



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

LUANA GODINHO MAYNARD

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN. (ERVA CIDREIRA
BRASILEIRA) EM RATOS**

São Cristóvão/SE

2011

LUANA GODINHO MAYNARD

EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN. (ERVA CIDREIRA
BRASILEIRA) EM RATOS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto V. Santos

São Cristóvão/SE

2011

LUANA GODINHO MAYNARD

EFEITOS CARDIOVASCULARES DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Lippia alba* (MILL) N.E. BROWN.
(ERVA CIDREIRA BRASILEIRA) EM RATOS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-
Graduação em Medicina da Universidade
Federal de Sergipe como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde.

Aprovada em ____ / ____ / ____

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Viana Santos
Universidade Federal de Sergipe – UFS

1º Examinador: Profª. Drª. Aldeídia Pereira de Oliveira
Universidade Federal do Piauí - UFPI

2º Examinador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho
Universidade Federal de Sergipe - UFS

PARECER

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Tadeu e Silmara, ao meu irmão Luan, a minha avó Neusa, a minha “dinha” Isa, que são os principais responsáveis pela base em que me ergui como pessoa; e ao meu namorado Henrique por sempre me apoiar.

AGRADECIMENTOS

Concluo este trabalho com muita alegria. Posso dizer que todas as experiências vividas foram gratificantes e que cada obstáculo ultrapassado me fez crescer como pessoa e profissional. Porém, ninguém caminha sozinho e por isto registro aqui alguns sinceros agradecimentos.

Agradeço primeiramente a **Deus** por iluminar mais um caminho trilhado por mim nesta jornada acadêmica. Obrigada Senhor por me dar saúde e sabedoria para alcançar os meus objetivos.

Ao professor Dr. **Márcio Roberto Viana Santos** que me recebeu muito carinhosamente desde o primeiro momento em que bati na porta de sua sala pedindo-lhe que fosse meu orientador. Obrigada por confiar que eu poderia chegar aonde cheguei. Obrigada pelas oportunidades, pelos ensinamentos e pela paciência. Tenho grande admiração e respeito pela pessoa e profissional que és.

Ao **Prof. Dr. Arie F. Blank**, à **Professora Dr^a. Maria de Fátima Arrigoni-Blank** e à doutoranda **Magna Galvão Peixoto** pelo fornecimento do material vegetal utilizado no experimento que resultou nesta dissertação e por se mostrarem sempre dispostos em ajudar.

Agradeço a todos os colegas do **LAFAC**: à **Kátia** que foi minha parceira desde o início deste projeto; a **André** por ter me ensinado as técnicas de cirurgia e canulação em ratos, além de todas as ajudas prestadas no decorrer do mestrado; à **Patrícia** por me ensinar os protocolos *in vitro*, agradeço a paciência e toda a ajuda prestada; a **Tharciano**, uma ótima amizade que conquistei durante o curso de mestrado, agradeço por dividir comigo as angústias e alegrias desta e de outras experiências de vida. Aos demais colegas: **Milene, Ana Paula Barbosa, Ana Paula Soares, Marcelo, Ayslan, Carol, Daniel, Vitor, Fabrício, Gabriela, Flávia, Byanca**, agradeço os momentos de descontração e as ajudas prestadas.

Agradeço à **Universidade Federal de Sergipe (UFS)**, pela oportunidade de realizar minha formação neste Curso de Mestrado em Ciências da Saúde.

A todos os **Professores do Curso de Mestrado em Ciências da Saúde**, pelos conhecimentos e experiências transmitidas.

Aos meus pais, **Luiz Tadeu e Silmara**, que são mais do que pais. São grandes amigos e meus maiores exemplos de vida. Agradeço por acreditarem sempre que sou capaz, por me amarem incondicionalmente e por me ensinarem que não há obstáculo que não consiga ser derrubado para se alcançar um sonho.

Ao meu irmão, **Luan Maynard**, um grande orgulho para mim. Meu grande amigo e a pessoa com quem posso contar em todos os momentos.

À minha avó **Neusa** e a minha “dinha” **Isa**, agradeço o amor que me fortalece, os braços que me acolhem quando preciso e por apostarem no meu futuro.

Ao meu namorado **Henrique**, que acima de tudo é meu grande amigo, agradeço a paciência, o carinho, o companheirismo e o incentivo em mais esta etapa de minha vida.

Às minhas amigas de muitos anos **Nicole, Nayra e Pollyanna**, que muitas vezes são o meu refúgio nas horas difíceis. Agradeço por se fazerem presentes mesmo quando estamos distantes e por estarem sempre torcendo e vibrando com as minhas vitórias.

A todos os **colegas de mestrado** que de forma direta e indireta colaboraram, torceram e estimularam a realização deste trabalho.

Aos animais do Biotério utilizados em prol do desenvolvimento da ciência.

Ao Sr. Oswaldo pelos cuidados com os animais.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudos.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

RESUMO

MAYNARD, L. G. Efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. (Erva Cidreira Brasileira) em ratos. Dissertação de Mestrado, Núcleo de Pós graduação em Medicina, Mestrado em Saúde- NPGME/UFS, 94p, 2011.

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (VERBENACEAE), conhecida popularmente como Erva Cidreira Brasileira, é uma das plantas mais utilizadas na medicina popular brasileira, inclusive para o tratamento da hipertensão arterial. Este estudo buscou investigar os efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Lippia alba* (OELA) em ratos. Para registro dos parâmetros hemodinâmicos, ratos machos Wistar saudáveis foram canulados na aorta abdominal e na veia cava inferior. Inicialmente foram testados 5 quimiotipos deste óleo (geranial, limoneno, linalol, mirceno e carvona), administrados por via intravenosa e *in bolus*, nas doses de 5, 10, 20, 40 e 60 mg/kg. Após análise destes resultados, observou-se que o quimiotipo geranial (OELAG) foi o que apresentou o melhor efeito sobre a pressão arterial, tornando-se o quimiotipo de escolha. Em animais saudáveis e não-anestesiados, o OELAG (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) induziu hipotensão e bradicardia transientes. Estes efeitos foram atenuados em animais pré-tratados com atropina (2 mg/kg, i.v.), hexametônio (20 mg/kg, i.v.) ou L-NAME (20 mg/kg, i.v.), mas não com indometacina (5 mg/kg, i.v.). Para os experimentos *in vitro*, os ratos foram eutanasiados e a artéria mesentérica superior foi removida e seccionada em anéis (1-2 mm), os quais foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Tyrode a 37° C e gaseificada com carbogênio. Em anéis intactos de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contráidos com fenilefrina (10 µM), o OELAG (1 - 1000 µg/mL) induziu relaxamento ($pD_2 = 1,89 \pm 0,21$; $E_{max} = 110,8 \pm 10,8$ %) cujo efeito não foi alterado após remoção do endotélio ($pD_2 = 2,37 \pm 0,16$; $E_{max} = 134,8 \pm 16,5$ %), após a incubação com tetraetilamônio (TEA) ($pD_2 = 2,23 \pm 0,04$; $E_{max} = 117,2 \pm 4,96$ %) ou KCl (80 mM) ($pD_2 = 1,96 \pm 0,06$; $E_{max} = 112,6 \pm 6,70$ %). Além disso, o OELAG foi capaz de inibir as contrações induzidas por CaCl₂ e produzir um efeito adicional (34,82 %; n = 5) sobre o relaxamento máximo causado pela nifedipina (10 µM) em anéis sem endotélio. Diante destes resultados, pode-se concluir que o OELAG produz efeito hipotensor, que parece ser causado por ativação de receptores muscarínicos e liberação de NO, e bradicardia, que parece ser causado pela ativação de receptores muscarínicos cardíacos e

nicotínicos ganglionares. Além disso, o OE_{LAG} induz vasorelaxamento que parece ser causado inicialmente por um bloqueio do influxo de Ca²⁺ através dos canais de Ca²⁺ operados por voltagem.

Palavras-chave: *Lippia alba*, óleo essencial, efeitos cardiovasculares, ratos, canais de cálcio.

ABSTRACT

MAYNARD, L. G. Cardiovascular effects of the essential oil *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Erva Cidreira Brasileira) in rats. Dissertação de Mestrado, Núcleo de Pós graduação em Medicina, Mestrado em Saúde- NPGME/UFS, 94p, 2011.

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown (VERBENACEAE), popularly known as Erva Cidreira Brasileira, has been one of the most commonly used herbs in the Brazilian folk medicine to blood pressure control. This study aimed to investigate the cardiovascular effects of the essential oil of *Lippia alba* (EOLA) in rats. For the hemodynamic measurement, normotensive male Wistar rats had their abdominal aorta and lower vena cava cannulated. Initially, five chemotypes (geraniol, limonene, linalool, mircene, and carvone) were tested in normotensive conscious rats. They were intravenously and *in bolus* administered at the doses of 5, 10, 20, 40 and 60 mg/kg. The EOLA_G showed the best results on blood pressure, being chosen for the following experiments. The administration of EOLA_G (5, 10, 20, and 40 mg/kg, i.v.) induced transient hypotension and bradycardia. These responses were attenuated by atropine (2 mg/kg, i.v.), hexamethonium (20 mg/kg, i.v.) and N^G-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME - 20 mg/kg, i.v.), but not by indomethacin (5 mg/kg, i.v.). For *in vitro* approach, the rats were euthanized and the superior mesenteric artery was removed and cut in rings (1-2 mm), which were placed in organ baths containing Tyrode's solution at 37° C and gassed with carbogen. In intact rings of rat mesenteric artery pre-contracted with phenylephrine (1 μM), EOLA_G (1 - 1000 μg/mL) induced relaxation (pD₂ = 1.89 ± 0.21; Emax = 110.8 ± 10.8 %) which was not modified after the removal of the endothelium (pD₂ = 2.37 ± 0.16; Emax = 134.8 ± 16.5 %), after incubation with TEA (pD₂ = 2.23 ± 0.04; Emax = 117.2 ± 4.96 %) or KCl (80 mM) (pD₂ = 1.96 ± 0.06; Emax = 112.6 ± 6.70 %). In addition, the EOLA_G was able to inhibit the contraction caused by CaCl₂ and produced an additional effect (34.82 %; n = 5) on maximal relaxation of nifedipine (10 μM). In conclusion, the results demonstrate that the EOLA_G induces a hypotensive effect, that seems to be caused by muscarinic activation and NO release, and bradycardia, that seems to be due to an activation of ganglionic nicotinic and cardiac muscarinic receptors. Furthermore, EOLA_G produces vasorelaxation primarily caused by blocking Ca²⁺ influx through voltage-operated Ca²⁺ channels.

Keywords: *Lippia alba*, essential oil, cardiovascular effects, rats, calcium channel blockers.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh- Acetilcolina

AMPc - Adenosina monofosfato cíclica

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BK_{Ca}- Canais para potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância

BVLC – Região do bulbo ventro-lateral caudal

Ca²⁺- Ions cálcio

CaCl₂– Cloreto de cálcio

Cavs – Canais de cálcio operados por voltagem

CEME/MS – Central de Medicamentos

CEPA – Comitê de ética em pesquisa com animais

CG/EM – Cromatografia gasosa interfaceada com espectrometria de massa

CGs – ciclase da guanilil solúvel

CO₂ – gás carbônico

COX – ciclo-oxigenase

DAG- Diacilglicerol

DVE – Doença vascular encefálica

EDHF- Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRFs- Fatores relaxantes derivados do endotélio

eNOS- Oxído nítrico sintase endotelial

E.P.M. - Erro padrão da média

eV – Elétron-volt

FC – Frequência cardíaca

FOB – Free on board- entregue embarcada

GABA – Ácido γ -aminobutírico

GMPc- Guanosina monofosfato cíclica

HA– Hipertensão arterial sistêmica

HEXA – Hexametônio

IES – Instituições de ensino superior

IK_{Ca} – Canais de potássio de condutância intermediária

INDO - Indometacina

IP₃- Trisfosfato de inositol

i.p. – Via intraperitoneal

i.v. – Via intravenosa

K⁺- Ions potássio

KCl – cloreto de potássio

L-NAME – N^G-nitro L-arginina metil éster

M₂ – Receptor muscarínico cardíaco

M₃ – Receptor muscarínico endotelial

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MLCK- Quinase da cadeia leve da miosina

MS/SNVS – Ministério da Saúde/Sistema Nacional de Vigilância Sanitária

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio

NaH₂PO₄ – fosfato monobásico de sódio

NIF - Nifedipina

NO- Oxído nítrico

NOS- Oxído nítrico sintase

NTS – Núcleo do trato solitário

O₂ - Oxigênio

OELA - Óleo essencial de *Lippia alba*

OELAC - Óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo carvona

OELAG – Óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo geranial

OELAL - Óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo linalol

OELAL_m - Óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo limoneno

OELAM - Óleo essencial de *Lippia alba*, quimiotipo mirceno

OMS – Organização mundial da saúde

PA – Pressão arterial

PAM – Pressão arterial média

PE - Polietileno

PGI₂- Prostaciclina

Phe - Fenilefrina

PKC- Proteína quinase C

PKG- Proteína quinase G

PNPIC – Programa Nacional de Práticas investigativas e complementares

PTZ – Pentilenotetrazol

RE – Retículo endoplasmático

RVLM – Área bulbar ventro-lateral rostral

RVP – Resistência vascular periférica

SERCA- Bomba de Ca^{2+}

SK_{Ca} – Canais de potássio de baixa condutância

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNC – Sistema nervoso central

SNS – Sistema nervoso simpático

TEA - Tetraetilamônio

v.o. – Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown.....	28
Figura 2: Distribuição mundial de <i>Lippia alba</i>	28
Figura 3: Esquema de Disfunção Endotelial, favorecendo o surgimento de doenças cardiovasculares.....	39
Figura 4: Ratos Wistar.....	47
Figura 5: Sistema de aquisição de dados da PAM e FC em ratos.....	48
Figura 6: Artéria mesentérica superior de rato	51
Figura 7: Sistema de aquisição de dados de reatividade vascular.....	52
Figura 8: Anel arterial, disposto entre duas hastes, suspenso por linha de algodão e mantido em cuba para órgão isolado contendo solução nutritiva de Tyrode.....	53
Figura 9: Efeitos da administração intravenosa e <i>in bolus</i> dos cinco diferentes quimiotipos de OELA: geranial (OELAG), limoneno (OELALm), linalol (OELAL), mirceno (OELAM) e carvona (OELAC) (5, 10, 20, 40 e 60 mg/kg) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos saudáveis não-anestesiados.....	58
Figura 10: Registro original mostrando os efeitos do OELAG (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) sobre a PAM e FC de um rato saudável. A setas indicam o momento de administração do óleo.....	59

Figura 11: Efeitos hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração intravenosa <i>in bolus</i> de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg) em ratos saudáveis não-nestesiados.....	60
Figura 12: Efeitos hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração intravenosa <i>in bolus</i> de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com atropina (2 mg/kg; i.v.; 30 min).....	61
Figura 13: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa <i>in bolus</i> de doses do OELAG (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com hexametônio (20 mg/kg; i.v.; 30 min).....	62
Figura 14: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa <i>in bolus</i> de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com L-NAME (20mg/kg i.v., 30 min.).....	63
Figura 15: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa <i>in bolus</i> de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados indometacina (5 mg/kg i.v.; 30 min).....	64
Figura 16: Curva concentração-resposta para o OELAG (1 – 1000 µg/mL, cumulativo) em anéis arteriais, com e sem endotélio, de artéria mesentérica superior de ratos saudáveis pré-contraídos com Phe (1µM).....	65
Figura 17: Curva concentração-resposta para o OELAG (1 – 1000 µg/mL, cumulativo) em anéis arteriais sem endotélio de mesentérica superior de ratos saudáveis pré-contraídos com Phe (1µM) ou pré-contraídos com Phe (1µM) após incubação com TEA (100µM, 30 min).....	66

Figura 18: Curva concentração-resposta para o OELAG (1 – 1000 µg/mL, cumulativo) em anéis sem endotélio de artéria mesentérica superior de ratos pré-contráidos com Phe (1µM) ou pré-contráidos com KCl80 mM.....67

Figura 19: Curva concentração-resposta para CaCl₂ (10⁻⁶, 3x10⁻⁶, 10⁻⁵, 3x10⁻⁵, 10⁻⁴, 3x10⁻⁴, 10⁻³, 3x10⁻³, 10⁻² e 3x10⁻² M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, sem endotélio, antes (controle) e após pré-incubação com OELAG nas concentrações de 10, 30 e 300 µg/mL, separadamente.....69

Figura 20: Efeito vasorelaxante da nifedipina (NIF: 10 µM), OELAG (300 µg/mL), separadamente, e OELAG adicionado sobre o relaxamento máximo da NIF (NIF + OELAG) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, sem endotélio, pré-contráidos com Phe (1 µM).....70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* quimiotipo geranial.....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1. Plantas Medicinais	24
2.2. Políticas Normativas Brasileiras sobre plantas medicinais	25
2.3. <i>Lippia Alba</i>	27
2.3.1. Sinonímias populares e científicas.....	29
2.4. Metabólitos Secundários	29
2.5. Óleo essencial de <i>Lippia alba</i>	30
2.5.1. Quimiotipos.....	31
2.5.2. Potencial Econômico.....	33
2.6. Estudos pré-clínicos com a <i>Lippia alba</i>	34
2.7. Hipertensão arterial sistêmica	35
2.7.1. Fisiopatologia da HAS.....	37
2.7.2. Disfunção endotelial e Hipertensão.....	38
2.7.3. Controle da pressão arterial.....	40
2.7.4. Tratamento da hipertensão arterial.....	41
2.7.5. <i>Lippia alba</i> e Hipertensão arterial.....	42
3. OBJETIVOS	44
3.1. Geral	44
3.2. Específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1. Obtenção do OELA	45
4.2. Drogas	46
4.3. Animais	46
4.4. Ensaio farmacológico in vivo	47
4.4.1. Preparação dos animais.....	47
4.4.2. Protocolos experimentais dos estudos <i>in vivo</i> com os diferentes quimiotipos do OELA.....	49

4.4.3. Protocolo experimental <i>in vivo</i> com o quimiotipo do OELA de escolha.....	4
9	

4.5.1. Preparação da artéria mesentérica superior isolada de rato.....	50
4.5.2. Protocolos experimentais empregados nos estudos <i>in vitro</i>	53
4.5.2.1. Avaliação da participação dos canais de K ⁺ nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA.....	53
4.5.2.2. Avaliação da participação dos canais de Ca ²⁺ nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA.....	54
4.5.2.3. Avaliação da participação dos canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem (Cav) tipo-L sensíveis a diidropiridina nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA.....	54
4.6. Análise Estatística.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Efeitos dos 5 quimiotipos de OELA sobre a PAM e FC em ratos saudáveis.....	56
5.2. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Lippia alba</i> quimiotipo geranial.....	5
6	
5.3. Efeitos hemodinâmicos do OELAG nos experimentos <i>in vivo</i>.....	56
5.3.1. Efeitos do OELAG sobre a PAM e FC em ratos saudáveis.....	58
5.3.2. Efeitos do OELAG sobre a PAM e FC em ratos saudáveis após o pré tratamento com atropina e hexametônio.....	60
5.3.3. Efeitos do OELAG sobre a PAM e FC em ratos saudáveis após o pré- tratamento com L-NAME e INDO.....	62
5.4. Efeitos do OELAG sobre a reatividade vascular em artéria mesentérica de rato saudável: estudos <i>in vitro</i>.....	65
5.4.1. Efeito do OELAG em anéis com e sem endotélio funcional.....	65
5.4.2. Efeito do TEA sobre o vasorrelaxamento induzido pelo OELAG em anéis sem endotélio funcional.....	66

5.4.3. Efeito de altas concentrações de K^+ sobre o vasorrelaxamento induzido pelo OELAG em anéis sem endotélio funcional.....	67
5.4.4. Efeito do OELAG sobre as contrações induzidas pelo $CaCl_2$ em anéis sem endotélio funcional.....	68
5.4.5. Efeito do OELAG sobre o relaxamento máximo induzido pela NIF em anéis sem endotélio funcional.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	78
9. REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais representa para muitas comunidades a opção terapêutica disponível para o tratamento de doenças. O uso desses recursos vegetais relaciona-se aos primórdios da medicina e está fundamentado no acúmulo de informações transferidas por sucessivas gerações (PINTO et al., 2006). Este elo entre o homem e a natureza permanece ativo nos dias de hoje por meio de cultivos residenciais ou comercialização do material vegetal em mercados e feiras populares (MACIEL et al., 2002).

