

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
MORFOFUNCIONAIS**

**FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA DA SILVA**

**Efeito espasmolítico do *Óleo essencial de Lippia Sidoides* e do Carvacrol no músculo liso de fundo de estômago de rato: investigação da participação dos canais de cálcio operados por voltagens.**

**FORTALEZA – CEARÁ  
2018**

**FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Prata Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- O47e Oliveira da Silva, Francisco Rafael.  
Efeito espasmolítico do Óleo essencial de Lippia Sidoides e do Carvacrol no músculo liso de fundo de estômago de rato: investigação da participação dos canais de cálcio operados por voltagens. / Francisco Rafael Oliveira da Silva. – 2019.  
68 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Emmanuel Prata Sousa.  
Coorientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. Óleo essencial, Lippia sidoides, carvacrol, estômago, efeito espasmolítico, músculo liso. I. Título.

**FORTALEZA – CEARÁ**  
**2018**  
**FRANCISCO RAFAEL OLIVEIRA SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina do Departamento de Morfologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfofuncionais.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Emmanuel Prata Sousa (Orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Gilberto Santos Cerqueira

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro

Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Dedico esse trabalho em primeiro lugar a Deus, pois sem sua permissão nada seria possível, sua graça e misericórdia para com a minha vida são imensuráveis.

Em segundo lugar, dedico a minha amada esposa Débora Viana, ao meu filho Isaac Viana e a meus pais, Fernando da Silva e Aparecida de Oliveira e também a meus irmãos, que sempre me incentivaram e me ensinaram a buscar de forma honesta meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos as pessoas que de forma direta ou indireta estiveram comigo durante esse trabalho comemorando as vitórias, mas também sofrendo as provações, sem vocês com certeza seria bem mais difícil do que foi.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emmanuel Prata Souza, que mesmo sem conhecer-me recebeu-me a mim e confiou a mim a oportunidade de partilhar das suas ideias. Sempre com muito cuidado e experiência me mostrou o melhor caminho para essa pesquisa, e nunca me privou de sua presença diante de minhas necessidades em relação a esse trabalho. Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, sua orientação foi fundamental para a realização desse trabalho. Obrigado pela sua disponibilidade em tirar dúvidas e ensinar muito bem a contratilidade, seu compromisso e sabedoria com a pesquisa são inspiradores.

Ao Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira por sua presença tão honrada para os alunos e meio científico, muito obrigado pela disponibilidade em participar da banca.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Monteiro pela sua solicitude e disponibilidade sempre que fora contactado para participar da banca.

Aos meus amigos e companheiros de experimentos Prof. Ms. Tiago Santos, Ms. Marcos Aurélio de Sousa Lima, e Daniel Maia Nogueira de Oliveira, sem vocês jamais teria conseguido realizar essa pesquisa. Muito obrigado pela amizade, pela paciência, parceria, conselhos e disponibilidade em ajudar nos experimentos. Devo a vocês uma grande parte dessa pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório (LEFFAG), em especial ao Juan Roriz e ao Vitor Emanuel da iniciação científica que sempre estiveram prontos a ajudar durante das necessidades.

A minha família pela dedicação, companheirismo e por servir de base sólida para minha vida.

A CAPES pela bolsa concedida a mim e que me possibilitou ir em busca do mestrado.

Aos professores do Programa de Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará que ajudara-me na minha formação profissional, os meus mais sinceros agradecimentos.

E a todos que direta ou indiretamente participaram dessa nova fase da minha vida e pela busca da realização de um sonho, muito obrigado, essa vitória não é apenas minha, mas sem dúvidas nossa.

“Mais ciência Mais Deus, Menos  
ciência Menos Deus”.

Louis Pasteur



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS – Todas corrigidas e conferidas

% - Símbolo percentagem

°C - Símbolo de grau Celsius

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> – Concentração intracelular de cálcio

0Ca<sup>2+</sup> – Zero cálcio

AA - Ácido Aracdônico

ABRAPOE - Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais

AC - Adenilato Ciclase

ACh – Acetilcolina

ADT - *Autodock tools*

AMPc - Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

ATPase – Adenosina trifosfatase

Ca<sup>2+</sup> – Cálcio

Ca<sup>2+</sup>-atpase – Cálcio atpase

CaCl<sub>2</sub> - Cloreto de cálcio

CaCM - Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina

CaM – Calmodulina

CaV - Canais de cálcio dependentes de voltagem

CaV1 - Canais de cálcio dependentes de voltagem da família 1

CaV2 - Canais de cálcio dependentes de voltagem da família 2

CaV3 - Canais de cálcio dependentes de voltagem da família 3

CaV-L - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L

CaV-N - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N

CaV-P/Q - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo P/Q

CaV-R - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo R

CaV-T - Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo T

CCa – Canais de Ca<sup>2+</sup>

CCh – Cloridrato de carbamilcolina ou Carbacol

Cm - Centímetro

CO<sub>2</sub> – Gás carbônico

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase  
COX2 – Isoforma 2 da Ciclooxigenase  
DAG – Diacilglicerol  
DBP – 12, 13 dibutirate phorbol ester  
DHP – Dihidropiridina  
DL50 - Dose letal da substância  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DPPH - 1,1-difenil-2-picril-Idrazil  
EGTA - Ácido etileno glicol tetracético  
E.P.M – Erro padrão da média  
EUA – Estados Unidos da América  
Ev - Elétron-volt  
g – grama  
GC - Guanilato Ciclase  
GC/MS - Gas Cromatografy/Mass Spectrometry  
GDP - Difosfato de Guanosina  
GM/MS - Gabinete do Ministro, Ministério da Saúde  
GMPc - Monofosfato Cíclico de Guanosina  
GTP - Trifosfato de Guanosina  
HIS - Histamina  
 $I_{Ca}$  - Pico da corrente de cálcio  
 $I_K$  - Pico da corrente de potássio  
 $I_{Kr}$  - Corrente de saída de  $K^+$   
 $I_{Ks}$  - Corrente de  $K^+$  retificadora tardia  
 $I_{to}$  - Corrente transitória de efluxo de  $K^+$   
IP3 – Inositol trifosfato  
IP3R – Receptor de inositol trifosfato  
KCl – Cloreto de Potássio  
Kg – Quilograma  
Kv - canais para potássio abertos por voltagem  
K 60 – 60 mM de Cloreto de Potássio  
LAFARMULI - Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso  
LPN - Laboratório de Produtos Naturais  
M2 - Receptor muscarínico do tipo 2

M3 - Receptor muscarínico do tipo 3  
m – Metro  
mg – Miligrama  
Min - Minuto  
ml – Mililitro  
MLC – Cadeia leve de miosina  
MLCK – Miosina quinase de cadeia leve  
MLCP – Fosfatase de cadeia leve de miosina  
mm - Milímetro  
MR - Receptores Muscarínicos  
nº - Número  
O<sub>2</sub> - Oxigênio  
OELs – Óleos essenciais  
OEL – Óleo essencial  
pH - Potencial hidrogeniônico  
PIP<sub>2</sub> – Fosfatidilinositol 4,5- Difosfato  
PKA – Proteína quinase A  
PKC – Proteína quinase C  
PLA2 - Fosfolipase A2  
PLC – Fosfolipase C  
ROCCs – Canais de cálcio operado por receptor  
RS – Retículo Sarcoplasmático  
RYR – Receptor de Rianodina  
S - Segundo  
SERCA – Ca<sup>2+</sup>-ATPase do Retículo Sarcoplasmático  
SOCCs – Canais de cálcio operado por estoque  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TEA - Tetraetilamônio  
TPA - 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
USA - United States of America  
US\$ - Símbolo da moeda dos Estados Unidos da América  
VOCCs – Canais de cálcio operado por voltagem

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> A planta <i>Lippia sidoides</i> .....	18
<b>Figura 02.</b> Estrutura molecular do carvacrol e do timol.....	20
<b>Figura 03.</b> Mecanismos bioquímicos da contração do músculo liso.....	27
<b>Figura 04.</b> Esquema ilustrado da preparação de tecido gastrointestinal isolado.....	34
<b>Figura 04.</b> Mecanismo de relaxamento do músculo liso do estômago.....	27
<b>Figura 05.</b> Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl a 60mM em fundo de estômago de ratos.....	33
<b>Figura 06.</b> Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol (CCh) a 30mM.....	33
<b>Figura 07.</b> Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> frente as contrações tônicas induzidas por CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> (0Ca).....	34
<b>Figura 08.</b> Efeito do Carvacrol sobre contração mantida por 60 mM de KCl em músculo liso de estômago de ratos.....	34
<b>Figura 09.</b> Efeito do Carvacrol sobre as contrações induzidas por 30µM de CCh em músculo liso de estômago de ratos.....	35
<b>Figura 10.</b> Efeito do Carvacrol sobre contrações induzidas por CaCl <sub>2</sub> em tecido 0Ca <sup>2+</sup> contraído por KCl 60 mM.....	36
<b>Figura 11.</b> Efeito do Carvacrol sobre a contração mantida por 30µM de CCh na presença de nifedipina em músculo liso de estômago de ratos.....	37
<b>Figura 12.</b> Modelos de docagem molecular das interações entre os VOCCs e o carvacrol.....	37
<b>Figura 13.</b> Complexo proteína-ligante com carvacrol.....	38
<b>Figura 14.</b> Sítio de ligação do Carvacrol e entrada de Ca <sup>2+</sup> .....	

## RESUMO

### **Efeito espasmolítico do Óleo essencial de *Lippia Sidoides* Cham e do Carvacrol no músculo liso de fundo de estômago de rato: investigação da participação dos canais de cálcio operados por voltagens.**

A *Lippia sidoides* é uma planta medicinal da família Verbenaceae com diversas atividades farmacológicas dentre elas antiespasmódica. Muitas espécies da família Verbenaceae demonstram em sua composição óleos essenciais, dotados de atividades biológicas despertando assim grande interesse farmacológico por apresentar atividade sobre a musculatura lisa. Baseado nessas premissas, o objetivo desse trabalho foi investigar o efeito espasmolítico do óleo essencial (OEL) de *Lippia sidoides* e carvacrol sobre músculo liso de fundo de estômago de rato. Os registros foram obtidos a partir de tiras isoladas de fundo de estômago em preparações para órgãos isolados através de sistema de aquisição de dados. Foram adicionadas concentrações cumulativas do OEL (1-300 µg/ml) no fundo do estômago de rato sob o efeito dos contraturantes carbacol (CCh) e cloreto de potássio (KCl). No estômago pré-contraído com KCl 60mM, a contração foi reduzida para 50% (36,82146 ± 7,9157), 80% (20,83054 ± 7,32411) e 100% (-10.95499 ± 7.73396), nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/ml (p<0,05). No estômago pré-contraído com carbacol e incubado com OEL, a dose de 300µg/ml reduziu a contração em 100% (-45,83 ± 40,33). A partir dos achados, tecidos isentos de Ca<sup>2+</sup> foram pré-incubados com o OEL (1-300ug/mL) e em seguida contraídos por curvas cumulativas de CaCl<sub>2</sub> (0,1-0,5M - 1-2M) e constatamos que o OEL nas concentrações (100-300 ug/ml) foi capaz de inibir a curva da contração em quase 90% comparado ao grupo controle. Nos experimentos realizados com o carvacrol foram adicionadas concentrações cumulativas na proporção de (10-1000 µM) no fundo do estômago de rato sob o efeito dos contraturantes CCh e KCl sendo observadas o efeito antiespasmolítico do carvacrol. Observou-se que esse composto foi efetivo em relaxar o tecido pré-contraído com carbacol (CCh) na proporção de 22%, 35% e 46% nas concentrações 300, 600 e 1000 µM. No experimento realizado com KCl a 60 mM diminuiu as contrações nas proporções de 26%, 33%, 42%, 56%, e 70% nas concentrações 30, 100, 300, 600 e 1000 µM. Na concentração de 1000 µM de carvacrol em meio a concentrações cumulativas de Ca<sup>2+</sup> em solução 0Ca<sup>2+</sup>, a concentração 0,5mM inibiu a contração em 61% (11,75 ± 112). Contudo, na concentração 1mM tivemos uma redução na contração de 86% (35,92 ± 136,2) e já a concentração 2mM inibiu a contração em 71% (21,12 ± 121,4 µg/ml). O carvacrol relaxou 29 % da contração induzida por CCh na presença de nifedipina. No protocolo com TEA foi possível observar que o carvacrol na concentração 1000µM foi capaz de induzir o relaxamento cerca de 14% (-85,23 ± 6,755) na contração mantida por CCh. Constatou-se que o óleo essencial de *Lippia sidoides* e o carvacrol demonstram efeito antiespasmolítico envolvendo o bloqueio de canal de cálcio operados por voltagem. No estudo de ancoramento molecular realizada foi possível verificar que o carvacrol ocupou sitio de ligação distante do poro para a entrada de cálcio, podendo-se sugerir que o carvacrol possa induzir um fechamento no canal sitio dirigido. Além disso, as energias de ligação do carvacrol foram negativas -6,7 kcal/mol, variando entre -6,1 e -7,0 kcal/mol entre 09 diferentes conformações, com constantes de inibição entre 7 uM e 33 uM.

**Palavras-chave:** Óleo essencial, *Lippia sidoides*, carvacrol, estômago, efeito espasmolítico, músculo liso.

## ABSTRACT

### **Spasmolytic effect of the Lippia Sidoides Cham Essential Oil and Carvacrol in the smooth muscle of the stomach of the rat: investigation of the participation of voltage-operated calcium channels.**

*Lippia sidoides* is a medicinal plant of the family Verbenaceae with diverse pharmacological activities among them antispasmodic. Many species of the family Verbenaceae demonstrate in their composition essential oils, endowed with biological activities, thus arousing great pharmacological interest because they present activity on the smooth musculature. Based on these premises, the objective of this work was to investigate the spasmolytic effect of essential oil (OEL) of *Lippia sidoides* and carvacrol on the smooth muscle of the stomach of the rat. The records were obtained from isolated strips of stomach in preparations for isolated organs through a data acquisition system. Cumulative OEL concentrations (1-300 µg / ml) were added to the bottom of the rat stomach under the effect of the carbachol (CCh) and potassium chloride (KCl) contractors. In the pre-contracted stomach with 60 mM KCl, the shrinkage was reduced to 50% ( $36.82146 \pm 7.9157$ ), 80% ( $20.83054 \pm 7.32411$ ) and 100% ( $-10.95499 \pm 7.73396$ ) at the concentrations of 30, 100 and 300 µg / ml ( $p < 0.05$ ). In the stomach pre-contracted with carbachol and incubated with OEL, the 300 µg / ml dose reduced contraction by 100% ( $-45.83 \pm 40.33$ ). From the findings,  $Ca^{2+}$ -free tissues were preincubated with OEL (1-300 µg / mL) and then contracted by cumulative  $CaCl_2$  curves (0.1-0.5M - 1-2M) and we found that OEL (100-300 µg / ml) was able to inhibit the contraction curve by almost 90% compared to the control group. In the experiments performed with carvacrol, cumulative concentrations in the proportion of (10-1000 µM) were added to the bottom of the rat stomach under the effect of the CCh and KCl contractors, with the antispasmodic effect of carvacrol being observed. It was observed that this compound was effective in relaxing pre-contracted tissue with carbachol (CCh) in the proportion of 22%, 35% and 46% in the concentrations 300, 600 and 1000 µM. In the experiment performed with 60 mM KCl, the contractions were reduced in the proportions of 26%, 33%, 42%, 56%, and 70% in the concentrations 30, 100, 300, 600 and 1000 µM. At the concentration of 1000 µM carvacrol in medium at cumulative concentrations of  $Ca^{2+}$  in 0  $Ca^{2+}$  solution, the concentration 0.5 mM inhibited contraction in 61% ( $11.75 \pm 112$ ). However, at 1 mM concentration we had a reduction in contraction of 86% ( $35.92 \pm 136.2$ ) and already the 2mM concentration inhibited the contraction in 71% ( $21.12 \pm 121.4$  µg / ml). Carvacrol relaxed 29% of the CCh-induced contraction in the presence of nifedipine. In the protocol with TEA, it was possible to observe that carvacrol in the concentration 1000µM was able to induce relaxation about 14% ( $-85,23 \pm 6,755$ ) in the contraction maintained by CCh. It was found that the essential oil of *Lippia sidoides* and carvacrol demonstrate antispasmodic effect involving voltage-operated calcium channel block. In the study of molecular anchoring it was possible to verify that carvacrol occupied a site of attachment far from the pore for the entry of calcium, and it may be suggested that carvacrol may induce a closure in the directed site canal. In addition, the binding energies of carvacrol were negative -

6.7 kcal / mol, ranging from -6.1 to -7.0 kcal / mol among nine different conformations, with inhibition constants between 7  $\mu$ M and 33  $\mu$ M.

