke modificada para obter as concentrações de trabalho almejadas (300, 100, 60, 30, 10 e 3 $\mu\text{g/mL}$).

4.8 Obtenção do tecido

Os animais foram sacrificados em atmosfera de CO_2 , em seguida, cautelosamente submetidos à cirurgia de dissecação dos nervos isquiáticos da origem à inserção (Figura 6). Ao término da extração, foram imediatamente acondicionados em solução de Locke modificada, à temperatura ambiente, até o momento de sua utilização.

Figura 6 – Nervo isquiático e seus ramos



Fonte: Adaptada de Souza, 2011.

4.9 Registro extracelular

Para a obtenção dos registros do PAC (Figura 7), a câmara de registro (câmara de Harvard) foi preenchida com 8 ml de solução de Locke e o nervo posicionado horizontalmente sobre os eletrodos de platina desta câmara. Uma alça de aproximadamente 20 milímetros do nervo ficou submersa na preparação a fim de que, por capilaridade, a solução, bem como as drogas (OELa e Citral) nas concentrações estabelecidas, fossem administradas ao tecido. A câmara foi mantida hermeticamente fechada para evitar a desidratação da preparação.

Uma das extremidades do nervo foi eletricamente estimulada por pares de eletrodos acoplados a um estimulador de Grass, modelo S-48 (Grass Instrument Co.; Quincy, MA, USA), por meio de uma unidade isoladora de estímulo Grass, modelo SIU 4678 (Grass Instrument Co.). O pulso gerado pelo estimulador foi do tipo onda quadrada, com amplitude de 40 Volts, duração de 100 μ s e aplicados a uma frequência de 0,2 Hz, que ao chegar à preparação e evocou o potencial de ação que se propagou ao longo do nervo isquiático.

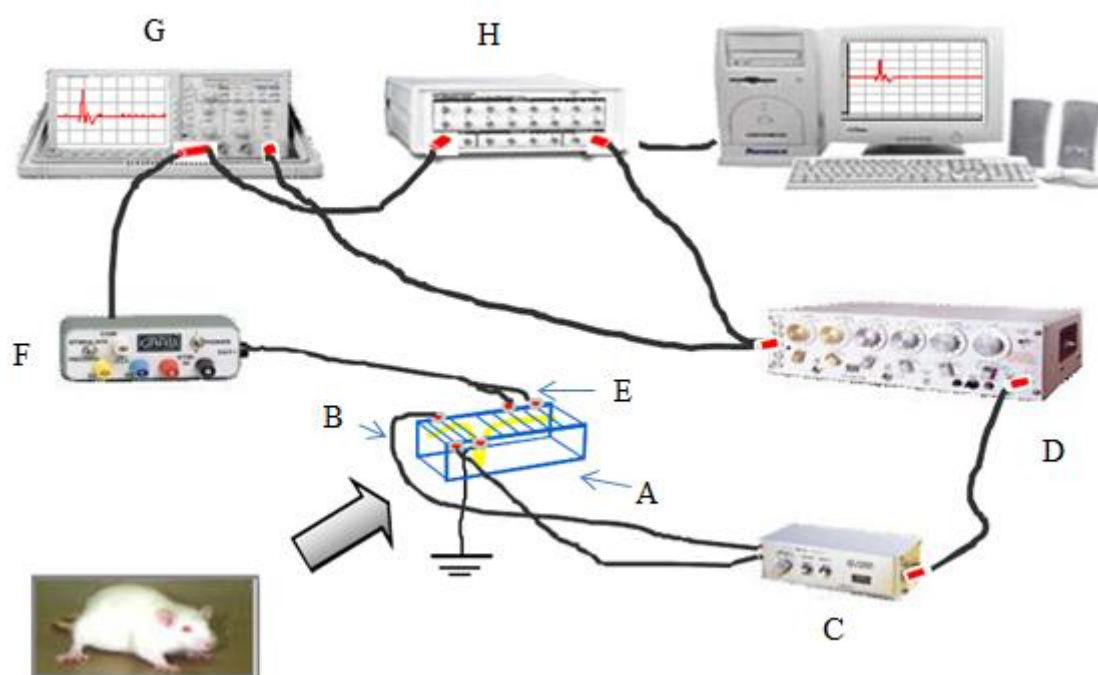
O PAC evocado foi coletado por eletrodos de registro na outra extremidade do nervo. O sinal foi aumentado em 1000X por um amplificador (AM 01/UECE) de alta impedância de entrada e visualizado em osciloscópio (KENWOOD, modelo CS4125).

Uma placa de interface análogo-digital (A/D) (DIGIDATA 1322A) possibilitou a transformação, leitura e armazenamento do sinal em um computador por meio do software

(AxonScope, da Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) para posterior análise dos dados.

O registro extracelular e a armazenagem dos dados foram realizados de acordo com técnicas descritas na literatura (WEINREICH et al.,1995; ALBUQUERQUE et al., 1996).

Figura 7 - Esquema ilustrativo do “set up” para registro extracelular do Potencial de Ação Composto.



A- câmara de Harvard; B- eletrodos de estímulo; C- unidade isoladora de estímulo; D- estimulador; E- eletrodos de registro; F- amplificador; G- osciloscópio; H- placa de interface analógico-digital. Fonte: adaptado de: Silva-Alves, 2009.

O protocolo experimental utilizado na coleta dos dados teve duração aproximada de 8 horas, período em que comprovadamente o tecido se mantém viável, não interferindo assim nos resultados expressos. Como descrito por Cruz, (2000) durante este tempo o nervo isquiático de rato, mantido em uma câmara hermeticamente fechada sob estimulação, mantém estáveis seus valores de amplitude pico-a-pico e de velocidade de condução.

Os nervos isquiáticos passaram por um período de estabilização de 120 minutos, tempo geralmente superior ao necessário para que ocorram completas alterações nas amplitudes ou se comprovem as ausências de modificação do potencial de ação composto.

Posteriormente à estabilização, decorreu o período de experimentação (administração do OELa e do Citral nas concentrações de 3, 10, 30, 60, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) onde o nervo

permaneceu exposto aos fármacos durante 180 minutos, objetivando a evidenciação do estado estacionário do respectivo efeito. Em seguida realizou-se o período de lavagem (180 min), tempo reservado para a recuperação dos parâmetros alterados pela droga. Ao final do experimento o comprimento do tecido nervoso entre os eletrodos de estimulação e registro foi mensurado para determinação da velocidade de condução.

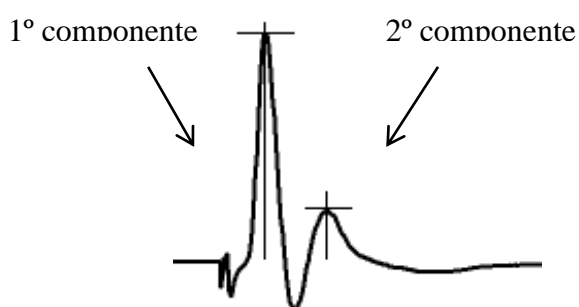
4.10 Análise Eletrofisiológica

O efeito do OELa e do Citral sobre a condutibilidade nervosa foi avaliado através das mudanças observadas na amplitude pico-a-pico, amplitude positiva, duração e na velocidade de condução dos componentes do potencial de ação composto evocado. A caracterização das alterações da excitabilidade nervosa foi obtida através da avaliação da reobase e cronaxia. A análise de todos os dados se deu por meio do software Clampfit, da Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA.

4.10.1 Amplitude Positiva

A amplitude positiva foi obtida através do pico que expressa a máxima positividade de cada componente (Figura 8).

Figura 8 - Traçado ilustrativo do cálculo da amplitude positiva do 1º e 2º componentes.

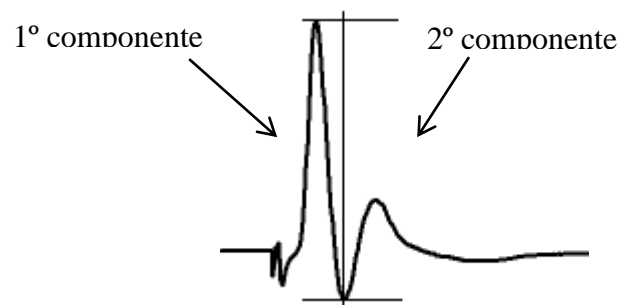


Fonte: SOUSA, D. G., 2013.

4.10.2 Amplitude Pico-a-Pico (APP)

A amplitude pico a pico foi estabelecida por meio da soma da maior amplitude positiva com o módulo da maior amplitude negativa, alcançadas no registro do potencial de ação composto (Figura 9). Segundo Meiri, (1985) a amplitude pico-pico é proporcional ao número de axônios responsáveis pela condução do impulso em uma dada velocidade.

Figura 9- Traçado ilustrativo do cálculo da amplitude pico-a-pico.

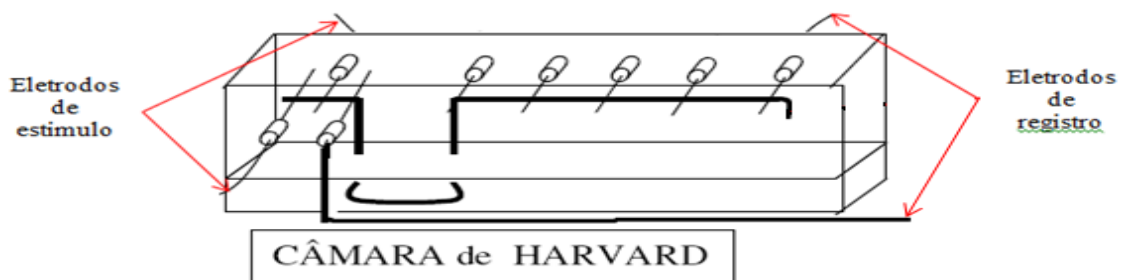


Fonte: SOUSA, D.G., 2013.

4.10.3 Velocidade de Condução

Para determinar a velocidade de condução nervosa, foi utilizada a distância percorrida pelo potencial de ação composto, a partir do eletrodo de estímulo mais próximo ao ponto de imersão do nervo na preparação, até o termino de seu percurso, no último eletrodo de registro (Figura 10).

Figura 10- câmara de Harvard.

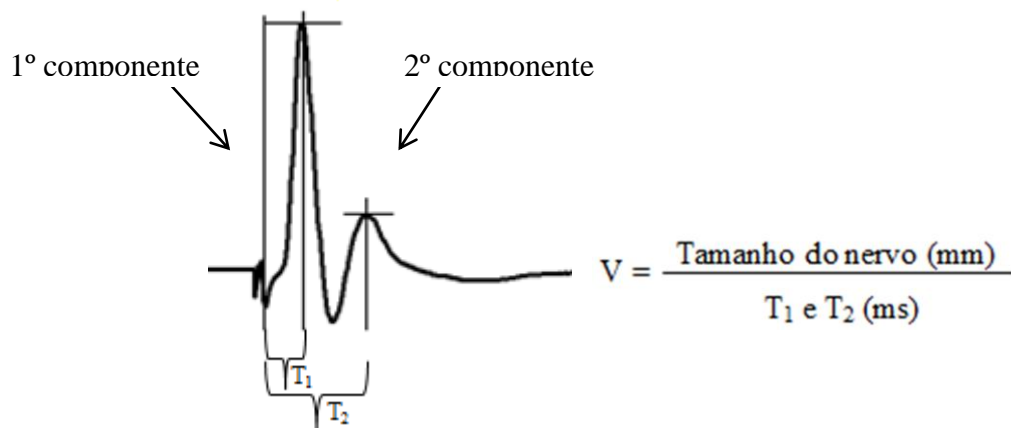


Fonte: adaptada de Mendonça, 2006.

Para definição de tempo utilizado para o cálculo da velocidade de condução, foi usado o intervalo de tempo compreendido entre o ponto de início do artefato de estímulo verificado no gráfico de registro, e o ponto onde a curvatura ascendente do gráfico de potencial de ação composto alcança o ponto máximo da amplitude.

A velocidade de condução dos componentes foi determinada pela razão entre a distância percorrida pelo potencial de ação composto (distância entre eletrodos – vide acima) e o intervalo de tempo entre o ponto inicial do artefato de estímulo e o pico positivo de cada componente (Figura 11).

Figura 11- Traçado ilustrativo do cálculo da velocidade de condução do 1º e 2º componentes.



T_1 e T_2 = o tempo usado para o cálculo da velocidade de condução do primeiro e segundo componente, respectivamente. Fonte: SOUSA, D.G., 2013.

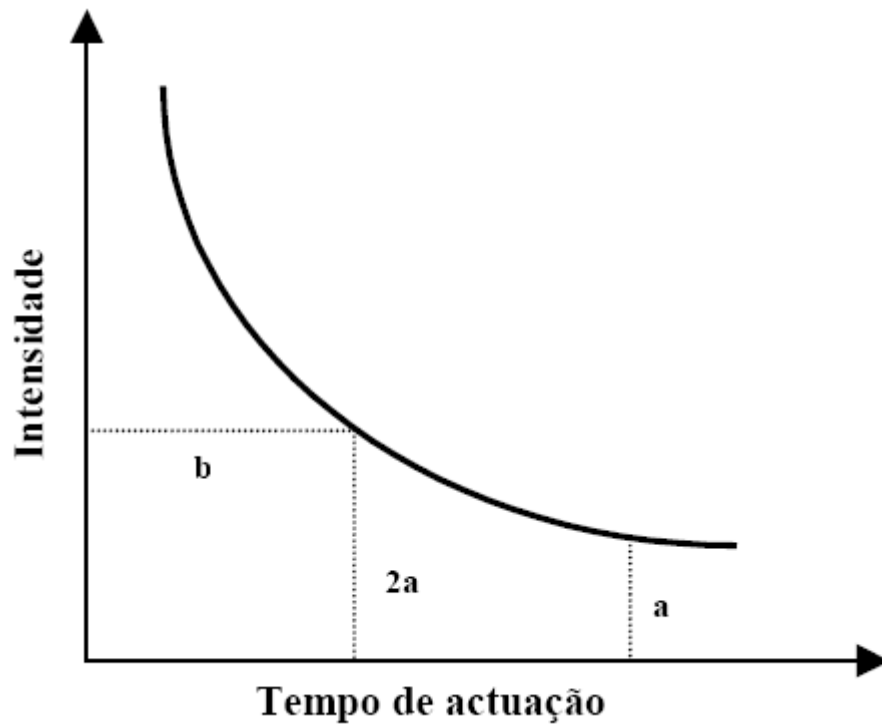
4.10.4 Reobase

Tida como a voltagem limiar capaz de produzir uma resposta ativa com uma longa duração do pulso (1000 μ s), a reobase foi medida aumentando-se a amplitude (voltagem) do pulso de onda quadrada até obterem-se os primeiros sinais da geração de potencial de ação.