Calcula-se que no mundo haja 250.000 espécies vegetais. Entre os diversos países, o Brasil destaca-se por possuir $\frac{1}{4}$ (cerca de 60.000) das espécies estimadas para o mundo (CORRÊA JÚNIOR et al., 2006). As razões que favorecem ao nosso país ocupar este patamar são o vasto território, com diversas situações climáticas, geomorfológicas e de solo, propícias ao surgimento de uma flora diversificada (CAMÊLO, 2010).

Apesar de abranger um valioso patrimônio natural, a maioria das espécies de plantas utilizadas com fins medicinais é pouco estudada em relação aos seus constituintes químicos e seus potenciais farmacológicos (SOUZA, 2008). Acredita-se que somente cerca de 5 a 7% do potencial medicinal das plantas seja conhecido (OLIVEIRA et al., 2009).

O comércio de plantas medicinais cresceu muito na última década, produzindo uma movimentação financeira mundial que atingiu aproximadamente 22 bilhões de dólares no ano de 2000 (YUNES et al., 2001). O mercado de fitoterápicos movimentou no ano de 2001 cerca de US\$ 3,9 bilhões na América do Norte, US\$ 6,9 bilhões na Europa, US\$ 5,1 bilhões na Ásia, US\$ 2,3 bilhões no Japão, US\$ 600 milhões na América do Sul e US\$ 800 milhões nos demais países (FUNARI; FERRO, 2005).

Mais recentemente, tem-se observando um crescimento considerável do comércio de plantas medicinais, principalmente quando parte dessas plantas são transformadas em fitoterápicos. Este crescimento foi demonstrado em um estudo realizado por De Freitas (2007) no período de 2003 a 2006 em que se percebe a grande movimentação financeira no país. O montante mobilizado pelo Brasil neste período alcançou o valor de R\$ 1.840.228.655, 00.

Um dos fatores que contribui para essa crescente circulação monetária em torno das plantas medicinais é o alto custo dos medicamentos industrializados (BRANDÃO et al., 2006). Por conta disso, mais de 50% da população brasileira, principalmente as pessoas de condições financeiras menos favoráveis, fazem uso de plantas medicinais ou fitoterápicos para tratar doenças agudas ou até mesmo crônicas, como a hipertensão arterial (SOARES, 2002).

No ano de 2001, foi realizada a *1ª Reunião Técnica sobre Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas*, organizada pela comunidade científica da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do IBAMA, a fim de definir estratégias para conservação e manejo sustentável da flora brasileira (VIEIRA; SILVA, 2002). Segundo Camêlo (2010), a *Lippia alba* é uma das plantas da Mata Atlântica citada como espécie a ser conservada. Esta espécie tramita pelos comércios externos, internos e regionais além de já estar sendo explorada pelo Programa Nacional de Desenvolvimento Sustentável de Territórios Rurais – PRONAT (empresa incubada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará – PADETEC - que está ligado à Universidade Federal do Ceará) (COSTA, 2006).

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, popularmente conhecida como Erva-Cidreira Brasileira, possui diversos quimiotipos responsáveis pelas múltiplas utilizações desta planta na medicina popular e na fitoterapia, a depender do seu componente majoritário. Suas principais indicações populares são contra problemas digestivos, respiratórios, cardíacos e como calmante (ALEA et al., 1997; SOARES, 2001; PESSINI et al., 2003).

Estudos etnobotânicos demonstram que a *Lippia alba* é uma das plantas mais utilizadas de forma terapêutica pelos brasileiros, inclusive no que se refere à prevenção ou controle de doenças como a hipertensão (PÉRTILE, 2007). No entanto, este uso anti-hipertensivo ainda não é conclusivo, embora já tenham sido isolados potentes compostos vasorelaxantes, como verbascosídeos e isoverbascosídeos, além de glicosídeos de apigenina (citrus bioflavonóide) e luteolina (citrus bioflavonóide) (HENNEBELLE et al., 2008).

Sabendo-se da alta taxa de abandono dos tratamentos anti-hipertensivos devido aos efeitos colaterais de seus medicamentos e aos custos socioeconômicos elevados decorrentes principalmente das complicações dessa patologia, torna-se

imprescindível a descoberta de novas drogas mais seguras, eficazes e de menor custo por meio de estudos mais aprofundados das plantas medicinais. Desta maneira, a avaliação dos efeitos cardiovasculares da *Lippia alba* é mais do que justificável.

Neste contexto, os Departamentos de Fisiologia/Farmácia e Agronomia da Universidade Federal de Sergipe tem concentrado esforços no sentido de desenvolver estudos científicos com a *Lippia alba*, visando um retorno à população quanto a sua eficácia e possíveis efeitos indesejáveis. Especificamente no tocante a sua atividade sobre o sistema cardiovascular, os estudos desenvolvidos até o momento tem gerado grandes expectativas no que diz respeito ao seu uso.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

Embora o Brasil seja o país com a maior diversidade na flora nativa pouco se comprovou acerca de suas reais propriedades científicas (HEINZMANN; BARROS, 2007).

Neste país, na década de 80, foram realizados inúmeros trabalhos com o propósito de embasar cientificamente o uso de plantas medicinais como recurso terapêutico. Quase a totalidade desses estudos concentrava-se em Instituições de Ensino Superior (IES), que desenvolviam pesquisas nas áreas de botânica, agronomia, química e farmacologia. Através do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais, iniciado no ano de 1983, e vinculado à antiga Central de Medicamentos (CEME/MS), o Brasil exerceu uma ação multiplicadora de conhecimentos sobre a potencialidade de nossa flora. No entanto, a interrupção desse programa no ano de 1995 trouxe um impacto negativo nessas áreas (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Nas últimas décadas, estudos têm revelado que o mercado de plantas medicinais é um mercado promissor e com grande potencial de expansão (SIMÕES; SCHENKEL, 2002). A avaliação de algumas plantas da medicina popular já revela, através de pesquisas pré-clínicas, importantes constituintes de ações farmacológicas como flavonóides, alcalóides, triterpenos, taninos, entre outros (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Os ensinamentos da sociedade sobre plantas medicinais têm proporcionado um crescente interesse no meio científico, sobretudo nas áreas de fitoquímica e farmacologia (CUNNINGHAM, 1993; ALBUQUERQUE, 2001). Um estudo revelou que cerca de 25% de todos os medicamentos industrializados eram originados de forma direta ou indireta dos vegetais, quer por isolamento de suas substâncias ativas, quer por semi-síntese das mesmas (CALIXTO, 2000). Vale lembrar que princípios ativos de plantas medicinais descobertos há anos são utilizados até os dias de hoje para diversas terapêuticas. Como exemplos, a morfina de ação analgésica isolada da planta *Papaver somniferum* e a atropina de ação anticolinérgica isolada da *Atropina belladonna* (RATES, 2001b; MARTINEZ et al., 2009).

O Nordeste brasileiro abrange uma diversidade de espécies vegetais conhecidas por suas propriedades terapêuticas na medicina popular (ARRIGONI-BLANK, 2005). Aproximadamente 75% das substâncias ativas empregadas na formulação de fitoterápicos ou fármacos são isolados seguindo informações e utilizações populares. O primeiro passo para se estudar uma planta medicinal baseia-se, portanto, nos conhecimentos adquiridos de gerações sucessivas sobre a espécie que se quer pesquisar (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; PINTO et al., 2006).

Dentre as espécies populares de grande interesse para pesquisas científicas está a *Lippia alba*. Estudos etnobotânicos demonstram que esta planta é uma das plantas mais utilizadas de forma terapêutica no Brasil, inclusive no que se refere à prevenção ou controle do aumento na pressão arterial (PÉRTILE, 2007).

2.2. Políticas Normativas Brasileiras sobre plantas medicinais

Desde a Declaração de Alma-Ata, em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem demonstrado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais, revelando que cerca de 80% da população mundial recorre ao uso desses vegetais e/ou seus subprodutos para satisfazer suas necessidades básicas de saúde, embora somente 1% da flora de tradição medicinal seja quimicamente conhecida. Em 1981, a Portaria de nº 812 aprovada pelo Ministério da Saúde veio definir o estudo de plantas medicinais como prioridade investigativa (LUZ NETTO et al., 2006).

A Portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995, normatizava o Registro de Produtos Fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária e legalizava a definição de fitoterápico como sendo “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnósticos (...)” (BRASIL, 1995).

Visando normatizar o Registro de Medicamentos Fitoterápicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária editou a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC nº 17), de 24 de fevereiro de 2000, em que aprovava o regulamento técnico dos fitoterápicos.

Quatro anos depois, a ANVISA editou nova resolução com o intuito de atualizar a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Sendo assim, a

principal legislação vigente que regulamenta o registro de fitoterápicos e prevê diferentes formas de se comprovar a segurança e eficácia destes é a RDC/ ANVISA nº 48 de 16 de março de 2004. Esta inclui ainda, a importância da etnofarmacologia (ANVISA, 2004).

A partir das diretrizes da OMS, houve a construção do Programa Nacional de Práticas Investigativas e Complementares (PNPIC) no SUS com o objetivo de programar ações e serviços relativos a práticas medicinais alternativas. Somente no ano de 2006, o PNPIC foi aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde e publicado na forma de Portaria Ministeriais nº 971 de 3 de maio de 2006. Neste mesmo ano também foi estabelecida a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, fortalece e amplia as ações políticas voltadas ao setor, bem como propõe acesso seguro e uso racional da flora medicinal (BRASIL, 2006; HEINZMANN; BARROS, 2007).

Por ser o chá a forma mais tradicional de utilização das plantas medicinais pela população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária legitimou as características mínimas de qualidade dos chás por meio da Resolução RDC ANVISA nº 277, de 22 de setembro de 2005. A Resolução RDC ANVISA nº 267, de 22 de setembro de 2005, que aprova o "Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás" traz as espécies e suas partes vegetais cujas pesquisas científicas apresentaram aceitação para o uso terapêutico descrito.

De acordo com o art 3º, inciso V da Resolução-RDC nº. 10, de 9 de março de 2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA, "*drogas vegetais são as plantas medicinais e suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas(...)*".

Ponderando-se o incremento de novos vegetais no comércio popular brasileiro, A ANVISA divulgou uma tabela com mais de 60 drogas vegetais e a forma correta de preparar cada uma delas, uma vez que a ação terapêutica está intimamente relacionada ao modo de preparo. Dentre as espécies divulgadas, encontra-se a *Lippia alba* cuja recomendação enquadra casos de ansiedade, insônia,

calmante, contra algias abdominais e estomacais, expectorante, sendo aconselhado o uso cauteloso por indivíduos com hipotensão.

2.3. *Lippia alba*

A família Verbenaceae caracteriza-se por sua diversidade botânica e ampla distribuição. Ela possui cerca de 175 gêneros e 2800 espécies espalhadas pelas regiões temperadas do hemisfério sul e poucas espécies no hemisfério norte. O gênero *Lippia* faz parte desta família e dentre suas espécies encontra-se a *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. Esta planta possui um aroma relacionado aos constituintes predominantes de seus óleos essenciais, os quais podem variar qualitativamente e quantitativamente, em função de diversos fatores como: estação do ano, época de floração, idade da planta, fatores geográficos e climáticos (COSTA et al., 2004).

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown é um subarbusto nativo de quase todo o território brasileiro, de morfologia variável, podendo atingir até um metro e meio de altura (raramente dois metros). Seus ramos apresentam-se finos, longos, arqueados, esbranquiçados e quebradiços. Suas folhas são inteiras, com 3 a 6 cm de comprimento, de bordos serrados e ápice agudo. Suas flores são azul-arroxeadas, reunidas em inflorescências axilares capituliformes de eixo curto e tamanho variável e os frutos são drupas globosas de cor róseo-arroxeadas (LORENZI; MATOS, 2002).

A *Lippia alba* pode ser utilizada nas formas de chá, macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos. É tradicionalmente usada como analgésico, antipirética, sedativa, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, no tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias, antiespasmódica, antifúngica, inseticida e repelente (PASCUAL et al., 2001; PÉRTILE, 2007; YAMAMOTO et al., 2008).



Figura 1: *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. Fonte: Hennebelle et al. (2008).

Esta planta tem ampla distribuição territorial, desde o México até a Argentina, passando por Cuba, Brasil, Uruguai e Paraguai, com larga variedade fenotípica que facilita sua adaptação em condições ambientais diversificadas (PALÁCIO-LOPÉZ; RODRÍGUEZ-LOPÉZ, 2007). Ela é encontrada de forma abundante entre o Sul dos Estados Unidos (Flórida) e Norte da Argentina, sendo presente também em países do oriente como Índia e Austrália (HENNEBELLE et al., 2008; AQUINO et al., 2010).

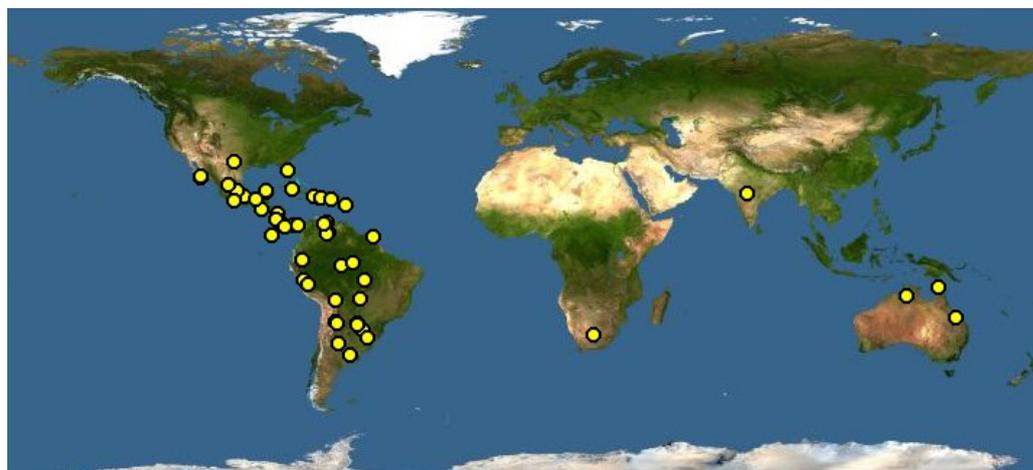


Figura 2: Distribuição mundial de *Lippia alba*. Fonte: Missouri (2011)

Suas numerosas denominações na América Latina devem-se ao seu odor aromático ou a sua difusa utilização terapêutica (HENNEBELLE et al., 2008). A *Lippia alba* tolera secas de aproximadamente 4 a 6 meses sem chuva devido a suas alterações morfológicas (ARAMBARRI et al., 2006). Essa espécie cresce em temperatura média de 24°C, com uma umidade relativa de 75% e precipitação média anual de 1.056 mm, em áreas onde as estações chuvosas e secas são bem definidas (RUENDA et al., 2007).

2.3.1. Sinonímias populares e científicas

No Brasil, esta planta é comumente conhecida como erva-cidreira, no entanto, pode-se citar várias sinonímias populares descritas para a *Lippia alba* como: chá de tabuleiro, cidrila, falsa-melissa, erva-cidreira brasileira, alecrim-selvagem, cidreira carmelitana, salva, salva-limão, sálvia, dentre outros (LORENZI; MATOS, 2002).

Além da diversidade de nomes populares, há também inúmeras sinonímias no campo científico que podem gerar confusões em dados de publicação. Como exemplo temos as denominações: *Lantana alba* Mill., *Lantana canescens* Hort., *Lantana geminata* Spreng., *Lantana lippoides* Hook. & Arn., *L. glabiflora* Kuntze, *L. mollissima* Desf., *L. asperifolia* A. Rich., *L. citrata* Cham., *Verbena globiflora* L'Herz., *V. lippoides* Hook. & Arn., *Zapania globiflora* (L'Her) Wild. e *Z. odorata* Pers. (PÉRTILE, 2007).

2.4. Metabólitos Secundários

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos pelas plantas que estão sujeitos a variações climáticas e geomorfológicas o que altera a quantidade de seus componentes químicos (MING, 1992; YAMAMOTO, 2006; METLEN et al., 2009).

Estes compostos realizam importantes funções no desenvolvimento vegetal, sendo responsáveis por respostas sistêmicas de defesa da espécie (KUTCHAN, 2001; DUDAREVA et al., 2004; IJIMA et al., 2004). Com o intuito de garantir a adaptação da espécie na seleção natural há variações nos metabólitos que se adequam às modificações ambientais (SIMÕES; SPITZER, 2003). Muitos desses compostos

apresentam também importância para o homem no que diz respeito à síntese de medicamentos e cosméticos, além do seu valor para os setores alimentício e agroquímico (PINTO et al., 2002).

Esses metabólitos ditos secundários se dividem principalmente em terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (MANTOVANI; PORCU, 2009). De acordo com Peñuela (2010), os terpenos são o grupo de metabólitos predominante no óleo essencial de *Lippia alba*.

O gênero *Lippia* apresenta uma variedade de derivados do ácido caféico, como exemplo o verbascosídeo (ou acteosídeo), um glicosídeo feniletanóide. Numa análise quantitativa da fração butanólica de *Lippia alba*, foram descritas quatro substâncias majoritárias, sendo duas identificadas saponina e fenilpropanóide verbascosídeo. Como ainda se desconhece as substâncias ativas dessa espécie, propõe-se que o verbascosídeo seja um marcador fitoquímico dessa espécie já que aparece de forma constante sem qualquer variação sazonal (CORRÊA, 2005).

2.5. Óleo essencial de *Lippia alba*

De acordo com a ISO (International Standard Organization) óleo essencial é o produto vegetal obtido de partes de plantas, separáveis por destilação por arraste com vapor d'água ou por prensagem de pericarpos de frutos cítricos (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os óleos são líquidos voláteis, de aroma intenso e coloração incolor ou ligeiramente amarelada. Seus componentes químicos são uma mistura de substâncias orgânicas como fenilpropanóides, terpenóides, aldeídos, cetonas, fenóis, etc. (RAVEN et al., 2001; MACIEL et al., 2002; SIMÕES; SPITZER, 2003).

Sua distribuição não acontece de forma homogênea na planta, podendo se concentrar em diversas partes como, raízes, rizomas, caules, folhas, flores e sementes. Na família Verbenaceae os óleos essenciais são principalmente secretados em tricomas glandulares da face abaxial das folhas e pelas células do parênquima clorofiliano da planta (RICCIARDI et al., 1999; CASTRO, 2001; SANTOS et al., 2004).

Na espécie *Lippia alba*, os óleos essenciais são formados principalmente por mono e sesquiterpenos (hidrocarbonetos) (SANTOS-MENDES, 2001). Para Julião et

al. (2001) e Santos-Mendes (2001) os principais compostos orgânicos encontrados no óleo essencial de *Lippia alba* são hidrocarbonetos, flavonóides e terpenóides sendo os mais frequentes citral, limoneno, β -mirceno carvona e linalol, embora outras substâncias já tenham sido citadas na literatura (SCHOCKEN, 2007).

Devido à grande variedade morfoquímica da *Lippia alba* é possível caracterizá-la em diferentes quimiotipos a partir dos seus constituintes majoritários (CAMÊLO, 2010).

Gomes (1990), em busca dos componentes do óleo essencial de *Lippia alba*, realizou uma análise por meio de cromatografia gasosa onde comprovou a existência dos componentes terpineno, r-cimeno, b-cariofileno, mirceno, geranial e neral, além do predomínio de compostos aminados, esteroidais, terpênicos e fenólicos (SCHOCKEN, 2007).

As substâncias mais importantes detectadas do óleo essencial de *Lippia alba* são linalol, citral (neral e geranial), limoneno, carvona, cariofileno, mirceno (SANTOS et al., 2004; FRIGHETTO; OLIVEIRA, 1998). Esse óleo apresenta diversos quimiotipos, cujos compostos majoritários mais citados na literatura científica são linalol, citral e carvona (RICCIARDI et al., 1999).

2.5.1. Quimiotipos

Alguns quimiotipos da *Lippia alba* já foram identificados, sendo encontrados de forma predominante os componentes citral, carvona e linalol (JULIÃO et al., 2001).