**Key words:** Essential oil, *Lippia sidoides*, carvacrol, Stomach, spasmolytic effect, smooth muscle.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Plantas medicinais.....	15
1.1.1 Óleos essenciais (OELs).....	16
1.2 Família <i>Verbenaceae</i> e o gênero <i>Lippia</i> .....	17
1.2.1 A <i>Lippia sidoides</i> .....	18
1.2.1.1 O óleo essencial da <i>Lippia sidoides</i> .....	19
<b>2 Os constituintes</b> .....	20
2.1 O Carvacrol.....	20
2.2 O Timol.....	22
<b>3 O mecanismo contrátil do músculo liso</b> .....	23
3.1 Relaxamento do músculo liso.....	27
<b>4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	29
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	31
5.1 Objetivo geral.....	31
5.2 Objetivos específicos.....	31
<b>6 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	32
6.1 Óleo essencial (OEL) .....	32
6.2 Soluções e drogas.....	32
6.3 Ancoramento Molecular.....	33
6.4 Animais e preparo do tecido.....	34
6.5 Grupos experimentais.....	36
6.6 Análise estatística.....	36
<b>7 ASPÉCTOS ÉTICOS</b> .....	37
<b>9 RESULTADOS</b> .....	38
9.1 Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl a 60 mM em fundo de estômago de ratos.....	38

9.2 Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol (CCh) a 30 mM.....	39
9.3 Efeito do OEL de <i>Lippia sidoides</i> frente as contrações tônicas induzidas por CaCl <sub>2</sub> em meio despolarizante nominalmente sem Ca <sup>2+</sup> (0Ca <sup>2+</sup> ).....	40
9.4 Avaliação da responsividade do tecido do fundo de estômago ao carvacrol.....	41
9.4.1 Curva concentração-efeito para carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por KCl a 60 Mm.....	41
9.4.2 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh a 30 mM .....	42
9.4.3 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CaCl <sub>2</sub> em fundo de estômago de ratos em solução zero Ca <sup>+2</sup> pré-contraído por KCl a 60 mM.....	43
9.4.4 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em fundo de estômago de ratos pré-incubadas com Nifedipina a 10 mM.....	44
9.4.5 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em fundo de estômago de ratos pré-incubadas com Tetraetilamônio.....	45
9.5 Sistema de dosagem entre a molécula de carvacrol e o VOCCs.....	46
<b>10 DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>11 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>67</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças estomacais é conhecido desde antiguidade (LÓPEZ, 2006). Assim, muitos são os conhecimentos empíricos obtidos através dos séculos. Com o aparecendo cada vez maior de enfermidades que acometiam as pessoas, também, foi crescendo o número de práticas populares utilizadas para o tratamento de doenças.

O Nordeste brasileiro tem se destacado, por apresentar uma flora bastante variada e rica em plantas medicinais largamente utilizadas na medicina popular com diversas ações (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; ABDON et al., 2002; MORAIS et al., 2006a,b).

Em 2016, o Nordeste recebeu 1 milhão de reais em medicamentos fitoterápicos pelo Ministério da Saúde. Segundo o ministro da saúde Ricardo Barros, a expectativa é que os fitoterápicos avancem, tanto na prescrição médica quanto na disponibilidade por municípios. Para o ministro, os medicamentos sintetizados a partir de plantas medicinais já tem seus efeitos consolidados. Ainda segundo ele, os efeitos desses compostos no organismo humano ainda precisam ser melhor elucidados e são uma ótima opção para o tratamento de doenças por serem também mais baratos, e por terem menos efeitos colaterais (AGÊNCIA BRASIL, 2016). O Sistema Único de Saúde – SUS tem reconhecido a importância da utilização dos fitoterápicos no tratamentos de diversas doenças entre essas doenças as relacionadas a distúrbios gastrintestinais, e para tanto, já elaborou um plano plurianual, que compõem o “Programa 2015 - Aperfeiçoamento do SUS” permitindo o financiamento e o apoio ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS de acordo com a portaria GM/MS nº 2.001, de 3 de agosto de 2017 (BRASIL, 2017).

Ainda a grande questão tanto para a utilização quanto para a comercialização dos produtos naturais no Brasil é a falta de garantia quanto eficácia, segurança e qualidade dos compostos fitoterápicos com bases científicas para a segurança da população. O mercado é desorganizado, e o resultado é que muitos produtos sem qualidade continuam à circular livremente para consumo da população (COLAVITTI, 2002).

Então, sem a comprovação científica e o conhecimento apropriado do uso desses produtos, a população muitas vezes, desconhece os possíveis riscos existentes como por exemplo a possível toxicidade comprovada em relação às plantas medicinais, bem como não conhece e nem entende a forma correta de cultivo, preparo, indicações e contraindicações, pois acreditam que, por serem plantas medicinais, a forma e quantidade usadas não trazem problemas e danos à saúde (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

### 1.1.1 Óleos essenciais (OELs)

Os óleos essenciais (OELs) são definidos como substâncias complexas voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, oriundas do metabolismo secundário de vegetais. Estes podem ser aplicados em vários segmentos, como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e contra o ataque de herbívoros, bem como nos setores de higiene pessoal, perfumaria, cosmética, com um mercado mundial girando em torno de US\$ 1,8 bilhão. A participação do Brasil corresponde a apenas 0,1% deste valor sendo 80% referente ao comércio de OEL de laranja (SIMÕES; SPITZER, 2004; COSTA, 2008).

A sua ação pode ser de maneira individual, aditiva ou sinérgica, os mesmos são dotados principalmente de mono e sesquiterpenos e fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Dentre as plantas presentes no Nordeste brasileiro produtora de OELs pode citar a *Lippia sidoides* (*L. sidoides*), conhecida popularmente como “alecrim-pimenta”. Essa planta medicinal da família *Verbenaceae*, nativa do Nordeste brasileiro principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, própria da vegetação do semiárido, que apresenta comportamento caducifólio, porte ereto, com até três metros de altura e possui folhas aromáticas e picantes. A *L. sidoides* é uma planta aromática, de uso medicinal popular e rica em carvacrol (fenol monoterpenóides biosintetizados em plantas a partir do  $\gamma$ -terpineno e p-cimeno) (BASER; DEMIRCI, 2007; LORENZI; MATOS, 2008).

O Brasil tem lugar de destaque na produção de OELs ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os 4 grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos OELs de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. Apesar de tal destaque, o Brasil enfrenta problemas crônicos como falta de

manutenção do padrão de qualidade dos OELs, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor. Recentemente, foi fundada a ABRAPOE (Associação Brasileira de Produtores de Óleos Essenciais) que busca, entre outras metas, colaborar na aproximação entre os produtores e os centros de pesquisa nacionais para agregar qualidade aos OELs através de pesquisa e estudos de padronização, fornecer dados atualizados de mercado e representar a área frente aos órgãos e programas governamentais (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

## 1.2 Família *Verbenaceae* e o gênero *Lippia*

A família *Verbenaceae* compreende cerca de 32 gêneros e 480 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, nas regiões temperadas do Hemisfério Sul e poucas nas regiões temperadas do Hemisfério Norte (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013; SALIMENA; MÚLGURA, 2015).

Exemplos comuns no Nordeste do Brasil são os arbustos conhecidos como Camará Chumbinho (*Lantania câmara*), Alecrins (*Lippia spp*) e as árvores Mangue-canoé (*Avicennia*), Tarumã (*Vitex spp*) etc (CRAVEIRO et al., 1981).

O gênero *Lippia* é o segundo maior da família *Verbenaceae*, com aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores em três centros de dispersão, sendo o Brasil o maior deles, com 111 espécies, que se destacam por seu aspecto chamativo no período da floração e por seu aroma forte e geralmente agradável (PASCUAL, 2001; GOMES, 2009). O gênero *Lippia* é conhecido por apresentar, principalmente, atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e larvicida (MENDES et al., 2010; DAMASCENO et al., 2011).

No Nordeste do país as espécies de *Lippia* são usadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse. Em muitos casos, as partes usadas são as folhas e flores na forma de infusão ou decocto administradas oralmente ou através de emplastos (PASCUAL et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006). Matos (2002), sugere essa espécie como antisséptica local, no tratamento da seborréia, na cura de impingem e dermatoses.

A espécie apresenta propriedades medicinais destacando-se por apresentar altos teores de monoterpenos. Os compostos químicos presentes no OELs, principalmente os monoterpenos carvacrol e timol, tem apresentado forte ação

contra bactérias e fungos (ALBUQUERQUE et al., 2006; GOMES; NOGUEIRA; MORAES, 2011).

O objeto desse estudo, a planta *L. sidoides*, popularmente conhecida no Nordeste como “alecrim pimenta”, é bastante utilizada na medicina popular para tratamento de doenças de origem bacteriana e fúngicas (MATOS; OLIVEIRA, 1998). A folhagem canforada da *L. sidoides* é indicada como agente antiséptico tópico para pele, superfície mucosa e infecções de garganta (LEMOS et al., 1990).

### 1.2.1 A *Lippia sidoides*



**Figura 01.** A planta *Lippia sidoides*. Fonte: <http://www.verdeefolha.com>

A *L. sidoides*, conhecida popularmente como alecrim-pimenta, é uma planta arbustiva com folhas grosso-serreadas, de tamanho variável, medindo até 8 cm, revestidas de pelos em ambas as faces. As flores são brancoamarelas, pequenas e dispostas em inflorescências subglobosas e subpiramidais (CRAVEIRO et al., 1981) (Figura 01).

É uma espécie nativa do Nordeste brasileiro, encontrada principalmente nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Grande parte das plantas do gênero *Lippia* são aromáticas, destacando-se a *L. sidoides* por seu uso medicinal popular, principalmente como antisséptico (LEMOS et al., 1990; MATOS; OLIVEIRA, 1998).

Sua folhagem é geralmente utilizada para tratamento de acne, ferimentos, infecções da pele e do couro cabeludo. A infusão tem sido usada na medicina popular em inalações, rinite alérgica e no tratamento das infecções vaginais, da boca e da garganta (MATOS; OLIVEIRA, 1998).

#### 1.2.1.1 O óleo essencial da *Lippia sidoides*

O OEL da *L. sidoides* é extraído de suas folhas por destilação a vapor e é constituído majoritariamente por timol e carvacrol (50-70%), e outras substâncias, como o felandreno, cariofileno e mirceno.

Seu OEL essencial possui grande valor comercial e farmacológico, devido aos constituintes encontrados nas folhas, com atividade inseticida, fungicida, bactericida, leishmanicida, larvicida, acaricida, anti-inflamatória e antiespasmódica (LEMOS et al., 1990; LACOSTE et al., 1996; BOTELHO et al., 2007; FONTENELLE et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2010; PINHO et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

O OEL inibe o crescimento dos fungos das espécies *Microsporum canis*, *Microsporum pachydermatis* e *Candida spp.* (FONTENELLE et al., 2007) e seus componentes majoritários (timol e carvacrol) apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias, incluindo espécies do gênero *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivaris*, *S. sanguis* e *Candida albicans* (BOTELHO et al., 2007) e reduzem a severidade da gengivite, placa bacteriana e inflamação (GIRÃO et al., 2007; BOTELHO et al., 2007).

Estudos também relataram atividade larvicida e ovicida do OEL contra larvas de *Aedes aegypti* (CAVALCANTI et al., 2004) e contra larvas e ovos do nematódeo *Haemonchus contortus* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007).

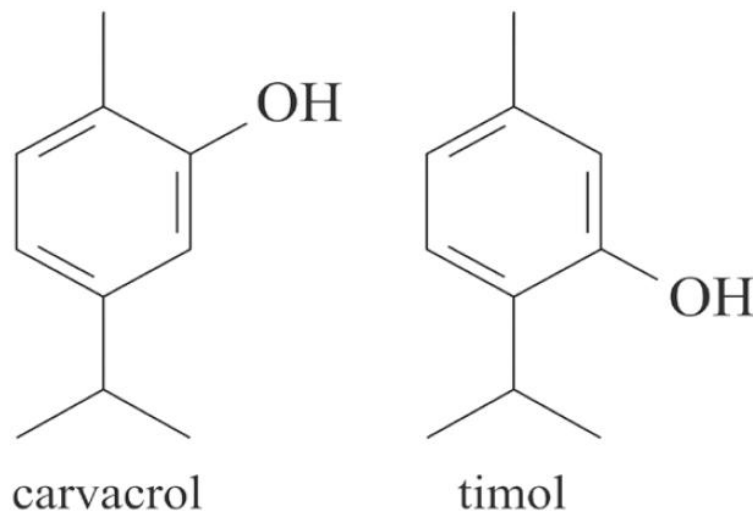
O OEL possui também atividade acaricida, demonstrado por Cavalcanti et al. (2010), através de experimentos com *Tetranychus urticae Koch*, que o OEL e seus componentes voláteis causaram a morte desses fitoparasitas.

Monteiro et al. (2007) mostraram que o OEL reduziu a inflamação aguda induzida por TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) na orelha de camundongos, bem como reduziu lesões gástricas induzidas por etanol.

Silva et al. (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *L. sidoides* frente a isolados de *Staphylococcus aureus* de origem humana hospitalar e todas as amostras mostraram-se sensíveis à ação do extrato.

A administração aguda do OEL acima de 3 g/kg por via oral, em camundongos, não apresentou toxicidade. Em ratos, a administração oral por 30 dias do OEL (117.95 mg/kg/dia), não induziu nenhuma alteração significativa histopatologicamente, hematologicamente ou bioquimicamente (FONTENELLE, 2008).

## 2 Os constituintes



**Figura 02.** Estrutura molecular do carvacrol e do timol. Fonte: Costa et al. (2017).

### 2.1 O Carvacrol

O carvacrol é um fenol monoterpênóide quimicamente denominado 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol ou isopropyl-0-cresol, possui fórmula molecular  $C_6H_{12}O_6$ ,  $C_6H_3(OH)(C_3H_7)$  e peso de 150,22 g/mol (Figura 2). Em temperatura ambiente, apresenta-se na forma líquida de coloração amarelo claro com densidade igual a 0,975 g/ml. Possui característica pungente e odor aromático, semelhante ao orégano. Seu ponto de fusão é de 2° C e seu ponto de ebulição é de 234° C. Sua DL50 é igual a 100 mg/Kg (CARVALHO et al., 2003).

Essa substância apresenta-se como um dos principais constituintes do OEL da *L. sidoides* (66,7%) (BOTELHO et al., 2007), e da *Lippia gracilis* (44,43%) (SILVA et al., 2008).

Por sua baixa toxicidade é aprovado como um aditivo alimentar seguro nos Estados Unidos da América e Europa e também foi avaliado como seguro para o uso tópico (ANDERSEN, 2006; GURIB-FAKIM, 2006).