4.10.5 Cronaxia

Determina a menor duração do estímulo com amplitude (voltagem) igual ao dobro do valor da reobase, capaz de desencadear o potencial de ação. Portanto, a cronaxia indica a duração limiar para uma resposta ativa quando se utiliza um pulso de voltagem igual ao dobro da reobase. (Figura 12).

Figura 12 - Curva de Excitabilidade



(a) Reobase e (b) Cronaxia. Fonte: Menezes, 2004

4.11 Análise estatística dos dados

A análise estatística foi expressa tomando como base a média \pm erro padrão da média. A letra “n” representa o total de experimentos. Para a análise estatística e confecção dos gráficos foi utilizado o software SigmaPlot[®] (versão 11.0, Systat Software). Na comparação entre duas amostras foram utilizados o teste t-student pareado. Enquanto para comparações múltiplas realizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, prosseguindo-se de teste para contraste (Dunnett`s ou Dunn`s). Sendo consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise química do óleo essencial

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 2).

Tabela 2 – Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Lippia alba*.

TEOR (%)	COMPOSTO
41,81	GERANIAL
34,11	NERAL
9,85	1-LIMONENE
8,92	CARVONE
2,05	GAMMA-TERPINENE
1,00	BENZENE, 1-METHYL-3-(1-METHYLETHYL)
0,72	6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE
0,58	ALPHA-HUMULENE
0,50	LINALOOL
0,47	BETA-PINENE

5.2 Valores controle dos parâmetros eletrofisiológicos do nervo isquiático

Ao estimular nervos isquiáticos a 0,2 Hz, os valores controles referentes a amplitude pico-a-pico, amplitude positiva, duração e velocidade de condução estão descritos na tabela 3.

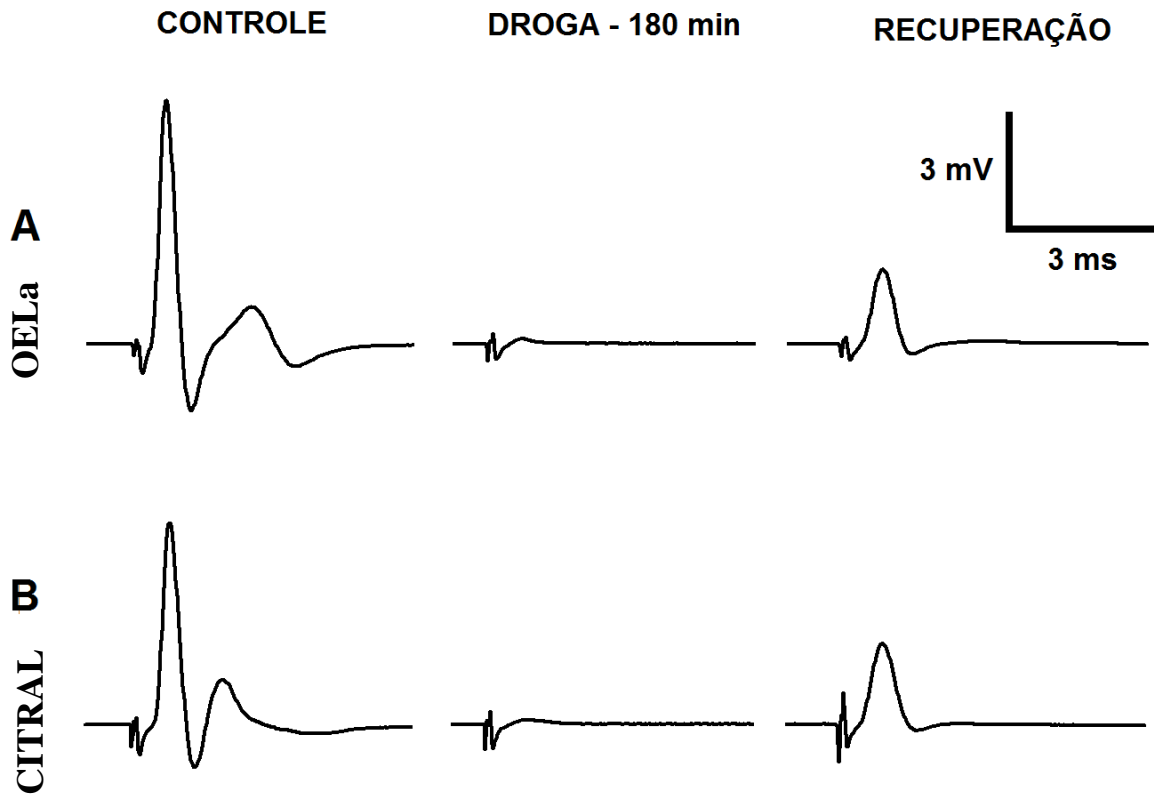
Tabela 3 - Tabela de valores controle

	Controle	(n)
APP	7,13 ± 0,27 mV	87
Amplitude positiva – 1º componente	5,49 ± 0,21 mV	81
Amplitude positiva – 2º componente	2,24 ± 0,13 mV	81
Duração – 1º componente	0,40 ± 0,01 mV	81
Duração – 2º componente	0,78 ± 0,03 m/s	81
Velocidade – 1º componente	85,40 ± 2,34 m/s	81
Velocidade – 2º componente	30,84 ± 1,11 m/s	81
Reobase	3,49 ± 0,22 V	17
Cronaxia	51,52 ± 2,34 µs	17

5.3 Efeitos do OELa e Citral sobre o PAC do nervo isquiático de ratos.

O óleo e o Citral apresentou uma redução da amplitude da primeira e segunda componente do potencial de ação composto (Figura 13). O efeito depressor concentração dependente foi constatado tanto para o OELa quanto para o Citral. Na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ambas as drogas foi possível observar o bloqueio total do 1º e 2º componente, com recuperação parcial do 1º componente aos 180 minutos de lavagem.

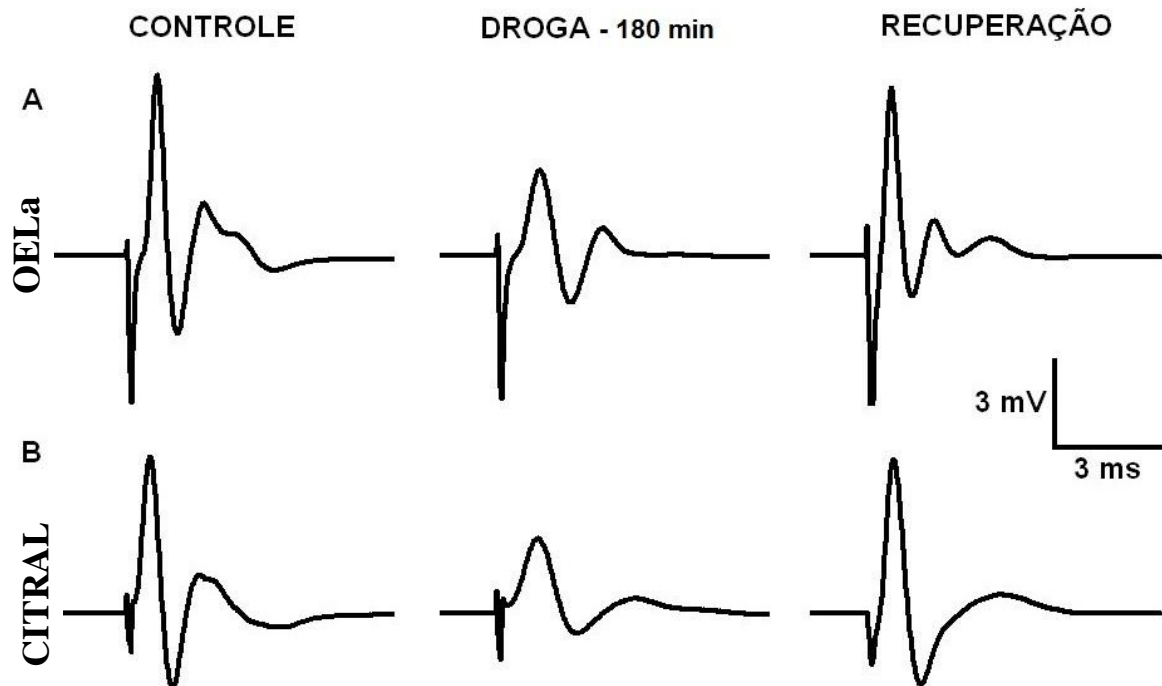
Figura 13- Traçados representativos do efeito do OELa e do Citral na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre o PAC de nervo isquiático de ratos.



OELa na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A), e Citral na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B). Controle (coluna da esquerda), aos 180 minutos de exposição (coluna do centro), aos 180 minutos de recuperação (coluna da direita).

A concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ tanto do OELa quanto do Citral bloquearam aproximadamente 50 % das amplitudes do PAC, e mostraram uma recuperação total do 1º componente e parcial do 2º componente (Figura 14).

Figura 14- Traçados representativos do efeito do OELa e do Citral na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ sobre o PAC de nervo isquiático de ratos.



OELa na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ (A), e Citral na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ (B). Controle (coluna da esquerda), aos 180 minutos de exposição (coluna do centro), aos 180 minutos de recuperação (coluna da direita).

5.4 Efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC.

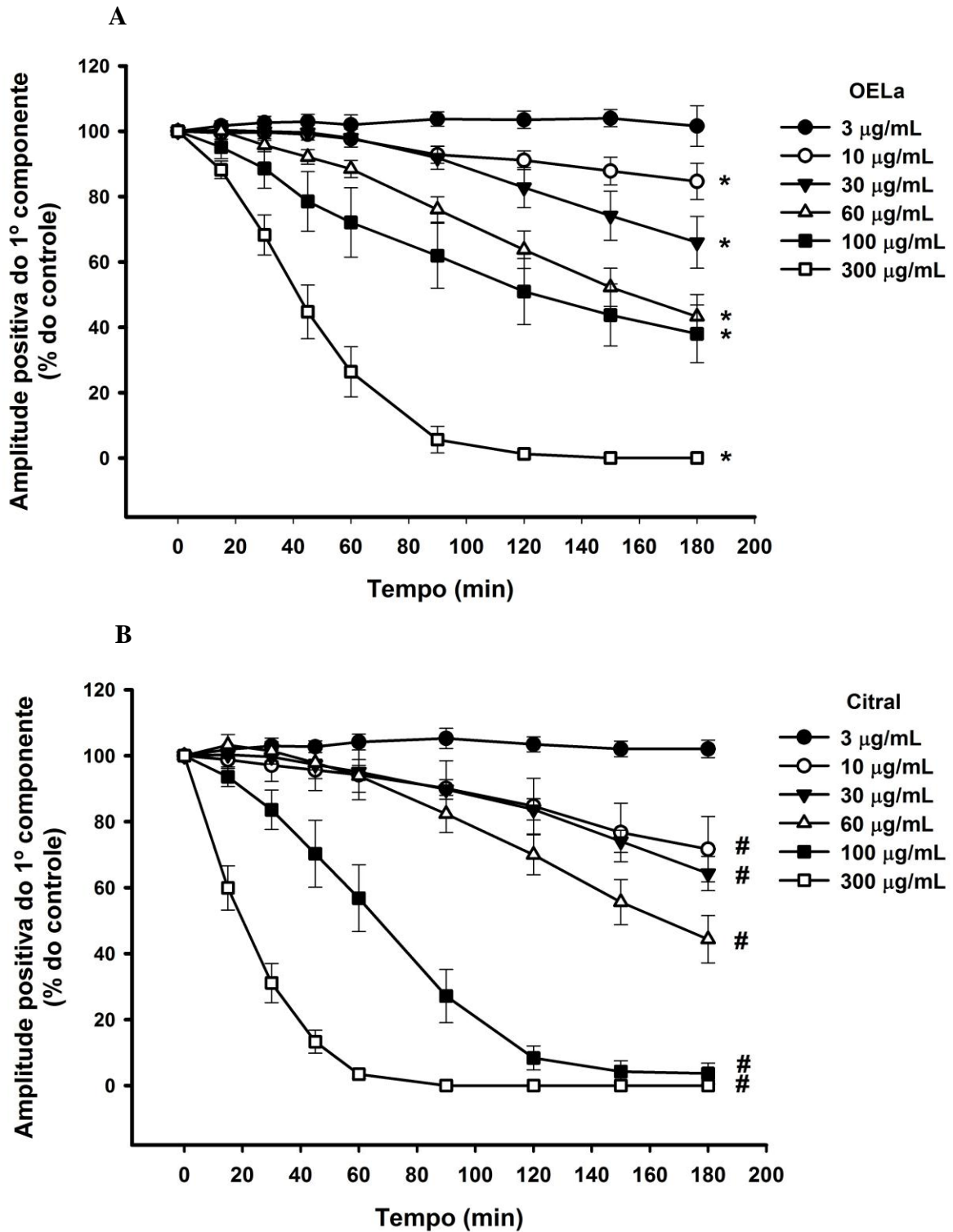
O OELa e o Citral apresentaram efeito depressor concentração-dependente para as amplitudes positivas do primeiro componente do PAC (Figura 15a). Sendo que o Citral apresentou um bloqueio mais rápido se comparado ao OELa em todas as concentrações analisadas, exceto em 3 µg/mL do OELa (n=4) e do Citral (n=5) que não se mostrou estatisticamente significativo em comparação ao controle (ANOVA e Teste t pareado).