Como resultado de várias análises morfológicas e químicas, além de estudos circadianos e sazonais do óleo essencial das folhas de *Lippia alba*, pôde-se descrever a existência de três quimiotipos para esta espécie. Quimiotipo I caracteriza-se por altos teores de mirceno e citral (neral e geranial); quimiotipo II distingui-se por elevados teores de limoneno e citral; já o quimiotipo III é caracterizado por um alto teor de limoneno e carvona, combinado com ausência de citral (PÉRTILE, 2007).

Estudos dos óleos essenciais em seis tipos de *Lippia alba* encontradas no Nordeste brasileiro, realizados por Matos et al. (1996), mostraram que o neral e o geranial são os constituintes químicos majoritários presentes em três tipos e a carvona foi o constituinte majoritário de outros três. Dentre os componentes

químicos dos óleos essenciais, o citral, mirceno e limoneno parecem atuar de maneira sinérgica, sendo responsáveis pelos principais efeitos desses óleos (AGUIAR; COSTA, 2005).

Já no ano 2000, Rao et al. identificaram 50 compostos que correspondiam a aproximadamente 90% do total do óleo desta espécie. O geranial foi o composto majoritário correspondendo a 15,57%, seguido por uma mistura do mirteno e mirtenal (9,89%), neral (9,44%), geraniol (7,36%), 2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimetil acetato (6,87%), 1-octeno-3-ol (4,66%), 6-metil-5-hepteno-2-one (4,60%), óxido de cariofileno (4,52%), b-cariofileno (3,09%), citronelol (2,63%), linalol (2,20%), 3-pipeno-2-ol (2,19%), beta mirceno (1,49%) e farnesol (1,35%).

Em 2001, Lorenzo et al. demonstraram que o linalol foi o componente majoritário (55%) do óleo essencial de *Lippia alba*. Já Senatore e Rigano (2001), na Guatemala, encontraram altas quantidades de limoneno (43,6%) e piperitone (30,6%) no óleo essencial obtido a partir de folhas secas da *Lippia alba*.

Em seu estudo, Jannuzzi (2006) identificou cinco quimiotipos da espécie de *Lippia alba* cultivada no Distrito Federal: limoneno-citral, mirceno-citral, mirceno-neral, citral e linalol. Assim como este autor, Ricciard et al. (2001) relatam que existem cinco quimiotipos de *Lippia alba* conhecidos na Argentina, porém com apresentação de seus constituintes diferentes da encontrada por Jannuzzi: citral/linalol, d-limoneno/lippiona, d-piperitona, citral e piperitona/limoneno + 1,8 cineol.

A composição do óleo essencial está intimamente relacionada às condições geomorfológicas, climáticas e de cultivo além da metodologia de extração e análise utilizadas. Tudo isso gera uma variedade de quimiotipos cuja composição, nem sempre são coincidentes (BOTTIGNON, 2009).

Essa variabilidade de tipos químicos é responsável pelas inúmeras utilizações na medicina popular. Contudo, deve-se estar atendo ao seu constituinte majoritário na hora de descrever a sua ação, pois pode ocorrer uso inadequado da espécie cultivada para se alcançar um objetivo (JANNUZZI, 2006).

2.5.2. Potencial Econômico

Estima-se que atualmente o Brasil colabore com 0,1% dos US\$ 1,8 bilhões despendidos no mercado internacional de óleos essenciais. Esta quantia brasileira refere-se à exportação de óleos de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima e capim-limão (*Lippia sidoides*) (SANTOS et al., 2006; YAMAMOTO, 2006).

De acordo com o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Brasil movimentou um total aproximado de US\$ 115 milhões (FOB) com importação e exportação de óleo essencial. Este comércio tem despertado o interesse da comunidade científica para novos estudos com plantas medicinais promissoras tendo em vista maiores exportações (SCHOCKEN, 2007).

De acordo com Ming (1992), a *Lippia alba* é uma planta com múltiplas propriedades medicinais, bastante utilizada no mercado popular e de grande interesse comercial pelas propriedades de seus compostos secundários (BOTTIGNON, 2009).

Para Tavares et al. (2003), as condições de rápida propagação vegetativa da *Lippia alba* e sua ampla variedade fenotípica, favorece um crescente potencial econômico dessa espécie (BOTTIGNON, 2009). No entanto, o sistema de classificação de óleos essenciais, *The Harmonized Commodity Description System* (HS), utilizado por diversos países, ainda não apresenta o óleo essencial de *Lippia alba* em sua lista. Por isto, não se sabe a respeito da disponibilidade desse óleo em nível comércio internacional, ou mesmo estatísticas que revelem a sua movimentação no quadro de importações e exportações (UNCTAD, 2005).

A espécie *Lippia alba* é amplamente utilizada na medicina popular, que descreve suas inúmeras propriedades farmacológicas. Mostra-se, portanto, como uma espécie promissora para as indústrias já sendo utilizada na elaboração de fragrâncias, repelentes, inseticidas e fungicidas (MING, 1992; SANTO MENDES, 2001; RUFINO, 2008).

De acordo com informações transmitidas por Krause (2010), a empresa catarinense Herbia®, faz uso, dentre outros produtos, do óleo essencial da *Lippia alba* para comercializar sabonetes, xampus, perfumes e hidratantes, sendo que o valor dos produtos gira em torno de 5,82 a 11,65 dólares (PEÑUELA, 2010).

Na Costa Rica, há produção de 2 toneladas de folhas secas da *Lippia alba* comercializadas na forma de saches. 20 gramas do produto custa o equivalente US\$

0,7 e o quilograma alcançando US\$ 3,00 a 3,60. Neste país, a desvalorização comercial dessa espécie advém da baixa demanda local por faltas de comprovações farmacológicas e toxicológicas da planta que dificultam um registro sanitário para a sua comercialização (DOMÍNGUEZ et al., 2004).

2.6 Estudos pré-clínicos com a *Lippia alba*

Alguns estudos já foram realizados na tentativa de comprovar algumas das utilizações populares da *Lippia alba* bem como para caracterizar o mecanismos de ação dessa espécie. A exemplo seguem-se alguns destes trabalhos.

Por ser bastante conhecida na medicina popular como calmante, Klüeger et al. (1996) verificou o efeito depressor de infuso e destilado de *Lippia alba* (Mill.) sobre o SNC e comprovou a ação depressora somente com o infuso na dose de 30 mg/kg i.p. Santos et al. (1998) administraram o extrato etanólico da *Lippia alba* (40%, 60%, 80% e/ou 90%) nas concentrações 100 e 200 mg/kg por via oral e verificaram também uma ação depressora sobre SNC. Já Vale et al. (1999) analisaram três quimiotipos de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.), a saber EO I: citral (55,1%), β -myrcene (10,5%) e limoneno (1,5%); EO II: citral (63,0%) e limoneno (23,2%); EO III: carvona (54,7%) e limoneno (12,1%), e compararam a ação sobre o SNC nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200 mg/Kg pela via i.p. Eles comprovaram que este óleo possui efeitos ansiolíticos e sedativos. No ano seguinte, Viana et al. (2000) realizaram experimentos com os mesmos três quimiotipos citados, nas concentrações 50, 100, 200, 400 e 800 mg/Kg por via i.p., e v.o., e observaram efeitos inibitórios sobre as convulsões induzidas por Pentilenotetrazol (PTZ). O estudo de Soares et al. (2001), com o extrato etanólico da *Lippia alba* (com 40%, 60%, 80% e 90% de etanol), nas concentrações de 100, 200 e 400 mg/Kg, corroborou com os trabalhos anteriores ao identificar atividade anticonvulsivante no ensaio também com PTZ. Essa ação anticonvulsivante, especificamente no modelo induzido PTZ, e o efeito potencializador do diazepam, sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico.

Em 2002, Zetóla et al. utilizaram extratos etanólicos (com 40%, 60% e 80% de etanol) na dose de 200 mg/kg (v.o.) e demonstraram ações sedativa, miorrelaxante e anticonvulsivante dos extratos. O extrato com 80% de etanol, que continha a maior

quantidade de flavonóides, foi o que apresentou mais efeitos significativos de sedação e relaxamento muscular.

No ano seguinte, Trevisan e Macedo (2003) investigaram a atividade anticolinesterase de componentes extraídos de algumas plantas, dentre elas a *Lippia alba*, no tratamento da doença de Alzheimer e os resultados apontaram certos percentuais de inibição.

As diversas utilizações da *Lippia alba* conduziram os estudos com esta planta para diversos fins a citar seu efeito inseticida, fungicida, antibacteriana e antimicrobiana.

Ao investigar compostos de origem vegetal em busca de inseticidas com baixa toxicidade para mamíferos, Russo et al. (2005) testaram o extrato de *Lippia alba* contra a praga *Tribolium castaneum*, observando um efeito letal sobre a mesma. Com isso, sugeriu-se que esse extrato poderia servir de base para novos agroquímicos. Além disso, outros trabalhos com o extrato também revelaram efeito citotóxico e alelopático em sementes de alface bem como atividade anti-cândida com o uso da planta (SOUZA, 2005; HOLETZ et al., 2006).

Cáceres et al. (1991) verificou a atividade antibacteriana da *Lippia alba* que inibiu preferencialmente *S. aureus* e *S. pneumoniae* e moderadamente *S. pyogenes*. Esse achado corroborou com Sena Filho et al. (2006) que confirmaram a ação do extrato etanólico desta espécie frente a *S. aureus*. A atividade antimicrobiana dessa espécie também foi avaliada por Alea et al. (1997) através do uso de óleo essencial de *Lippia alba* que apresentou atividade antibacteriana principalmente sobre bactérias Grampositivas com concentração inibitória mínima variando entre 0,3 e 0,63mg mL⁻¹. De todas as bactérias a *Pseudomonas aeruginosa* foi a única que revelou-se resistente.

2.7. Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) constitui uma das principais causas de morte entre os adultos no Brasil e se enquadra entre os principais fatores de risco para complicações cardiovasculares (SIMÕES; SCHMIDT, 1996). Contudo, segundo Ku (2006) cerca de 90 a 95% dos hipertensos desconhecem a sua etiologia (SOARES, 2008).

De acordo com *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure* (2004), estima-se que no mundo haja um bilhão de indivíduos acometidos pela hipertensão arterial, cuja morbidade é tida como causa morte para 7,1 milhões de óbitos registrados. Em 2001, a hipertensão arterial foi responsável por 7,6 milhões de mortes no mundo e foi classificada como o fator de risco responsável por 54% dos óbitos por acidente vascular cerebral e 47% daqueles registrados como doença isquêmica cardíaca (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

No Brasil, ainda são poucos os estudos que investigam a prevalência da HAS. Contudo, análises realizadas nos últimos 20 anos em diversas cidades brasileiras estimam que acima de 30% de toda a população deste país seja portadora de HAS (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010). O surgimento desta patologia correlaciona-se com a idade do indivíduo, alcançando uma probabilidade de 90% de risco para uma pessoa ser hipertensa ao longo de sua vida (VASAN et al., 2002).

A hipertensão arterial é um conjunto de alterações metabólicas, inflamatórias, pró-trombóticas que ocasionam uma elevação da pressão arterial. A pressão arterial é a força que o sangue exerce contra as paredes vasculares, em função da resistência vascular e do débito cardíaco, variáveis estas controladas também pelo sistema nervoso autônomo. Os níveis pressóricos normais de um ser humano adulto variam de 120 a 80 mmHg, raramente variando mais do que 10 a 15 % devido aos mecanismos de controle existentes no organismo humano (GUYENET et al., 2006).

Guyton e Hall (2006) classificam esses mecanismos em: a) mecanismo de resposta rápida, que age em segundos e é comandado pelos barorreceptores, quimiorreceptores e o sistema nervoso central; b) mecanismo de controle a médio prazo, ocorre em minutos e é comandado pelos sistemas hormonais como renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, fator natriurético atrial e fatores contracturantes derivados do endotélio; c) mecanismo de controle pressórico que ocorre por horas ou dias, de responsabilidade dos rins.

2.7.1. Fisiopatologia da HAS

A hipertensão é uma patologia crônica multifatorial que se relaciona diretamente com o valor da resistência vascular periférica (RVP). A elevação da RVP pode advir da constrição da musculatura lisa arterial ou da proliferação e crescimento das células desta musculatura. O controle dessa resistência se faz por fatores intrínsecos, humorais e pelo sistema nervoso autônomo (SNA) que influencia o controle da pressão arterial (PA) por meio da ação do sistema nervoso simpático (SNS), o principal responsável, e através da ativação vagal cardíaca (LIZARDO, 2005).

Os neurônios pós-ganglionares simpáticos agem no controle da pressão de três maneiras: regulando a contração dos vasos arteriais; influenciando o aumento do débito cardíaco através das ações inotrópica e cronotrópica positivas; bem como por meio da modulação do volume sanguíneo por constrição venosa (COLOMBARI et al., 2001). Fisiologicamente, esse controle da PA pelo tônus simpático é gerado por estímulos enviados pelos barorreceptores à área bulbar ventrolateral rostral (RVLM) que modula a atividade eferente simpática. Logo, a remoção ou destruição de aferências barorreflexas proporciona um desbalanço no controle da PA, tornando-se um sistema incapaz de manter a pressão dentro de uma faixa de regulação normal. Embora o barorreceptor tenha ação reguladora da pressão arterial, e sua sensibilidade seja um preditor de mortalidade cardiovascular, o seu papel na gênese da HAS ainda não está definido (LA ROVERE et al., 1998; DE ANGELIS et al., 2004; GUYENET, 2006).

A existência da hipertensão pode estar correlacionada também com a predisposição genética do indivíduo, a idade, a obesidade, a dieta, o tabagismo, a atividade física e com fatores ambientais (KAKAR et al., 2006). Segundo critérios estabelecidos pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), é classificado com hipertenso o indivíduo que apresentar pressão sistólica ≥ 140 mmHg e pressão diastólica ≥ 90 mmHg.

A HAS pode ser dividida em pré-hipertensão, cuja pressão sistólica varia de 120 a 135 mmHg e a pressão diastólica varia de 80 a 89 mmHg; hipertensão primária (essencial) responsável por cerca de 95% dos casos; e hipertensão secundária, cuja

etiologia é conhecida, possibilitando a cura a partir do tratamento da patologia primária (CORRÊA et al., 2005).

A forma mais comum, a hipertensão essencial, caracteriza-se por uma elevação de causa desconhecida da pressão sanguínea (GUYTON; HALL, 2006). Até os dias de hoje, não se conseguiu conectar essa patologia a qualquer um dos mecanismos descritos anteriormente (PAGE et al., 1999). Acredita-se, portanto, que esse tipo principal de hipertensão esteja associado à disfunção endotelial que é encontrada em inúmeros acometimentos cardiovasculares tornando-se objeto de estudo terapêutico (ALCÂNTARA; RAMALHINHO, 2003).

2.7.2. Disfunção endotelial e Hipertensão

O endotélio vascular constitui o maior órgão-alvo na hipertensão arterial (MELO et al., 2007). Quando íntegro, é responsável por secretar substâncias relaxantes e contraturantes que em equilíbrio controlam o tônus e a estrutura do vaso (ALCÂNTARA; RAMALHINHO, 2003; LUZ et al., 2005; FÉLÉTOU, 2009).

As funções do endotélio intacto relacionadas à vasomotricidade são: a) síntese de vasodilatadores dependentes do endotélio como o óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI_2) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); b) produção de fatores constritores derivados do endotélio como endotelina 1, angiotensina II, tromboxano A_2 , prostaglandina H_2 , leucotrienos, e espécies reativas de oxigênio (BATLOUNI, 2001; LUZ et al., 2005).

A disfunção endotelial advinda do desequilíbrio de seus fatores derivantes pode ocasionar um aumento da resistência vascular e com isso propiciar o surgimento da hipertensão arterial por mecanismos multifatoriais (CARVALHO et al., 2001). Entre os mecanismos causadores pode-se propor: a) redução da liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio; b) aumento da liberação dos fatores constritores derivados do endotélio; c) redução da biodisponibilidade dos fatores relaxantes, principalmente o NO; d) redução da sensibilidade do músculo liso vascular aos fatores relaxantes; e) distúrbios na transdução de sinais liberados pelos fatores relaxantes (BATLOUNI, 2001).

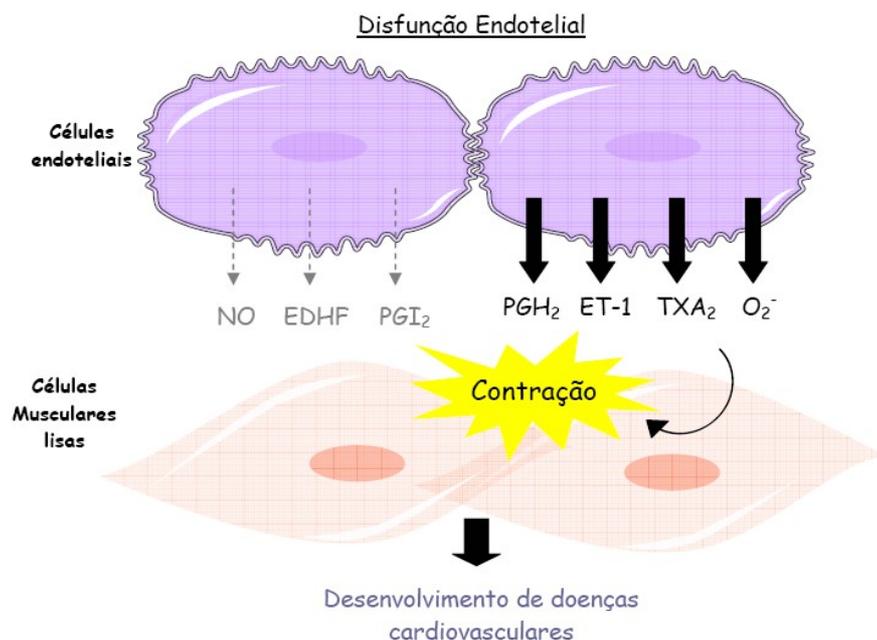


Figura 3: Esquema de Disfunção Endotelial, favorecendo o surgimento de doenças cardiovasculares. Fonte: Rattmann (2009)

Atualmente, considera-se o NO derivado das células endoteliais como substância fundamental para a homeostase vascular, por isso, este gás tem sido alvo de estudos para a prevenção de doenças cardiovasculares (SOARES, 2008). A diminuição da disponibilidade de NO nos hipertensos retira o efeito inibitório deste sobre o receptor de endotelina tipo B das células musculares que medeiam a contração. Dessa forma, o equilíbrio encontra-se alterado e a ação constritora supera o relaxamento (ALCÂNTARA; RAMALHINHO, 2003).

Outro mediador importante na hipertensão é a Angiotensina II. Sua ação aumentada sobre o receptor AT1 favorece a contração e hipertrofia celular, sendo ainda responsável por produção de espécies reativas de oxigênio que em quantidade excessiva implica em processos fisiopatológicos de degradação do principal fator relaxante, o NO (LUZ et al., 2005; BIAN et al., 2008).

Alterações do EDHF também estão associadas à doenças cardiovasculares. As ações do EDHF envolvem um aumento intracelular de Ca²⁺ que ativa canais de potássio (K⁺) (BK_{Ca}, SK_{Ca} e IK_{Ca}) que induzem a hiperpolarização das células da musculatura lisa pelo efluxo de K⁺. Esse mecanismo irá reduzir a abertura de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem, reduzindo a contração. Desta forma, alterações

desta via também contribuem para o aparecimento de uma disfunção endotelial (LUZ et al., 2005; FÉLÉTOU, 2009).

Os canais de potássio são de extrema importância para a excitação cardíaca uma vez que atuam na repolarização do potencial de ação.

O K^+ encontra-se abundante no meio intracelular quando comparado ao meio extracelular. A abertura de canais deste íon favorece a saída de K^+ , o que negativa o potencial de membrana (hiperpolarização). Essa alteração de potencial é importante para a regulação do tônus da musculatura lisa e para o fluxo sanguíneo (SHIEH et al., 2000).

2.7.3. Controle da pressão arterial

De acordo com Panza et al. (1993), indivíduos com hipertensão essencial apresentam uma alteração na liberação de NO pelo endotélio o que gera um incremento da resistência vascular basal e um comprometimento na resposta vasodilatadora derivada do endotélio.