Atualmente, o carvacrol é usado em baixas concentrações, demonstrando assim uma variedade de propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antiinflamatórios, hepatoprotectores, espasmolíticos e vasorelaxantes (CHAVAN; TUPE, 2014; ARIGESAVAN; SUDHANDIRAN, 2015; SÁNCHEZ; AZNAR; SÁNCHEZ, 2015).

Em músculo liso traqueal e vascular, o carvacrol em baixas concentrações relaxa as contrações induzidas por alta concentração de potássio extracelular e também induzidas por agonistas de receptores ligados a proteína G (BOSKABADY; JANDAGHI, 2003; PEIXOTO-NEVES et al., 2010; BOSKABADY; JAFARI; POURABOLI, 2011), indicando que o carvacrol tem um grande potencial como agente terapêutico.

Segundo Magyar et al. (2004), o carvacrol inibiu correntes de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) do tipo L em cardiomiócitos de caninos e humanos.

Esse monoterpeneo carvacrol mostrou ser efetivo em bloquear o potencial de ação composto no nervo ciático (GONÇALVES et al., 2010).

O carvacrol mostrou ter também potente atividade antiinflamatória pela inibição não-seletiva de ambas as isoformas da ciclooxygenase (COX) (LANDA et al., 2009) e também por suprimir a expressão da isoforma COX-2 (HOTTA et al., 2010).

Plantas que tem em seus extratos o carvacrol como principal constituinte, apresentam ação analgésica em modelos animais diversos (AMANLOU et al., 2005; CHIU et al., 2012). Pesquisas em modelo experimental in vitro mostraram que o carvacrol isoladamente reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e inibiu as fases iniciais (dor neurogênica) e tardias (dor inflamatória) do teste de lambida de pata induzida por formalina (LU; WU, 2010).

Estudos realizados em aortas isoladas de ratos, pré-contraídas com cloreto de potássio (KCl) ou fenilefrina, e que foram tratadas com carvacrol mostraram que o carvacrol apresentou um relaxamento independente do endotélio, provavelmente envolvendo a via de transdução de liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

## 2.2 O Timol

O timol, também chamado de 2-isopropil-5-metil-fenol, é um terpeno de fórmula química  $C_{10}H_{14}O$  (Figura 2). Trata-se de uma substância encontrada abundantemente no OEL de *L. sidoides Cham.* (*Verbenaceae*). Estudos anteriores demonstraram que o OEL de algumas espécies nativas do Nordeste brasileiro possui cerca de 60% de timol em sua composição (FONTENELLE et al., 2007).

O timol apresenta-se em forma de cristais grandes translúcidos incolores ou brancos. Possui odor aromático, semelhante ao tomilho (*T. vulgaris*), e paladar pungente com um leve efeito cáustico sobre os lábios. É uma substância pouco solúvel em água. Seu ponto de fusão é  $52^{\circ} C$ , permanecendo líquido em temperaturas consideravelmente mais baixas, enquanto que seu ponto de ebulição é  $233^{\circ} C$ .

Os compostos com estruturas fenólicas tais como timol, possuem alta atividade *in vitro* contra bactérias Gram negativas e Gram positivas (DORMAN; DEANS, 2000). Estudos de Botelho et al. (2007) demonstraram que o timol inibiu crescimento de patógenos orais como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, contribuindo para a manutenção da higiene oral. Timol e carvacrol, seu isômero, inibiram o crescimento de biofilmes pré-formados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (NOSTRO et al., 2007; KARPANEN et al., 2008), apresentaram efeito antioxidante sobre hexanos (LEE et al., 2005) e efeito relaxante sobre o músculo liso da aorta (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

O timol é o segundo constituinte mais abundante (25,16%) no OEL de *Satureja thymbra* o qual apresentou atividades, bactericida, fungicida, bacteriostática e fungistática (GIWELI et al., 2012). Begrow et al. (2010) relataram que o timol e carvacrol são responsáveis pelo efeito antiespasmódico do extrato da planta *Thymus vulgaris* em íleo e traqueia.

Monteiro et al. (2007), demonstraram que o timol tem um efeito anticarcinogênico, suprimindo a proliferação e promovendo o início da apoptose das células do melanoma B16F10 em camundongos. Sendo o mesmo o principal agente antioxidante do OEL, através do ensaio antioxidante de remoção do DPPH (1,1-difenil-2-picril-Idrazil).

O timol aumenta a liberação de  $Ca^{2+}$  induzida por despolarização no retículo sarcoplasmático, agindo diretamente nos canais de  $Ca^{2+}$  (CCa) do retículo



sarcoplasmático (receptor rianodina). Utilizando-se de microscopia confocal, demonstraram que o timol aumenta a probabilidade do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  estar no estado aberto e a duração do estado aberto do canal (SZENTESI et al., 2004).

Timol exibiu um efeito supressivo dependente de concentração no pico das correntes de  $\text{Ca}^+$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) e de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{K}}$ ) nas fibras do músculo esquelético de rato, alterando a ativação e a inativação dessas correntes (SZENTANDRÁSSY et al., 2003) e um efeito supressor das correntes de  $\text{Ca}^+$  e das correntes  $\text{K}^+$  dos tipos:  $I_{\text{Kr}}$  (Corrente de saída de  $\text{K}^+$ ),  $I_{\text{Ks}}$  (corrente de  $\text{K}^+$  retificadora tardia) e  $I_{\text{to}}$  (corrente transitória de efluxo de  $\text{K}^+$ ) em cardiomiócitos ventriculares de humanos e cães (MAGYAR et al., 2002) e induziu efeitos vasorelaxantes em músculo liso de aorta de ratos, independente da integridade do endotélio vascular (HAESLER et al., 2002; PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

Adicionalmente, timol e carvacrol aliviaram os danos cognitivos causados por níveis aumentados de beta-amilóide ou hipofunção colinérgica em ratos. Atividades anticolinesterase, antioxidante, e anti-inflamatória podem ser os mecanismos que contribuem para tais efeitos benéficos (AZIZI et al., 2012).

O ensaio toxicológico agudo demonstrou baixa toxicidade do timol, destacando uma DL50 de 1,8 g/kg por via oral em ratos (SOUZA; MATOS, 1991).

### **3 O mecanismo contrátil do músculo liso**

A contração do músculo liso, assim como nos outros tecidos musculares, ocorre a partir da interação entre as proteínas contráteis miosina e actina, sendo dependente da concentração do íon  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma. O aumento dos níveis desse íon, oriundo outrora do meio intracelular outrora do meio extracelular, desencadeia cascatas de sinalizações que levam ao evento contrátil (ALLEN; WALSH, 1994; MCFADZEAN; GIBSON, 2002; GUYTON; HALL, 2006; BERNE et al., 2009).

O músculo liso intestinal é do tipo unitário, de modo que a estimulação elétrica de uma célula é seguida pela estimulação elétrica das células musculares adjacentes, uma vez que suas células se comunicam por junções intercelulares de baixa resistência elétrica, *gap-junctions*. As fibras musculares estão dispostas em feixes e são inervadas por um único neurônio, formando uma unidade motora. Quando o neurônio secreta seus neurotransmissores, as células mais próximas são

excitadas, mas a estimulação é repassada a todas as células, graças as *gap-junctions*. Isso leva à onda de contração, peristaltismo (AIRES, 2012).

O Retículo Sarcoplasmático (RS) possui a capacidade de estocar  $\text{Ca}^{2+}$ , e que, ao ser estimulado, libera esse íon para o citoplasma. No entanto, por possuir um RS pouco desenvolvido, o músculo liso para contrair depende do influxo deste íon através de canais para  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltagem (VOCCs) dependentes da variação do potencial de membrana, operados por receptor (ROCCs), dependentes de ligante, ou operados por estoque (SOCC) ativados pela depleção das reservas de  $\text{Ca}^{2+}$  no RS (RUSSEL, 1986; MCFADZEAN; GIBSON, 2002; SWEENEY et al., 2002).

O RS possui grande importância em relação à concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio citoplasmático. Ele possui uma proteína em sua membrana, a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase dos Retículos Endoplasmático e Sarcoplasmático (SERCA) que transporta o  $\text{Ca}^{2+}$  do citoplasma contra um gradiente de concentração (de forma lenta), recuperando os seus estoques, participando da diminuição da concentração intracelular deste íon.

O RS favorece uma rápida disponibilização do íon  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular através de dois canais específicos, um ligado ao receptor de inositol trifosfato (IP3R) e outro ligado ao receptor de Rianodina (RYR) (FLYNN et al., 2001; BLAUSTEIN et al., 2002; RUEDA; GARCÍA; GUERRERO-HERNÁNDEZ, 2002; GUYTON; HALL, 2006; NG et al., 2007; BERNE et al., 2009).

Caso a membrana do músculo liso do estômago seja estimulada ocasionando uma variação das concentrações de íons entre os meios intra e extracelular, a referida membrana pode sofrer um processo conhecido como despolarização, ou seja, variação do seu potencial de repouso para níveis mais positivos. Este fenômeno promove uma mudança na conformação dos VOCCs, provocando a sua abertura, permitindo a passagem de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando a concentração intracelular do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , desenvolvendo a contração. Uma pequena elevação de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula os RYR, liberando o  $\text{Ca}^{2+}$  que se encontra armazenado no RS, aumentando ainda mais a concentração desse íon no citoplasma. A este tipo de estimulação e a cascata de sinalização que se segue denominamos acoplamento eletromecânico (BERRIDGE, 1993; MCFADZEAN; GIBSON, 2002; WEBB, 2003; BERNE et al., 2009).

O músculo liso também pode contrair por acoplamento farmacomecânico, onde não ocorre uma alteração do potencial de membrana celular para desencadear

a contração. Nesta situação, o aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular acontecerá através da combinação da liberação dos estoques intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  por sinalização intrínseca e da entrada do íon através da abertura dos ROCCs (MCFADZEAN; GIBSON, 2002). No estômago, a sinalização é estimulada por receptores de cloridrato de acetilcolina ou acetilcolina (ACh) do tipo muscarínico M3. Os Receptores Muscarínicos (MR) também podem ser ativados por Cloreto de Carbaminocolina – ou Carbacol (CCh), uma análogo da ACh que não é degradado pela acetilcolinesterase, propiciando um estímulo de contração mais prolongado (ROUX et al., 1997).

Os receptores de membrana, que podem desencadear a contração do músculo liso, possuem 7 (sete) segmentos transmembrana, dos quais 2 (dois) segmentos extracelulares estão disponíveis para a ligação do agonista e um segmento intracelular está acoplado a proteína G (HEDIN; DUERSON; CLAPHAM, 1993).

A proteína G é composta de 3 nucleotídeos de Guanina (heterotrímero  $\alpha\beta\gamma$ ) de alta afinidade, quando esta proteína se encontra acoplada a Difosfato de Guanosina (GDP). Ao sofrer ação do ligante, o receptor de membrana ativa a proteína G, que substitui o GDP por Trifosfato de Guanosina (GTP), perdendo afinidade entre os nucleotídeos. Assim, a subunidade  $\alpha$ -GTP ativará a subunidade  $\beta$  da Fosfolipase C (PLC), sofrerá hidrólise e reassociará ao complexo proteína G (BERSTEIN et al., 1992; LOGOTHETIS et al., 1987). A PLC ativada irá clivar o Fosfatidilinositol 4,5- Difosfato ( $\text{PIP}_2$ ), gerando Diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (BERSTEIN et al., 1992; KOTLIKOFF; KUME; TOMASIC, 1992; ROUX et al., 1997).

Em seguida o IP3 ativará o IP3R no RS, que irá ativar os receptores de RYR que abrirá os CCa do retículo sarcoplasmático, aumentando a concentração citosólica do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (BERRIDGE; GALIONE, 1988; BERRIDGE, 1993; MIKOSHIBA, 2003; WEBB, 2003). O DAG irá ativar a Proteína Quinase C (PKC), que estimula a atividade da Fosfolipase A2 (PLA2), liberando o Ácido Aracônico (AA) para a via das COX, transformando-o em prostaglandina e tromboxano, mediando fatores de transcrição gênica e de crescimento (BILLINGTON; PENN, 2003).

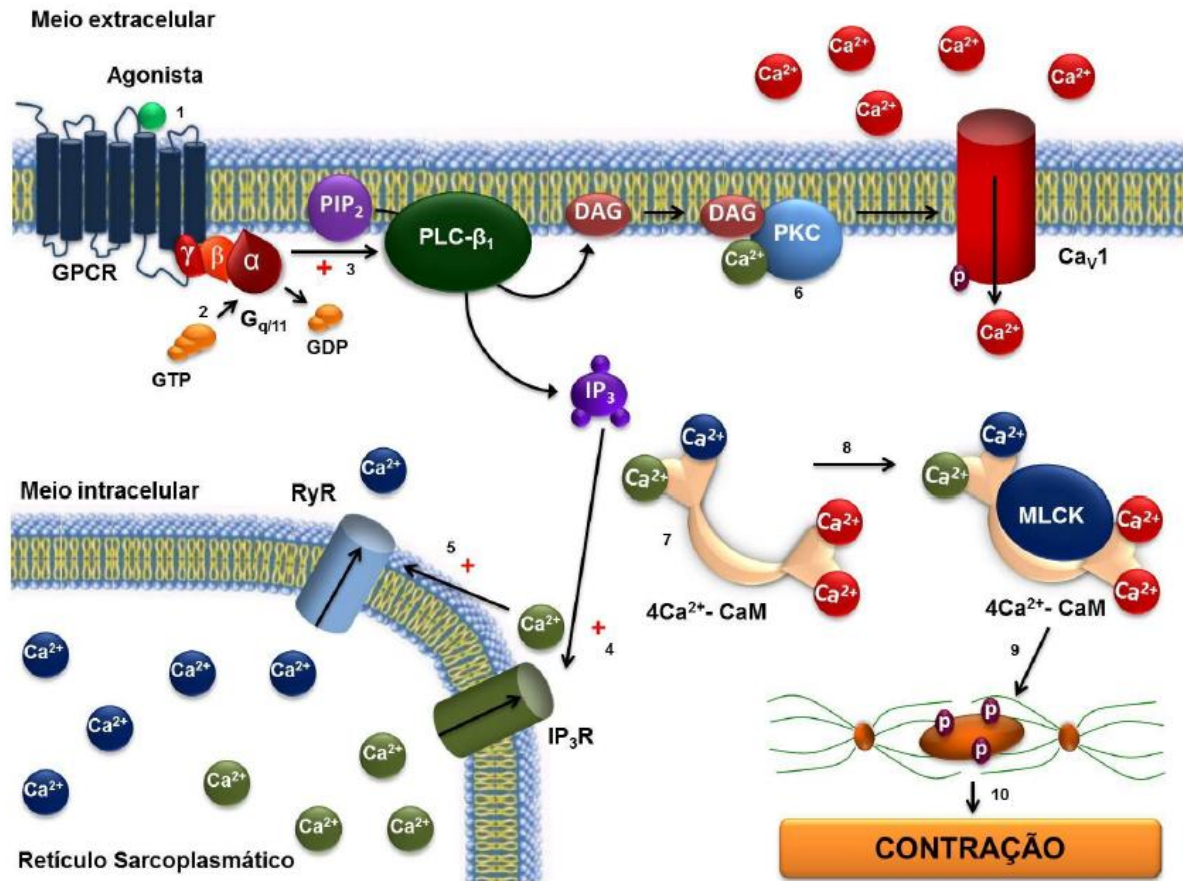
Seja por acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol sinalizara uma cascata de reações para o aparelho

contrátil do músculo liso. A proteína Calmodulina (CaM) ligar-se-á a 4 íons  $\text{Ca}^{2+}$ , e então o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (CaCM) ativará a Quinase da Cadeia Leve de Miosina (MLCK), que fosforila a Cadeia Leve de Miosina (MLC) regulatória. Ainda, a MLCK ativa a ATPase para fornecer energia que possibilita a junção actina-miosina, ativando o ciclo das pontes cruzadas, análogas ao músculo esquelético, provocando a contração (ALLEN; WALSH, 1994; WEBB, 2003; BERNE et al., 2009).