Ao fim de 180 minutos de exposição do nervo isquiático ao OELa, houve um bloqueio da amplitude positiva do 1º componente para $84,65 \pm 5,55$ (n=5), $66,00 \pm 7,91$ (n=7), $43,27 \pm 6,79$ (n= 8), e $38,02 \pm 8,83\%$ (n=13) em comparação ao controle, nas concentrações de 10, 30, 60 e 100 µg/mL respectivamente. As reduções foram estatisticamente significantes em comparação ao controle ($p < 0,05$, ANOVA e teste t pareado).

Semelhante ao OELa, o Citral bloqueou a amplitude positiva do 1º componente, ao fim de 180 minutos de exposição do nervo isquiático, para $71,68 \pm 9,89$ (n=8), $64,30 \pm 5,19$ (n=7), $44,35 \pm 7,18$ (=8) e $3,67 \pm 3,16 \%$ (n=4) do valor do controle nas concentrações de 10, 30, 60 e 100 µg/mL respectivamente (Figura 15b). Os valores apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, ANOVA e teste t pareado).

A concentração de 300 µg/mL do OELa (n=6) e do Citral (n=6) inibiu totalmente o primeiro componente, sendo que com o OELa o bloqueio total se deu em média aos 150 minutos e na presença do Citral aos 90 minutos de exposição do nervo.

Figura 15 – Tempo de curso do efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do primeiro componente do PAC.



Os dados foram expressos em percentuais do controle e estão apresentados como média + erro padrão da média. *($P < 0,05$) representa significância do OELa em comparação ao controle; # ($P < 0,05$) do Citral em relação ao controle (ANOVA ou Test t pareado).

5.5 Efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do segundo componente do PAC.

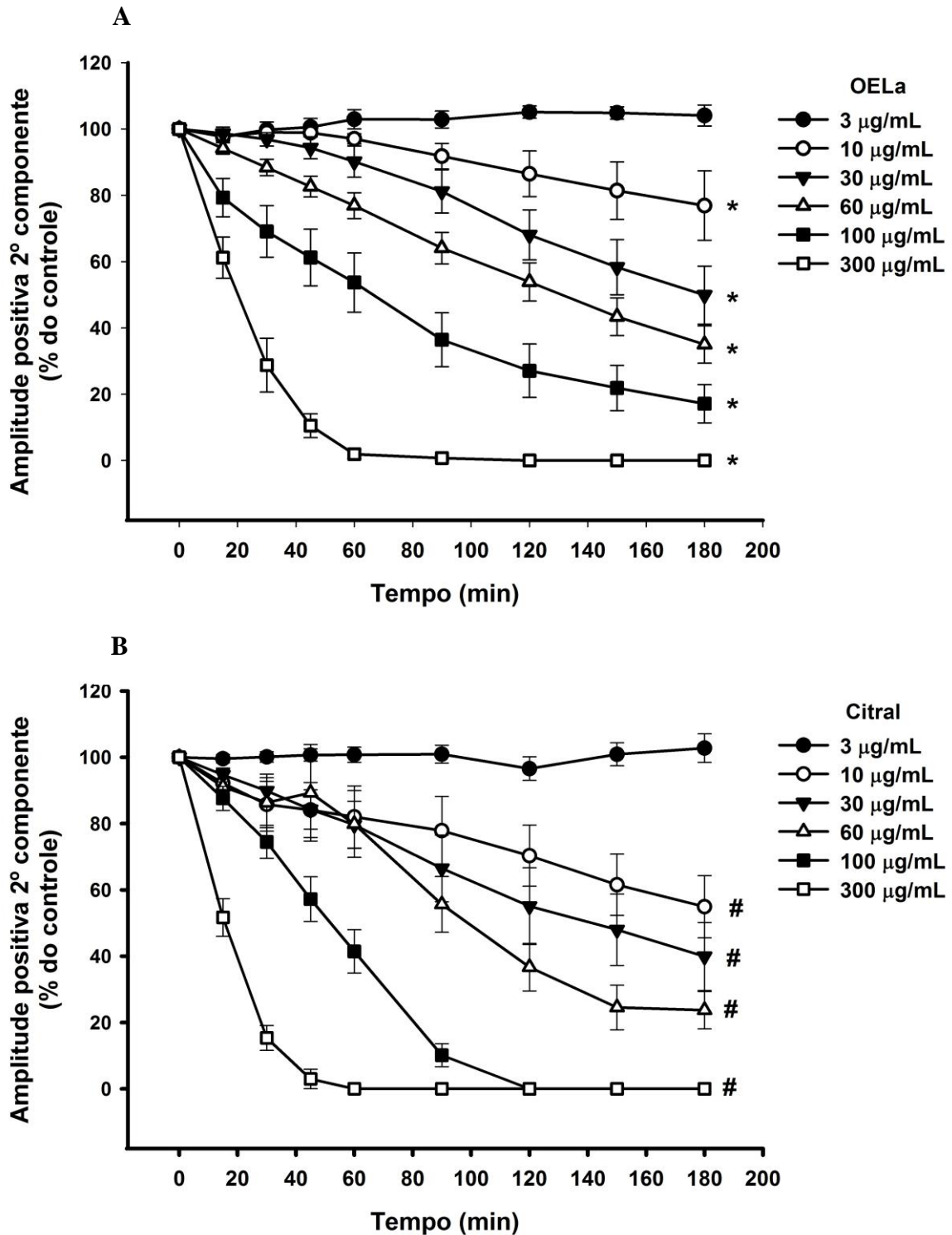
Ao final dos 180 minutos de exposição do nervo isquiático ao OELa e ao Citral, a amplitude positiva do segundo componente foi significativamente reduzidas em todas as concentrações, exceto para a de 3 µg/mL (n=5) (ANOVA e Teste t pareado).

Nas concentrações de 10, 30, 60 e 100 µg/mL do OELa o segundo componente foi inibido do valor do controle para $76,90 \pm 10,46$ (n=5), $49,89 \pm 8,75$ (n=7) $35,02 \pm 5,62$ (n=8) e $17,15 \pm 5,76\%$ (n=13) respectivamente. O bloqueio total se deu na concentração de 300 µg/mL, aos 120 minutos de exposição do nervo à droga (Figura 16a).

Enquanto o Citral nas mesmas concentrações de 10, 30, 60 µg/mL reduziu a amplitude do componente para $54,94 \pm 9,38$ (n=8), $39,93 \pm 10,25$ (n=7) e $23,73 \pm 5,65\%$ (n=8) do percentual do controle respectivamente.

Nas concentrações de 100 e 300 µg/mL de Citral foi observada uma redução total da amplitude positiva do segundo componente em relação ao controle, sendo que em 100 µg/mL o bloqueio total foi apresentado aos 90 minutos e para 300 µg/mL de Citral o mesmo foi notado durante a primeira à hora de exposição do nervo (Figura 16b).

Figura 16 - Tempo de curso efeito do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do segundo componente do PAC.



Os dados foram expressos em percentuais do controle e estão apresentados como média \pm erro padrão da média. *($P < 0,05$) representa significância do controle com o OELa; # ($P < 0,05$) do controle com o Citral. (ANOVA ou Test t pareado).

5.6 CI₅₀ % do efeito do OELa e do Citral sobre os componentes do PAC.

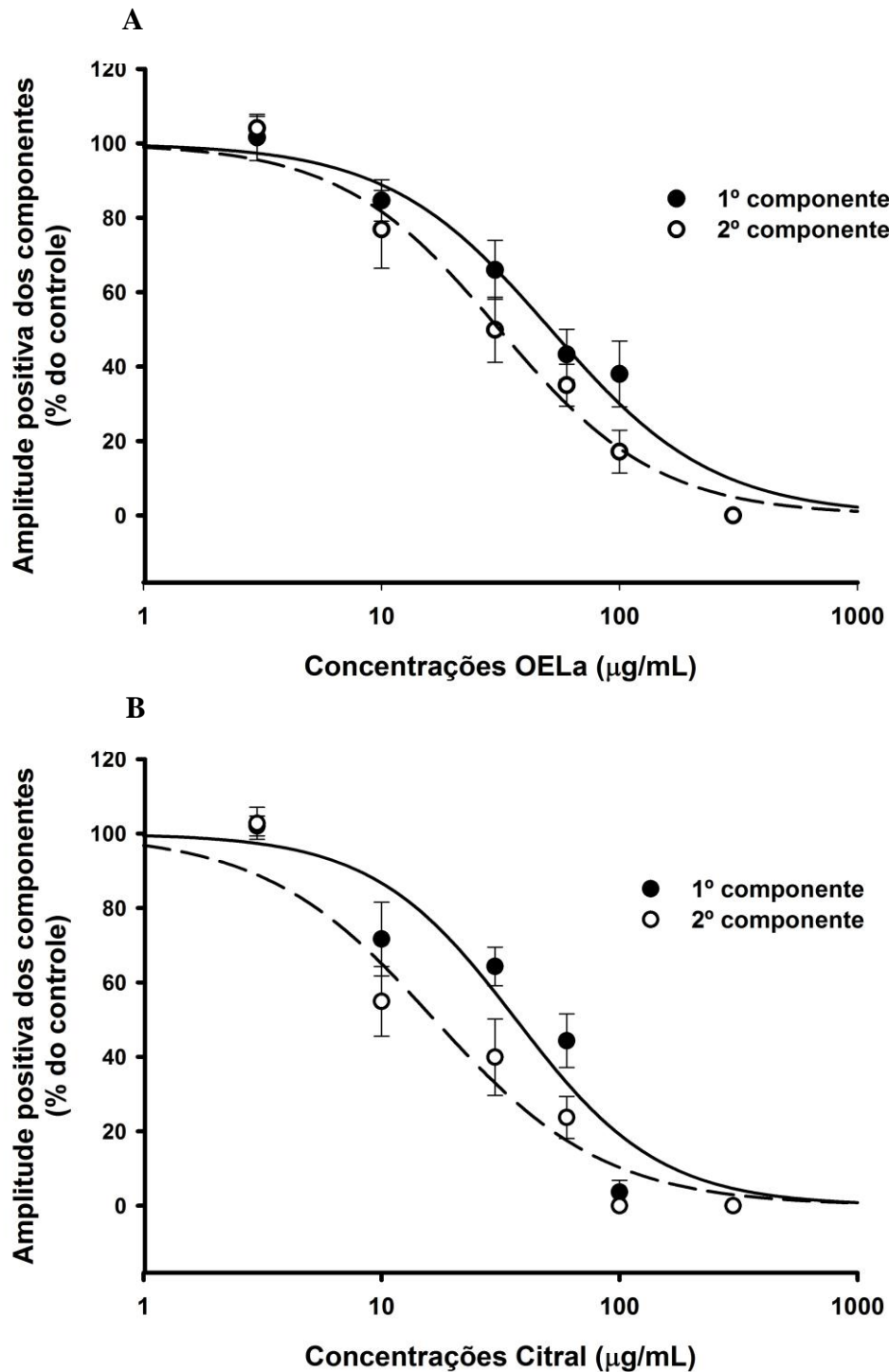
Estabelecemos também a concentração em que se obteria 50 % do bloqueio da amplitude positiva dos componentes do PAC. Para o primeiro e segundo componente, a concentração em que se desenvolveria 50% do efeito do OELa foi de 51,34 µg/mL e 31,29 µg/mL, respectivamente (Figura 17a). Enquanto para o Citral, essas concentrações foram para o primeiro e segundo componentes respectivamente 36,78 µg/mL e 16,70 µg/mL (Figura 17b).

Todas as concentrações do OELa recuperaram, sendo que a concentração de 10 µg/mL foi a única que recuperou totalmente em ambos os componentes. Foi possível observar que o primeiro componente mostrou um melhor retorno aos parâmetros do controle.

Comportamento parecido foi demonstrado pelo Citral, que não mostrou recuperação apenas para o segundo componente na concentração de 300 µg/mL. Da mesma forma que para o OELa a concentração de 10 µg/mL foi a única que ao final do tempo destinado para a recuperação teve sua amplitude positiva reestabelecida para ambos os componentes.

Nenhuma das recuperações para o OELa (60, 100 e 300 µg/mL), e para o Citral (30, 60, 100 e 300 µg/mL) as quais se aplicou o teste estático ANOVA, mostrou-se estatisticamente semelhante ao controle, exceto para o segundo componente submetido a 300 µg/mL de Citral. Para as demais concentrações foi aplicado o teste t pareado, não sendo possível a comparação da recuperação com o controle (Anexo – Tabelas - 3, 4, 5 e 6).

Figura 17 – Curva concentração resposta do OELA e do Citral sobre a amplitude positiva dos componentes do PAC.



Concentrações de 3, 10, 30, 60, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ do OELA e do Citral sobre as amplitudes positivas do PAC em nervo isquiático de ratos, após 180 minutos de exposição. Os dados foram expressos em percentuais do controle e estão apresentados como média + erro padrão da média. *($P < 0,05$) representa significância do OELA em relação ao controle; # ($P < 0,05$) do Citral em comparação ao controle (ANOVA ou Test t pareado).