A síntese de NO nas células endoteliais está relacionada com o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . A ligação de um agonista ao receptor M_3 ativa a proteína G que por sua vez estimula a fosfolipase C para produzir DAG e IP_3 . Este último é responsável pela liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) para o meio intracelular. O aumento das concentrações citoplasmáticas de Ca^{2+} na célula endotelial favorecem a sua ligação com a calmodulina estimulando a ativação da eNOS. A eNOS reduz a L-arginina em L-citrulina e libera o NO. Após sua síntese, o NO se difunde para as células musculares lisas vasculares e se liga ao seu receptor, à ciclase da guanilil solúvel (CGs). Ativada, a CGs aumenta as concentrações intracelulares de GMPc, que por sua vez ativam a proteína quinase G (PKG) promovendo diversos efeitos, entre eles podemos citar: abertura de canais para K^+ , aumento da captação de Ca^{2+} do citoplasma para o RE através da bomba de cálcio do RE (SERCA) e inativação da quinase da cadeia leve de miosina (MLCK). Todos estes eventos em conjunto resultam em vasorrelaxamento (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; WALDMAN; MURAD, 1988; CORNWELL, et al., 1991; ARCHER et al., 1994; RANG et al., 2001; LUZ et al., 2005; FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; SURKS, 2007; RATTMANN et al.,

2009). Além disso, a ativação dessa proteína induz uma hiperpolarização da membrana que influencia no fechamento dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem e conseqüentemente inibe a entrada desse íon para o citosol (ARCHER et al., 1994; BUSSE et al., 2002; CAWLEY et al., 2007).

2.7.4. Tratamento da hipertensão arterial

Manter a pressão arterial dentro dos níveis de normalidade evita morbidade e mortalidade por causas cardiovasculares. Sendo assim, diversos são os tratamentos medicamentosos para preservar esses indivíduos de acometimentos futuros. Dentro da classe de anti-hipertensivos tem-se diuréticos, inibidores adrenérgicos, vasodilatadores diretos, inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), antagonistas dos canais de Ca^{2+} e antagonistas do receptor da angiotensina II (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO, 2010).

Algumas dessas substâncias, contudo, ocasionam significativos efeitos colaterais. Estes efeitos associados aos elevados custos médico e socioeconômico, decorrente principalmente das complicações secundárias à hipertensão como doença vascular encefálica (DVE), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal, favorecem a falta de adesão a esses tipos de tratamentos.

Em média 30 a 50 % dos pacientes diagnosticados com hipertensão interrompem o tratamento medicamentoso no primeiro ano de uso. Isso ocorre porque na maioria dos casos é uma doença sem sintomas. Essa taxa de adesão é cada vez menor com o passar dos anos de terapia, atingindo 75% de abandono após cinco anos de tratamento (PÉRES et al., 2003)

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão (2010), o tratamento não farmacológico ou alterações nos hábitos de vida devem ser os primeiros métodos de escolha dos portadores de hipertensão arterial, exceto em casos de hipertensão grave e comprometimento de órgãos-alvo. Como exemplo de terapêutica não medicamentosa para reduzir os valores pressóricos alterados temos o uso de plantas na medicina popular na forma de infusões e macerações (FERRO, 2006).

2.7.5. *Lippia alba* e Hipertensão arterial

Em algumas comunidades, as práticas populares são, muitas vezes, a única opção viável para tratar doenças. Portanto, a descoberta científica de benefícios obtidos com o uso de plantas medicinais deve superar os riscos que esse produto possa vir a oferecer, para que drogas mais seguras, eficazes e de baixo custo sejam lançadas à população facilitando o tratamento da hipertensão arterial.

O uso medicinal de produtos naturais deve estar fundamentado em comprovações científicas para que possam ser consumidos de maneira segura. No entanto, Vora e Mansoor (2005) reportam que poucas são as plantas, utilizadas de maneira terapêutica, cuja segurança e efetividade são constatadas (SOARES, 2008).

Inúmeras pessoas utilizam-se dos vegetais como intervenção básica para tratar patologias agudas e crônicas, a exemplo hipertensão. Especificamente para este último uso, as pesquisas com plantas medicinais buscam demonstrar a efetiva ação cardioprotetora e anti-hipertensiva dessa terapêutica alternativa, visto que a manutenção da pressão arterial a níveis normais minimiza a morbidade e mortalidade por complicações como doenças cardiovasculares e DVE (TESTAI et al., 2002; MOHAMED et al., 2010).

Alguns autores propõem que a ação inespecífica da *Lippia alba* sobre o SNC advém de uma possível ação fisiológica periférica responsável pelo desenvolvimento de hipotensão e hipotermia (ZETOLA et al., 2002). Contudo, os achados de Guerrero et al. (2002) contradizem os estudos anteriores afirmando que o tratamento pela via intravenosa de ratos Wistar e ratos SHR com extrato etanólico de *Lippia alba* não ocasionou uma hipotensão.

O uso da *Lippia alba* contra hipertensão ainda não foi confirmado pela farmacologia experimental. No entanto, verbascosídeos e isoverbascosídeos, que são potentes compostos vasorelaxantes, assim como glicosídeos de apigenina (citrus bioflavonóide) e luteolina (citrus bioflavonóide), ambos com propriedades vasorelaxantes, já foram isolados desta planta (HENNEBELLE et al., 2008).

Sendo assim, o estudo da *Lippia alba* é imprescindível para que profissionais da saúde possam orientar o uso correto dessa planta. A sua indicação no combate à hipertensão deve estar embasada cientificamente para que não haja prejuízo ao indivíduo e para que se possa comprovar o seu uso, quer seja como alternativa

terapêutica ou como complemento ao tratamento com medicamentos alopáticos. Portanto, partindo-se desse pensamento, o estudo em questão mostra-se justificável.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar os efeitos cardiovasculares de diferentes quimiotipos do óleo essencial de *Lippia alba* (OELA).

3.2. Específicos

- I) Caracterizar qual dos diferentes quimiotipos do OELA disponíveis apresenta o melhor efeito sobre a PAM e FC;
- II) Caracterizar os efeitos da administração aguda do melhor quimiotipo testado do OELA pela via intravenosa (i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) em ratos saudáveis não-anestesiados;
- III) Investigar a participação dos receptores muscarínicos e nicotínicos, bem como do NO e da PGI₂ nos efeitos sobre a PA e FC do melhor quimiotipo testado do OELA em ratos saudáveis não anestesiados;
- IV) Caracterizar os efeitos do melhor quimiotipo testado do OELA sobre a reatividade vascular da artéria mesentérica de ratos saudáveis;
- V) Investigar os possíveis mecanismos de ação do melhor quimiotipo testado do OELA sobre a reatividade vascular da artéria mesentérica de ratos saudáveis;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do OELA

O material vegetal foi coletado na Fazenda Experimental “Campus Rural da UFS”, localizado no município de São Cristóvão/SE, latitude 11°00’ S e longitude 37°12’ W.

Em estudo anterior desenvolvido por Blank et al. (2007), observou-se que, especificamente durante a estação chuvosa, o teor dos componentes do óleo volátil de *Lippia alba* aumentou ao longo do meio-dia, diminuindo até às 17:00 h. Vale destacar que variações diárias de temperatura e luminosidade podem ser as responsáveis por estes resultados. Estes pesquisadores ainda verificaram que o horário de maior quantidade de constituintes voláteis do óleo essencial de *Lippia alba* era às 15:00 h tanto em épocas de seca quanto em épocas chuvosas. Sendo assim, a coleta das folhas de *Lippia alba* foram realizadas nos períodos de julho de 2009 e fevereiro de 2010 nos horários de 14:00 h às 17:00 h. Um exsicata desta espécie foi depositada no Herbário da UFS sob o número ASE 13495.

Foram selecionados 5 quimiotipos do Banco Ativo de Germoplasma de *Lippia alba* da UFS. As plantas foram cortadas a 20 cm do solo e suas folhas foram secas em estufas com fluxo de ar forçado a uma temperatura de $40 \pm 1^\circ \text{C}$ por cinco dias. O óleo foi então extraído pelo processo de hidrodestilação em aparelho Clevenger por 160 min. O teor dos principais componentes químicos no óleo essencial foi identificado pela análise de cromatografia gasosa (Shimadzu QP5050A) interfaceada com espectrometria de massa (CG/EM) dotada de coluna capilar DB-5 conectado a um detector operando em impacto eletrônico a 70 eV. A identificação dos constituintes do óleo essencial foi efetuada com base nos índices de retenção e pela comparação do espectro de massa com o banco de dados da biblioteca NIST21 e NIST107. Todo este processo foi realizado no Laboratório de Fitotecnia do Departamento de Engenharia Agrônômica – UFS, coordenado pelos professores Arie e Fátima Blank, em parceria com o Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da UFS.

4.2. Drogas

Durante a realização dos experimentos, foram utilizadas as seguintes drogas: Tiopental sódico (CRISTÁLIA), heparina (Roche), sulfato de atropina, hexametônio, N^G-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), indometacina (INDO), nifedipina (NIF) e tetraetilamônio (TEA) (todas da SIGMA). Para a preparação das soluções estoques, a INDO foi dissolvida juntamente com NaHCO₃ a 5% em água destilada e as demais drogas foram dissolvidas somente em água destilada.

Para preparação das soluções estoques, o óleo foi dissolvido em uma mistura de salina/cremofor (0,1% v/v) para estudos *in vivo* e em uma mistura de água destilada/ cremofor (0,1% v/v) para estudos *in vitro*.

Todas as soluções foram mantidas a 0°C e quando necessário, elas foram diluídas em salina (estudos *in vivo*) para concentrações desejadas minutos antes dos ensaios farmacológicos.

4.3. Animais

Em todos os experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), saudáveis, pesando entre 200 e 300 g (Figura 4), provenientes do Biotério Central da UFS, e mantidos sob condições controladas de temperatura (21 ± 1°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (6 - 18 horas), tendo livre acesso à alimentação e água até a realização dos experimentos.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe/UFS sob o número de protocolo 06/09.



Figura 4: Ratos Wistar. Fonte: Luana Maynard (2011)

4.4. Ensaios farmacológicos *in vivo*

4.4.1. Preparação dos animais

Os efeitos da anestesia sobre o sistema cardiovascular são bem relatados na literatura. A utilização desta tem repercussão na alteração dos principais sistemas de regulação da pressão arterial (PA), o que induz depressão das sinapses do sistema nervoso central além de promover alterações das respostas autonômicas. Desta forma, com o objetivo de minimizar a influência da anestesia e do estresse cirúrgico nos parâmetros cardiovasculares durante os testes farmacológicos, os animais foram mantidos sob anestesia somente durante o procedimento cirúrgico de implantação de cateteres descrito a seguir.

Neste procedimento, 44 ratos (200 - 300g) foram anestesiados com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.), e cateteres de polietileno (PE), um segmento de 3 cm de PE-10 (diâmetro interno e externo de 0,28 e 0,61 mm, respectivamente), soldado a um segmento de PE-50 (diâmetro interno e externo de 0,58 e 0,96 mm, respectivamente), preenchidos com solução salina heparinizada (1:20 v/v), foram implantados, através de incisão inguinal, na aorta abdominal e na veia cava inferior, via artéria e veia femoral esquerdas, respectivamente. Após a inserção e fixação dos cateteres, os mesmos foram tunelizados subcutaneamente e exteriorizados através de uma incisão

na região cervical posterior do animal (*scapulae*). As incisões foram então suturadas e os animais foram colocados em caixas individuais, onde permaneceram por um período mínimo de 24h (recuperação pós-operatória).

Após este período, a PA e frequência cardíaca (FC) foram medidas pela conexão do cateter arterial a um transdutor de pressão (Edwards Lifescience, Irvine, CA, EUA) pré-calibrado acoplado a um amplificador (Modelo BD-01, BioData, João Pessoa, PB, Brasil) e conectado a um micro-computador equipado com placa conversora analógico-digital (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) e com programa Biomed (BioData, João Pessoa, PB, Brasil) (Figura 5). Os parâmetros foram registrados simultaneamente numa frequência de amostragem de 200 Hz. Para cada ciclo cardíaco, o computador calculou pressão arterial sistólica, diastólica e média, e o intervalo de pulso (referido como frequência cardíaca). O cateter venoso foi implantado para a administração das drogas.



Figura 5: Sistema de aquisição de dados da PAM e FC em ratos.
Fonte: Luana Maynard (2011)

4.4.2. Protocolo experimental *in vivo* com os diferentes quimiotipos do OELA

Para caracterizar qual o quimiotipo do OELA apresenta melhor efeito sobre a pressão arterial média (PAM) e FC, foi realizada uma curva dose-resposta para cada quimiotipo separadamente (n = 5). Os cinco quimiotipos analisados da *Lippia alba* a saber: geranial (OELA_G), limoneno (OELA_{Lm}), linalol (OELA_L), mirceno (OELA_M) e carvona (OELA_C).

As medidas de PAM e FC foram realizadas como descrito em MOREIRA et al. (2010). Para obtenção de uma curva dose-resposta controle, os animais foram mantidos em aclimatação por um período de no mínimo 30 minutos, para estabilização dos parâmetros cardiovasculares. Após este período, doses crescentes do OELA (5, 10, 20, 40 e 60 mg/kg) foram administradas pela via intravenosa *in bolus* com intervalos de tempo suficiente para que os parâmetros cardiovasculares retornassem aos seus valores basais (em média 5 minutos). Os valores de PA e FC foram computados antes (valores da linha de base) e imediatamente após a administração do OELA, e suas variações foram expressas em percentagem para cada dose, calculadas através do seguinte modelo de fórmula:

$$\text{Resposta (\%)} = \frac{(\text{Resposta final} - \text{Resposta inicial}) \times 100}{\text{Resposta inicial}}$$

Após a identificação do quimiotipo com melhor efeito, este foi utilizado para os demais protocolos experimentais que se seguem.

4.4.3. Protocolo experimental *in vivo* com o quimiotipo do OELA de escolha

Para tentar elucidar o(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação implicado(s) no efeito do quimiotipo do OELA com melhor efeito sobre a PA e FC, a mesma curva dose-resposta foi obtida em animais previamente tratados, pelo menos 30 minutos, com atropina (2 mg/kg, i.v.), um antagonista muscarínico não-seletivo (MITCHELSON, 1984), L-NAME (20 mg/kg, i.v.), um inibidor competitivo da sintase do óxido nítrico (NOS) (REES et al., 1990), indometacina (5 mg/kg, i.v.), um inibidor da ciclo-oxigenase (COX) (CLARK; FUCHS, 1997) e hexametônio (20

mg/kg, i.v.), um antagonista dos receptores nicotínicos (TAKAHASHI; OWYANG, 1997). Estas curvas foram comparadas com a curva controle do quimiotipo de escolha do OELA nas doses de 5, 10, 20 e 40 mg/kg.

4.5. Caracterização dos efeitos do OELAG sobre a reatividade vascular em artéria mesentérica de rato saudável: estudos *in vitro*

4.5.1. Preparação da artéria mesentérica superior isolada de rato

Os ratos (n = 12) foram previamente anestesiados com éter e então eutanasiados por deslocamento cervical e dessangramento. Em seguida, a artéria mesentérica superior foi retirada através de uma incisão no abdome do animal (Figura 6). Após este procedimento, as carcaças foram embaladas em jornal, acondicionadas em sacos plásticos e depositadas no freezer do biotério setorial do DFS/UFS para o devido descarte pela TORRE, empresa de coleta de lixo hospitalar que presta serviço a UFS.

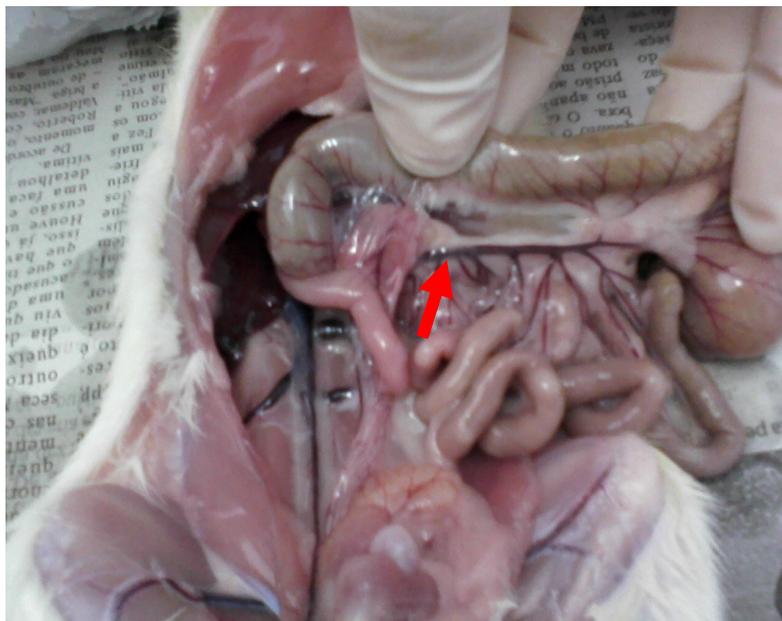


Figura 6: Artéria mesentérica superior de rato. Fonte: Luana Maynard (2011)

Anéis do primeiro segmento da artéria mesentérica (1 - 2 mm) foram obtidos livres de tecido conjuntivo e adiposo, mantidos em cubas contendo 10 mL de solução nutritiva de Tyrode (concentração em mM: NaCl, 158,3; KCl, 4,0; CaCl₂, 2,0; MgCl₂, 1,05; NaH₂PO₄, 0,42; NaHCO₃, 10,0 e glucose, 5,6) a 37° C e gaseificada com uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para o registro das contrações isométricas, os anéis foram suspensos por linhas de algodão e estas fixadas a transdutores de força (Letica Scientific Instruments, TRI 210, Barcelona, Espanha). Estes transdutores estavam conectados a um sistema de aquisição de dados de 4 canais constituído por um amplificador de sinais (AVS, São Paulo – SP, Brasil), interface conversora analógica-digital (DATAq Instruments, DI 148U, Akron - OH, USA) com software de aquisição (Dataq instruments, Windaq Lite, Akron - OH, USA) (Figura 7).

Cada anel (Figura 8) foi submetido a uma tensão constante de 0,75 g por um período de no mínimo 60 min. Durante este tempo, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos para prevenir a interferência de metabólitos (ALTURA; ALTURA, 1970).

Os anéis sem endotélio foram obtidos mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso e um fio de aço inoxidável fino. A presença ou ausência do endotélio funcional foi verificada pela habilidade da ACh (10 μ M) em relaxar os anéis pré-contraídos com 1 μ M de fenilefrina (Phe), medida em porcentagem de relaxamento (%). Foram considerados com endotélio funcional, os anéis que apresentaram relaxamentos superiores a 75 % sobre a pré-contracção com Phe. Já os anéis com relaxamentos inferiores a 10 %, foram considerados sem endotélio funcional (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Anéis com relaxamentos entre 10 e 75 % foram descartados.

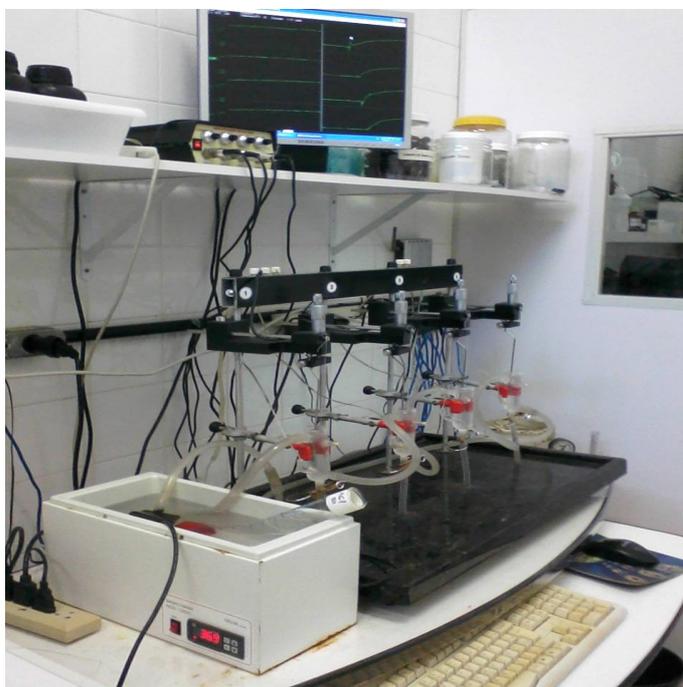


Figura 7: Sistema de aquisição de dados de reatividade vascular.
Fonte: Luana Maynard (2011)



Figura 8: Anel arterial, disposto entre duas hastes, suspenso por linha de algodão e mantido em cuba para órgão isolado contendo solução nutritiva de Tyrode. Fonte: Luana Maynard (2011)

4.5.2. Protocolos experimentais empregados nos estudos *in vitro*

Após o período de estabilização e a verificação da presença do endotélio funcional, os anéis ($n = 5$) foram pré-contraídos com Phe ($1 \mu\text{M}$) e sobre a fase tônica desta contração foram adicionadas cumulativamente à cuba, concentrações crescentes do quimiotipo de escolha do OELA ($1, 3, 10, 30, 100, 300$ e $1000 \mu\text{g/mL}$), para a obtenção de uma curva concentração-resposta controle. Curvas como estas também foram obtidas após a remoção do endotélio vascular ($n = 5$).