Para completar o entendimento, a Fosfatase da Cadeia Leve de Miosina (MLCP) provoca a desfosforilação da MLC, acarretando a inibição do aparelho contrátil. Apesar do fato de que os mecanismos de atuação da MLCP ainda não foram bem elucidados, afirma-se que a relação entre as atividades da MLCK e da MLCP e que regula a contração do músculo liso (BERNE et al., 2009).

A regulação da contração é necessária a partir do instante em que ocorrem as alterações na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . No início da contração, conhecido como momento fásico, a fosforização e a força, conseqüentemente, alcançam seu pico, com a tendência de logo retornarem a seus valores basais, relaxando o miócito. Isto não acontece por causa da fase tônica da contração, onde a força aumenta lentamente e se mantém alta por um período maior. Mesmo com a saída de uma grande quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$ , a manutenção de 20 a 30% das pontes cruzadas fosforiladas sustenta a força de contração, reduzindo o gasto de adenosina trifosfato (ATP), importante fenômeno para um tecido que depende de glicólise. Este mecanismo é conhecido como estado de trava, pois a atividade da MLCP é mais lenta que a da MLCK. Assim, o relaxamento ocorrerá quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  atingir valores que não possibilitem a formação do complexo CaCM, ou na atuação de outros mecanismos (GUYTON; HALL, 2006; BERNE et al., 2009).

O tipo de agonista utilizado para contração, a sua concentração, o tipo e a localização do músculo liso a ser investigado determinam se serão utilizadas fontes extracelulares e /ou intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , bem como se o  $\text{Ca}^{2+}$  entrará na célula por VOCCs e/ou ROCCs (RUSSEL, 1986).



**Figura 03.** Mecanismos bioquímicos da contração do músculo liso. **Fonte:** Adaptado de Travassos, 2010.

### 3.1 Relaxamento do músculo liso

Como já mostrado anteriormente, a MLCP é um importante mecanismo para produzir o relaxamento do músculo liso, porém não é o único nem este age sozinho nesse processo de contração sozinho. A diminuição do estímulo e a ação de outras substâncias também participam deste processo (WEBB, 2003). Na retirada do Ca<sup>2+</sup> do citosol em concentrações mais baixas, a MLCP atua separando o fosfato da MLC reguladora, desativando o processo de contração (BERNE et al., 2009).

Os mecanismos de remoção do Ca<sup>2+</sup> do meio intracelular são importantes para o processo de relaxamento. A SERCA, um trocador 3Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, e Ca-Mg-ATPase ajudam a recuperação das reservas de Ca<sup>2+</sup> e a sua expulsão da célula (HONDA; TOMITA, 1987; WEBB, 2003; BERNE et al., 2009). A redução dos estoques no RS e/ou o aumento da concentração extracelular provoca a liberação de fatores de influxo de Ca<sup>2+</sup> pelo próprio RS, capaz de ativar canais SOCC

presentes na sua membrana e no sarcolema (BERNE et al., 2009). A captação do íon pela mitocôndria também participa da sua remoção, mas as células de músculo liso geralmente possuem esta organela pouco desenvolvida (ROUX; MARHL, 2004).

A hiperpolarização da membrana e o aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e de Monofosfato Cíclico de Guanosina (GMPc) no mioplasma pela atuação da Adenilato Ciclase (AC) e Guanilato Ciclase (GC) – estas podendo ser ativadas por agentes farmacológicos – são outros meios pelos quais conduzem ao relaxamento (MCFADZEAN; GIBSON, 2002; WEBB, 2003; GUYTON; HALL, 2006).

O GMPc tem a capacidade de ativar canais para  $K^+$  e inibir os canais catiônicos de entrada, conduzindo assim, o potencial de membrana para valores mais negativos, reduzindo o influxo de  $Ca^{2+}$ , estimulando com isso, a reposição dos estoques de  $Ca^{2+}$  no RS, ativando desta forma as SERCA e reduzindo a concentração de IP3 ao inibir a PLC (GUYTON; HALL, 2006; BERNE et al., 2009).

A atuação da AMPc se dá pela diminuição da fosforilação por parte da MLCK, reduzindo a concentração de  $Ca^{2+}$  através da ativação dos canais de remoção do íon (BAI; SANDERSON, 2006).

O AMPc age diminuindo a fosforilação por parte da MLCK, reduzindo a concentração de  $Ca^{2+}$  por meio da ativação dos canais de remoção do íon (BAI; SANDERSON, 2006). Ele também ativa a Proteína Quinase A (PKA), que atua sobre a proteína G e PLC, inibindo a lise do  $PIP_2$  e reduzindo a afinidade do IP3R por fosforilação. Com isso acontece a diminuição da concentração de  $Ca^{2+}$ , e da afinidade da MLCK pelo CaCM e com isso, promove o efluxo de  $K^+$  (BILLINGTON; PENN, 2003). Webb (2003) demonstra um esquema de alguns processos para o relaxamento do músculo liso, apresentado na Figura abaixo.

#### **4 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

A influência das plantas medicinais na produção de fármacos tem sido de grande relevância e um exemplo são as drogas antitumorais e antimicrobianas, das quais 60% disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

O crescente interesse em se estudar e conhecer a fundo os mecanismos de ação das plantas medicinais, aliado a grande diversidade das floras brasileira nordestina, colocam o Brasil em uma posição favorável na corrida em prol da descoberta de novos agentes terapêuticos para tratamentos de diversas patologias.

No Nordeste do Brasil, a precária assistência à saúde de boa parte da população associada a diversidade de espécies torna a utilização dessas plantas uma prática rotineira para tratamento de diversas enfermidades. As substâncias biologicamente ativas presentes nos OELs ou extratos de diferentes partes dessas plantas são retidas através de chás, infusões, extratos e utilizadas na medicina popular contra cólicas intestinais, dores de cabeça, inflamações, infecções bacterianas, fúngicas, dentre outras (TEÓFILO, 2012).

Conforme evidências científicas citadas na revisão de literatura sobre a *L. sidoides* e o carvacrol, essa planta e seu composto majoritário supracitado é bastante utilizada na medicina popular com diversas ações, apesar de não existirem registros de estudos de sua atividade antiespasmolítica sobre o músculo liso de estômago (BEGROW et al., 2010)

Devido à importância da musculatura lisa para o controle das atividades motoras gastrintestinais, diversas pesquisas são realizadas em busca de se entender as repercussões de alterações sobre os padrões normais de contratilidade dessa musculatura.

Desta forma, considerando a importância de se conhecer a diversidade de plantas com finalidades terapêuticas e os poucos estudos para o estado do Ceará, bem como o interesse em investigar a atividade espasmolítica de espécies que apresentam os OELs como constituinte químico reside no fato de que esses produtos podem exercer diferentes ações em processos fisiopatológicos distintos, tais como: asma, hipertensão, disfunção erétil, diarreias e espasmos intestinais (HUBINONT; DEBIEVE, 2011). O processo de contração de vários músculos lisos, a exemplo do o estômago, é complexo e depende de vários elementos fisiológicos torna-se necessária conhecer e descrever o mecanismo da atividade espasmolítica da *L. sidoides* e do carvacrol.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar as ações farmacológicas do óleo essencial (OEL) de *Lippia sidoides* e seu constituinte majoritário carvacrol, na contratilidade da musculatura lisa de fundo de estômago de ratos.

### 5.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do OEL e do carvacrol no tônus basal do músculo liso de fundo de estômago de rato.

Caracterizar o efeito OEL e carvacrol sobre parâmetros contráteis do músculo liso de fundo de estômago de rato.

Investigar o mecanismo de ação dos referidos agentes em estudo na contratilidade do fundo de estômago.

Determinar o mecanismo molecular da ligação do carvacrol aos VOCCs através de docagem.

Investigar o papel do OEL e do carvacrol sobre os canais de K<sup>+</sup>.



## 6 MATERIAS E MÉTODOS

### 6.1 Óleo essencial (OEL)

O OEL de *L. sidoides* utilizado nesse estudo foi adquirido pelo o Laboratório de Produtos Naturais (LPN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Por sua vez o carvacrol foi adquirido pelo Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagem (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

A identificação dos constituintes do OEL foi feita por GC/MS (Gas Chromatography/Mass Spectrometry) nas condições a seguir: coluna capilar de sílica fundida a uma camada de Dimetilpolisiloxano DB-1 (30 m x 0,25 mm de comprimento); gás carreador: He (1 ml/min.); temperatura do injetor: 250 °C; detector de temperatura: 200 °C; temperatura da coluna: 35-180 °C; impacto eletrônico 70 eV e por pesquisa literária, índice de retenção e interpretação visual do espectro de massa (ADAMS, 2001).

### 6.2 Soluções e drogas

Os sais e drogas utilizados nos experimentos apresentaram grau de pureza analítica e foram obtidos das empresas Sigma Chemical Corporation (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany) ou Reagem (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Como solução nutritiva foi utilizada Tyrode contendo (em mM): NaCl 9,251g; KCl 0,2982g; MgCl<sub>2</sub> 0,2134g; NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0503g; NaHCO<sub>3</sub> 0,8401g; CaCl<sub>2</sub> 0,2219g e glicose 1.1096g, com pH ajustado para 7,4 na temperatura de 37 °C.

Soluções isentas de íons Ca<sup>2+</sup> foram preparadas de acordo com os protocolos descritos por Cuthbert et al. (1994) por meio da omissão de CaCl<sub>2</sub> e ácido etileno glicol tetracético (EGTA), um clássico e tradicional quelante de Ca<sup>2+</sup>.

A solução de cloridrato de carbamilcolina ou CCh e outras foram preparadas pela diluição da substância pura em água destilada. Preparou-se a solução de nifedipina pela diluição da substância pura em etanol e a solução de éster de forbol (DBP – 12, 13 dibutirate phorbol ester) pela diluição da substância pura em dimetilsulfóxido (DMSO). Substâncias fotossensíveis foram cuidadosamente protegidas da luz.

Soluções estoques de OEL e carvacrol, foram preparadas imediatamente antes da realização dos protocolos experimentais dissolvendo-os diretamente em DMSO a 10% e, em seguida, homogeneizadas no agitador Vortex.

A partir das soluções estoques foi pipetado, diretamente no banho de perfusão, um volume adequado para fornecer uma determinada concentração do OEL e do carvacrol. Ao final de um protocolo experimental, a concentração final de DMSO a 10% dentro da câmara de perfusão não ultrapassou 0,1%.

### **6.3 Ancoramento Molecular**

O ancoramento molecular consiste em prever a conformação bioativa de uma molécula (ligante) no sítio de uma macromolécula seguida de avaliação e classificação do modo de ligação proposto (MOITESSIER et al., 2008). A proteína VOCC (PDB ID: 4MS2), uma estrutura determinada por cristalografia de raios-X obtida do Banco de dados de proteínas RCSB, com uma resolução de 2,75 foi usada como estrutura fixa para o método de ancoramento e foi considerada livre de ligantes. Moléculas de água também foram removidas por simulação de docagem usando Autodock tools (ADT). Átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína usando a ferramenta de docagem automática, AutoDock 4.2.

A estrutura 3D do carvacrol foi desenhado usando Maestro (release 2016-1) e a simulação de ancoramento automático foi realizado utilizando ADT para acessar as orientações de ligação apropriadas e as conformações das moléculas ligantes com diferentes inibidores. Um método de algoritmo genético Lamarquiano foi implementado no programa Autodock 4.2. Para os cálculos, as cargas de Gasteiger foram adicionadas por padrão e as ligações rotacionáveis foram selecionadas pelo Autodock tools e todas as torções foram permitidas para rotacionar. Os mapas da grade foram gerados pelo programa Autogrid onde a grade teve o tamanho de 126×126×126 pontos com um espaço padrão de 0.375 Å entre os pontos da grade cobrindo favoravelmente toda a área de ligação. O centro X, Y, Z foi -16.535, -11.122, 54.388, respectivamente.

O protocolo de ancoramento molecular rígida consistiu em 10 algoritmos genéticos independentes e outros parâmetros usados por padrão pelo ADT. Os aspectos de ligações do carvacrol e seus correspondentes escores de afinidade de

ligação são considerados como melhor interação molecular. Os resultados foram visualizados e analisados usando ADT, Maestro, Pymol e Discovery Studio.

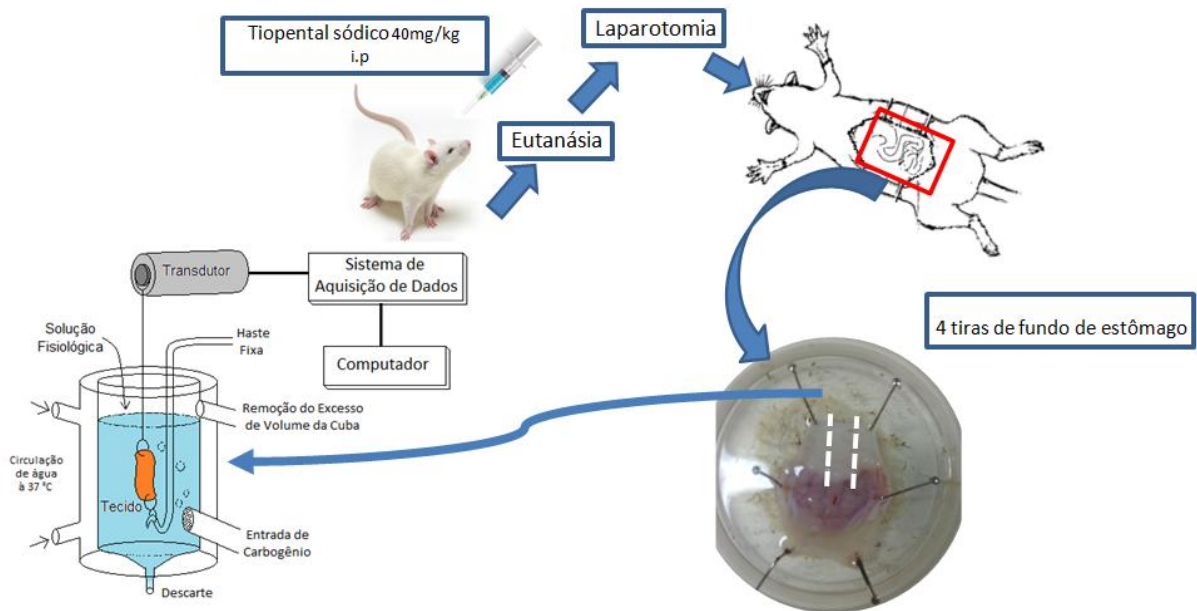
#### **6.4 Animais e preparo do tecido**

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), do sexo masculino, com massa corporal entre 150-250 gramas, oriundos do Biotério Central da UFC e mantidos em nosso laboratório sobre os nossos cuidados. Os animais foram mantidos em caixa de propileno em ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e ração. O estudo foi feito tomando por base os princípios e normas internacionalmente existentes em vigor para a utilização de animais em projetos de pesquisa, tendo como principais fundamentos a ética e normas legais que regem a pesquisa com animais, estabelecidos pela lei 11.794/08, estando de acordo com a ética e regimentos legais do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará - UFC, tendo obtido parecer favorável, sob o número de protocolo: Nº 2928040518.