5.7 Efeito e recuperação do OELa e do Citral sobre a APP do PAC.

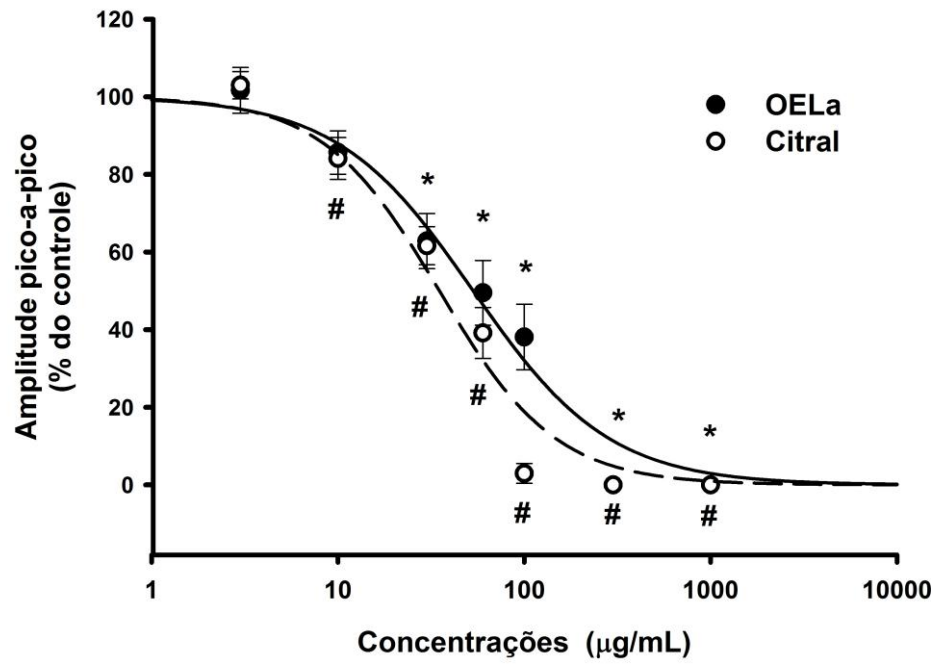
A APP na presença do OELa e do Citral sofreu um decréscimo de caráter concentração-dependente (Figura 18).

Na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (n=4) do OELa não provoca redução da APP, ao passo que esse efeito depressor sobre a APP começou a ser observado na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (n=5) para o OELa, porém somente a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ que reduziu para $(62,83 \pm 7,10 \text{ n}=7)$ (Teste t pareado; $p < 0,05$) essa redução foi considerada estatisticamente significativa em relação ao controle. Ao final dos 180 minutos de exposição às concentrações de 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$ a APP foi reduzida respectivamente para $49,51 \pm 8,34 \%$ (n=8) e $38,11 \pm 8,43 \%$ (n=13), mostrando-se estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$, ANOVA; Dunnett's). O bloqueio completo da APP foi obtido na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ (n=6) ($p < 0,05$, ANOVA; Dunn's). A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ bloqueio totalmente a APP do PAC.

Semelhante ao que foi visto para o OELa, o Citral na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ (n=5) não demonstrou efeito inibidor sobre a APP. A partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ o Citral reduziu para $84,09 \pm 5,38 \%$ (n=6) a APP apresentando diferença estatística em comparação ao controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Em 30 $\mu\text{g/mL}$ (n=7) a APP foi reduzida para $61,62 \pm 4,91 \%$ do valor do controle ($p < 0,05$, ANOVA; Dunnett's). Enquanto em 60 $\mu\text{g/mL}$ (n=7) a APP diminuiu sua amplitude para $39,17 \pm 6,58 \%$ (n=8) se comparado ao controle ($p < 0,05$, ANOVA; Dunnett's). Na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ (n=7) ao final dos 180 minutos de exposição à droga, a APP caiu para $2,95 \pm 2,54 \%$ (n=4) em comparação ao controle ($p < 0,05$, ANOVA; Dunn's). Aos 90 minutos a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ de Citral (n=6) inibiu totalmente a APP do PAC do nervo isquiático de ratos ($p < 0,05$, ANOVA; Dunn's). A concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ foi incluída no estudo apenas com o intuito de mostrar uma continuidade da curva concentração-efeito da APP, tanto para o OELa (n=3) e quanto para o Citral (n=3).

O tempo de observação da recuperação da APP para o OELa e para o Citral foi de 180 minutos. Todas as concentrações estudadas mostraram-se parcialmente reversíveis ao final do tempo estipulado, sendo que OELa apresentou maior reversão em todas se comparado ao Citral. Apenas a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ do Citral se mostrou estatisticamente diferentes do valor controle ($p < 0,05$, ANOVA; Dunn's) (Anexo – Tabelas – 7 e 8).

Figura 18 – Curva concentração-efeito do OELa e do Citral sobre a APP do PAC.



Os dados foram expressos em percentuais do controle e estão apresentados como média \pm erro padrão da média $n= 87$. *($P < 0,05$) representa significância do OELa em comparação ao controle. # ($P < 0,05$) significância do Citral em comparação ao controle (ANOVA e Test t pareado).

5.8 Efeito do OELa e do Citral sobre a reobase e cronaxia do PAC.

Na curva concentração-efeito da APP foi possível identificar desde a concentração que não esboçou nenhum bloqueio, a concentração de efeito intermediário, até a obtenção da concentração que inibiu completamente a APP, permitindo o cálculo da concentração em que se obtém 50% do bloqueio (CI₅₀) (Figura 19).

Figura 19 – Equação logística de quatro parâmetros

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-Hillslope}}$$

Fonte: SIGMA PLOT, 2013.

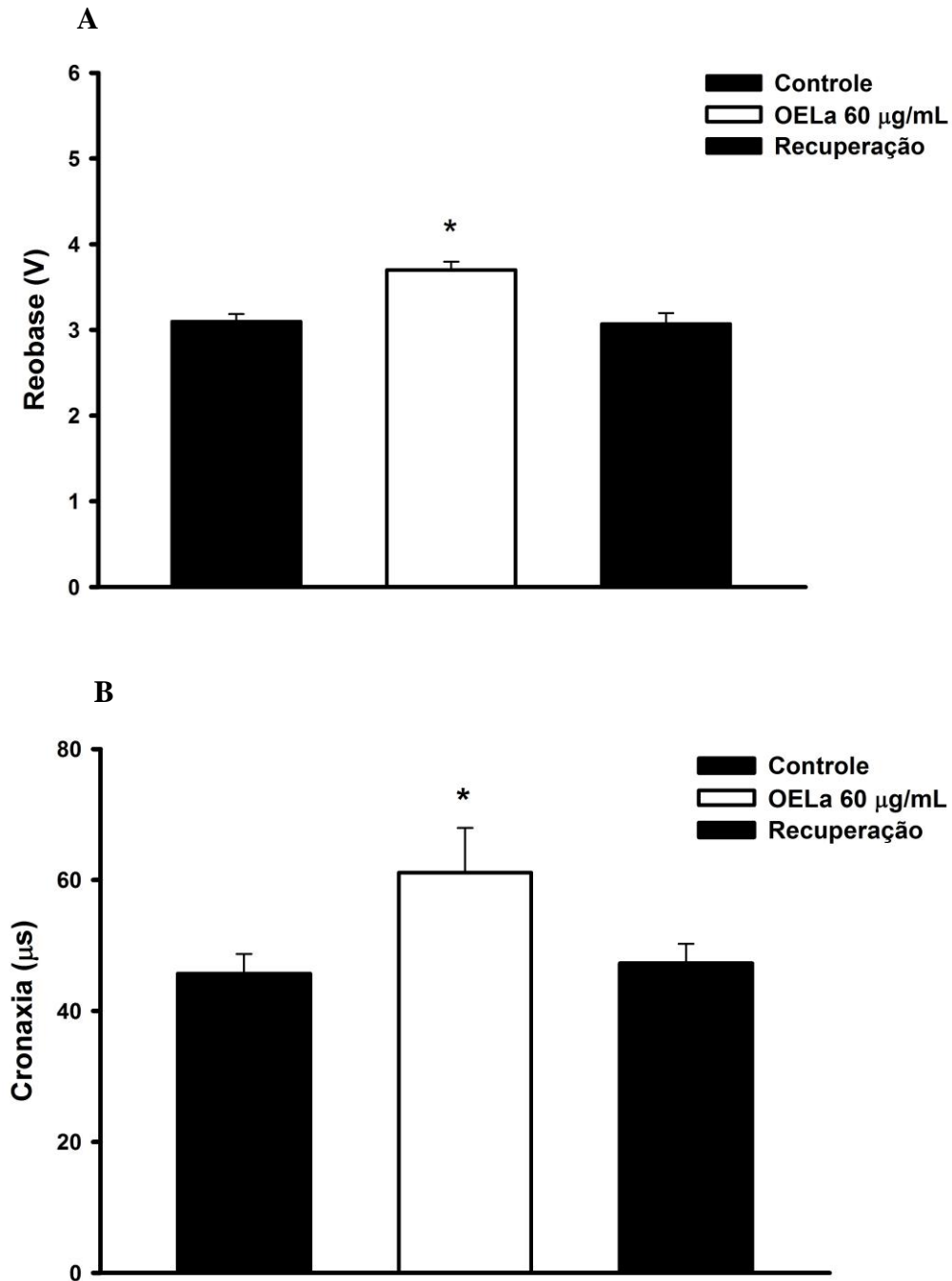
A equação nos permitiu identificar que os valores de CI₅₀ para o OELa e para o Citral que foram respectivamente (53,19 µg/mL e 35,05 µg/mL).

Em meio a todas as concentrações avaliadas, 60 µg/mL de OELa e 30 µg/mL de Citral foram as que apresentaram efeitos intermediários mais aproximados aos valores da concentração na qual ocorre 50 % do efeito inibitório (CI₅₀) da APP. Sendo, por tanto, utilizadas para a coleta da reobase e cronaxia

Para o OELa em situação controle o valor da reobase foi de 3,10 ± 0,08 V (n=7), ao término dos 180 minutos de exposição do nervo a droga esse valor subiu para 3,70 ± 0,09 V (Figura 20a). A cronaxia no controle foi de 45,71 ± 2,98 µs (n=7), ao final dos 180 minutos passou a 61,14 ± 6,80 µs (Figura 20b). Estes valores foram estatisticamente diferentes do controle.

A alteração no valor da reobase foi completamente revertida após o período de lavagem (ANOVA; Dunn's). Enquanto o valor da cronaxia foi parcialmente reestabelecido.

Figura 20 - Efeito e recuperação do OELa sobre a reobase e cronaxia do PAC.

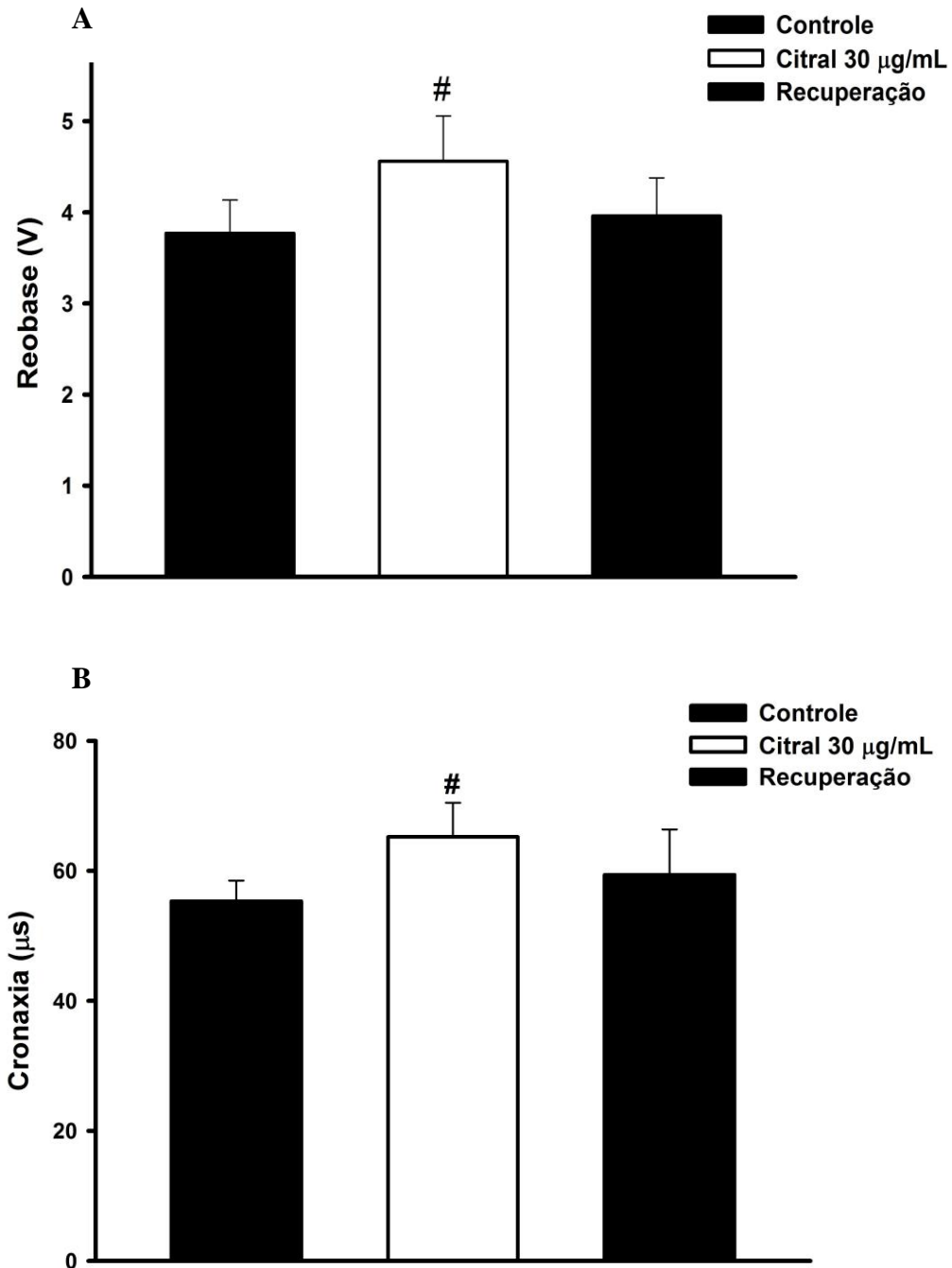


Tempo controle, aos 180 minutos de exposição do nervo isquiático a 60 µg/mL do OELa e após 180 minutos de lavagem. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média, n=7. *(P < 0,05) comparado ao controle (ANOVA; Dunn's; Teste t pareado).