4.5.2.1. Avaliação da participação dos canais de K^+ nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA

Para avaliar a participação dos canais de K^+ foram obtidas curvas concentração-resposta para o quimiotipo de escolha do OELA ($1, 3, 10, 30, 100, 300$ e $1000 \mu\text{g/mL}$), na ausência do endotélio funcional e após pré-incubação por $30'$ com

TEA (100 μM), que segundo Cook (1989), nessa concentração é um bloqueador não seletivo de canais de K^+ .

4.5.2.2. Avaliação da participação dos canais de Ca^{2+} nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA

Um possível efeito do OELA sobre os canais de Ca^{2+} , foi investigado a partir de curvas concentração-resposta ($n = 5$) para o quimiotipo de escolha do OELA em anéis sem endotélio e pré-contraídos com KCl 80 mM, ou a partir da construção de curvas concentração-resposta para CaCl_2 . Para os experimentos com CaCl_2 , as preparações eram lavadas com solução de Tyrode nominalmente sem cálcio e permaneciam nesta solução por 15 minutos. Após este período, as preparações eram lavadas com uma solução de KCl 60 mM nominalmente sem cálcio por mais 15 minutos e em seguida era adicionado cumulativamente a cuba o CaCl_2 (10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} , 3×10^{-3} , 10^{-2} e 3×10^{-2} M), porém na presença de concentrações isoladas de OELA (10; 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$) por um período de incubação de 30 minutos. Decorrido este tempo, os resultados foram avaliados comparando-se os percentuais de resposta contrátil na presença e na ausência do OELA.

4.5.2.3. Avaliação da participação dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Cavs) tipo-L sensíveis a diidropiridina nas respostas induzidas pelo quimiotipo de escolha do OELA

Investigou-se um provável efeito do OELA sobre os Cavs tipo-L a partir da comparação das respostas vasorelaxantes do OELA (300 $\mu\text{g/mL}$), em anéis sem endotélio funcional pré-contraídos com Phe (1 μM), antes e após a incubação com nifedipina (10 μM), um bloqueador seletivo destes canais (HAGIWARA et al., 1993).

4.6. Análise Estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para avaliar a significância das diferenças entre as médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma-via ou duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Para estas análises foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism versão 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.).

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos dos 5 quimiotipos de OELA sobre a PAM e FC em ratos saudáveis

A administração de doses crescentes dos 5 quimiotipos diferentes de OELA (5, 10, 20, 40 e 60 mg/kg, i.v.) revelou que o quimiotipo geranial (OELAG) desempenhou uma ação hipotensora significativamente maior quando comparado aos demais grupo (Figura 9 A).

No que diz respeito à FC, o OELAG produziu uma ação bradicárdica mais evidente nas últimas doses (40 e 60 mg/kg), contudo este efeito não foi significativamente diferente dos demais quimiotipos (Figura 9 B).

Com base nos resultados encontrados, optou-se por utilizar o quimiotipo geranial (OELAG) do óleo para desenvolver o restante da pesquisa visto que sua resposta hipotensora foi mais efetiva que aquelas obtidas para os demais quimiotipos.

5.2. Composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* quimiotipo geranial

Como demonstrado na tabela 1, a análise cromatográfica do OELAG revelou a presença de 19 constituintes, sendo o geranial e o neral os constituintes majoritários.

5.3. Efeitos hemodinâmicos do OELAG nos experimentos in vivo

O segundo objetivo específico buscou caracterizar os efeitos da administração aguda do OELA, agora denominado OELAG, pela via intravenosa sobre a PAM e FC em ratos saudáveis não-anestesiados, procurando investigar a participação dos receptores muscarínicos, nicotínicos, NO e PGI₂ nestes efeitos;

Tabela 1: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* quimiotipo geranial.

Pico	TR (min)	Composto	(%) GC-MS	IRR exp.*	IRR lit.**
1	8.275	1-Octen-3-ol	0.85	978	979
2	8.433	6-metil-5-Hepten-2-ona	0.74	983	985
3	8.600	Mirceno	1.99	988	990
4	10.608	(E) β -Ocimeno	0.67	1045	1050
5	12.575	Linalol	1.04	1100	1095
6	14.350	<i>trans</i> -Chrisanthemal	0.28	1147	1153
7	14.850	(Z) Isocitral	0.34	1161	1164
8	15.142	Epóxido de Rosefurano	0.27	1169	1177
9	15.550	(E) Isocitral	0.57	1180	1180
10	17.683	Neral	35.42	1238	1238
11	18.783	Geranial	48.58	1268	1267
12	22.617	Acetato de Geranila	0.53	1377	1381
13	22.975	β -Elemeno	1.45	1388	1390
14	23.992	(E) Cariofileno	2.72	1418	1419
15	26.033	Germacreno D	0.82	1480	1485
16	26.883	Germacreno A	0.50	1506	1509
17	27.142	Cubebol	0.27	1514	1515
18	29.233	Óxido de Cariofileno	2.68	1581	1583
19	31.250	Não identificado	0.28	1647	-
Total					

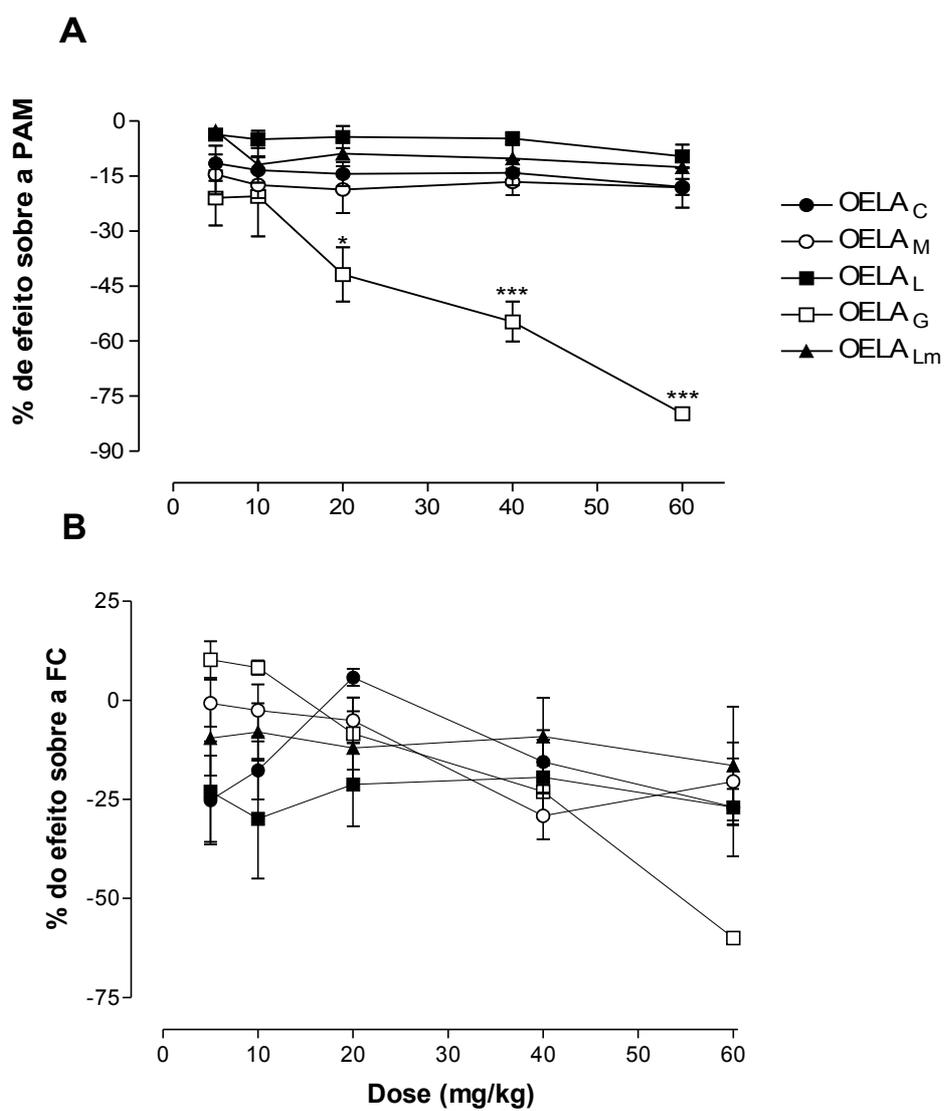


Figura 9: Efeitos da administração intravenosa e *in bolus* dos cinco diferentes quimiotipos de OELA: geranial (OELA_G), limoneno (OELA_{Lm}), linalol (OELA_L), mircenol (OELA_M) e carvona (OELA_C) (5, 10, 20, 40 e 60 mg/kg) sobre a PAM (A) e FC (B) de ratos saudáveis não-anestesiados. Os valores representam a média ± E.P.M. de 5 animais. As diferenças significativas foram avaliadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs os demais quimiotipos do OELA.

5.3.1. Efeitos do OELA_G sobre a PAM e FC em ratos saudáveis

A Figura 10 demonstra o registro original dos efeitos do OELA_G sobre a PAM e FC de um rato saudável. A análise da curva dose-resposta ($n = 5$) obtida em ratos controles demonstra que a administração intravenosa *in bolus* do OELA_G produziu uma redução da PAM e da FC (Figura 11 A e B).

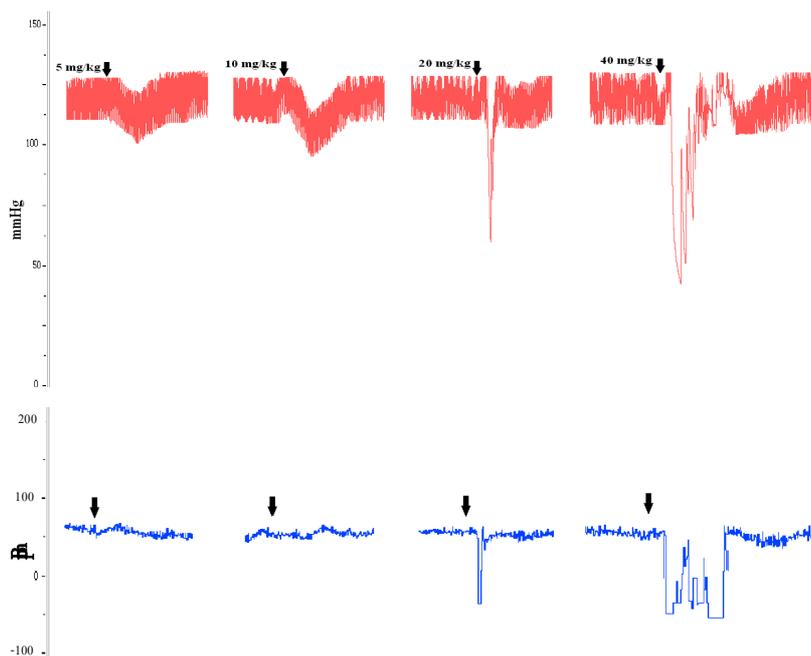


Figura 10: Registro original mostrando os efeitos do OELA_G (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) sobre a PAM e FC de um rato saudável. As setas indicam o momento de administração do óleo.

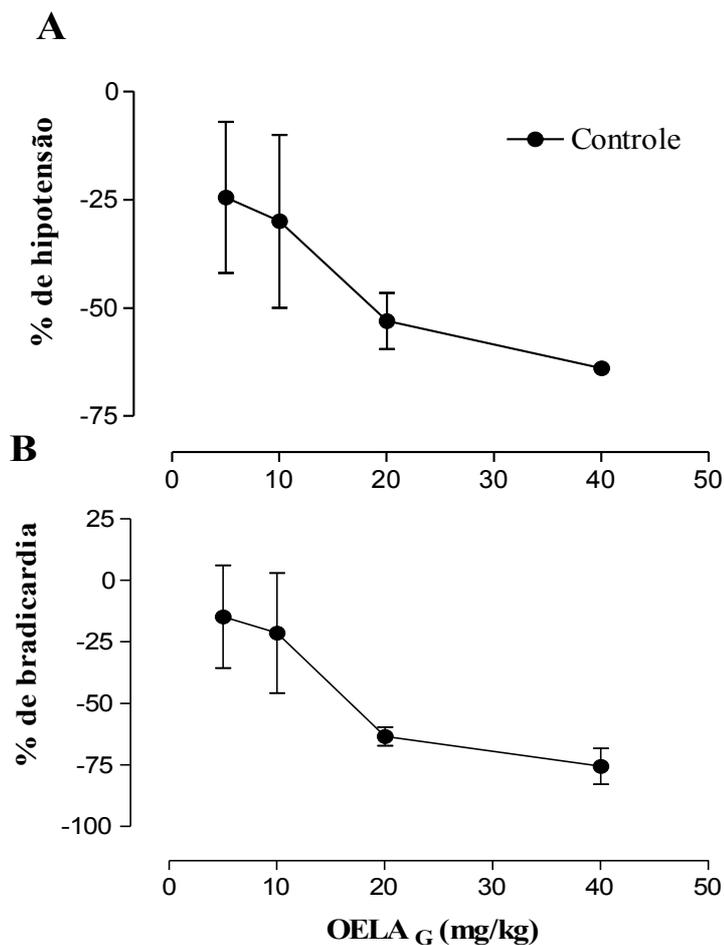


Figura 11: Efeitos hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração intravenosa *in bolus* de doses do OELA_G (5; 10; 20 e 40 mg/kg) em ratos saudáveis não-anestesiados. Os pontos expressam a média \pm E.P.M. (n = 5).

5.3.2. Efeitos do OELA_G sobre a PAM e FC em ratos saudáveis após o pré tratamento com atropina e hexametônio.

Como observado nas Figuras 12 (A e B) e 13 (A e B), as respostas hipotensora e bradicárdica do OELA_G, em animais pré-tratados com atropina ou hexametônio, foram significativamente atenuadas nas doses de 20 e 40 mg/Kg quando comparada com as respostas controles.

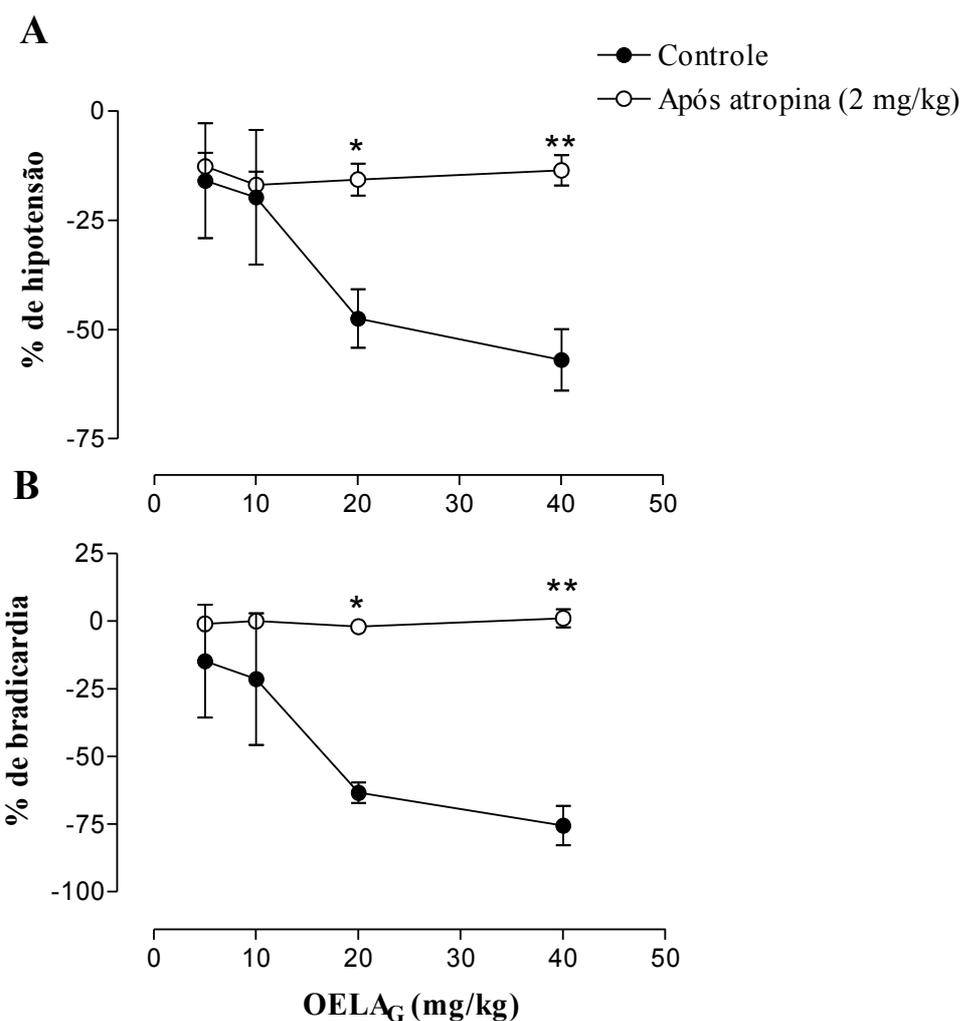


Figura 12: Efeitos hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzidos pela administração intravenosa *in bolus* de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com atropina (2 mg/kg; i.v.; 30 min). Os pontos expressam a média \pm E.P.M. de 5 experimentos. As diferenças significativas foram avaliadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle na mesma dose de OELAG.

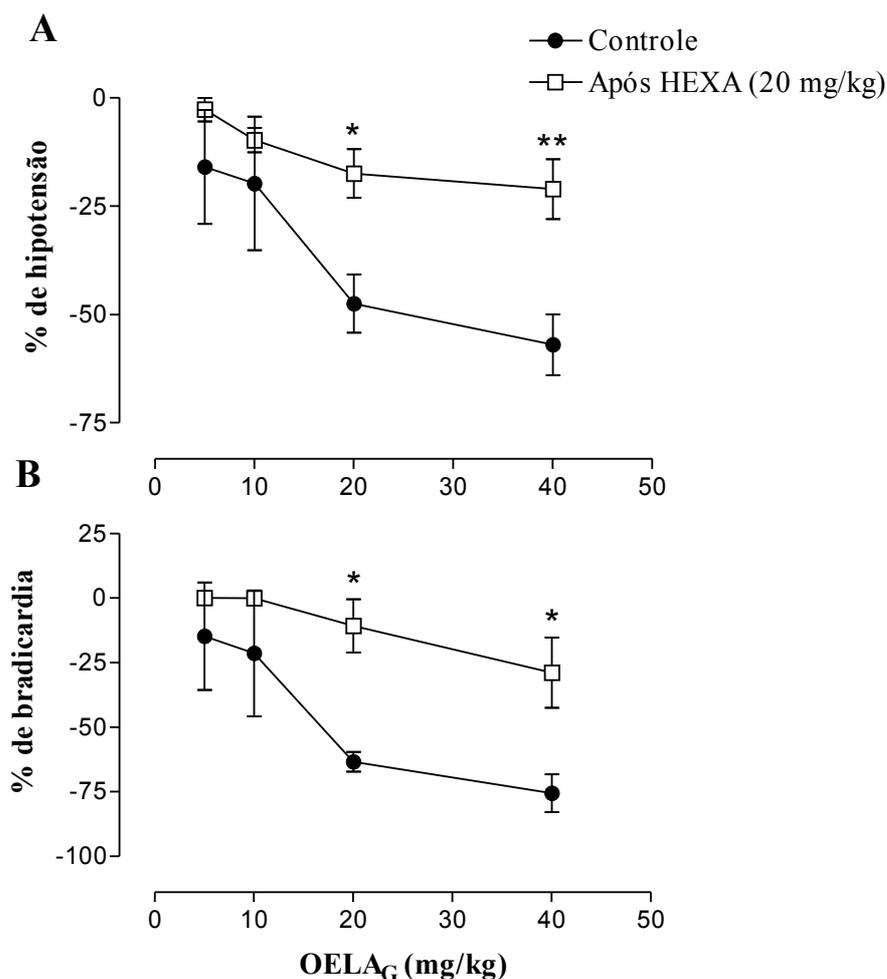


Figura 13: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa *in bolus* de doses do OELAG (5, 10, 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com hexametônio (20 mg/kg; i.v.; 30 min). Os pontos expressam a média \pm E.P.M. de 5 experimentos. As diferenças significativas foram avaliadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs controle.