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico, agente barbitúrico de ultracurta duração por via intraperitoneal na dose de 40 mg/kg (THURMON; TRANQUILLI; BENSON, 1996), e através de exanguinação por secção da aorta abdominal e veia cava inferior.

O animal foi colocado em decúbito dorsal e feito uma incisão no abdômen para retirada o estômago e em seguida feito tiras longitudinais de fundo de estômago medindo 1,5-2 cm, onde foram montadas em câmaras orgânicas com volume de 10 ml, contendo solução de Tyrode, a temperatura de 37 °C, pH= 7.4, oxigenadas com mistura de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>, logo em seguida foi fixada uma extremidade do tecido à base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico (modelo Panlab S.L, Barcelona, Espanha). Foi aplicada ao tecido uma tensão de 1 g por um período de equilíbrio de 60 minutos.

**Figura 04.** Esquema ilustrado da preparação de tecido gastrointestinal isolado.



**Fonte:** Laboratório de Farmacologia do Músculo Liso (LAFARMULI).

Adaptado por Francisco Rafael Oliveira da Silva

Sob aspectos gerais, após o período de estabilização de todos os protocolos, foram induzidas, duas contrações subsequentes por 60 mM de KCl (K60) adicionado diretamente ao banho, através de solução hipertônica. Este procedimento permitiu avaliar a viabilidade e integridade da preparação, bem como a reprodutibilidade da resposta biológica do ensaio. O OEL foi incubado em várias concentrações 3, 10, 30, 100 e 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  individualmente com tempo de 15 min entre uma e outra e o mesmo foi feito com o carvacrol sendo que em concentração cumulativas de 3, 10,30, 100, 300, 600 e 1000  $\mu\text{M}$ . Os valores da concentração dos compostos (OEL e carvacrol) foram avaliados em uma contração do músculo induzido por uma dose única de CCh a 30  $\mu\text{M}$ . Em todos os experimentos o OEL e o carvacrol foram adicionados ao tecido de diferentes grupos com intervalos de 10 min em concentrações cumulativas. A influência de canais iônicos foi avaliada através da adição das substâncias sobre os tecidos pré-contraídos com agonistas e pré-incubados com bloqueadores de potássio (tetraetilamonio) e de  $\text{Ca}^{2+}$  (nifedipina).

Enfim, para avaliar a resposta do tecido utilizamos novamente KCl na concentração de 60 mM para observar se o tecido está vivo e em seguida desligaremos o equipamento.

## 6.5 Grupos experimentais.

- **Grupo OELs + K60:** Efeito do OELs sobre contrações induzidas por  $60\mu\text{M}$  no fundo de estômago de ratos.
  - **Grupo OELs + CCh:** Efeito do OELs sobre contrações induzidas por  $30\mu\text{M}$  de CCh no fundo de estômago de ratos.
  - **Grupo OELs +  $0\text{Ca}^{+2}$ :** Efeito do OELs sobre contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  em solução  $0\text{Ca}^{+2}$  contraído por  $60\text{mM}$  KCl.
  - **Grupo carvacrol + K60:** Efeito do carvacrol sobre contrações induzidas por  $60\mu\text{M}$  no fundo de estômago de ratos.
  - **Grupo carvacrol + CCh:** Efeito do carvacrol sobre contrações induzidas por  $30\mu\text{M}$  de CCh no fundo de estômago de ratos. **Total = 6 animais**
  - **Grupo carvacrol + NIFEDIPINA:** Efeito do carvacrol em tecido de estômago de ratos sobre contração induzida por CCh com adição de nifedipina.
  - **Grupo carvacrol +  $0\text{Ca}^{+2}$ :** Efeito do carvacrol sobre contrações induzidas por  $\text{CaCl}_2$  em tecido  $0\text{Ca}^{+2}$  contraído por  $60\text{mM}$  KCl.
- Grupo carvacrol + TEA:** Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em fundo de estômago de ratos pré-incubadas com Tetraetilamônio (TEA)

## 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado teste de normalidade para os dados do estudo. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* (não pareado) ou ANOVA “one-way” seguido do teste de Bonferroni. A hipótese nula era rejeitada quando o valor de *p* fosse menor que 0,05. Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

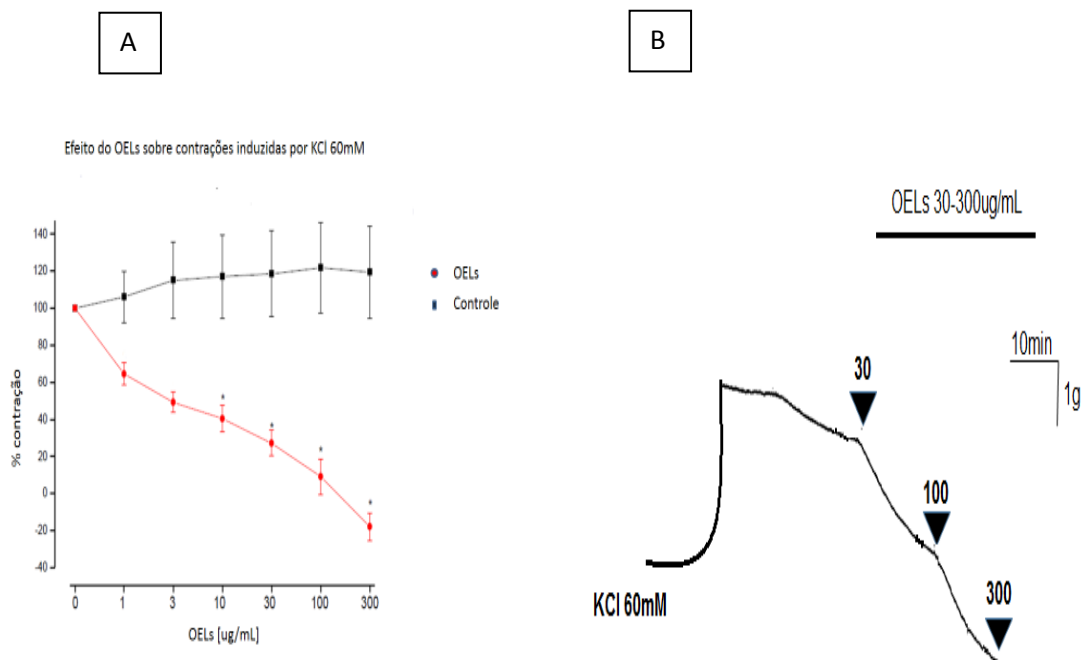
## 8 ASPÉCTOS ÉTICOS

O estudo foi realizado com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa, tendo como alicerce os princípios éticos e legais que regem as pesquisas com animais, estabelecidos pela lei 11.794/08, assim como de acordo com os preceitos éticos e legais do COBEA. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC, tendo obtido parecer favorável, sob o número de protocolo: N° 2928040518.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Efeito do OEL de *Lippia sidoides* sobre as contrações tônicas induzidas por KCl a 60 mM em fundo de estômago de ratos

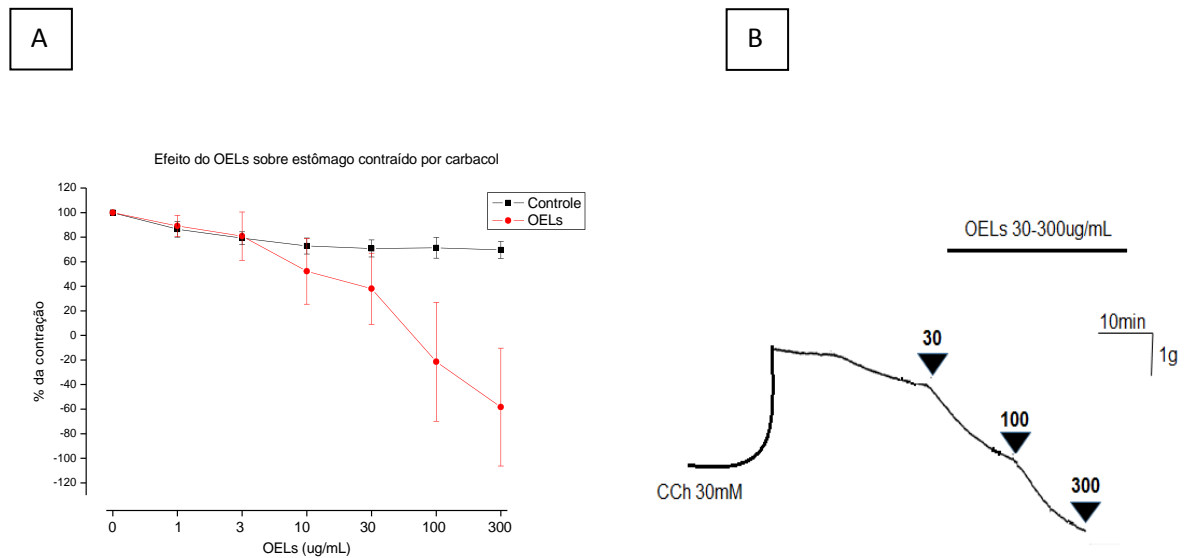
O OEL (1-300 µg/ml) inibiu a contração induzida por KCl a 60 mM na concentração de 300 µg/ml 100% ( $-10,95499 \pm 7,73396\%$ ), 30 µg/mL 50% ( $36,82146 \pm 7,9157\%$ ), 100 µg/mL 80% ( $20,83054 \pm 7,32411\%$ ), ( $p < 0,05$ , ANOVA seguido por Student Newman Keuls teste post hoc - MODELO).



**Figura 05** – Curva concentração efeito ao OEL em segmentos de fundo de estômago pré-contraído por KCl 60 mM mantido em solução de Tyrode e pH 7,4 (A); Traçado original de uma curva concentração efeito ao OEL em segmentos de fundo de estômago pré-contraído por KCl 60 mM mantido em solução de Tyrode e pH 7,4 (B).

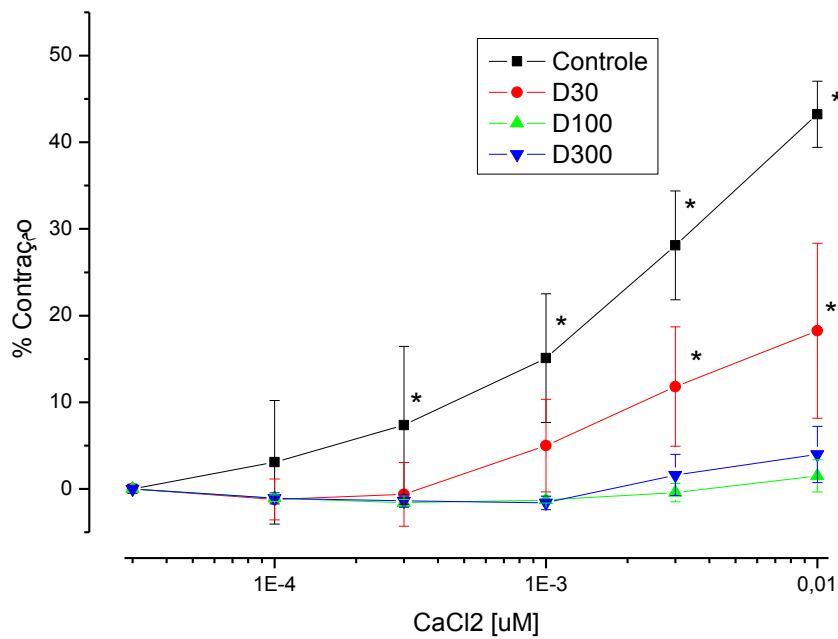
## 9.2 Efeito do OEL de *Lippia sidoides* sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol (CCh) a 30 mM

O OEL (1-300 µg/ml) o valor de 100% ( $-45.83 \pm 40.33\%$ ) ( $p < 0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni).



**Figura 06** - A e B - Imagem do gráfico e do traçado original de uma curva concentração efeito ao OEL em segmentos de fundo de estômago pré-contraído por CCh 30 mM mantido em solução de Tyrode e pH 7,4.

### 9.3 Efeito do OEL de *Lippia sidoides* frente as contrações tônicas induzidas por $\text{CaCl}_2$ em meio despolarizante nominalmente sem $\text{Ca}^{2+}$ ( $0\text{Ca}^{2+}$ )



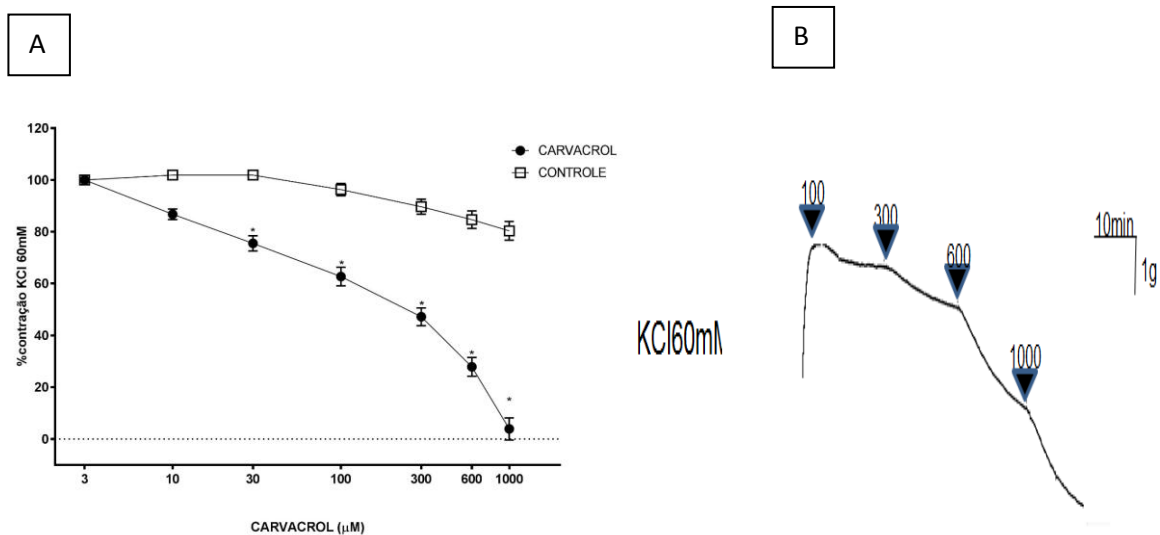
**Figura 07** - O OEL (100-300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi capaz de inibir a curva em quase 90% com ( $P < 0,05$ , "t" Student).



## 9.4 Avaliação da responsividade do tecido do fundo de estômago ao carvacrol

### 9.4.1 Curva concentração-efeito para carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por KCl a 60 Mm

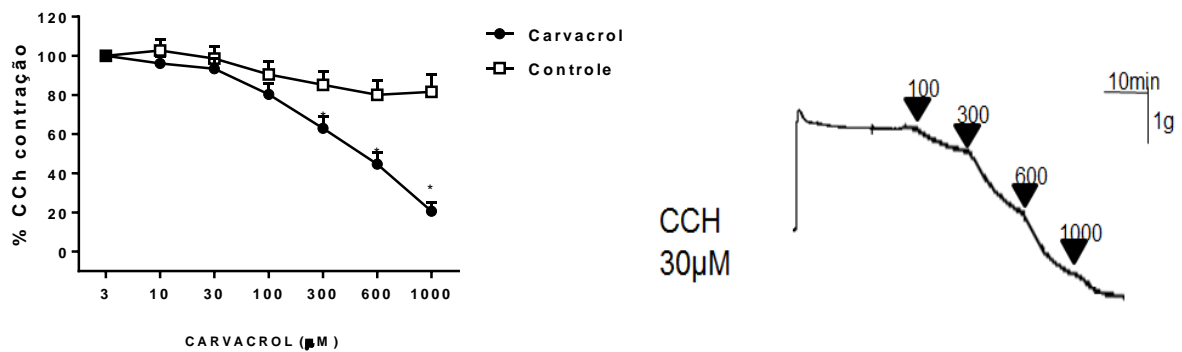
Observou-se que o carvacrol promoveu efeito relaxante no tecido de fundo de estômago, de maneira concentração-efeito, quando comparado a tecido pré-contraído com KCl a 60 mM. O carvacrol a 30  $\mu$ M reduziu a contração em 24% ( $75,54 \pm 2,98,3\%$ ). Na concentração 100  $\mu$ M vimos que o relaxamento foi de 37% ( $62,69 \pm 3,63$ ), 300  $\mu$ M 52% ( $47,21 \pm 3,465$ ), 600  $\mu$ M 72% ( $27,89 \pm 3,622$ ), 1000  $\mu$ M 96% ( $3,88 \pm 4,272$ ), ( $p < 0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni).