Para o Citral na concentração de 30 µg/mL, a reobase variou de $3,83 \pm 0,40$ V (n=9) no controle, para $4,66 \pm 0,54$ V ao final dos 180 minutos de exposição do nervo à droga (Figura 21a). A cronaxia no controle apresentou $55,33 \pm 3,15$ µs (n=9) e ao final dos 180 minutos de exposição ao Citral passou a $65,22 \pm 5,26$ µs (Figura 21b). A redução da excitabilidade para ambos os parâmetros foi considerada significativa em relação ao controle

(Teste t pareado). A recuperação dos efeitos do Citral sobre a reobase e a cronaxia se deu de forma parcial ao final dos 180 minutos.

Figura 21 - Efeito e recuperação do Citral sobre a reobase e cronaxia do PAC.



Tempos controle, aos 180 minutos de exposição do nervo isquiático a 30 µg/mL do Citral, e após 180 minutos de lavagem. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (n=9). # (P < 0,05) comparado ao controle (Teste t pareado).

5.9 Efeito do OELa e do Citral sobre a duração dos componentes do PAC.

A duração das componentes do PAC foi outro parâmetro onde os efeitos tanto do OELa quanto Citral foram observados.

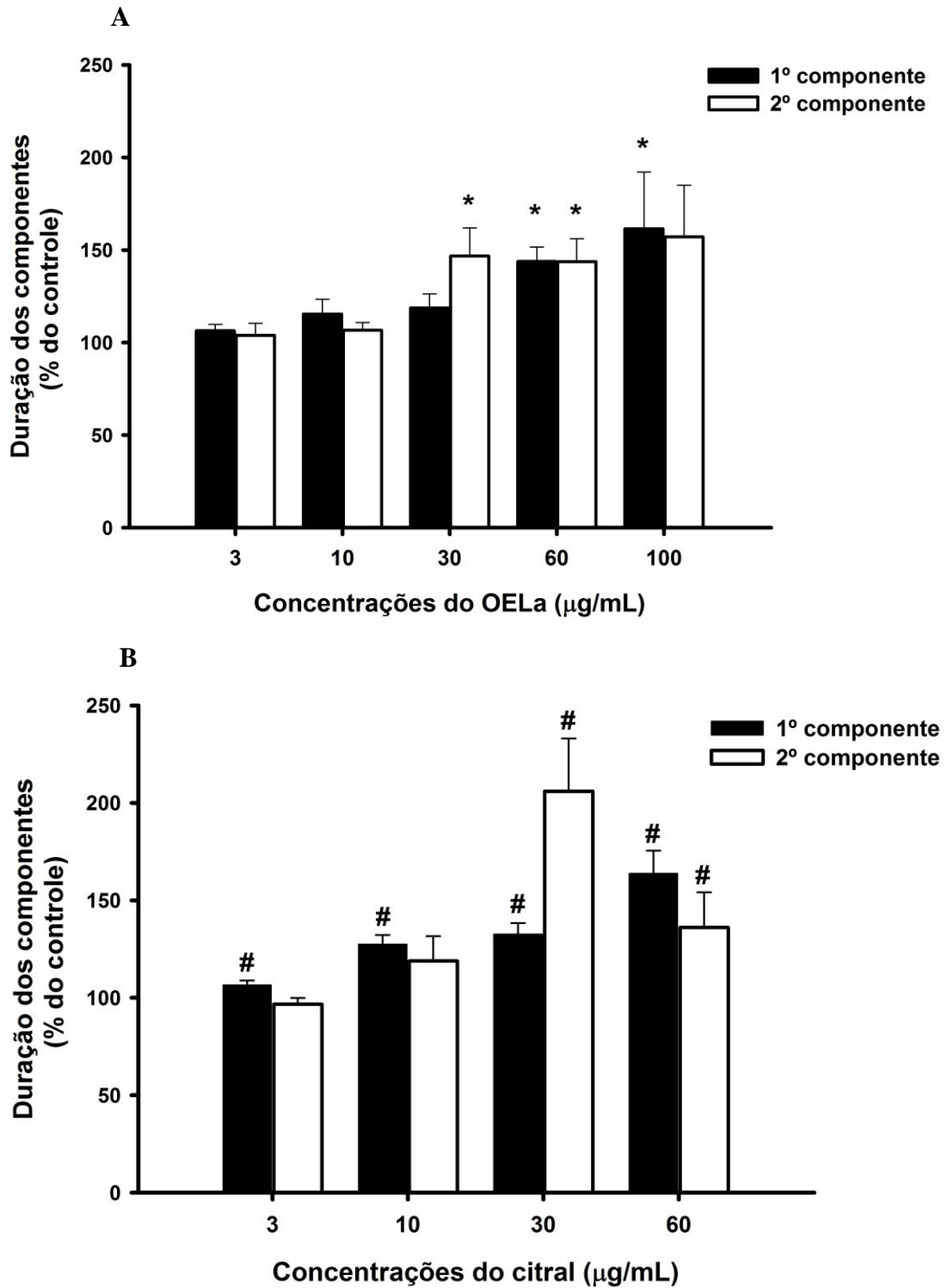
Em relação à duração da condução nervosa do primeiro componente, ao término de 180 minutos de exposição do nervo ao OELa foi observado um aumento da duração para $106,40 \pm 3,34$ (n=5), $115,42 \pm 8,05$ (n=5), $118,71 \pm 7,54$ (n=7), $143,83 \pm 7,76$ (n=8) e $161,46 \pm 30,68$ % (n=13) do valor controle nas concentrações de 3, 10, 30, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Em 300 $\mu\text{g/mL}$, devido a grande redução da amplitude não foi possível mensurar a duração da onda. Apenas as concentrações de 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$ em comparação ao controle apresentaram diferença estatística significativa.

O segundo componente também foi influenciado pelo OELa. Quando o nervo isquiático foi exposto às concentrações de 3, 10, 30, 60 e 100 $\mu\text{g/mL}$, teve sua duração alterada respectivamente para $103,92 \pm 6,46$ (n=5), $106,63 \pm 4,19$ (n=5), $146,74 \pm 15,17$ (n=7), $143,66 \pm 12,40$ (n=8) e $157,13 \pm 27,81$ % (n=13) do valor percentual do controle. No caso do segundo componente a concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ inibiu a amplitude ao ponto de impossibilitar a mensuração da duração. As alterações foram significantes para as concentrações de 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$ (ANOVA e Teste t pareado) (Figura 22a).

Para o Citral, a duração ao término de 180 minutos de exposição do nervo isquiático à droga, foi aumentada para $106,49 \pm 2,32$ (n=5), $127,44 \pm 4,74$ (n=8), $132,65 \pm 5,67$ (n=7) e $163,74 \pm 11,72$ % (n=8) do percentual do controle respectivamente.

Ao final dos 180 minutos de exposição do nervo ao Citral, o segundo componente do PAC teve a duração alterada significativamente a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ ($205,98 \pm 27,10$ % n=7). Apenas as concentrações de 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença estatística em relação ao percentual do controle. Não foi possível analisar a duração nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ do Citral, por conta do grande bloqueio na amplitude positiva de ambos os componentes do PAC. (Figura 22b).

Figura 22 – Efeito do OELa e do Citral sobre a duração dos componentes do PAC.



Os dados foram expressos em percentuais do controle e estão apresentados como média \pm erro padrão da média. *($P < 0,05$) representa significância do controle com o OELa # ($P < 0,05$) representa significância do controle com o Citral (ANOVA).

A recuperação dos efeitos do OELa e do Citral sobre os componentes do PAC foi parcial, exceto os efeitos do Citral na concentração de 300 µg/mL sobre o segundo componente do PAC que não esboçou nenhuma recuperação. Após o período de lavagem o primeiro componente do PAC apresentou uma melhor recuperação dos efeitos do OELa e do Citral em todas as concentrações (Anexo - Tabelas – 9, 10, 11 e 12).

5.10 Efeitos do OELa e do Citral sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.

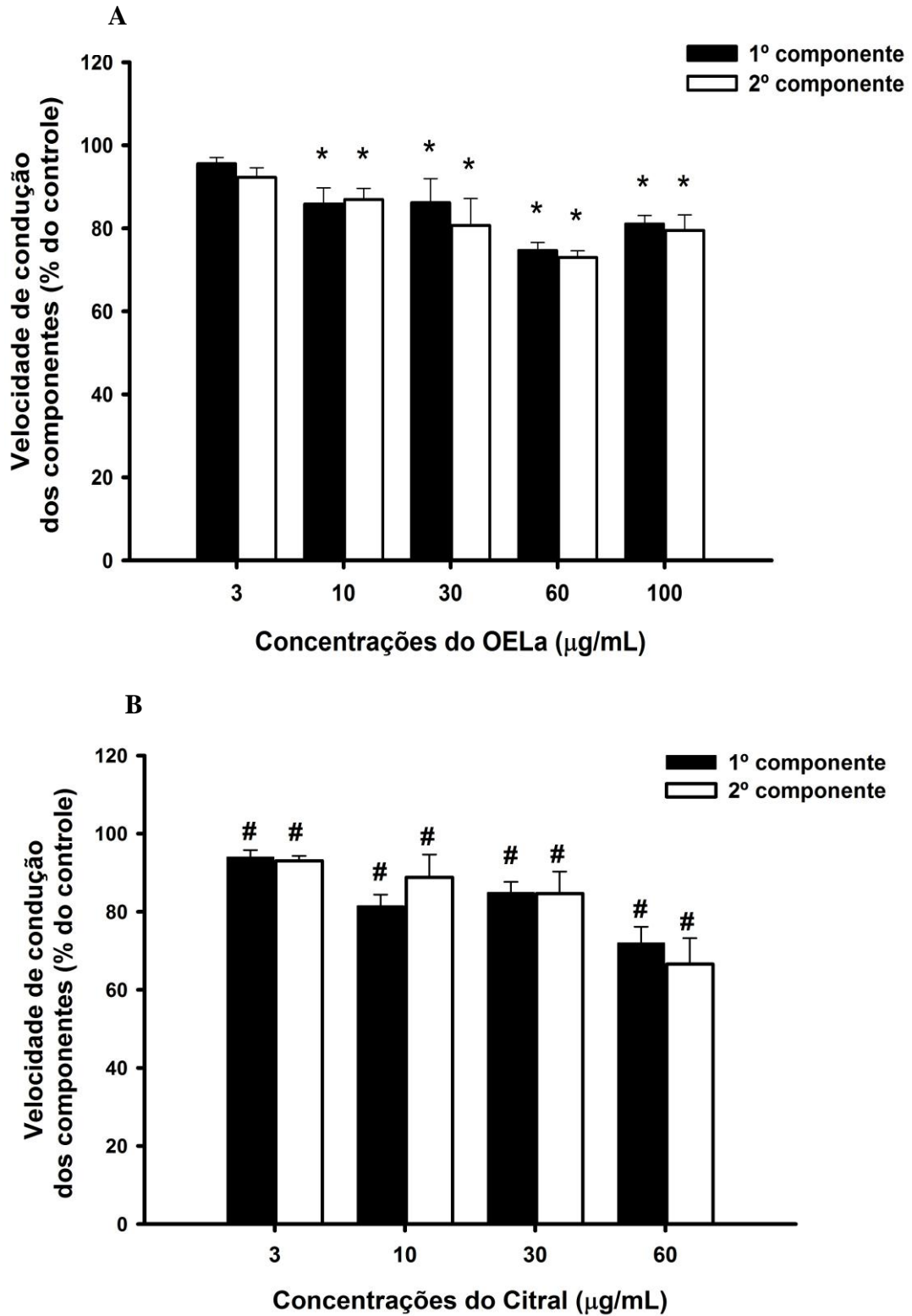
A velocidade de condução dos componentes do PAC foi reduzida de maneira concentração dependente tanto pelo OELa quanto pelo Citral.

A concentração de 3 µg/mL (n=4) do OELa não apresentou redução significativa da velocidade condução de nenhum dos componentes do PAC. Já 10 µg/mL (n=5) do OELa a redução foi estatisticamente significativa para o primeiro ($85,85 \pm 3,87$ %) e segundo ($86,93 \pm 2,68$ %) componente. Em 30 µg/mL (n=7) o OELa reduziu significativamente a velocidade de condução do primeiro e do segundo componente para $80,66 \pm 1,96$ e $74,92 \pm 3,38$ % do valor controle. Enquanto nas concentrações de 60 (n=8) e 100 µg/mL (n=13) houve inibição da velocidade de condução do primeiro componente para $74,65 \pm 1,95$ e $81,04 \pm 2,03$ %, e do segundo para $72,98 \pm 1,58$ e $79,52 \pm 3,67$ respectivamente. Em presença de 300 µg/mL (n=6) a amplitude foi totalmente bloqueada, impossibilitando a mensuração da velocidade de condução ($p < 0,05$, ANOVA e Teste t pareado) (Figura 23a).

Todas as concentrações estudadas para o Citral apresentaram diferença estatística sobre a velocidade de condução de ambos os componentes ($p < 0,05$, ANOVA e Teste t pareado). Nas concentrações de 3, 10, 30 e 60 µg/mL de Citral o primeiro componente foi reduzido respectivamente para $93,95 \pm 1,83$ (n=5), $81,46 \pm 2,93$ (n=8), $84,89 \pm 2,74$ (n=7) e $72,00 \pm 4,14$ % (n=8). O segundo componente nas mesmas concentrações inibiu para $93,05 \pm 1,26$ (n=5), $88,83 \pm 5,80$ (n=8), $84,64 \pm 5,65$ (n=7) e $66,58 \pm 6,64$ % (n=8) do percentual do controle (Figura 23b).

Nas concentrações de 100 e 300 µg/mL reduziram as amplitudes de tal maneira que impossibilitou a análise da velocidade de condução de ambos os componentes.

Figura 23 - Efeitos do OELa e do Citral sobre a velocidade de condução dos componentes do PAC.



Os dados estão expressos em valores percentuais em relação ao controle, após 180 min de exposição à droga. Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ OELa comparado ao controle e # $P < 0,05$ Citral comparado ao controle (ANOVA e Teste t pareado).