5.3.3. Efeitos do OELAG sobre a PAM e FC em ratos saudáveis após o pré-tratamento com L-NAME e INDO

Ao investigar a participação do óxido nítrico (NO) nos mecanismos de ação do OELAG, após a administração do L-NAME, um inibidor das isoformas da NOS, foi observado uma atenuação significativa ($p < 0,05$) do efeito hipotensor do OELAG.

No entanto, embora o L-NAME tenha atenuado também os efeitos bradicárdicos do OELAG, principalmente nas doses maiores (20 e 40 mg/kg), esta atenuação não foi estatisticamente significativa (Figura 14 A e B).

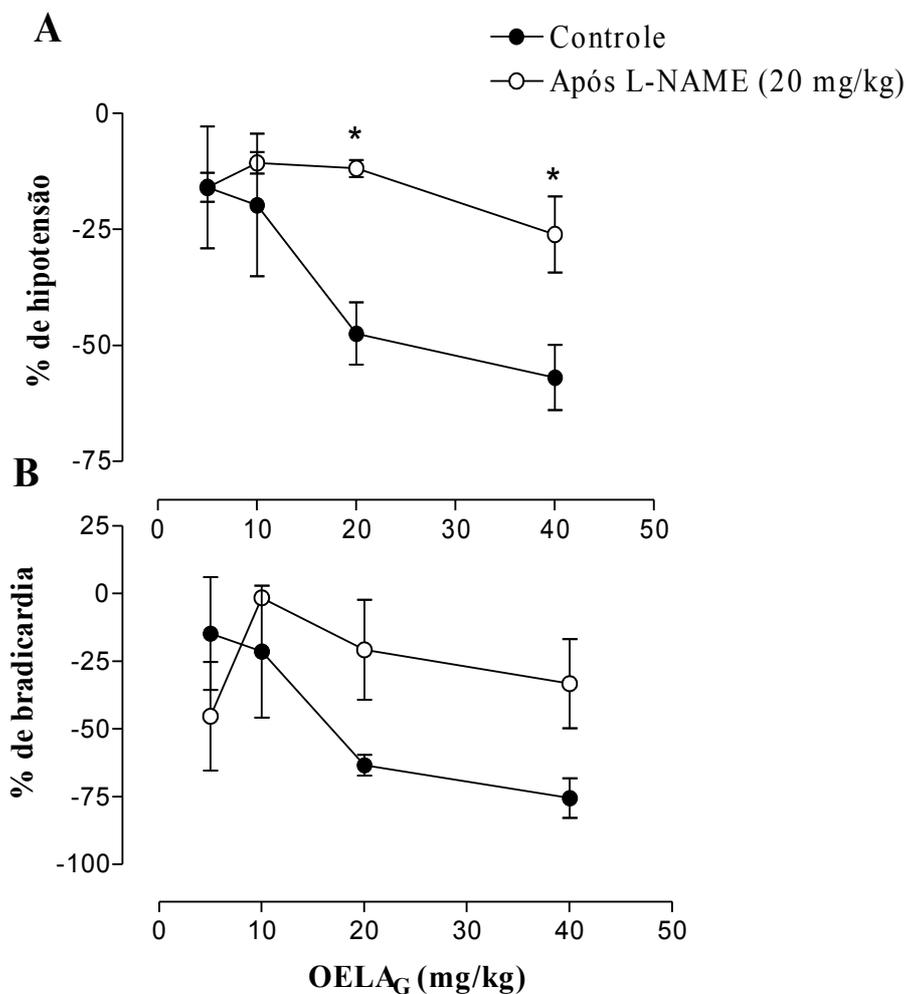


Figura 14: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa *in bolus* de doses do OELAG (5; 10; 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados com L-NAME (20mg/kg i.v., 30 min.). Os pontos expressam a média \pm E.P.M. de 5 experimentos. As diferenças significativas foram avaliadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni, onde * $p < 0,05$ vs controle.

Por último, investigou-se a participação da prostaciclina PGI₂ nos efeitos do OELA_G. O resultado obtido demonstra que não houve alteração significativa dos efeitos do OELA_G sobre a PAM e FC antes e após o pré-tratamento dos animais com a INDO, um potente inibidor da ciclo-oxigenase (COX) (Figura 15 A e B).

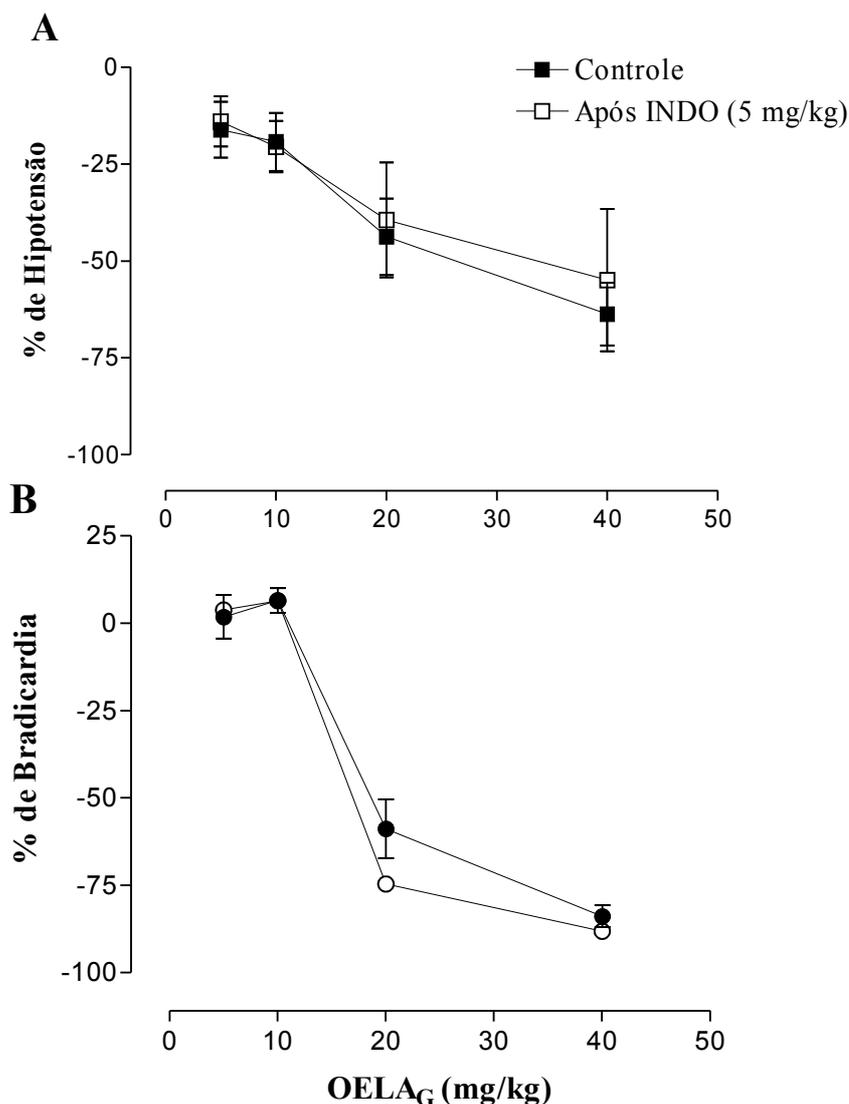


Figura 15: Efeito hipotensor (A) e bradicárdico (B) induzido pela administração intravenosa *in bolus* de doses do OELA_G (5; 10; 20 e 40 mg/kg, i.v.) em ratos saudáveis não-anestesiados na condição controle e em animais pré-tratados indometacina (5 mg/kg i.v.; 30 min). Os pontos expressam a média ± E.P.M. de 5 animais. As diferenças significativas foram avaliadas através de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni.

5.4. Efeitos do OELA_G sobre a reatividade vascular em artéria mesentérica de rato saudável: estudos *in vitro*

O último objetivo específico buscou caracterizar os efeitos do OELA_G sobre a reatividade vascular da artéria mesentérica de ratos saudáveis, procurando investigar os possíveis mecanismos de ação.

5.4.1. Efeito do OELA_G em anéis com e sem endotélio

Como observado na Figura 16, o OELA_G foi capaz de induzir vasorrelaxamento ($pD_2 = 1,89 \pm 0,21$; $E_{max} = 110,8 \pm 10,8$ %) cujo efeito não foi alterado após remoção do endotélio ($pD_2 = 2,37 \pm 0,16$; $E_{max} = 134,8 \pm 16,5$ %).

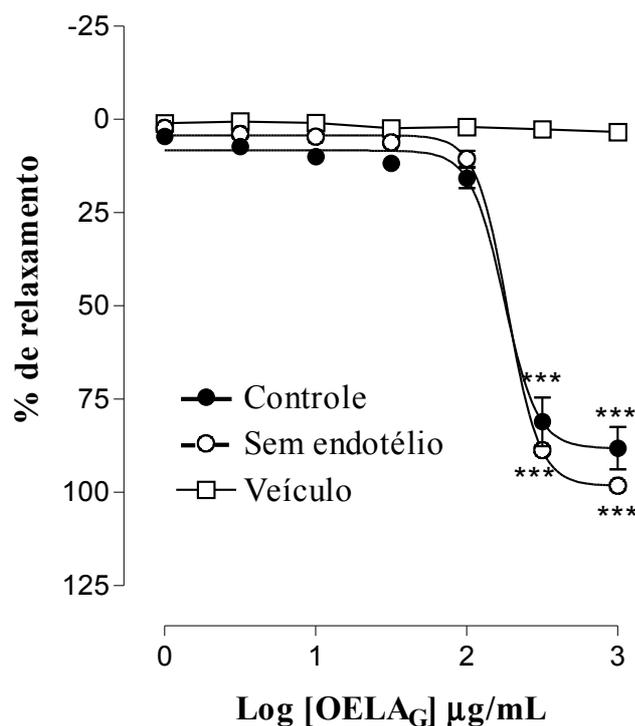


Figura 16: Curva concentração-resposta para o OELA_G (1 – 1000 µg/mL, cumulativo) em anéis arteriais, com e sem endotélio, de artéria mesentérica superior de ratos saudáveis pré-contraídos com Phe (1µM). Valores foram expressos como média ± E.P.M. de 5 experimentos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs veículo.

5.4.2. Efeito do TEA sobre o vasorrelaxamento induzido pelo OELAG em anéis sem endotélio funcional

Na ausência de TEA (100 μ M), o OELAG ($pD_2 = 2.26 \pm 0.02$; $E_{max} = 98.3 \pm 1.85$ %) produziu um relaxamento que não foi significativamente diferente daquele obtido na presença do TEA ($pD_2 = 2.23 \pm 0.04$; $E_{max} = 117.2 \pm 4.96$ %). Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$), mas pontual, apenas na última concentração do óleo (1000 μ g/mL) (Figura 17).

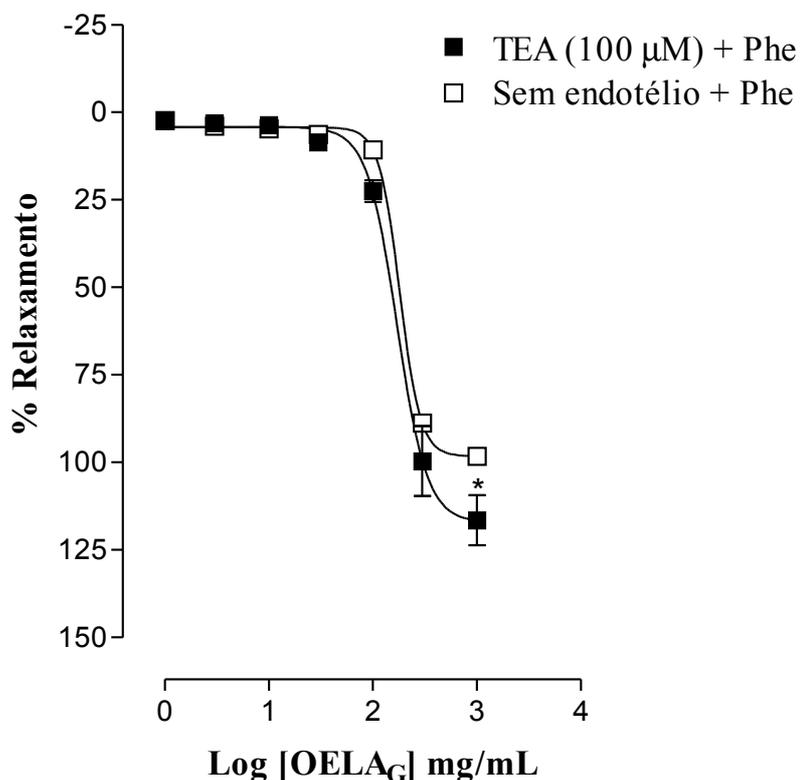


Figura 17: Curva concentração-resposta para o OELAG (1 – 1000 μ g/mL, cumulativo) em anéis arteriais sem endotélio de mesentérica superior de ratos saudáveis pré-contraídos com Phe (1 μ M) ou pré-contraídos com Phe (1 μ M) após incubação com TEA (100 μ M, 30 min). Valores foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 experimentos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs sem endotélio.

5.4.3. Efeito de altas concentrações de K^+ sobre o vasorrelaxamento induzido pelo OELAG em anéis sem endotélio funcional

Como mostrado na Figura 18, em anéis sem endotélio ($n = 5$) pré-contraídos com uma solução despolarizante de K^+ (KCl 80 mM), o OELAG induziu vasorrelaxamento ($pD_2 = 1.96 \pm 0.06$; $E_{max} = 112.6 \pm 6.70$ %) que não foi diferente daquele obtido em anéis pré-contraídos com Phe ($pD_2 = 2.26 \pm 0.02$; $E_{max} = 98.3 \pm 1.85$ %). Foi encontrada uma diferença significativa ($p < 0,001$), mas pontual, apenas na concentração submáxima (300 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 17).

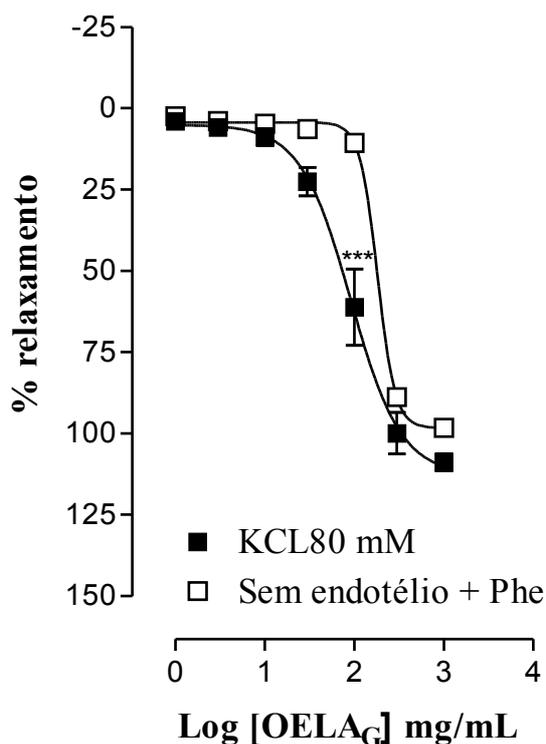


Figura 18: Curva concentração-resposta para o OELAG (1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$, cumulativo) em anéis sem endotélio de artéria mesentérica superior de ratos pré-contraídos com Phe (1 μM) ou pré-contraídos com KCl80 mM. Valores foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 experimentos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ vs sem endotélio.

5.4.4. Efeito do OELA_G sobre as contrações induzidas pelo CaCl₂ em anéis sem endotélio funcional

O CaCl₂ (10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} , 3×10^{-3} , 10^{-2} e 3×10^{-2} M) em presença de uma solução de K⁺ despolarizante (KCl 60 mM) foi capaz de induzir contração em anéis de artéria mesentérica sem endotélio funcional, de maneira concentração-dependente. Essa contração foi significativamente inibida após incubação com o OELA_G nas concentrações de 10, 30 e 300 µg/mL (31,32%; 89,17%; 96,73%, respectivamente; n = 5) (Figura 19).

5.4.5. Efeito do OELA_G sobre o relaxamento máximo induzido pela NIF em anéis sem endotélio funcional

A Figura 19 demonstra os efeitos do OELA_G sobre a resposta máxima da NIF, bem como os efeitos deles isoladamente em anéis sem endotélio funcional e pré-contraídos com Phe. Como pode ser observado, tanto o OELA_G (300 µg/mL) como a NIF (10 µM) foram capazes de promover vasorrelaxamentos que não foram significativamente diferentes ($70,5 \pm 3,4\%$ e $90,2 \pm 3,0\%$, respectivamente). Porém, o efeito vasorelaxante obtido após adição a cuba do OELA_G (300 µg/mL) na presença de NIF (10 µM) foi maior quando comparado com a NIF isoladamente ($105,3 \pm 13,6\%$; n = 5) (Figura 20).

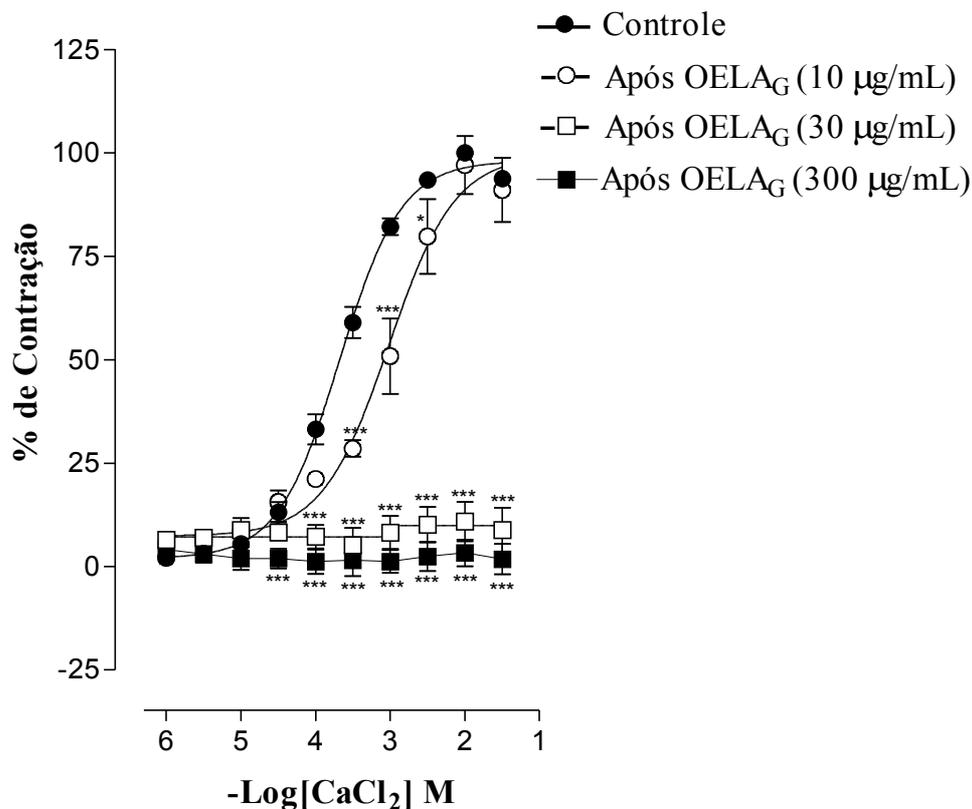


Figura 19: Curva concentração-resposta para CaCl_2 (10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} , 3×10^{-4} , 10^{-3} , 3×10^{-3} , 10^{-2} e 3×10^{-2} M) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, sem endotélio, antes (controle) e após pré-incubação com OELAG nas concentrações de 10, 30 e 300 $\mu\text{g/mL}$, separadamente. Valores foram expressos como média \pm E.P.M., de 5 experimentos. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs CaCl_2 .