**Figura 08** - Gráfico com valores médios das respostas à concentrações crescentes de carvacrol (3 – 1000  $\mu$ M) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio a KCl a 60 Mm,  $p < 0,05$  em relação aos grupos carvacrol n (7) e controle (7).

### 9.4.2 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh a 30 mM

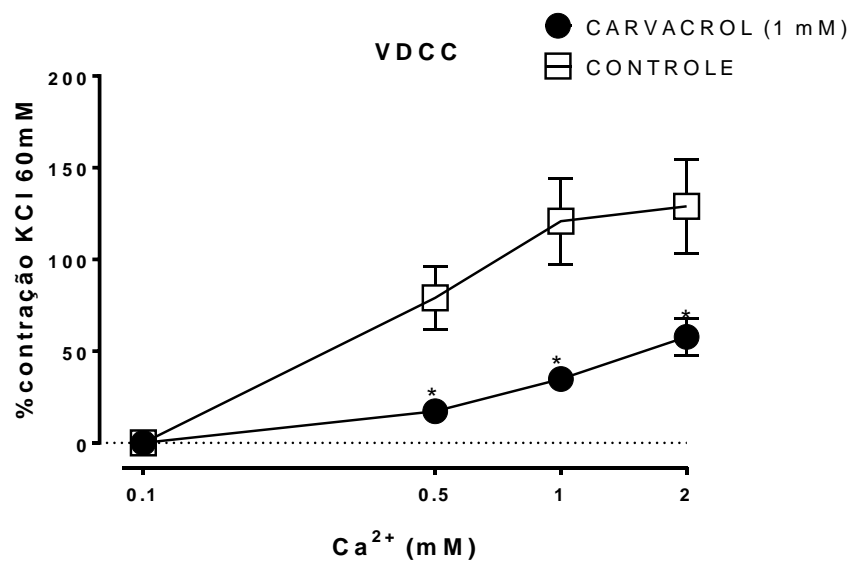
O carvacrol promoveu efeito relaxante no tecido de fundo de estômago, de maneira concentração-efeito, quando comparado a tecido pré-contraído com CCh. O carvacrol a 300  $\mu\text{M}$  reduziu a contração em 37% ( $63,01 \pm 5,928\%$ ), 600  $\mu\text{M}$  55% ( $44,69 \pm 6,027\%$ ), 1000  $\mu\text{M}$  79% ( $20,58 \pm 4,514$ ), ( $p < 0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni).



**Figura 09** - A e B - Imagem do gráfico e do traçado com valores médios das respostas à concentrações crescentes de carvacrol (3 – 1000  $\mu\text{M}$ ) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio a CCh a 30 mM. ( $p < 0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni), em relação aos grupos carvacrol n (7) e controle (7).

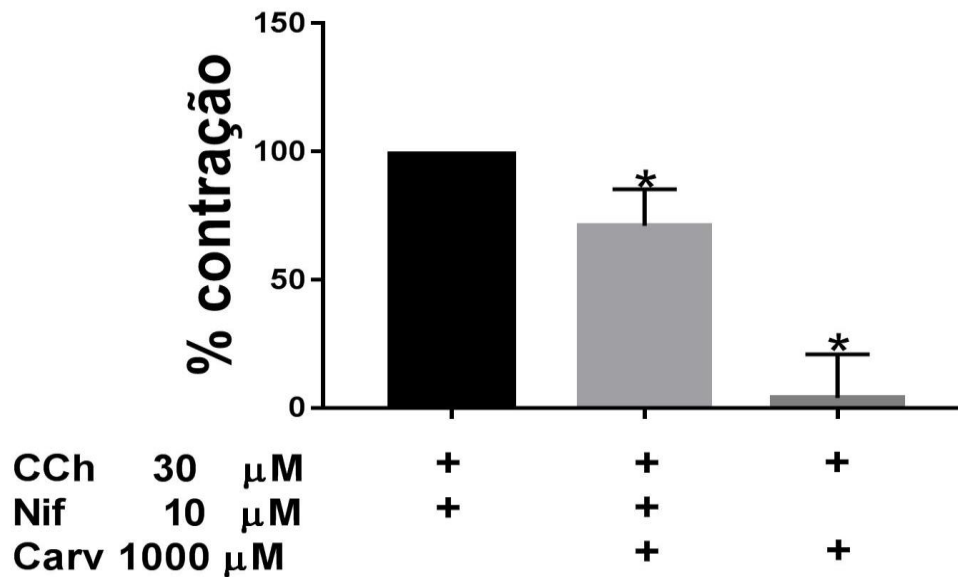
### 9.4.3 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por $\text{CaCl}_2$ em fundo de estômago de ratos em solução zero $\text{Ca}^{2+}$ pré-contraído por KCl a 60 mM

O carvacrol em meio a concentrações cumulativas de  $\text{Ca}^{2+}$  em solução  $0\text{Ca}^{2+}$ , induziu um relaxamento nas seguintes magnitudes: 0,5 mM 82% ( $17,19 \pm 3,145$ ), 1 mM 65% ( $34,79 \pm 6,465$ ), 2 mM 42% ( $57,77 \pm 10,13$ ), ( $p < 0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni).



**Figura 10** - Gráfico com valores médios das respostas à concentrações crescentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 – 2 mM) em tiras de fundo de estômago em preparações mantidas em meio a solução isente de  $\text{Ca}^{2+}$ .  $P < 0,05$  em relação aos grupos carvacrol n (7) e controle (7).

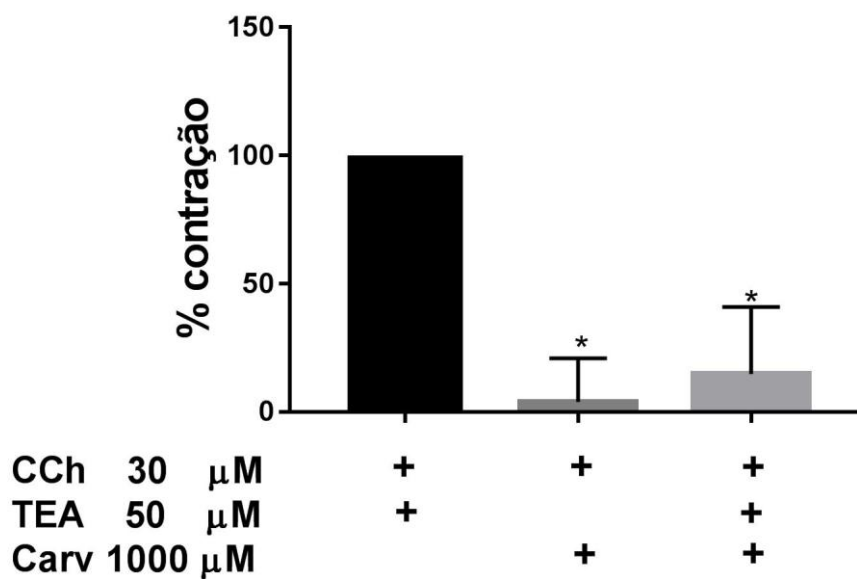
**9.4.4 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em fundo de estômago de ratos pré-incubadas com Nifedipina a 10 mM.**



**Figura 11** – Verificou-se que o carvacrol na concentração 1000  $\mu$ M, em contração sustentada por 30  $\mu$ M de CCh na presença de nifedipina promoveu um relaxamento de 29% ( $72 \pm 2,956$ ).

#### 9.4.5 Efeito do Carvacrol sobre as contrações tônicas induzidas por CCh em fundo de estômago de ratos pré-incubadas com Tetraetilamônio (TEA)

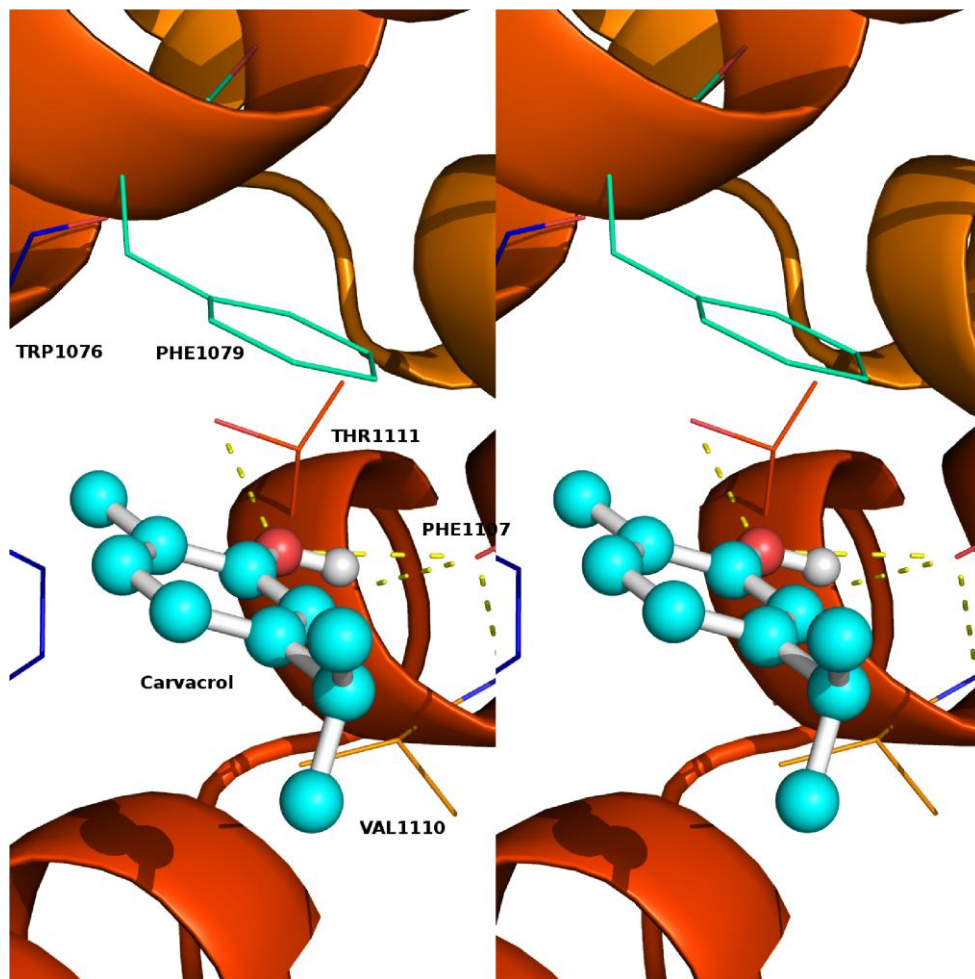
O carvacrol na concentração 1000  $\mu\text{M}$ , em contração sustentada por 30  $\mu\text{M}$  de CCh na presença do TEA promoveu uma inibição na contração de 14% ( $14,69 \pm 6,708$ ). Dados expressos em percentual da contração em resposta ao TEA 14% ( $14,69 \pm 6,708$ ) e pré-incubado por 10  $\mu\text{M}$  de CCh ( $n=15$ ), ( $p<0,05$ , Two way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni).



**Figura 12** - Gráfico com valores das respostas à concentração de carvacrol 1000 $\mu\text{M}$  na presença do TEA, bloqueador de canal de potássio em tiras de fundo de estômago.

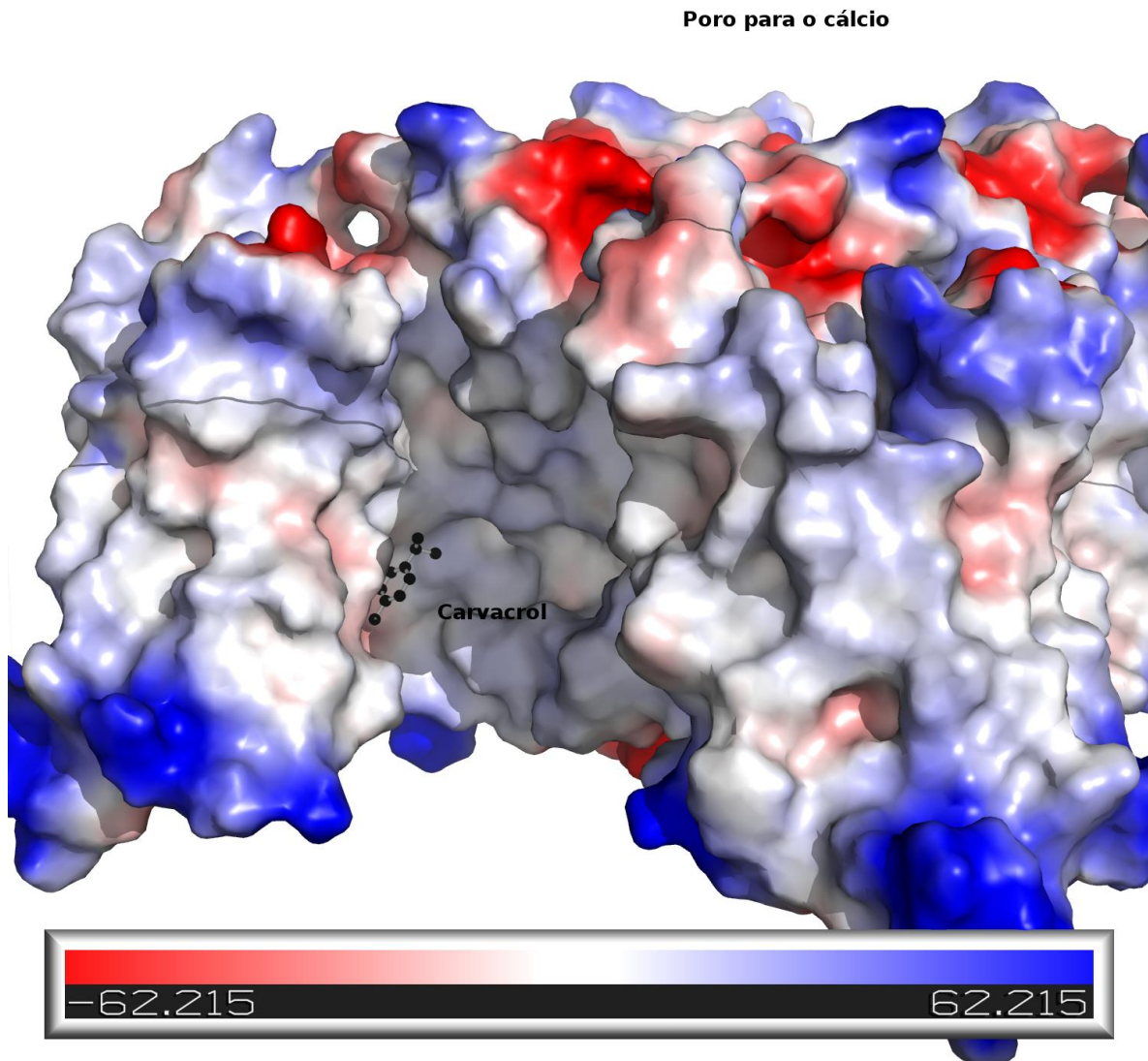
### 9.5 Sistema de dosagem entre a molécula de carvacrol e o VOCCs

O complexo proteína-ligante com carvacrol foi estavelmente colocado na mesma cavidade do VOCCs pelo Autodock 4.2. A Figura 13 mostra as interações do ligantes correspondentes ao carvacrol interagiram com 05 aminoácidos: PHE1107, VAL1110, THR1111, TRP1076 e PHE1079, com 02 pontes de hidrogênio com a PHE1107 e THR1111. Os resíduos PHE1107, VAL1110, TRP1076 e PHE1079 interagiram com o carvacrol através de forças hidrofóbicas. Já a THR1111 estabeleceu interação polar não carregada.