Em relação a recuperação da velocidade de condução do primeiro e do segundo componente, tanto o OELa quanto o Citral ao final dos 180 minutos de lavagem tiveram seus efeitos parcialmente revertidos, exceto o efeito de 300 µg/mL do Citral sobre o segundo componente do PAC (Anexo – Tabelas – 13, 14, 15 e 16).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A descoberta mais importante deste estudo foi que o OELa e seu constituinte majoritário, o Citral (mistura do trans-isômero geranial e o cis-isômero neral), inibem a excitabilidade do nervo isquiático de ratos. O efeito depressor se deu de forma concentração dependente, reduzindo a APP, amplitude positiva, velocidade de condução dos componentes do PAC e aumentando a duração, a cronaxia e a reobase. A literatura internacional nada trata a respeito do efeito do OELa e/ou Citral sobre o nervo isquiático, confirmando o ineditismo do estudo.

6.1 Efeito do OELa e Citral sobre o PAC.

De acordo com a classificação de Erlanger e Gasser o nervo isquiático é composto em sua maioria por fibras do tipo A de subtipos $A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$ e $A\delta$, e fibras não mielinizadas do tipo C. Essas fibras exibem diferenças de diâmetro, velocidade, limiar de excitabilidade e possivelmente populações de canais para Na^+ distintos. (NOKES et al., 1991; CATTERAL e MACKIE, 1996; JUNGE, 1976).

Os estudos de Junge, (1976), mostraram no PAC a existência de três picos distintos (α , β e γ), com α exibindo o menor limiar de excitação e a velocidade de condução mais alta, sendo o diâmetro da fibra nervosa proporcional à velocidade apresentada em cada pico. Desta maneira tomando por base a velocidade de condução dos componentes do PAC é possível determinar os tipos de fibras que contribuem para a formação de cada pico.

Em nossos registros do PAC, foi possível identificar a presença de dois componentes. Ao calcular a velocidade de condução de cada onda, conseguimos diferenciar os tipos de fibras presentes em cada pico. No primeiro componente a velocidade de condução foi em média de $85,40 \pm 2,34$ m/s, velocidade esta característica das fibras motoras do subtipo $A\alpha$. O segundo componente apresentou velocidade média de $30,84 \pm 1,11$ m/s sendo, portanto, composto por fibras sensoriais mielinizadas do tipo $A\beta$ e motoras do tipo $A\gamma$.

Os resultados revelaram que OELa e o Citral promovem o bloqueio total do PAC, agindo sobre as fibras mielinizadas que contribuem para a formação tanto do primeiro quanto do segundo componente.

O Citral é o constituinte majoritário do OELa e ambos apresentam efeitos similares, sendo que, em todos os parâmetros analisados o Citral mostrou-se mais potente, indicando ser ele o responsável pelo efeito depressor da excitabilidade demonstrado pelo óleo.

Apesar do OELa e o Citral apresentarem efeito sobre os dois componentes do PAC, os dados mostram um bloqueio mais pronunciado sobre o segundo componente indicando uma maior ação sobre fibras sensoriais. Esses dados foram confirmados pela obtenção da CI_{50} do OELa e do Citral sobre a amplitude positiva do PAC, que para o primeiro componente foi 51,34 e 31, 29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e para o segundo componente foram 36,78 e 16,70 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sugerindo um possível efeito anestésico do OELa, assim como do Citral. Esta constatação corrobora com os achados de Staiman e Seeman (1977), que observaram que as fibras mielinizadas de pequeno diâmetro se mostram mais susceptíveis aos anestésicos locais clássicos como benzil álcool, lidocaína e tetrodoxina.

Mendes (2012) também constatou, em seus estudos, essa preferência do óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs) e seus constituintes: Timol e carvacrol por fibras de menor diâmetro.

Sabendo que o OELa e o Citral agem sobre fibras A alfa, A beta e gama, que são fibras de condução rápida, podemos inferir que ambos demonstram uma ação inibitória sobre o sistema somatosensorial. Quanto a APP, esta foi inibida de forma significativa pelo OELa a partir da concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, e o Citral, neste parâmetro, apresentou uma inibição significativa iniciando na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Um dado importante, é que a diferença no percentual de bloqueio foi aumentando concomitantemente ao aumento da concentração. Essa diferença se acentua a partir de 60 $\mu\text{g/mL}$, onde, ao final dos 180 minutos de exposição ao OELa e ao Citral, a APP cai para ($49,51 \pm 8,34\%$ e $39,17 \pm 6,58\%$) respectivamente, enquanto na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ a inibição para o OELa e para o Citral foram, respectivamente ($38,11 \pm 8,43$ e $2,95 \pm 2,54\%$). O Citral apresentou um efeito depressor mais rápido que o OELa em comparação controle. Em 300 $\mu\text{g/mL}$, o Citral efetuou o bloqueio total da APP nos primeiros 90 minutos de exposição, enquanto esse efeito, na mesma concentração do OELa, só pode ser constatado, em média, aos 180 minutos de exposição.

Se levarmos em consideração o fato do OELa conter, em média, 75 % de Citral em sua constituição, essa diferença pode, mais uma vez, provar a influência do Citral sobre essa inibição provocada pelo OELa.

Diferente do resultado obtido por Lima-Accioly et al. (2006), ao estudar o óleo essencial de *Cróton nepetaefolius* (OECn) e seu constituinte majoritário o 1,8 cineol, a pesquisa revelou uma inibição da APP pelo OECn, em uma concentração menor (500 $\mu\text{g/mL}$), se comparada ao 1,8 cineol, que só apresentou efeito significativo a partir da concentração de 614 $\mu\text{g/mL}$.

Nossos dados são semelhantes aos observados por Mendes (2012) para o óleo essencial de *Lippia sidoides* (OELs) e seu constituinte majoritário o timol (66,7% da amostra), onde um efeito concentração dependente foi identificado para ambos os compostos. Também uma redução significativa da APP foi obtida na concentração de 60 µg/mL do OELs. Em relação aos efeitos do OELs do timol, o último mostrou-se mais potente na inibição da APP do PAC. Esses resultados permitiram ao autor atribuir o efeito do OELs à presença do timol.

A recuperação se mostrou mais difícil para o Citral na maioria dos parâmetros analisados, talvez pelo fato de ser ele o principal responsável pelo bloqueio, e estar presente em menor proporção no OELa.

Lima-acioly, 2006 aponta o fato do óleo essencial de *Cróton nepetaefolius* (OECn) recuperar em menor proporção que seu constituinte majoritário o 1,8 cineol como um indício de que o 1,8 cineol não é o único responsável pelo efeito depressor da excitabilidade do OECn.

Quando comparamos o efeito do OELa, sobre a APP, concluímos que este apresenta um potencial de inibição maior que o relatado para outros óleos essenciais, como o de *Alpinia zerumbet* (OEAz) que mostra bloqueio total da APP em concentrações superiores a 600 µg/mL (LEAL-CARDOSO et al., 2004) e para o OECn que inibiu por completo a APP do PAC na concentração de 1000 µg/mL. O mesmo é percebido para o Citral, em equiparação ao 1,8 cineol (LIMA-ACCIOLY et al., 2006).

A CI_{50} correspondente ao OELa (53,19 µg/mL ou 0,35 mM) foi mais alta que a do Citral (35,05 µg/mL ou 0,23 mM), confirmando o efeito mais pronunciado do constituinte em relação ao óleo, e também maior se comparado ao terpeno carvacrol que exerce 50 % de seu efeito na concentração de 0,50 mM (JOCA et al., 2010).

Houve uma clara redução da excitabilidade nervosa, quando em presença do OELa e do Citral, evidenciado pelo aumento significativo da reobase e cronaxia, sendo necessário um estímulo mais intenso e de maior duração para desencadear um potencial de ação.

Efeitos de redução da excitabilidade foram descritos para outros óleos essenciais como o óleo essencial de *Alpinia zerumbet*, o óleo essencial de *Cróton nepetaefolius*, e o óleo essencial de *Lippia sidoides*, e para alguns terpenos tais como terpineol, estragol, 1,8-cineol, eugenol, metileugenol, timol, carvacrol e linalol (MOREIRA et al., 2001; LEAL-CARDOSO et al., 2004; LIMA-ACCIOLY et al., 2006; MENDONÇA, 2006; MOREIRA-LOBO et al., 2010; LEAL-CARDOSO et al. 2010; JOCA et al., 2012; MENDES, 2012).

A duração e a velocidade de condução foram outros parâmetros dos componentes analisados. Na duração o Citral alterou de maneira mais evidente nos componentes que o OELa. Entretanto, na velocidade de condução das fibras do nervo isquiático foi demonstrada a alteração nos dois componentes do PAC a partir da concentração de 10 µg/mL do OELa. Valor muito menor, se comparado a outros óleos essenciais como o OELs, que reduziu esse parâmetro na concentração de 30 µg/mL, e de OECz e do OEAz demonstrando efeito significativo em concentrações na ordem de centenas de microgramas por mL (LEAL-CARDOSO et al., 2004; LIMA-ACCIOLY et al., 2006; MENDES, 2012).

O Citral mostra efeito depressor da velocidade de condução em 3 µg/mL. Transformado em milimolar, esse valor equivale a 0,01mM, exibindo inibição em uma concentração muito inferior à do OELa. Outros constituintes provenientes de vegetais, como 1,8 cineol, timol, carvacrol, estragol, linalol e terpineol, também apresentaram esse efeito inibitório (MOREIRA et al, 2001; LEAL-CARDOSO et al., 2004; LIMA-ACCIOLY et al., 2006; LEAL-CARDOSO et al., 2012; MENDES, 2012).

Um dado interessante é que tanto para o OELa quanto para o Citral a partir da concentração de 10 µg/mL não houve um estado estacionário do bloqueio do PAC. Mesmo aos 180 minutos de exposição foi possível observar que as amplitudes continuavam a decrescer.

Efeito similar foi observado para o eugenol sobre os componentes, onde o autor relata que mesmo após 3 horas de exposição do nervo a concentrações acima de 0,1mM de eugenol, o estado estacionário não foi atingido (MOREIRA-LOBO et al., 2010). Diferente do que foi constatado para o estragol e o terpineol (MOREIRA et al., 2001; LEAL-CARDOSO et al., 2004).

Ao realizar a conversão de 10 µg/mL de Citral em milimolar, observamos que essa concentração corresponde a 0,06 mM. Portanto, em uma concentração menor o Citral mostra um efeito depressor maior mais pronunciado que o eugenol.

O intuito do trabalho não foi verificar o mecanismo de ação do OELa e do seu constituinte, mas o possível efeito do bloqueio do PAC por esses compostos. Entretanto, podemos sugerir que esse efeito se dê por uma ação direta sobre os canais de Na⁺ ou mesmo de forma indireta, como, por exemplo, despolarizando a membrana ao agir sobre os canais de K⁺. A ação poderia ser semelhante a outros estudos, com outros compostos, por exemplo, o carvacrol e o estragol, que mostraram inibição direta dos canais para sódio dependentes de voltagem, sugerindo uma atuação como um anestésico local (JOCA et al, 2012, SILVA-ALVES, 2009), e que também apresentaram um efeito similar ao nosso sobre o PAC.

A recuperação dos parâmetros analisados se deu dentro de um tempo estabelecido de 180 min e esse restabelecimento se mostrou de forma lenta e parcial, especialmente para o Citral. O caráter parcial desta recuperação indica que a instalação dos efeitos é mais rápida do que a recuperação. O lento processo da recuperação talvez seja explicado pela alta lipossolubilidade da molécula do Citral que, ao interagir profundamente com a membrana lipídica, necessita de um tempo maior para ser desprendida dos múltiplos envoltórios.

Uma investigação mais aprofundada é necessária para que se possa explicar o mecanismo exato pelo qual OELa ou o Citral deprimem a excitabilidade nervosa.

Nossos resultados corroboram com aquilo que é relatado na literatura sobre a atividade anestésica de *Lippia alba* (CUNHA et al., 2010; HELDWEIN et al., 2012; PARODI et al., 2012), mostrando que *Lippia alba* e seu constituinte Citral são compostos promissores para o desenvolvimento de novas drogas com ação anestésica.

Os resultados obtidos justificam o uso etnofarmacológico deste vegetal no tratamento da inflamação e dor, legitimando as propriedades farmacológicas de *Lippia alba* no que concerne a analgesia periférica.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

- OELa e o Citral deprimem de maneira concentração dependente a excitabilidade nervosa do nervo isquiático de ratos.
- Os efeitos do OELa e do Citral foram mais pronunciados sobre o segundo componente, indicando uma maior ação sobre as fibras sensoriais.
- A inibição do PAC pelo OELa e pelo Citral, se dá em menor concentração do que em outros óleos essenciais, e constituintes com potencial anestésico descritos na literatura.
- A CI_{50} da APP para o OELa foram em média 53 e 35 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- A concentração do OELa e do Citral mais próximas da CI_{50} foram 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- O OELa na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ e o Citral na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$ alteraram a reobase e cronaxia significativamente.
- Em todos os parâmetros analisados (amplitude positiva, amplitude pico-a-pico, duração, velocidade de condução, reobase e cronaxia) o Citral mostrou efeito mais pronunciado que o OELa.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADAM, K. P.; ZAPP, J. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 953-959, 1998.

AIDLEY, D. J. **The Physiology of excitable cells**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, p. 35-71, 1998.

ALBUQUERQUE, A. A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; WEINREICH, D. Antigen induced synaptic plasticity in sympathetic ganglia from actively and passively sensitized guinea pig. **Journal Autonomic Nervous System**. v. 61, p. 139 - 144, 1996.

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.

ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill). N.E.Br grow in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, n. 2, p. 72 - 74, 2002.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils. **Flavour Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 235 – 244, 1998.

BARBOSA, F. F.; BARBOSA, L. C.; MELO, E. C.; BOTELHO, F. M.; SANTOS, R. H. S. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1221 - 1225, 2006.

BASKETTER, D. A.; SCHOLE, 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.

BASKETTER, D. A.; SCHOLE, E. W.; KIMBER, I. The performance of the local lymph node assay with chemicals identified as contact allergens in the human maximization test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 6, p. 543 – 547, 1994.

BAZZANO, F. C. O. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, p. 149 - 180. Apud: SILVA, José Vitor da (Org.). **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. 1. ed. Iátria, 2006.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Revist Pain**, v. 33, n. 1, p. 87 - 107, 1998.