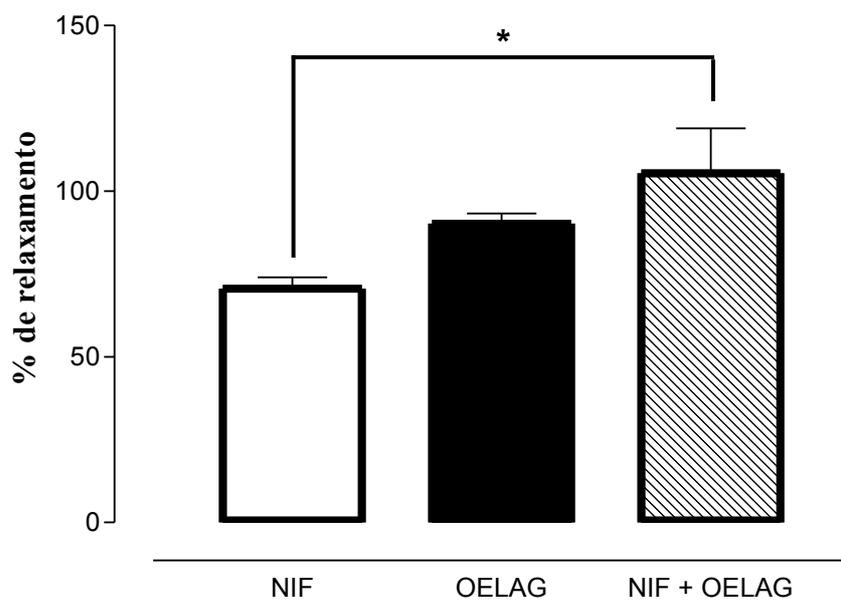


Figura 20: Efeito vasorelaxante da nifedipina (NIF: 10 μ M), OELAG (300 μ g/mL), separadamente, e OELAG adicionado sobre o relaxamento máximo da NIF (NIF + OELAG) em anéis de artéria mesentérica superior de ratos, sem endotélio, pré-contraídos com Phe (1 μ M). Valores foram expressos como média \pm EPM, n = 4. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * p < 0,05 vs NIF.

6. DISCUSSÃO

A procura de terapêuticas alternativas ao uso de medicações, como exemplo o uso de plantas medicinais, vem crescendo nos últimos anos. Países como o Brasil, que detêm uma rica biodiversidade e conhecimentos populares têm incrementado suas aptidões em estudos pré-clínicos e clínicos do uso de vegetais que se encontra disseminado na população sob forma de chás, extratos brutos e macerados (HEINZMANN; BARROS, 2007).

A *Lippia alba* foi a planta de escolha deste estudo por apresentar diversas utilizações na medicina popular, sendo recomendada inclusive em casos de hipertensão arterial (RODRIGUES; GUEDES, 2006; PÉRTILE, 2007). Esta espécie apresenta uma variedade morfológica e química que permite diferenciá-la em diversos quimiotipos tais como: geranial, limoneno, linalol, mirceno e carvona. Para poder delinear a pesquisa, foram avaliados inicialmente os efeitos dos 5 quimiotipos (geranial, limoneno, linalol, mirceno e carvona) sobre a PAM e FC.

Destes o quimiotipo geranial (OELAG), destacou-se nos resultados. O OELAG obteve a melhor resposta hipotensora, após a administração intravenosa *in bolus* em ratos, quando comparado com os demais grupos estudados, sendo desta forma o quimiotipo de escolha para os experimentos que se seguiram. Não foram encontrados na literatura estudos que demonstrassem a atividade deste aldeído sobre o sistema cardiovascular.

Os achados *in vivo* demonstram que a administração intravenosa e *in bolus* do OELAG induziu hipotensão e bradicardia transientes em ratos saudáveis não-anestesiados. Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Gerrero et al. (2002) e Oliveira et al. (2006), porém com o extrato etanólico da *Lippia alba*.

Já está bem estabelecido que a ativação muscarínica reproduz a ação parassimpática. Após estimular receptores muscarínicos cardíacos (M₂), localizados no nodo sinoatrial, ocorre uma redução dos níveis intracelulares de AMPc, o que resulta em bradicardia (LEVY, 1971; BELEVYCH; HARVEY, 2000). Esta bradicardia pode vir associada a uma hipotensão devido à queda no débito cardíaco (PETERSON et al., 1984). Por outro lado, a ativação de receptores muscarínicos presentes nas células endoteliais (M₃) gera vasodilatação por liberar fatores relaxantes derivados do endotélio (LUZ et al., 2005), a exemplo do NO e PGI₂.

Para investigar uma possível participação dos receptores muscarínicos no efeito bradicárdico e hipotensor induzido pelo OELAG, foram realizados experimentos com animais pré-tratados com atropina, um antagonista competitivo e não seletivo dos receptores muscarínicos. Nestes animais obteve-se uma atenuação dos efeitos do OELAG sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca nas duas últimas e maiores doses (20 e 40 mg/kg) sugerindo que o efeito bradicárdico do óleo parece envolver ativação destes receptores.

Tendo em vista o fato de que um dos potenciais mecanismos causadores da hipotensão e bradicardia possa vir da alteração do tônus parassimpático eferente para o coração, foi utilizado hexametônio que é um antagonista dos receptores nicotínicos ganglionares. Os resultados demonstraram que o hexametônio foi capaz de atenuar tanto a resposta hipotensora como a bradicárdica, nas duas últimas doses (20 e 40 mg/kg), sugerindo que os efeitos do OELAG sobre a FC pode ser de origem reflexa.

Sabe-se que o núcleo do trato solitário (NTS) desempenha um importante papel na modulação da atividade autonômica eferente para o sistema cardiovascular (MACHADO et al., 1997). Como os estudos com atropina e hexametônio não descartam uma ação mais central desse óleo, pode-se supor que o OELAG tenha efeito sobre as vias neuronais do núcleo do trato solitário.

Evidências mostram que a atividade cardiovascular eferente simpática é gerada e modulada pelos neurônios da região bulbar ventro-lateral rostral (RVLM) e esta atividade encontra-se normalmente sob inibição tônica mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) (GUYENET et al., 1989). Além disso, estudo de Soares et al. (2001) sugeriu que o óleo essencial de *Lippia alba* poderia estar agindo sobre o sistema GABAérgico, influenciando a queda da FC por esta via simpatoinibitória que se origina na região do bulbo ventro-lateral caudal (BVLC). Logo, pode-se hipotetizar que o óleo possa ativar a via neuronal inibitória da RVLM resultando numa redução dos efeitos do sistema simpático e, conseqüentemente, queda da FC.

Uma segunda hipótese sobre a ação central do OELAG seria de que, paralelamente ao efeito simpatoinibitório, ele poderia estar agindo sobre os receptores do NTS que envia projeções para o núcleo ambíguo, excitando neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, resultando assim numa conseqüente descarga vagal para o coração e queda da FC (MACHADO et al., 1997; VERBERNE;

GUYENET, 1992). Apesar disto, outros experimentos serão necessários para melhor compreensão deste ponto.

Embora o efeito bradicárdico induzido pelo OELA_G via ativação colinérgica (muscarínica e nicotínica) possa estar contribuindo para a resposta hipotensora através da queda no débito cardíaco, vale lembrar que existem receptores muscarínicos nas células endoteliais que também podem estar influenciando o efeito hipotensor do OELA_G.

O endotélio apresenta um papel imprescindível no controle do tônus vascular, uma vez que sintetiza e libera mediadores capazes de promover alteração na tonicidade basal (GUYENET, 2006). O relaxamento da musculatura lisa vascular ocorre por uma cascata que se inicia com a interação de um agonista, como ACh e bradicinina, com o receptor de membrana para liberar EDRFs capazes de estimular o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ através da produção de segundos mensageiros, AMPc, GMPc, ou como consequência de uma hiperpolarização promovida por abertura dos canais para K⁺ (RATTMANN et al., 2009).

Para determinar se o efeito hipotensor poderia ter origem na liberação de NO e PGI₂, importantes EDRFs, foram realizados experimentos com seus respectivos bloqueadores.

A participação do NO nos efeitos do OELA foi avaliada através da obtenção de curvas dose-resposta em animais previamente tratados com L-NAME (20 mg/kg i.v.), um inibidor da NOS (MONCADA; HIGGS, 1993; LUZ et al., 2005). Nesta condição experimental, o efeito hipotensor induzido pelo OELA_G foi significativamente atenuado, enquanto que a bradicardia não foi alterada, sugerindo a participação de NO no efeito hipotensor do óleo.

A via endotelial do NO proporciona uma ação vasodilatadora fisiológica que modula a resistência vascular periférica e conseqüentemente a pressão arterial (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; LUZ et al., 2005; FÖRSTERMANN; MÜNZEL, 2006; RATTMANN et al., 2009). Alguns estudos mostram também que o NO é capaz de produzir vasorrelaxamentos através de uma via independente de GMPc, envolvendo a ativação direta de canais para K⁺ sensíveis ao Ca²⁺ de grande condutância (BK_{Ca}) (BOLOTINA et al., 1994; MISTRY; GARLAND, 1998).

Portanto, é possível hipotetizar que o efeito hipotensor induzido pelo óleo possa estar, ao menos em parte, relacionado a um possível vasorelaxamento induzido

pela liberação do NO. Porém, outros experimentos são necessários para confirmar esta hipótese.

Já está relatado que o NO apresenta uma importante função moduladora das respostas reflexas, incluindo o barorreflexo e os reflexos cardiopulmonares do NTS. Além disso, o NO também parece facilitar a regulação cardiovascular através da interação com a transmissão glutamatérgica (DIAS et al, 2005; LIN; TALMAN, 2006). Sakai et al. (2000) verificaram que o aumento da expressão de eNOS no NTS diminui a PA, a FC e a atividade nervosa simpática em ratos acordados. Somado a isto, Kishi et al. (2001) sugeriram que esta resposta hipotensora e bradicárdica do NO pode advir de um aumento na liberação do neurotransmissor GABA na RVLM. Embora o efeito bradicárdico induzido pelo OELAG não tenha sido significativamente modificado após pré-tratamento com L-NAME, pode-se observar uma tendência de inibição desta resposta pelo L-NAME. Isto pode ser um indicativo de que o NO também possa estar envolvido na bradicaridíia induzida pelo óleo através de uma ação sobre o SNC.

Para avaliar a participação do metabólitos da ciclo-oxigenase, principalmente a PGI₂, sobre o efeito hipotensor do OELAG foram realizados experimentos com INDO, um potente inibidor não-seletivo da COX. Em animais pré-tratados com INDO, o efeito hipotensor e bradicárdico induzido pelo OELAG não foi alterado, o que implica sugerir que a PGI₂ parece não estar envolvida nestes efeitos do OELA.

Com o objetivo de avaliar melhor se o efeito hipotensor do OELAG poderia estar sendo causado por uma redução na resistência vascular periférica em função de uma vasodilatação, o OELAG foi testado em preparações *in vitro* de artéria mesentérica superior isolada de rato. Nestas preparações, o OELAG induziu vasorelaxamento de maneira concentração-dependente. Este resultado não diferiu daquele encontrado em artérias sem endotélio funcional, sugerindo que os EDRFs não estariam participando da resposta vasodilatadora induzida pelo OELAG.

Para melhor compreender a natureza do efeito hipotensor observado nos experimentos *in vivo*, foram realizados modelos experimentais *in vitro*. Contudo, os achados *in vitro* não corroboram com os achados *in vivo*, uma vez que o efeito hipotensor induzido por OELAG parece envolver a participação de um mediador endotelial, a exemplo do NO. A explicação para isto pode estar em 2 fatores. Primeiro, o OELAG, como já mencionado anteriormente, é formado por diversos

compostos os quais, possivelmente, apresentam efeitos variados. Portanto é possível que, nas faixas de concentrações utilizadas neste estudo, um determinado composto, que por sua vez utilize a via do NO, possa produzir efeito *in vivo*, mas não *in vitro*. Segundo, a administração dos óleos de forma intravenosa permite a metabolização dos mesmos por proteínas plasmáticas, o que pode mascarar seus efeitos e mecanismos de ação. Portanto, é possível que os efeitos *in vivo* e *in vitro* de um extrato ou óleo essencial possam apresentar diferenças em seus mecanismos de ação.

Como o OELAG induziu vasorrelaxamento por uma via independente do endotélio, buscou-se investigar um mecanismo de relaxamento envolvendo vias de sinalização no músculo liso vascular, tal como abertura de canais para K⁺ ou fechamentos dos canais para Ca²⁺.

Os canais para K⁺ desempenham um importante papel na determinação do tônus vascular (JACKSON, 2000). Para avaliar a participação dos canais para K⁺ no efeito do OELAG, foi realizado experimento em que as preparações foram pré-incubadas com o TEA na concentração de 100 µM. De acordo com a literatura, nestas concentrações o TEA comporta-se como um inibidor não seletivo dos canais para K⁺ (COOK, 1989). Portanto, nesta condição, os relaxamentos para OELAG não foram diferentes daqueles obtidos em preparações controles, o que permite sugerir que o efeito do OELAG não parece envolver a ativação de canais para K⁺ (Figura 17).

O influxo de Ca²⁺ e a sua liberação pelo RE são as principais fontes para se atingir concentrações catiônicas para o gatilho da contração da musculatura lisa vascular. A literatura relata que um incremento nas concentrações extracelulares de K⁺ (KCl 80 mM – solução despolarizante) leva a uma contração por ativação dos canais dependentes de voltagem (Cavs) seguida de liberação de Ca²⁺ pelo RE (KARAKI; WEISS, 1988). Desta forma, o efeito do OELAG sobre anéis sem endotélio pré-contraídos com a solução despolarizante de K⁺ revelou-se semelhante àquele pré-contraído com Phe, sugerindo que o OELAG inibe o influxo de Ca²⁺ através dos Cavs.

Para reforçar a hipótese acima foram feitos experimentos com a construção de uma curva concentração-resposta para CaCl₂ em presença de solução despolarizante (KCl 60 mM) antes e após a incubação com o OELAG. Como já esperado, o CaCl₂ foi capaz de induzir contração concentração-dependente dos anéis de artéria mesentérica superior sem endotélio funcional na situação controle. A incubação com

o OELA_G foi capaz de inibir e até mesmo bloquear totalmente essa contração, reforçando a hipótese de que o OELA_G parece realmente agir através da redução do influxo de Ca²⁺ através dos Cavs.

Com o objetivo de caracterizar qual o subtipo de Cav poderia estar envolvido na resposta do OELA_G, foram feitos experimentos utilizando a nifedipina, um bloqueador dos Cavs tipo L sensíveis a diidropiridina (HAGIWARA et al., 1993). Neste protocolo, os anéis foram pré-contraídos com Phe (1μM) e em seguida foi adicionado à cuba 10 μM de NIF, concentração que de acordo com a literatura bloqueia todos os Cavs Tipo L sensíveis a diidropiridinas (HAGIWARA et al., 1993). Em seguida, sobre a resposta relaxante máxima da NIF, foi adicionado OELA_G, com o intuito de avaliar o envolvimento destes canais. Nestas condições, o OELA_G foi capaz de promover um efeito vasorelaxante adicional sobre o efeito vasorrelaxante máximo induzido pela NIF, o que demonstra que o OELA_G parece, em parte, agir por uma via em comum com a nifedipina, ou seja, bloqueando os Cavs tipo L sensíveis a diidropiridinas, mas, supõe-se que outras vias de sinalização também podem estar envolvidas. No entanto, outros experimentos são necessários para melhor compreender este mecanismo de ação.

7. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a administração intravenosa *in bolus* do OEEL, em ratos saudáveis e não-anestesiados, produz uma hipotensão e bradicardia transientes. O efeito hipotensor parece ser causado por ativação de receptores muscarínicos e liberação de NO. Já a bradicardia parece ser devido à ativação dos receptores muscarínicos cardíacos e possivelmente por ativação dos receptores nicotínicos ganglionares, envolvendo, em parte, componentes do sistema nervoso autonômico. Essa bradicardia pode estar contribuindo para o efeito hipotensor.

Além disso, o OEEL induziu vasorelaxamento independente de endotélio em anéis de artéria mesentérica superior de ratos. Possivelmente, este efeito é causado por bloqueio de canais de cálcio operados por voltagem do tipo L, que também pode estar contribuindo para a hipotensão.

Sendo assim, o presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos cardiovasculares do óleo essencial de *Lippia alba* por meio de experimentos *in vivo* e de reatividade vascular. Os resultados encontrados com a *Lippia alba* destacam o seu potencial hipotensor que traz perspectivas quanto ao seu uso no tratamento contra a hipertensão arterial. No entanto, é imprescindível a realização de mais estudos com esta espécie, a fim de que possa ser avaliada a sua segurança e eficácia em animais hipertensos, antes do seu uso terapêutico em humanos.

8. PERSPECTIVAS

Com relação aos estudos *in vivo*, poderá ser investigada a participação dos mediadores endoteliais na resposta hipotensora e bradicárdica do OELAG em animais hipertensos. Além disso, poderá ser avaliado os efeitos da administração aguda pela via oral do OELAG em ratos hipertensos induzidos por L-NAME.

Com relação à investigação dos efeitos do OELAG sobre o SNC, poderá ser investigado os efeitos do óleo sobre a PAM e FC em ratos vagotomizados ou após administração do OELAG pela via intracerebroventricular em ratos tanto saudáveis com hipertensos.

Estudos *in vitro* poderão ser realizados a fim de elucidar a resposta vasorelaxante independente do endotélio. Para isto, poderá ser avaliado o efeito do OELAG sobre os estoques intracelulares de cálcio, tanto sensíveis a Phe como a cafeína ou efeito do OELAG sobre as correntes de cálcio através de experimentos com “patch-clamp”.

9. REFERÊNCIAS

AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D. *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.8, n. 1, p. 79-84, 2005.

ALBUQUERQUE, U.P. **Uso, manejo e conservação de florestas tropicais numa perspectiva etnobotânica: o caso da caatinga no estado de Pernambuco**. 2001. 208 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

ALCÂNTARA, C.; RAMALHINHO, V. Endotélio e hipertensão arterial. **Med. Interna**, v.10, n.4, 2003.

ALEA, J.A.; LUIS, A.G.; PERÉZ, A.R.; JORGE, M.R.; BALUJA, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. **Rev. Cubana Farm**, v.30, p. 29-35, 1997.

ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **Am. J. Physiol.**, v. 219, p. 1698-1705, 1970.

ANVISA. **Resolução RE N° 48, de 16 de março de 2004**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapi%20cos%20.pdf> Acesso em: 09/01/2011

AQUINO, L.C.L.; SANTOS, G.G.; TRINDADE, R.C.; ALVES, J.A.B.; SANTOS, P.O.; ALVES, P.B.; BALNK, A.F.; CARVALHO, L.M. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 21, n. 4, p. 529-535, out./dez. 2010.

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

ARCHER, S.L.; HUANG, J.M.C.; HAMPL, V.; NELSON, D.P.; SHULTZ, P.J.; WEIR, E. K. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Physiology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; v. 91, p.7583-7587, August 1994.

ARRIGONI-BLANK, M. F. **Estudos agronômicos e químico de *Hyptis pectinata* L. Poit. e avaliações das atividades antiedematogênica, antinociceptiva e isoenzimática.** Maceió: UFAL, 2005. 145 p. (Tese Doutorado), Universidade Federal de Alagoas, 2005.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Ver Bras Hipertens;** v.8, n.3, julho/setembro, 2001.

BELEVYCH, A. E.; HARVEY, R.D. Muscarinic inhibitory and stimulatory regulation of the L-type Ca^{2+} current is not altered in cardiac ventricular myocytes from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **J. Physiol,** v.528, n.2, p. 279-289, 2000.

BIAN, K.; DOURSOUT, M.F.; MURAD, F. Vascular system: role of nitric oxid in cardiovascular diseases. **The Journal of Clinical Hypertension,** v. 10, n. 4, 2008.