**Figura 13** – Modelos de ancoramento molecular das interações entre os VOCCs e o carvacrol.

É possível verificar que o carvacrol ocupa sitio de ligação distante do poro para a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , podendo-se sugerir que o carvacrol possa induzir um fechamento no canal sitio dirigido. Além disso, as energias de ligação do carvacrol foram negativas -6,7 kcal/mol, variando entre -6,1 e -7,0 kcal/mol entre 09 diferentes conformações, com constantes de inibição entre 7  $\mu\text{M}$  e 33  $\mu\text{M}$ .



**Figura 14** - Sitio de ligação do Carvacrol e entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 10 DISCUSSÃO

Aa plantas medicinais são ricas em metabólitos secundários dotados de atividade farmacológica, sendo uma importante ferramenta terapêutica para tratamento e prevenção de doenças. Dentre essas plantas medicinais encontra a *L. sidoides*, uma planta da família *Verbenaceae* rica em OEL monoterpênicos dentre eles o carvacrol.

*Lippia sidoides* é uma espécie típica de ervas do Nordeste do Brasil com uso generalizado em medicina popular. O principal constituinte do OEL de *L. sidoides* é o carvacrol. Vários estudos mostraram que o OEL e seu constituinte têm efeito farmacológicos, incluindo atividade antibacteriana, antiinflamatória, antioxidante, neuroprotetora e acaricida (SOARES et al., 2016; BARBOSA et al., 2017).

Os constituintes majoritários dos OELs, assim como de outras misturas complexas, a exemplo dos extratos podem exercer os mesmos efeitos da mistura como um todo, no entanto, é mais interessante estudar a substância isolada, uma vez que o facilita a determinação do mecanismo de ação, porem o sinergismo entre substância não pode ser descartado como possível mecanismo de ação (BAKKALI et al., 2008).

Este trabalho demonstrou, através de estudos farmacológicos, o potencial biológico da espécie *L. sidoides*, e de seu composto majoritário, carvacrol, indicando que esta planta e que este composto, podem virem a ser fonte de substâncias de interesse médico. A confirmação dessa observação reside no fato de que a avaliação farmacológica *in vitro* do OEL de *L. sidoides* e do carvacrol sobre preparações de tiras de fundo de estômago de ratos sugerem, pela primeira vez, atividade espasmolítica sobre esse órgão.

A habilidade de relaxar de diferentes tipos de músculos lisos em preparações de órgãos isolados vem sendo cada vez mais evidenciadas em trabalhos com OELs obtidos de espécies de *Lippia*. A *L. turbinata*, por exemplo, apresentou efeito gastroprotetor contra úlceras e entiespasmolítico em ratos (TOSO et al., 2007); a *L. graveolens*, reduziu a contratilidade da musculatura lisa de íleo de cobaia frente a contrações induzidas por histamina (HIS) e CCh (RIVERO et al., 2011); a *L. alba* promoveu relaxamento de artéria mesentérica de rato (MAYNARD et al., 2011); a *L. thymoides* induziu relaxamento em aorta de rato, útero de rata e traqueia de cobaia de maneira dependente da concentração (SILVA et al., 2016); a *L. microphylla* exibiu



atividade espasmolítica em íleo de cobaia (RODRIGUES et al., 2011); e a *L. dulcis* em brônquios de porco pré-contraídos tanto com HIS quanto com CCh, explicando, em parte, os relatos da utilização de *L. dulcis* na medicina popular para tratar inflamações e bronquite (GÖRNEMANN et al., 2008). Estudos realizados com OELs extraídos de plantas com uso popular e pertencentes ao gênero da *L. sidoides* costumam apresentar duas importantes características farmacológicas, as quais são compartilhadas pelo OELs: elevada eficácia como agente antiespasmódico e vasorelaxante; ausência ou baixa de toxicidade aguda (COELHO-DE-SOUZA; CRIDDLE; LEAL-CARDOSO, 1998; MAGALHÃES et al., 2008; PINHO-DA-SILVA et al., 2010).

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

Este trabalho demonstrou que o OEL *L. sidoides* e o carvacrol foram eficazes em inibir as contrações induzidas por agentes contracturantes sobre o músculo liso do fundo de estômago de ratos com eficácia farmacológica máxima para o OEL e submáxima para o carvacrol.

Diante desses achados neste trabalho sugerimos que o efeito do OEL pode ser atribuído aos seus constituintes químicos, particularmente ao composto majoritário, carvacrol. Esse composto constitui 66,7 % do OEL *L. sidoides* onde o mesmo demonstrou eficácia em promover relaxamento da musculatura lisa gástrica. Outra hipótese é que o efeito relaxante sobre a musculatura lisa do estômago, pode estar advindo do sinergismo entre o OEL e o carvacrol (OLIVEIRA, 2013).

No trabalho de Begrow e colaboradores (2010), os extratos da planta *Thymus vulgaris*, promoveu efeito relaxante das contrações induzidas por CCh, KCl e BaCl<sub>2</sub> em músculo liso, sendo esse efeito atribuído a estratos ricos em carvacrol.

O ponto de partida deste trabalho baseia-se em acreditar que o OEL e o carvacrol promovem o relaxamento do fundo de estômago pelo bloqueio dos

VOCCs. Nossos dados corroboram com os trabalhos feitos com outros monoterpenos em musculatura lisa (ALWAN et al., 2011; ARAÚJO et al., 2011).

Inicialmente observamos que a partir da concentração de 30 µg/mL comum as duas substâncias, o OEL e o carvacrol, mostrou promover um relaxamento diante do tecido pré-contraído por KCl a 60 mM e, a esta mesma concentração, quando induzidas por CCh a 30 µM as mesmas substâncias testes apresentaram um percentual de relaxamento menor.

Uma outra pesquisa realizada com íleo isolado de rato demonstrou que uma planta denominada *Croton argyrophyloides* rico em carvacrol demonstrou um efeito antiespasmódico, relacionando à capacidade desse constituinte majoritário inibir a contração do íleo, por, provavelmente bloquear o influxo de  $Ca^{2+}$  através da membrana na célula do músculo liso (LEONHARDT et al., 2010).

Em pesquisa realizada em órgão isolado de rato Porto (2010) sugeriu que os efeitos antiespasmódicos do *Croton argyrophyloideem* no íleo, veia porta e bexiga eram devido ao bloqueio de canais para  $Ca^{2+}$ . Corroborando com esses fatos, Pinho-Da-Silva (2010), mostrou que o relaxamento induzido pelo *Croton argyrophyloideem* em anéis de traquéia isolada de rato, em parte, pode ser explicado pelo bloqueio de canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem.

Com base nessas premissas e principalmente no fato de que há poucos relatos de estudos farmacológicos do OEL e de seu constituintes o carvacrol em músculo liso de estômago, foi decidido estudar a interação e o mecanismo de ação do OEL de *L. sidoides* e do carvacrol no fundo de estômago em modelo animal experimental, para o teste e possíveis descobertas de fármacos que possam atuar em diversos processos fisiopatológicos, a exemplo da diarreia, cólicas intestinais e constipação, ou que venham a servir de ferramentas farmacológicas nos estudos pré-clínicos de desenvolvimento de medicamentos espasmolíticos, aumentando com isso, a relevância do nosso trabalho.

No fundo de estômago de ratos, vários agentes contráteis, como os agonistas muscarínicos (CCh) por exemplo, (TRIGGLE et al., 1989) e o KCl (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976), causam uma resposta contrátil bifásica, consistindo em uma contração inicial transiente – componente fásico (< 30 s), seguido por uma contração sustentada – componente tônico, que se desenvolve lentamente ao longo de 15 minutos e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (TRIGGLE; TRIGGLE, 1976; VAN BREEMEN; AARONSON; LOUTZENHISER, 1978; BOLTON,

1979). Esta resposta bifásica é devido à fonte dual de  $\text{Ca}^{2+}$ , ou seja,  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no músculo liso. É sugerido que a contração fásica é causada por liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares mediados por IP3 (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), enquanto que a contração tônica é atribuída ao influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos VOCCs.

Nos experimentos realizados com o OEL para verificar uma possível atividade espasmolítica em fundo de estômago de ratos, comprovamos que este composto inibiu as contrações fásicas induzidas por KCl a 60 mM e por CCh conforme demonstrado nos gráficos 1 e 2. Ao compararmos os valores obtidos para o OEL, verificamos que este foi mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas por KCl a 60 mM do que por CCh em todas as concentrações do OEL respectivamente.

Nos experimentos realizados por Oliveira (2013) foi identificado que o carvacrol isolado seria um provável marcador químico do OEL LM-OE para a atividade espasmolítica em íleo de cobaia, e que provavelmente que o efeito antiespasmódico se dá através do bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos VOCCs corroborando com o nosso trabalho quando decidimos avaliar o efeito do carvacrol sobre o componente tônico das contrações induzidas por KCl e por CCh.

Então, em experimento realizado com o carvacrol foi possível observar que houve uma redução nas contrações fásicas induzidas por KCl a 60 mM e por CCh a 30  $\mu\text{M}$ . Porém, mas eficiente em relaxar as contrações induzidas por KCl do que CCh conforme gráficos 4 e 5.

O acoplamento farmacomecânico se baseia na abertura dos VOCCs (SOMLYO; SOMLYO, 1968) pela despolarização da membrana sarcoplasmática e consequente aumento da concentração de cálcio intracelular  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Como uma etapa muito frequentemente afetada pelas substâncias que bloqueiam este acoplamento é a abertura dos CCa, onde o OEL mostrou maior potência farmacológica sobre o acoplamento farmacomecânico sugerindo que ele é um bloqueador de VOCCs.

O OEL demonstrou ter menor ação farmacológica para o bloqueio da contração induzida pelo o CCh ao contrário do KCl a 60 mM como já demonstrado em um trabalho realizado por Madeira et al. (2002), onde o OEL demonstrou ser mais efetivo, assim, podemos observamos que esta substância não é mais potente em bloquear ROCCs do que VOCCS, e diante dos achados em nossos experimentos com o carvacrol acreditamos que o mesmo resultado se aplica para o carvacrol.

Para testar a hipótese da participação dos VOCCs na atividade espasmolítica do OEL e do carvacrol, foram realizadas curvas concentrações-resposta cumulativas ao  $\text{CaCl}_2$  em meio despolarizante nominalmente sem  $\text{Ca}^{2+}$  na ausência e na presença de diferentes concentrações do OEL e do carvacrol. Este protocolo baseia-se no fato de que a contração se dará, quase que exclusivamente, pelo  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pela elevada concentração dos níveis de  $[\text{K}^+]$  induz a abertura dos VOCCs (REMBOLD, 1996).

Observou-se no experimento realizado em meio zero  $\text{Ca}^{2+}$ , que a curva controle foi deslocada para direita de maneira não paralela e para cima em comparação a curva do OEL observando assim, uma redução da potência espasmolítica do  $\text{CaCl}_2$  conforme o gráfico 3. Da mesma forma em experimento realizado com o carvacrol observamos que o controle também deslocou a curva do gráfico para direita não paralela e para cima em comparação com a curva do carvacrol. Esses resultados confirmam a hipótese de que tanto o OEL quanto o carvacrol estejam agindo no bloqueio do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através dos VOCCs para exercer seus efeitos espasmolíticos em fundo de estômago de ratos.

Os VOCCs têm sido inicialmente classificados como sendo do tipo L, N, P/Q, R e T dependendo de várias propriedades eletrofisiológicas e farmacológicas (CATTERALL et al., 2005). Os VOCCs do tipo L tem sido chamados como  $\text{CaV}1.1 - 1.4$ , os do tipo N como  $\text{CaV}2.2$ , os do tipo P/Q como  $\text{CaV} 2.1$ , os do tipo R como  $\text{CaV}2.3$  que são insensíveis a di-hidropiridina (DHP) e ativados por alta voltagem; e os canais do tipo T  $\text{CaV}3.1 - 3.3$  que são canais ativados por baixa voltagem (ERTEL et al., 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

No músculo liso, os  $\text{CaV}1$  são melhores caracterizados e são os maiores responsáveis pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , cujo sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade  $\alpha 1$ , embora nele existam quatro outras subunidades complexadas ( $2 \alpha$ ,  $1 \beta$  e  $1 \gamma$ ) (VOGALIS; WARD; SANDERS, 1991; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Um dos VOCCs envolvidos com funções fisiológicas da contração do músculo liso é o  $\text{CaV}3.2$  ou  $\text{CaV-T}$  (SARSERO et al., 1998; CATTERALL et al., 2005), além dos canais que são mais expressos em fundo de estômago de ratos, que são os do tipo L ( $\text{CaV-L}$ ) (BOLTON, 1979), descritos por Catterall et al. (2005) como  $\text{CaV}1.2$ .

Neste trabalho não foi possível verificar qual o subtipo de canal envolvido em nossos achados tendo em vista que existem vários subtipos. Porém o estudo

realizado por Oliveira (2013) corrobora com a nossa hipótese de que seja o subtipo L tendo em vista que o autor encontrou resultados que colaboram com os nossos.

Ainda em experimento realizado com carvacrol foi utilizado nifedipina um bloqueador do afluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a despolarização das células do músculo liso e os resultados demonstraram um relaxamento por parte do carvacrol, entorno de 71% conforme demonstrado no gráfico 6. O tecido foi pré-contraído por CCh devido a mecanística de contração pelo CCh seguir uma ação farmacomecânica, onde a resposta é mediada por ativação de dois tipos de receptores muscarínico ( $M_2$  e  $M_3$ ) (GOYAL, 1988; LEVEY, 1993). A ativação desses receptores resulta em um aumento do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , um efeito mediado pelo inositol trifosfato que atua nas reservas internas de  $\text{Ca}^{2+}$  (CAULFIELD, 1993; EGLIN, HEGDE, WATSON, 1996). A diminuição da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula reduz a magnitude da contração (RANG et al., 2004). Sabendo que os CCa do tipo L podem ser bloqueados por concentrações de nifedipina (HILLE, 2001), e que em meio a concentrações elevadas de  $\text{K}^+$  esses canais são ativados, acreditamos que nosso resultado confirma que o carvacrol agi bloqueando os VOCCs e que o carvacrol mostrou-se mais potentes em inibir o acoplamento eletromecânico do que o farmacomecânico.

Para averiguar a existência da interação entre o carvacrol com os canais de potássio e sua ação relaxante do carvacrol sobre o músculo liso de fundo de estômago de ratos na presença de drogas bloqueadores para canais de potássio: TEA em tecido pré-contraído com CCh, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

Na adição do carvacrol em concentração correspondente a 1000  $\mu\text{M}$  a contração induzida por CCh 10  $\mu\text{M}$  foi inibida em torno de 90% conforme gráfico 7.

Os dados sugerem que a atividade espasmolítica do carvacrol não está relacionada à participação de canais para  $\text{K}^+$ . Portanto, mesmo que essas substâncias promovam a repolarização/hiperpolarização da fibra muscular, o carvacrol ainda tem a propriedade de relaxar o músculo liso do estômago de ratos.