BEST, C.; TAYLOR, N. **Physiological basis of medical practice**. 12 ed. Baltimore: Wilians e Wilkins, p. 24 - 46, 1990.

BIASI, L.A.; COSTA, G. Propagação vegetativa de *Lippia alba*. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 455 - 459, 2003.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588 - 594, 2009.

BRAGA R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Fortaleza: Edição Mossoroense, 1976.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foodssa review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223 – 253, 2004.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

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.

CARDOSO, T. A. O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, v. 64 - 67, p. 3 - 17, 1998 - 2001.

CARDULLO, A. C.; RUSZKOWSKI, A. M.; DELEO, V. A. Allergic contact dermatitis resulting from sensitivity to citrus peel, geraniol and citral. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 21, p. 395 – 397, 1989.

CARLINI, E. A.; CONTAR, J. D. D. P.; SIVA-FILHO, A. R.; DA SILVEIRA-FILHO, N. G.; FROCHTENGARTEN, 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.

CATTERALL, W.; MACKIE, K. Local Anesthetic. In: GOODMAAN, L. S. e GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. USA: Mcgraw-Hill Companies Inc., p. 331 - 347, 1996.

CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex Britt & Wilson erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 3, p. 57 – 64, 1992.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 151, 1994.

COWEN, L. D.; HELFAND, W. H. **Historia de la Farmacia**. Edición Española Doyma Libros, S. A., 1994.

COUTINHO NETO, A. *Lippia alba* (Mill.): **Caracterização neuroquímica / neuroetológica e fitoquímica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto. 67 f., 2007.

CRAVEIRO, A.; ALENCAR, J. W. ; MATOS, F. J. A.; ANDRADE, C. H. S.; MACHADO, M. I. L. Essential oils from brasilian Verbenaceae Genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 598 - 601, 1981.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essências e química fina. **Quim. Nova**, v. 16, n. 3, p. 224 - 228, 1993.

CRUZ, G. M. **Efeito do eugenol e do metil-eugenol sobre o potencial de ação composto em nervo isquiático de rato**. 2000. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 2000.

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, n. 1-4, p. 403 - 406, 2010.

DELACASSA, E.; SOLER, E.; MENENDEZ, P.; MOYNA, P. Essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown and *Aloysia chamaedrifolia* Cham. (Verbenaceae) from Uruguai. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 5, p. 107 - 108, 1990.

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.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69 – 91, 2002.

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.

ERLANGER, J.; GASSER H. S. Electrical signs of nervous activity. **Am. J. Psychiatry**, (93): 1472 – 1473, 1937.

FESTER, G. A.; MARTINUZI, E.A.; RICCIARDI, A. I. **Anais de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 42, p. 43, 1954.

FESTER, G.; RETAMAR, J.; RICCIARDI, A.; CASSANO, A. La essência de *Lippia alba* de Isla Puente (y de Villa Ana). **Revista de la Facultad de Ingenieria Química**, XXX, p. 5 - 10, 1961.

FIGOLS, J. Estructura del nervio periférico normal y lesiones elementares. In: SANCHES, F. F. C. **Neuropathologia: diagnóstico y clínica**. **Madri: Edimsa**, p. 687 - 701, 2000.

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.

FREITAS, A. **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**. Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf. Acesso em Março de 2013.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA, J. G.; SIANI, A. C.; CHAGAS, K. C. *Lippia alba* Mill N. E. Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 578 - 580, 1998.

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.

FUN, C. E.; SVENDENSEN, A. B. The essential oil of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, p. 265 - 267, 1990.

FUSELLI, S.; TARAZONA-SANTOS, E.; DUPANLOUP, I.; SOTO, A.; LUISELLI, D.; PETTENER, D. **Mol. Biol. Evol**, v. 20, n. 10, p. 1682 - 1691, 2003.

GASSER, H. S. Pain-producing impulses in peripheral nerves. **Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. proc**, v. 23, p. 44 - 62, 1943.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P.. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GOMES, E. C.; MING, L. C.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A.; CONTI, A.; FILHO, A. W. Constituents of the essential oil from *Lippia alba* (Mill) N. E. Br. (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, p. 29 - 32, 1993.

GONÇALVES, L. L. A.; BARBOSA, L. C. A.; AZEVEDO, A. A.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi Benth*) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8 - 14, 2003.

GUPTA, M. **270 Plantas medicinales Iberoamericanas**. Santafe de Bogotá: Presencia, p. 617, 1995.

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

HELDWEIN, C. G.; SILVA, L. L.; RECKZIEGEL, P.; BARROS, F. M.; BÜRGER, M. E.; BALDISSEROTTO, B.; MALLMANN, C. A.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 436 - 443, 2012.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; DERMONT, C.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry & Biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116 - 1125, 2006.

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

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. Action potentials recorded from inside a nerve fiber. **Nature London**, v. 144, p. 710 - 711, 1939.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. **Journal of Physiology**, v. 116, p. 449 - 472, 1952.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F. The ionic bases of nervous conduction. **Science**, v. 145, p. 1148 - 1154, 1964.

HODGKIN, A. L.; HUXLEY, A. F.; KATZ, B. Measurement of current-voltage relations in the membrane of giant axon of *Loligo*. **Journal of Physiology**, v. 116: 424 - 448, 1952.

HODGKIN, A. L.; KATZ, B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. **Journal of Physiology**, v. 108, p. 37 - 77, 1949.

HURSH, J. B. Conduction velocity and diameter of nerve-fibers. **American Journal of Physiology**, v. 127, n. 1, p. 131-139, 1939.

JANNUZZI H.; MATTOS, J. K. A.; VIEIRA, R. F.; SILVA, D. B.; BIZZO, H. R.; GRACINDO, L. A. M. Avaliação agronômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412 - 417, 2010.

JANNUZZI, H.; MATTOS, J. K.A.; SILVA, D. B.; GRACINDO, L.A.M.; VIEIRA, R.F. Avaliação agronômica e química de dezessete acessos de erva-cidreira [*Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown] - quimiotipo citral, cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 258 - 264, 2011.

JOCA, H. C.; CRUZ-MENDES, Y.; OLIVEIRA-ABREU, K; MAIA-JOCA, R. P. M.; BARBOSA, R.; LEMOS, BEIRÃO, T. L.; P. S. L.; LEAL-CARDOSO, J. H. Carvacrol Decreases Neuronal Excitability by Inhibition of Voltage-Gated Sodium Channels. **Journal of Natural Products**, v. 75, 1511 – 1517, 2012.

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. Br. (erva cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36 - 38, 2003.

JUNGE, D. **Nerve and muscle excitation**. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 7 - 21, 1976.

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.

KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. **Fisiologia**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KUMAR, V. O sistema nervoso. In: KUMAR, V. et al. **Robbins patologia básica**. Elsevier, p. 937-984, 2008.

LEAL-CARDOSO, J. H.; MATOS-BRITO, B. G.; LOPES-JUNIOR, J. E. G.; VIANA CARDOSO, K. V.; SAMAPIO-FREITAS, A. B.; BRASIL, R. O.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; ALBUQUERQUE, A. A. C. Effects of estragole on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1193-1198, 2004.

LEAL-CARDOSO, J. H.; MOREIRA, M. R.; PINTO-DA-CRUZ, G. M.; MORAIS, S. M.; LAHLOU, M. S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N. Effects of essential oil of *Alpinia zerumbet* on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Phytomedicine**, v. 11, p. 548 - 553, 2004.

LEAL-CARDOSO, J. H.; SILVA-ALVES, K. S.; FERREIRA-DA-SILVA, F. W.; SANTOSNASCIMENTO, T.; JOCA, H. C.; MACEDO, F. H. P.; ALBUQUERQUE-NETO, P. M.; MAGALHAES, P. J. C.; LAHLOU, S.; CRUZ, J. S. C.; BARBOSA, R. Linalool blocks excitability in peripheral nerves and voltage-dependent Na⁺ current in dissociated dorsal root ganglia neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 645, p. 86 - 93, 2010.

LIMA-ACCIOLY, P. M.; LAVOR-PORTO, P. R.; CAVALCANTE, F. S.; MAGALHÃES, P. J.; LAHLOU, S.; MORAIS, S. M.; LEAL-CARDOSO, J. H. Essential oil of *croton nepetaefolius* and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 1158 - 1163, 2006.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, p. 71 - 77, 2003.

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.

LÓPES, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939 - 6946, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, p. 511, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas Medicinais: a Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429 - 438, 2002.

MANICA-CATTANI, M. F.; ZACARIA, J.; PAULETTI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions of *Lippia alba* Mill. (Verbenaceae) detected by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, p. 375 - 380, 2009.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p. 220, 1995.

MATOS, M. J. A.; FERNANDES, A. **Relatórios de excursões do programa estudo químico de óleos essenciais de plantas nativas e cultivadas no nordeste**. Convênio BNB-CNPq-UFC, p. 1975 - 1978. Mimeografados.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) – Parte I – Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, p. 65 - 67, 1996a.

MATOS, F. J. A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil: estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) – Parte II – Farmacoquímica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, p. 137 - 141, 1996b.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. 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. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**. 3.ed. Fortaleza: EUFC, p. 220, 1998.

MATTOS, S. H.; INNECCO, R.; MARCO, C. A.; ARAÚJO, A. V. Plantas medicinais e aromáticas cultivadas no Ceará: tecnologia de produção e óleos essenciais. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, (série **BNB - ciência e tecnologia 2**), p. 61 - 63, 2007.

MAYNARD, L. G.; SANTOS, K. C.; CUNHA, P. S.; BARRETO, A. S.; PEIXOTO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, F.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; BONJARDIN, L. R.; SANTOS, M. R. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, p. 694 - 698, 2011.

MEIRI, H.; PRI-CHEN, S.; KORCZYN, A. D. Sodium channel localization in rat sciatic nerve following lead-induced demyelination. **Brain Research**, v. 359, p. 326 - 331, 1985.

MENDES, Y. C. **Ação do óleo essencial de *Lippia sidoides*, e seus constituintes timol, carvacrol e p-cimeno sobre os parâmetros eletrofisiológicos do nervo ciático de ratos**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.) 2012 — Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza. 78 f., 2012.

MENDONÇA, P. M. L. **Efeito do metileugenol na excitabilidade nervosa em nervo ciático de rato**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.) 2006 — Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza. 69 f., 2006.

MENEZES, A.P.B. **Efeito do timol sobre o potencial de ação composto em nervo ciático de rato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) 2004 – Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde. Fortaleza, 2004.

MESA-ARANGO, A. C.; MONTIEL-RAMOS, J.; ZAPATA, B.; DURÁN, C.; BETANCUR-GALVIS, L.; STASHENKO, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878 - 884, 2009.

MIGLIATO, K. F.; BABY, A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 25, p. 310 – 314, 2006.

MOREIRA, M. R.; CRUZ, G. M.; LOPES, M. S.; ALBUQUERQUE, A. A.; LEALCARDOSO, J. H. Effects of terpineol on the compound action potential of the rat sciatic nerve. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1337 - 1340, 2001.

MOREIRA-LOBO, D. C.; LINHARES-SIQUEIRA, E. D.; CRUZ, G. M.; CRUZ, J. S.; CARVALHO-DE-SOUZA, J. L.; LAHLOU, S.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; BARBOSA, R.; MAGALHAES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H. Eugenol modifies the excitability of rat sciatic nerve and superior cervical ganglion neurons. **Neuroscience Letters**, v. 472, p. 220 - 224, 2010.

MORTON, C. **Atlas of medicinal plants of middle America**, Mincis, USA, chap. 1, 1981.

NOKES, L. D. M.; DANIEL, D.; FLINT, T.; BARASI, S. Investigations into the analysis of the rate of decay of the compound actions potentials recorded from the rat sciatic nerve after death: Significance for the prediction of the post-mortem period. **Forensic science International**, v. 50, p. 75 – 85, 1991.

OCAZIONEZ, R. E.; MENESES, R.; TORRES, F. Á.; STASHENKO, E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 304 - 309, 2010.

OKESON, J. P. **Bell's orofacial pain**. The clinical management of orofacial pain. 6th ed. Chicago: Quintessence; p. 592. 2005.

OPDYKE, D. L. Monographs on fragrance rawmaterials. **Food Cosmet Toxicol**, v. 17, p. 241–275, 1979.

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 Pharmacal research**, v. 33, p. 1691 - 1697, 2010.

PACIORNIK, E. F. **A planta nossa de cada dia: plantas medicinais: descrição e uso**. 2. ed. Curitiba : Copygraf, p. 92, 1990.

PARODI, T. V.; CUNHA, M. A.; HELDWEIN, C. G.; DE SOUZA, D. M.; MARTINS, Á. C.; GARCIA, L. D. E. O.; WASIELESKY, W. J. R.; MONSERRAT, J. M.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B.; BALDISSEROTTO, B. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v. 155, p. 462 - 468, 2012.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M. E., VILLAR, A. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v. 56, p. 501-504, 2001b.

PASSOS, C. S.; ARBO, M. D.; RATES, S. M. K.; POSER, G. L. V. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140 - 149, 2009.

PIMENTA, M.; FERNANDES, L.; PEREIRA, U.; GARCIA, L.; LEAL, S.; LEITAO, S.; SALIMENA, F.; VICCINI, L.; PEIXOTO, P. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia L.* (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 211 - 220, 2007.

QUINTANS-JUNIOR, L. J. et al. Citral reduces nociceptive and inflammatory response in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 497 - 502, 2011.

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.

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

REIS, P. S. **Avaliação da composição mineral e quantificação do citral em óleos essenciais de folhas de *lippia alba* (mill.) n. e. brown (verbenaceae)**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Química Aplicada) 2008 — Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Salvador: Vento Leste, 2008.

RESS, N. B.; HAILEY, J. R.; MARONPOT, R. R.; BUCHER, J. R.; TRAVLOS, G. S.; HASEMAN, J. K.; ORZECH, D. P.; JOHNSON, J. D.; HEJTMANCIK, M. R. Toxicology and carcinogenesis studies of microencapsulated citral in rats and mice. **Toxicological Sciences**, v. 71, p. 198 – 206, 2003.