BLANK, A.F.; COSTA, A.G.; Arrigoni-Blank, M.F.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; INNECCO, R.; EHLERT, P.A.D.; SOUSA, I.F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil **Rev. Bras. Farmacogn.,** v.17, n.4, p. 557-564, Out./Dez. 2007

BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature,** v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BOTTIGNON, M. R. **Estimativas de parâmetros genéticos em *Lippia alba* (Mill.) N. E. BR, quimiótipo linalol, em progênies clonais de meios irmãos.** 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agronômico, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo. 2009.

BRANDÃO, M.G.L., COSENZA, G.P., MOREIRA, R.A., MONTE-MOR, R.L.M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn.,** v.16, p. 408-420, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Café, Cevada,

Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 ago.2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 ago.2005.

BRASIL. Resolução RDC nº. 10, de 9 de março de 2010 Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 mar.2010.

BRASIL. Atos do poder executivo. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS nº 6 de 31.1.1995.** Institui e normatiza o registro de produto fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União, 6.2.1995. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=5311&word=>>>. Acesso em: 05 jan, 2011.

BUSSE, R.; EDWARDS, G.; FÉLÉTOU, M.; FLEMING, I.; VANHOUTTE, P.M.; WESTON, A.H. EDHF: bringing the concepts together. **Trends Pharmacol Sci**, v.23, n.8, 374-380, 2002.

CALIXTO, J.B. Efficacy, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 179-189, 2000.

CAMÊLO. Lúcia Cristina Alves. **Caracterização de germoplasma e sazonalidade em erva-cidreira-brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]**. 2010. 80f. Tese (Mestrado em Agroecossistema, área de concentração Sustentabilidade em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2010

CAMPBELL, W. B.; GEBREMEDHIN, D.; PRAIT, P. F.; HERDER, D. R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ. Res.**, v.78, p. 415-423, 1996.

CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**, v.8, p. 76-88, 2001.

CASTRO, D.M. **Efeito da variação sazonal, colheita selecionada e temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de folhas de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.ex Britt. & Wilson (Verbenaceae)**. 2001.132f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura). Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2001.

CAWLEY, S. M.; SAWYER, C. L.; BRUNELLE, K.F.; VLIET, A. V. D.; DOSTMANN, W. Nitric oxide-evoked transient kinetics of cyclic GMP in vascular smooth muscle cells. **Cellular Signalling**; v.9, n. 5, p. 1023-1033, 2007.

CECHINEL Filho, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. **Química Nova**, v. 21, n.1, 1998.

CHAN, W.; YAO, X.; KO, W.; HUANG, Y. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. **Cardiovasc Res.**; v.46, p. 180-187, 2000.

CLARK, S. G.; FUCHS, L. C. Role of nitric oxide and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels in mediating heterogeneous microvascular responses to acetylcholine in different vascular beds, **J.Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 282, n. 3, p. 1473–1479, 1997.

COLOMBARI, E; SATO, M.A.; CRAVO SL, BERGAMASCHI CT, JÚNIOR RRC, LOPES OU. Role of the medulla oblongata in hypertension. **Hypertension.**; v.38, p.549-54. 2001.

COOK, N. S. Effect of some potassium channel blockers on contractile responses of the rabbit aorta. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v.13, p. 299–306, 1989.

CORNWELL, T.L.; PRYZWANSKY, K.B.; WYATT, T.A.; LINCOLN, T.M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. **Mol Pharmacol**, v.40, n.6, p. 923-931, 1991.

CORRÊA JÚNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2. ed. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, p.151, 2000.

CORRÊA, M.M. **Estudo fitoquímico da fração n-butanólica de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

COSTA, M. C.C.D.; AGUIAR, J.S.; NASCIMENTO, S. C. do. Atividade Citotóxica de Extratos Brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, n.3, p.349-352, 2004.

COSTA, A.S. **Sustentabilidade da produção de Alecrim-Pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): micropropagação visando a conservação in vitro.** 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Núcleo de Pesquisa e Pós-Graduação e Estudos em Recursos naturais. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. 2006.

CUNNIGNHAM, A.B. **African medicinal plants: setting priorities at the interface between conservation and primary healthcare.** People and plants working paper 1. Paris: UNESCO. 1993.

DE ANGELIS K., SANTOS M.S.B. & IRIGOYEN M.C. Sistema nervoso autônomo e doença cardiovascular. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul** Ano XIII, v.3, p. 1-7, 2004.

DE FREITAS, A.; **Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira**, Ministério da Saúde, 2007, http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/estudo_fitoterapicos.pdf. Acesso em Fevereiro, 2011.

DOMÍNGUEZ, M.A.G.; VILLEGAS, A.D.; CÁCERES, A.; AGUILAR, Y.B. **El mercado potencia de ocho plantas medicinales latinoamericanas. *Lippia alba*, *Lippia graveolens*, *Passiflora edulis*, *Petiveria alliacea*, *Phlebodium aureum*, *Quassia amara*, *Arrabidaea chica* y *Smilax domingensis*. Desarrollo de Tecnología de Cultivo de Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos.** Estudio de Mercado, p. 32, 2004.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. In: Update on Biochemistry of Plant Volatiles. **Plant Physiology**, v.135, p. 1893- 1902, 2004.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. EDHF: an update. **Clin Sci**, v.117, n.4, p. 139-155, 2009.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**; v.46, n.3, p. 265-271, 2000.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. **Circulation**, v.113, p.1708-1714, 2006.

FRIGHETTO, N.; OLIVEIRA J.G. Lippia alba Mill N.E.Br. (Verbenaceae) as a source of linalool. **J. Essent. Oil Res.**, v.10, p. 578-580, 1998.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. Bras. Farmacogn.**; v.15, n.2, p. 178-182, 2005

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, p. 373-376, 1980.

GOMES, E.C. **Ensaio preliminar marcha sistemática e fitoquímica para Lippia alba (Mill) N. E. Br. Verbenaceae**. Curitiba, UFPR, 6p, 1990.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRÓN, R.; MARTÍN, M. L.; ARTEAGA, L.; SAN ROMÁN, L. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**; v.80, n.1, p.37-42, April, 2002.

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

GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: [Elsevier / Medicina Nacionais](#), 2006.

HAGIWARA, S.; MITSUI, M.; KARAKI, H. Effects of felodipine, nifedipine and verapamil on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v.234, n.1, p. 1-7, 1993.

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

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

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ D. A.G.; NAKAMURA C. V.; DIAS FILHO B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97(7), 1027-1031,2002.

IJIMA, Y.; DAVIDOVICH-RIKANATI, R.; FRIDMAN, E.; GANG, D. R.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E. The Biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate Glands of three Cultivars of Basil. **Plant Physiology**, v.136, p. 3724–3736, 2004.

JACKSON, W.F. Ion channels and vascular tone. **Hypertension**; v.35, p. 173-178, 2000.

JANNUZZI, H. VIEIRA. **Caracterização de dezesseis acessos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown, no Distrito Federal**. Brasília, 2006. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006.

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

JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LAGE, C.L.S.; LEITÃO, S.G. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiótipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (ervacidreira). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, p. 36-38, 2001.

KAKAR, P.; LIP, G. Towards understanding the aetiology and pathophysiology of human hypertension: where are we now? **Journal of Human Hypertension**, p.1–4, 2006.

KARAKI, H.; WEISS, G.B. Calcium release in smooth muscle. **Life Sci.**; v. 42, p. 111-122, 1988.

KISHI, T.; HIROOKA, Y.; SAKAI, K.; SHIGEMATSU, H.; SHIMOKAWA, H.;

TAKESHITA, A. Overexpression of eNOS in the RVLM Causes Hypotension and Bradycardia Via GABA Release. **Hypertension**. v. 38, p.896-901, 2001.

KLÜGER, P.A.; TEUBER, C.A.; DAROS, M.R.; FARIAS, M.R; DE LIMA, T.C.M. **Avaliação da atividade farmacológica central de diferentes preparações de *Lippia alba* (Miller) Will. N. E. Br.(Verbenaceae)**. 1996. SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XIV, Florianópolis, 1996. Resumos. Florianópolis, F-142, p.118 (1996).

KU, Y. H. Role of limbic peptidergic circuits in regulation of arterial pressure, relevant to development of essential hypertension. **Neuropeptides**, p.1-10, 2006.

KUTCHAN, T.M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v.125, p.58-60, jan. 2001.

LA ROVERE MT, BIGGER JT, MARCUS FI, MORTARA A, SCHWARTZ PJ. Baroreflex sensitivity and heart rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. **Lancet**, v.351, n.9101, p.478-84, 1998.

LEVY, M.N. Sympathetic-Parasympathetic interactions in the heart. Brief Review. **Circulation Resaerch**; v. XXIX, n.5, p. 437-445, 1971.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN M, A. C.; CRUZ A. V. M. Influência dos fatores abióticosna produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LIN, LH; TALMAN, WT. Vesicular glutamate transporters and neuronal nitric oxide synthase colocalize in aortic depressor afferent neurons. **J Chem Neuroanat**, v.32, p. 54-56, 2006.

LIZARDO, J.H.F. **Efeitos do L-NAME e hexametônio na hipotensão pós-exercício resistido em ratos espontaneamente hipertensos**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Cardiovascular) – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, ES. 2005.

LOPES, G. A. D. et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Rev. Ciênc. Ext.** v.6, n.2, p.143, 2010.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais do Brasil**. Nova Odessa, Instituto Plantarum; 2002.

LORENZO, D. et al. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E: Brown from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v.16, n.5, p.356- 9, 2001.

LUZ, P.L; LAURINDO, R.M; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio e doenças cardiovasculares**. 1^o ed., São Paulo, Editora Atheneu, 2005.

LUZ NETTO, N.; RIBEIRO, J.E.G.; RODRIGUES, A.G. **Programa de Pesquisa de Plantas medicinais da Central de Medicamentos. In: A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Ministério da Saúde. Brasília DF, 2006. Capítulo 2. p 29-117. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf> Acesso em 09/01/2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. São Paulo, **Quím. Nova**, v.25, n.3, May 2002.

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

MANTOVANI, D.; PORCU, O.M. Assessment phytochemical extract of *Lippia alba* for use as natural antioxidant in food. **Revista Tecnológica**, v.18, p. 69-74, 2009.

MARTINEZ, S.T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A.C. Natural hallucinogens: a flight from Medieval Europe to Brazil. São Paulo, **Quím. Nova** v.32, n.9 , 2009.

METLEN, K. L.; ASCHEHOUG, E. T.; CALLAWAY, R. M. Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. **Plant, Cell and Environment**; v.32, p. 641–653, 2009.

MING, L.C. **Influência de diferentes níveis de adubação orgânica na produção de biomassa e teor de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br.**

-Verbenaceae. 1992. 206 p. Tese. (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1992.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Specimen lists and maps.** Disponível em: <http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_pick?name=Lippia+alba>. Acesso em: 09 de janeiro de 2011

MISTRY, D.K.; GARLAND, C.J. Nitric oxide (NO)-induced activation of large conductance Ca_2^+ -dependent K^+ channels (BK(Ca)) in smooth muscle cells isolated from the rat mesenteric artery. **Br J Pharmacol**, v.124, n.6, p. 1131-40, 1998.

MITCHELSON, F. Heterogeneity in muscarinic receptors: evidence from pharmacological studies with antagonists. **Trends Pharmacol. Sci.** (suppl.), v.5, p. 12 – 16, 1984.

MOHAMED, D. A.; HAMED, T.E.; AL-OKBI, S. Y. Reduction in hypercholesterolemia and risk of cardiovascular diseases by mixtures of plant food extracts: a study on plasma lipid profile, oxidative stress and testosterone in rats. **Grasas y Aceites**, v. 61, n.4, p. 378-389, octubre-diciembre, 2010

MONCADA, S. HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v.29, p. 2002-2012, 1993.

MOREIRA, F.V.; BASTOS, J.F.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; SANTOS, M.R.V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.20, n.6, p. 904-909, Dez, 2010.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p. 103-108, 2006.

OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. **Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas medicinais.** Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livroorg/medicinasmelhoramento.pdf>>. Acesso em 20 de janeiro de 2009.

PAGE, C. P.; Cyrtis, M. J. C.; Suttier, M. C.; Walker, M. J. A.; Hoffmann, B. B. **As drogas e o sistema cardiovascular.** Farmacologia Integrada. 1ª ed., Editora Manole, São Paulo- SP, p.153-193, 1999.

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

PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; BADAR, D.M.; QUYYUMI, A.A. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, n.5, p. 1475-81, 1993.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K., CARRETERO, E.; SÁNCHEZ MATA, D., VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p. 201–214, 2001.

PEÑUELA, L. Y. F. **Acúmulo de biomassa e produção do óleo essencial de procedências de *Lippia alba* (MILL.) N.E. BR. ex britt. & p. wilson, quimiotipo linalol, no município de Pinhais – Paraná.** 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências.) – Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, curso de Pós-graduação em Agronomia, Curitiba, Paraná. 2010.

PÉRES, D.S.; MAGNA, J.M.; VIANA, L.A. Arterial hypertension patients: attitudes, beliefs, perceptions, thoughts and practices. **Rev Saúde Pública**; v.37, n.5, p.635-42, 2003.

PÉRTILE, R. **Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils.** 2007. Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V, Avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, n.11, p. 21-24. 2003.

PETERSON, G.L.; HERRON, G.S. YAMAKI, M.; FULLERTON, D.S.; SCHIMERLIK, M.I. Purification of the muscarinic acetylcholine receptor from porcine atria. **Proc Natl Acad Sci**, v.81, p. 4993-4997, 1984.

PIERRE, P. M. O. **Caracterização citogenética e molecular de três acessos de *Lippia alba* (Verbenaceae)**. Lavras: 2004. 95 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, 2004.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.DA S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios E Perspectivas. **Quim. Nova**, v.25, n.1, p. 45-61, 2002.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacarê, BA, Brasil. São Paulo, **Acta Bot. Bras.**, v.20, n. 4, Oct./Dec., 2006.

RANG, H. P; DALE, M. Maureen; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.11, n.2, p. 57-69, 2001.

RATTMANN, Y.D. **Mecanismos endoteliais envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook**, 2009, Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6ª edição, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2001. P.331

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; SCHULTZ, R. ; HODSON, H. F.; MONCADA S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxid synthase in vitro and in vivo. **Brit. J. Pharm**, v.101, p. 746-752, 1990.

RICCIARDI, G.; VEGLIA, J.; RICCIARDI, A.; BANDONI, A. Examen de los aceites esenciales de especies de *Aloysia* (*Verbenaceae*) del Nordeste. **Corrientes**, v.8, p. 100-102,1999.

RODRIGUES, A.C.C., GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas—Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**; v.8, p. 1–7, 2006.

RUEDA, S.; CARDENAS, C.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Estudio de la variación circadiana de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por

destilación- solvente simultánea, de hojas de *Lippia alba* (Fam: Verbenaceae). **Scientia et Technica**, v.13, n.33, p.83-85, 2007.

RUFINO, E. R. **Estimativas de parâmetros genéticos e seleção de clones linalol em *Lippia alba***. 2008. 130p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agronômico de Campinas, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo. 2008.

RUSSO, S.; BADO, S. G.; CLEMENTE, S. Actividad insecticida de compuestos de origen vegetal. Suplemento **Campo y Familia**. jan. 2005. Disponível em: <<http://www.laopinionrafaela.com.ar/opinion/2005/01/06/p510607.htm>> Acesso em: 05 jan 2011.

SAKAI, K.; HIROOKA, Y.; MATSUO, Y.; ESHIMA, K.; SHIGEMATSU, H., SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A. Overexpression of eNOS in NTS Causes Hypotension and Bradycardia In Vivo. **Hypertension**. n. 36, p. 1023-1028. 2000.

SANTOS, P.D.; CARDOSO, V.; SONAGLIO, D.; DE LIMA, T.C.M. **Efeito farmacológico de diferentes extratos de *Lippia alba* Miller (Verbenaceae) no comportamento de camundongos**. (01.166). p. 83 SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, XV, Águas de Lindóia - SP. Resumos. Águas de Lindóia: XV SPMB, (1998).

SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R.; SOARES, A.A. Anatomic characterization of secretory structures and essential oil production of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown in relation to harvest times in the dry and rainy seasons. **Revista Ciência Agronômica**, v.35, n.2, p. 377 – 383, jul.-dez., 2004.

SANTOS, R. B.; BLANK, A. F.; PAULA, J. W. A.; ARRIGONI-BLANK, M. F. ; INNECCO, R. **Caracterização morfológica e agronômica de acessos de alecrimpimenta na época chuvosa**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 46. 2006, Goiânia. Horticultura Brasileira. Brasília: ABH, 2006. v. 24. p. 2818-2821.

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

SCHOCKEN, N. R.L. **Obtenção de quimiotipos híbridos de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown**. 2007. 96f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e

Subtropical Área de Concentração em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia) – Instituto Agrônomo, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo. 2007.

SENA FILHO JG, MELO JGS, SARAIVA AM, GONÇALVES AM, PSIOTTANO MNC, XAVIER HS. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.506-509, 2006.

SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* ssp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **Flavour and fragrance Journal**, v.16, n.3, p.169- 71, 2001.

SHIEH, C.-C.; COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium Channels: Molecular Defects, Diseases, and Therapeutic Opportunities. **Pharmacological Reviews**; v.52, n.4, p.557-593, 2000.

SIMÕES, M.V.; SCHMIDT, A. **Hipertensão arterial como fator de risco para doenças cardiovasculares**. Simpósio: Hipertensão Arterial, Capítulo IV. Medicina, Ribeirão Preto, v.29, p. 214-219, abr./set. 1996.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.12, n.1, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC: p.467-495, 2003.

SOARES, L. **Estudo tecnológico, fitoquímico e bilógico da *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex Britt & Wils (falsa melissa) Verbenácea**. 2001. Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

SOARES, A.C. Se bem não fizer, mal também não fará. **Revista Eletrônica de Ciências**, n.12, out. 2002. Disponível em http://www.edcc.sc.usp.br/ciencia/artigos/art_12/medicamento.html. Acesso em dezembro, 2010.

SOARES, K.C.N. **Estudo do efeito vasorrelaxante e hipotensor do extrato hidroalcoólico da *Polygala paniculata* L. em ratos**. 2008. 85f. Dissertação

(Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná. 2008

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH). VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão- DBH VI. **Rev Bras Hipertens**, v.17, n.1, p.11-17, 2010.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na avaliação de fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul**. 2005. Monografia, Universidade Federal do Pará, 2005.

SOUZA, E. M. **Seleção, comportamento fenotípico e genotípico e desenvolvimento de uma nova cultivar de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) para Sergipe**. São Cristóvão: UFS, 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas).Universidade Federal de Sergipe, 2008.

TAKAHASHI, T.; OWYANG, C. Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. **J. Physiol.**, v.504, n.2, p. 479-488, 1997.

TESTAI, L.;CHERICONI, S.; CALDERONE, V.; NENCIONI, G.; NIERI, P.; MORELLI, L.; [MARTINOTTI](#), E.Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. **Journal of Ethnopharmacology**; v.81, n.1, p.105-109, 2002.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento de doença de Alzheimer. **Química Nova**, v.26, n.3, p.301-4, 2003.

UNCTAD - UNITED NATIONS CONFERENCE ON TRADE AND DEVELOPMENT. Market Brief in the European Union for selected natural ingredients derived from native species: *Lippia alba*. BioTrade Facilitation Programme – BTFP, 2005.

VALE, T. G.; MATOS, F. J. A.; DE LIMA, T. C. M.; 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.

VASAN, R.S.; BEISER, A.; SESHADRI, S.; LARSON, M.G.; KANNEL, W.B.; D'AGOSTINO, R.B.; LEVY, D. Residual Lifetime Risk for Developing

Hypertension in Middle-aged Women and Men The Framingham Heart Study. **Jama**, v.287, n.8, February, 2002.

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

VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas: Resultados da 1ª reunião técnica.** 2002. 184p. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 2002.

WALDMAN, S.A.; MURAD, F. Biochemical Mechanisms Underlying Vascular Smooth muscle relaxation: the guanylate Cyclase-Cyclic GMP System. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.12, n.5, 1988.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; SIQUEIRA, W.J. **Interação genótipo x ambiente na produção e composição de óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.** 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical Área de Concentração de Melhoramento Genético Vegetal.) – Instituto Agrônômico, curso de Pós-graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Campinas, São Paulo. 2006.

YAMAMOTO, P. Y.; COLOMBO, C. A.; 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. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.481-489, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova**, v.24, p. 147-152, 2001.

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