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.

ROTHENBORG, H. W.; MENNÉ, T.; SJOLIN, K. E. Temperature dependent primary irritant dermatitis from lemon perfume. **Contact Dermatitis**, v. 3, p. 37–48, 1977.

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.

SANTOS-MENDES, M. M. F. B. **Caracterização morfo-anatômica, fitoquímica e molecular de oito formas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. ex BRITT. & Wilson (Verbenaceae)**. (Tese de Doutorado) 2001 - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 102 f. 2001.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAIS, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803 - 808, 2007.

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M.; CASALI, V. W. D.; NASCIMENTO, E. A. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 1 - 7, 2009.

SILVA, N. A.; OLIVEIRA, F. F.; COSTA, L. C. B.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, R. A. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.) cultivada em Ilhéus na Bahia, **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 52 - 55, 2006.

SILVA-ALVES, K. S. **Estudo das alterações eletrofisiológicas produzidas pelo estragol sobre os axônios do nervo ciático e os neurosomas do gânglio da raiz dorsal de ratos**. 2009. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas.) — Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza, 71 f., 2009.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A.; SOUZA-SANTOS, L. C.; SOUZA, R. C. Analysis of uses of essential oils and terpenics/terpenoids compounds by pharmaceutical industry through USPTO granted patents. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 8 - 15, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. 1999. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S.; Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotechnology, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38 - 43, 2000.

SOUZA, F. I.; SANTOS, G. B.; SILVA, C. F. MATTAR-JUNIOR, R.; ZUMIOTTI, A. V. Avaliação histológica da neurografia término-lateral: estudo experimental em ratos. **Acta ortopédica brasileira**, v. 19, p. 129 – 131, 2011.

STAIMAN, A.; SEEMAN, P. Conduction-blocking concentrations of anesthetics increase with nerve axon diameter: studies with alcohol, lidocaine and tetrodotoxin on single myelinated fibers. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics**, v. 201, p. 340 – 349, 1977.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, 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**, v. 1025, p. 93 - 103, 2004.

STEFANINI, M. B.; RODRIGUES, S. D.; MING, L. C.; Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v. 20, p. 18 - 23, 2002.

STOTZ, S. C.; VRIENS, J.; MARTYN, D.; CLARDY, J.; CLAPHAM, D. E., 2008. Citral sensing by TRANSient receptor potential channels in dorsal root ganglion neurons. **PLoS One**, v. 3, 2008.

TAVARES, E. S. **Estudos integrados em *Lippia alba* (Verbenaceae)- uma planta de interesse econômico e medicinal.** (Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal) 2003 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 162 f, 2003.

TAVARES, E. S.; JULIÃO, L. S.; LOPES, D.; BIZZO, H. R.; LAGE, C. L. S.; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 1 - 5, 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, p. 204 – 220, 2011.

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.

VERAS, H. N.; CAMPOS, A. R.; RODRIGUES, F. F.; BOTELHO, M. A.; COUTINHO, H. D.; MENEZES, I. R.; DA COSTA, J. G. Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus aureus*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, p. 334 - 337, 2011.

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**, v. 36, p. 347 – 351, 1998.

VIANA, G. S. D.; VALE, T. G.; SILVA, C. M. M.; MATOS, F. J. D. Anticonvulsant activity of essential oils and active from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) NE Br. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1314 - 1317, 2000.

WEINREICH, D.; UNDEM, B. J.; TAYLOR, G.; BARRY, M. F. Antigen-induced long-term potentiation of nicotinic synaptic transmission in the superior cervical ganglion of guinea pig. **Journal of Neurophysiology**, v. 73, p. 2004 - 2016, 1995.

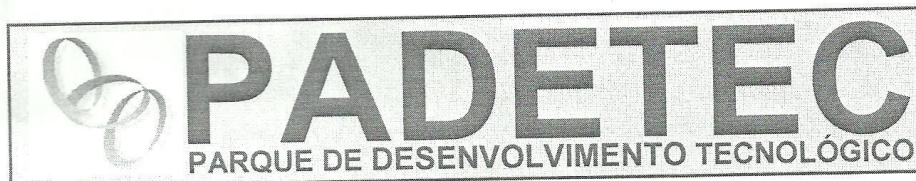
YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, A. C.; AZEVEDO-FILHO, J. A.; LOURENÇÃO, A. L. MARQUES, M. O. M.; MORAIS, G. D. S.; CHIORATO, A. F.; MARTINS, A. L. M.; SIQUEIRA, W. J. Performance of ginger grass (*Lippia alba*) for traits related to the production of essential oil. **Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)**, v. 65, p. 481 - 489, 2008.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H.; MAIA, J. G. S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill) N. E. Br Growing wild in the brasilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 47 - 48, 1998.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO I

**LAUDO DE ANÁLISE**

Nº DO LAUDO: 001/17.07.2012

INTERESSADO: PEDRO - UECE

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA RECEBIDA: OLEO ESSENCIAL DE CIDREIRA

ANÁLISE: DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS.

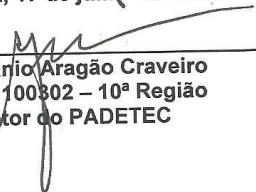
MÉTODO: CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA.

RESULTADOS:

PICO	R.TIME	TEOR(%)	PROBABILIDADE DE ACERTO(%)	COMPOSTO
1	7.992	0.47	86	BETA-PINENE
2	8.508	0.72	88	6-METHYL-5-HEPTEN-2-ONE
3	10.208	1.00	92	BENZENE, 1-METHYL-3-(1-METHYLETHYL)
4	10.508	9.85	92	1-LIMONENE
5	11.775	2.05	90	GAMMA-TERPINENE
6	13.883	0.50	86	LINALOOL
7	21.658	34.11	85	NERAL
8	21.792	8.92	96	CARVONE
9	23.325	41.81	92	GERANIAL
10	33.867	0.58	82	ALPHA-HUMULENE

Estes dados referem-se apenas a estas amostras e não tem valor extrapolativo para outras Amostras ou lotes do mesmo produto.

Fortaleza, 17 de julho de 2012.


 Dr. Afrânio Aragão Craveiro
 CRQ 01100302 – 10ª Região
 Diretor do PADETEC

ANEXO II

TABELA 4 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude positiva do 1º componente. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE POSITIVA			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	101,60 \pm 6,21	101,60 \pm 6,21
10	100	*84,65 \pm 5,55	112,84 \pm 26,77
30	100	*66,00 \pm 7,91	92,45 \pm 16,26
60	100	*43,27 \pm 6,79	85,16 \pm 9,39
100	100	*38,02 \pm 8,83	81,53 \pm 31,51
300	100	*0,00 \pm 0,00	44,00 \pm 11,37

ANEXO III

TABELA 5 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude positiva do 2º componente. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE POSITIVA			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	104,07 \pm 3,18	104,07 \pm 3,18
10	100	*76,90 \pm 10,46	70,53 \pm 18,71
30	100	*49,89 \pm 8,75	95,30 \pm 27,04
60	100	*35,02 \pm 5,62	72,84 \pm 22,45
100	100	*17,15 \pm 5,76	77,11 \pm 32,22
300	100	*0,00 \pm 0,00	9,78 \pm 4,09

ANEXO IV

TABELA 6 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude positiva do 1º componente. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE POSITIVA			
Concentração de Citral ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao Citral (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	102,06 \pm 2,66	102,06 \pm 2,66
10	100	#71,68 \pm 9,89	115,16 \pm 18,41
30	100	#64,30 \pm 5,19	77,92 \pm 0,00
60	100	#44,35 \pm 7,18	80,67 \pm 15,16
100	100	#3,67 \pm 3,16	34,45 \pm 8,06
300	100	#0,00 \pm 0,00	23,69 \pm 8,72

ANEXO V

TABELA 7 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude positiva do 2º componente. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE POSITIVA			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao Citral (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	102,77 \pm 4,32	102,77 \pm 4,32
10	100	#54,94 \pm 9,38	128,06 \pm 15,77
30	100	#39,93 \pm 10,25	41,80 \pm 5,40
60	100	#23,73 \pm 5,65	59,76 \pm 14,60
100	100	#0,00 \pm 0,00	14,79 \pm 4,76
300	100	#0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

ANEXO VI

TABELA 8 – Efeito e recuperação do OELa sobre a amplitude pico-a-pico. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE PICO-A-PICO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	101,65 \pm 5,88	101,65 \pm 5,88
10	100	85,64 \pm 5,58	87,38 \pm 38,84
30	100	*62,83 \pm 7,10	92,91 \pm 19,16
60	100	*49,51 \pm 8,34	87,27 \pm 10,17
100	100	*38,11 \pm 8,43	54,88 \pm 22,76
300	100	*0,00 \pm 0,00	28,51 \pm 7,89
1000	100	*0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

ANEXO VII

TABELA 9 – Efeito e recuperação do Citral sobre a amplitude pico-a-pico. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

AMPLITUDE PICO-A-PICO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao Citral	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	102,98 \pm 3,51	102,98 \pm 3,51
10	100	#84,09 \pm 5,38	109,22 \pm 10,82
30	100	#61,62 \pm 4,91	61,62 \pm 4,91
60	100	#39,17 \pm 6,58	54,19 \pm 15,21
100	100	#2,95 \pm 2,54	29,08 \pm 6,76
300	100	#0,00 \pm 0,00	12,88 \pm 6,56
1000	100	#0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

ANEXO VIII

TABELA 10 – Efeito e recuperação do OELa sobre a duração da onda do 1º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

DURAÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	106,40 \pm 3,34	106,40 \pm 3,34
10	100	115,42 \pm 8,05	118,96 \pm 9,77
30	100	118,71 \pm 7,54	95,81 \pm 7,76
60	100	*143,82 \pm 7,76	110,96 \pm 7,86
100	100	*161,46 \pm 30,68	113,57 \pm 3,56
300	100	--	125,72 \pm 5,82

ANEXO IX

TABELA 11 – Efeito e recuperação do OELa sobre a duração da onda do 2º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	DURAÇÃO		
	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	103,92 \pm 6,46	103,92 \pm 6,46
10	100	106,63 \pm 4,19	117,57 \pm 21,19
30	100	*146,74 \pm 15,17	122,84 \pm 19,45
60	100	*143,66 \pm 12,40	114,68 \pm 21,18
100	100	*157,13 \pm 27,81	91,37 \pm 5,70
300	100	--	192,11 \pm 27,96

ANEXO X

TABELA 12 – Efeito e recuperação do Citral sobre a duração da onda do 1º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

DURAÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao Citral (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	#106,49 \pm 2,32	106,49 \pm 2,32
10	100	#127,44 \pm 4,74	114,89 \pm 5,65
30	100	#132,65 \pm 5,67	128,08 \pm 8,50
60	100	#163,74 \pm 11,72	126,53 \pm 11,75
100	100	--	129,91 \pm 16,31
300	100	--	179,83 \pm 11,72

ANEXO XI

TABELA 13 – Efeito e recuperação do Citral sobre a duração da onda do 2º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

DURAÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao Citral (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	$96,72 \pm 3,12$	$96,72 \pm 3,12$
10	100	$118,89 \pm 12,66$	$118,50 \pm 6,62$
30	100	$\#205,98 \pm 27,10$	$137,69 \pm 2,18$
60	100	$\#136,09 \pm 17,95$	$147,32 \pm 14,02$
100	100	--	$152,36 \pm 66,76$
300	100	--	--

ANEXO XII

TABELA 14 – Efeito e recuperação do OELa sobre a Velocidade de condução do 1º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

VELOCIDADE DE CONDUÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	$95,54 \pm 1,51$	$95,54 \pm 1,51$
10	100	$*85,85 \pm 3,87$	$82,17 \pm 28,96$
30	100	$*86,19 \pm 5,77$	$108,54 \pm 8,17$
60	100	$*74,65 \pm 1,95$	$107,36 \pm 11,94$
100	100	$*81,04 \pm 2,03$	$91,91 \pm 5,63$
300	100	--	$88,28 \pm 7,61$

ANEXO XIII

TABELA 15 – Efeito e recuperação do OELa sobre a Velocidade de condução do 2º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

VELOCIDADE DE CONDUÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	92,28 \pm 2,29	92,28 \pm 2,29
10	100	*86,93 \pm 2,68	66,35 \pm 23,31
30	100	*80,70 \pm 6,44	102,65 \pm 11,33
60	100	*72,98 \pm 1,58	101,93 \pm 9,62
100	100	*79,52 \pm 3,67	99,63 \pm 11,51
300	100	--	86,38 \pm 10,57

ANEXO XIV

TABELA 16 – Efeito e recuperação do Citral sobre a Velocidade de condução do 1º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

VELOCIDADE DE CONDUÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (1º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	#91,21 \pm 3,12	91,21 \pm 3,12
10	100	#81,46 \pm 2,93	104,04 \pm 7,07
30	100	#84,89 \pm 2,74	85,03 \pm 3,42
60	100	#72,00 \pm 4,14	86,85 \pm 7,28
100	100	--	88,35 \pm 15,72
300	100	--	78,65 \pm 5,30

ANEXO XV

TABELA 17 – Efeito e recuperação do Citral sobre a Velocidade de condução do 2º componente do PAC. Os valores estão expressos em percentuais do controle, representados como média \pm erro padrão da média. #P < 0,05 comparado ao controle (ANOVA) e (Teste t-pareado).

VELOCIDADE DE CONDUÇÃO			
Concentração de OELa ($\mu\text{g/mL}$)	0 min (Controle)	Após 180 min de exposição ao OELa (2º componente)	Após 180 min de lavagem (Recuperação)
3	100	#90,01 \pm 3,20	90,01 \pm 3,20
10	100	#88,83 \pm 5,80	94,72 \pm 2,91
30	100	#84,64 \pm 5,65	82,14 \pm 2,66
60	100	#66,58 \pm 6,64	76,67 \pm 3,48
100	100	--	87,37 \pm 14,08
300	100	--	--