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

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

Na docagem molecular que realizamos foi possível verificar a ligação do carvacrol no sítio ativo de VOCCs e que os resultados apontam para um bloqueio do canal referido conforme figuras 1, 2 e 3. A docagem molecular consiste em prever a conformação bioativa de uma micromolécula (ligante) no sítio de uma macromolécula seguida de avaliação e classificação do modo de ligação proposto (MOITESSIER et al., 2008). O acoplamento molecular prediz a conformação ideal do complexo proteína-ligante, neste caso é o VOCCs e os ligantes está representado pelo inibidor do canal que é o carvacrol. Com isso, é possível sugerir que o composto carvacrol em nosso trabalho se liga fortemente ao sítio ativo de VOCCs

De acordo com este trabalho podemos sugerir que o OEL e o carvacrol atuam de forma semelhante em diversos tipos de acoplamentos da contração do músculo liso.

Em conclusão, este estudo mostra que OEL de *L. sidoides* e o carvacrol bloquearam as correntes dos CaV-L. Este resultado pode contribuir para uma melhor compreensão da ação dos OELs e seus constituintes sobre a atividade elétrica das células musculares.

## 11 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o OELs e o carvacrol foram eficazes em inibir as contrações induzidas por agentes contracturantes sobre o músculo liso do fundo de estômago de ratos com eficácia farmacológica máxima para o OELs e submáxima para o carvacrol.

Sugerimos que o efeito do OELs pode ser atribuído aos seus constituintes químicos, particularmente ao composto majoritários: carvacrol. Outra hipótese é que o efeito miorelaxante sobre a musculatura lisa do estomago, pode estar advindo do sinergismo entre o óleo e o carvacrol conforme trabalho já existente.

Acreditamos que o OELs e o carvacrol promovem o relaxamento do fundo de estômago pelo bloqueio dos canais de cálcio operado por voltagens. Nossos dados corroboram com vários trabalhos já publicados com outros monoterpenos em musculatura lisa.

O OELs é mais potente em bloquear os canais operados por voltagem – VOCCs do que os canais operados por receptor – ROCCs, e diante dos achados em nossos experimentos com o carvacrol acreditamos que o mesmo resultado se aplica ao carvacrol.

Não foi possível verificar qual o subtipo de canal envolvido em nossos achados, porém o estudo realizado por Oliveira (2013) corrobora com a nossa hipótese de que seja o subtipo L tendo em vista que o autor encontrou resultados semelhantes aos nossos.

O OELs e seu componente isolado diminui a contratilidade de tecidos de fundo de estômago de ratos deflagrada por acoplamento eletromecânico KCl e farmacomecânico (CCh) porém mais efetivo no primeiro.

O efeito espasmolítico observado para o OELs e para o carvacrol não envolve a ativação dos canais de potássio.

O carvedilol se liga ao sítio ativo de VOCCs e com isso bloqueia os canais de cálcio operados por voltagem.



➤ **REFERENCIAS – Está de acordo com as normas da UFC**

- ABDEL-LATIF, A.A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sci**, 45(9):757-786, 1989.
- ABDON, A.P.V. et al. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on mice. **Braz J Med Biol Res**, 35(10):1215-1219, 2002.
- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2001. 455 p.
- AGÊNCIA BRASIL. **Política de fitoterápicos faz 10 anos com 12 plantas na lista de essenciais**. Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2016-06/politica-de-fitoterapicos-faz-10-anos-com-12-plantas-na-lista-de-essenciais>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- AIRES, M.M. **Fisiologia**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ALBUQUERQUE, C.C. et al. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis Schauer*. **Braz Arch Biol Technol**, 49(4):527-535, 2006.
- ALEXANDER, S.P.H.; MATHIE, A.; PETERS, J.A. Guide to Receptors and Channels, 2nd edition (2007 Revision). **Br J Pharmacol**, 150(Suppl. 1):S1-S168, 2007.
- ALLEN, B.G.; WALSH, M.P. The biochemical basis of the regulation of smoothmuscle contraction. **Trends Biochem Sci**, 19(9):362-368, 1994.
- AMANLOU, M. et al. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica Jamzad* extract. **J Pharm Pharm Sci**, 8(1):102-106, 2005.
- ANDERSEN, A. Final report on the safety assessment of sodium p-chloro-m-cresol, p-chloro-m-cresol, chlorothymol, mixed cresols, m-cresol, o-cresol, p-cresol, isopropyl cresols, thymol, o-cymen-5-ol, and carvacrol. **Int J Toxicol**, 25(Suppl 1):29-127, 2006.
- ARIGESAVAN, K.; SUDHANDIRAN, G. Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. **Biochem Biophys Res Commun**, 461(2):314-320, 2015.
- AZIZI, Z. et al. Cognitive-enhancing activity of thymol and carvacrol in two rat models of dementia. **Behav Pharmacol**, 23(3):241-249, 2012.
- BAI, Y.; SANDERSON, M.J. Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP3 receptor. **Respir Res**, 7(34):1-20, 2006.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46(2):446-475, 2008.

BARBOSA, R. *et al.* Effects of *Lippia sidoides* essential oil, thymol, p-cymene, myrcene and caryophyllene on rat sciatic nerve excitability. **Braz J Med Biol Res**, 50(12):e6351, 2017.

BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. **Chemistry of Essential Oils**. In: Berger R. G. Ed, Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprospecting and Sustainability. Heidelberg: Springer, 2007. 43-86 p.

BEGROW, F. *et al.* Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. **Planta Méd**, 76(4):311-318, 2010.

BERNE, R.M. *et al.* **Fisiologia**. 6. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BERRIDGE, M.J.; GALIONE, A. Cytosolic calcium oscillators. **FASEB J**, 2(15):3074-3082, 1988.

BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signaling. **Nature**, 361(6410):315-325, 1993.

BERSTEIN, G. *et al.* Phospholipase C- $\beta$ 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. **Cell**, 70(3):411-418, 1992.

BILLINGTON, C.K.; PENN, R.B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respir Res**, 4(1):1-23, 2003.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quím Nova**, São Paulo, 32(3):588-594, 2009.

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

BLAUSTEIN, M.P. *et al.* Organization of  $Ca^{2+}$  stores in vascular smooth muscle: functional implications. **Novartis Found Symp**, 246:125-137, 2002.

BOLTON, T.B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiol Rev**, 59(3):606-718, 1979.

BOSKABADY, M.H.; JAFARI, Z.; POURABOLI, I. The effect of carvacrol on muscarinic receptors of guinea-pig tracheal chains. **Phytother Res**, 25(4):530-535, 2011.

BOSKABADY, M.H.; JANDAGHI, P. Relaxant effects of carvacrol on guinea pig tracheal chains and its possible mechanisms. **Pharmazie**, 58(9):661-663, 2003.

BOTELHO, M.A. *et al.* Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**, 40(3):349-356, 2007.

BRASIL. **PORTARIA Nº 2.001, DE 3 DE AGOSTO DE 2017.** Altera a Portaria nº 1.555/GM/MS, de 30 de julho de 2013, que dispõe sobre as normas de financiamento e execução do Componente Básico da Assistência Farmacêutica no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério da Saúde, Gabinete do Ministro, Brasília, DF, 3 agosto de 2017. Encontrado em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt2001\\_15\\_08\\_2017.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prt2001_15_08_2017.html). Acesso em: 10 jan. 2018.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JUNIOR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, 78(1):98-106, 2008.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F. *et al.* Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Vet Parasitol**, 148(3-4):288-294, 2007.

CARVALHO, A.F. *et al.* Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98(4):569-571, 2003.

CARVALHO, R.R.C. *et al.* *In vitro* activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. **Quím Nova**, São Paulo, 36(2):241-244, 2013.

CATTERALL, W.A. *et al.* International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacol Rev**, 57(4):411-425, 2005.

CAULFIELD, M.P. Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. **Pharmacol Ther**, 58:319-379, 1993.

CAVALCANTI, S.C. *et al.* Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresour Technol**, 101(2):829-832, 2010.

CAVALCANTI, E.S.B. *et al.* Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99(5):541-544, 2004.

CHAVAN, P.S.; TUPE, S.G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, 46:115-120, 2014.

CHIU, Y.J. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both *In Vitro* and *In Vivo*. **Evid Based Complement Alternat Med**, vol. 2012, Article ID 508137, 11 pages, 2012.

COELHO-DE-SOUZA, A.N.; CRIDDLE, D.N.; LEAL-CARDOSO, J.H. Selective modulatory effects of the essential oil of *Croton zehntneri* on isolated smooth muscle preparations of the guinea-pig. **Phytother Res**, 12(3):189-194, 1998.

COLAVITTI, F. **Um mercado incipiente. Como o Brasil começa a regularizar e expandir a "farmácia verde"**. Galileu, 2002. Disponível em: <http://galileu.globo.com/edic/129/rdossie5.htm>. Acesso em: 16 nov. 2017.

COSTA, A.G. **Desenvolvimento vegetativo, rendimento e composição do óleo essencial de Patchouli após a adubação nitrogenada**. 2008. 92p. Dissertação (Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COSTA, P.C. *et al.* Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia sensu lato* (Verbenaceae). **Hoehnea**, 44(2):158-171, 2017.

CRAVEIRO, A.A. *et al.* **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza, CE: Edições UFC, 1981.

CUTHBERT, N.J. *et al.* Roles of Ca<sup>2+</sup> influx and intracellular Ca<sup>2+</sup> release in agonist-induced contractions in guinea pig trachea. **Am J Physiol**, 266(6 Pt 1):L620-627, 1994.

DAMASCENO, E.I.T. *et al.* Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis Schauer*, Verbenaceae. **Rev Bras Farmac**, 21(1):78-85, 2011.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol**, 88:308-316, 2000.

EGLIN, R.M., HEGDE, S.S., WATSON, N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. **Pharmacol Rev**, 48:531-565, 1996.

ERTEL, E.A. *et al.* Nomenclature of voltage-gated calcium channels. **Neuron**, 25(3):533-5, 2000.

FLYNN, E. R. *et al.* Functionally separate intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in smooth muscle. **J Biol Chem**, 276(39):36411-36418, 2001.

FONTENELLE, R.O.S. **Efeito antifúngico de óleos essenciais de *Lippia sidoides Cham.*, *Croton argyrophyloides Muell.*, *Croton zehntneri Pax et Hoffm.*, *Croton nepetaefolius Baill.* e de seus principais constituintes contra dermatófitos e *Candida spp.* isolados de cães**. 2008. 150 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UECE, Fortaleza, 2008.

FONTENELLE, R.O. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides Cham.* **J Antimicrob Chemother**, 59(5):934-940, 2007.

GIRÃO, V.C.C. *et al.* A clinical trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides Cham* essential oil in dogs with mild gingival disease. **Prev Vet Med**, 59(1):95-192, 2007.

GIWELI, A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in *Libya*. **Molecules**, 17(5):4836-4850, 2012.

GOMES, S.V.F. **Desenvolvimento de método por cromatografia líquida de alta eficiência para diferenciação de genótipos de *Lippia gracilis Schauer***. 2009. 163 f. Dissertação (Mestrado em Química). Núcleo de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis Schauer*. **Eclet Quím**, São Paulo, 36(1):64-77, 2011.

GONÇALVES, J.C. *et al.* Distinct effects of carvone analogues on the isolated nerve of rats. **Eur J Pharmacol**, 645(1-3):108-112, 2010.

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

GOYAL, R.K. Identification, isolation and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. **Life Sci**, 43:2209-2220, 1988.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, 27(1):1-93, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAESELER, G. *et al.* Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. **Eur J Anaesthesiol**, 19(8):571-579, 2002.

HEDIN, K.E.; DUERSON, K.; CLAPHAM, D.E. Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. **Cell Signal**, 5(5):505-518, 1993.

HILLE, B. **Ion channels of excitable membranes**. 3ª edição. Sunderland: Sinauer Associates, 2001.

HONDA, K.; TOMITA, T. Electrical activity in isolated human tracheal muscle. **Jpn J Physiol**, 37(2):333-336, 1987.

HOTTA, M. *et al.* Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. **J Lipid Res**, 51(1):132-139, 2010.

HUBINONT, C.; DEBIEVE, F. Prevention of Preterm Labour: 2011 Update on Tocolysis. **J Pregnancy**, vol. 2011, Article ID 941057, 5 pages, 2011.

KARPANEN, T.J. *et al.* Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. **J Antimicrob Chemother**, 62(5):1031-1036, 2008.

KNOT, H.T.; BRAYDEN, E.J.; NELSON, M.T. **Calcium channels and potassium channels**. In BÁRÁNY, M. Biochemistry of smooth muscle contraction. San Diego, Academic Press, 1996. 203-219 p.

KOBAYASHI, S. *et al.* Cytosolic heparin inhibits muscarinic and alpha-adrenergic Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **J Biol Chem**, 264(30):17997-18004, 1989.

KOTLIKOFF, M.I.; KUME, H.; TOMASIC, M. Muscarinic regulation of membrane ion channels in airway smooth muscle cells. **Biochem Pharmacol**, 43(1):5-10, 1992.

LACOSTE, E. *et al.* Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides Cham.* Application to the cutaneous microflora. **Ann Pharm Fr**, 54(5):228-230, 1996.

LANDA, P. *et al.* In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. **Arch Pharm Res**, 32(1):75-78, 2009.

LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. **An Ac Bras Cienc**, 71(2):207-213, 1999.

LEE, S. *et al.* Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. **Food Chem**, 91:131-137, 2005.

LEMOS, T.L.G. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil of Brazilian plants. **Phytother Res**, 4(2):82-84, 1990.

LEONHARDT, V. *et al.* Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent  $\beta$ -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundam Clin Pharmacol**, 24(6):749-758, 2010.

LEVEY, A.I. Immunological localization of M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissue and brain. **Life Sci**, 52:441-448, 1993.

LOGOTHETIS, D.E. *et al.* The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart. **Nature**, 325(6102):321-326, 1987.

LÓPEZ, C.A.A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais**. Universidade Estadual de Roraima – UERR. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, 1(1):19-27, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LU, Y.; WU, C. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. **J Food Prot**, 73(12):2270-2275, 2010.

MADEIRA, S.V. *et al.* Relaxant effects of the essential oil of *Ocimum gratissimum* on isolated ileum of the guinea pig. **J Ethnopharmacol**, 81(1):1-4, 2002.

MAGALHÃES, P.J. *et al.* Vasorelaxation induced by the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents in rat aorta are partially mediated by the endothelium. **Fundam Clin Pharmacol**, 22(2):169-77, 2008.

MAGYAR, J. *et al.* Effects of terpenoid phenol derivatives on calcium current in canine and human ventricular cardiomyocytes. **Eur J Pharmacol**, 487(1-3):29-36, 2004.

MAGYAR, J. *et al.* Effects of thymol on calcium and potassium currents in canine and human ventricular cardiomyocytes. **Br J Pharmacol**, 136(2):330-338, 2002.

MATOS, F.J.A. **Farmácias vivas**. 4 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2002. 267p.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Rev Bras Farm**, 79(3/4):84-87, 1998.

MCFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **Br J Pharmacol**, 135(1):1-13, 2002.

MAYNARD, L.G. *et al.* Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian J Pharmacol**, 43(6):694-698, 2011.

MENDES, S.S. *et al.* Evolution of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **J Ethnopharmacol**, 129(3):391-397, 2010.

MIKOSHIBA, K. Inositol 1,4,5 triphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor. **Folia Pharmacol Jap**, 121(4):241-253, 2003.

MOITESSIER, N. *et al.* Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. **Br J Pharmacol**, 153(Suppl 1):S7-S26, 2008.

MONTEIRO, M.V. *et al.* Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **J Ethnopharmacol**, 111(2):378-382, 2007.

MORAIS, S.M. *et al.* Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Quím. Nova**, São Paulo, 29(5):907-910, 2006b.

MORAIS, S.M. *et al.* Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **J Am Mosq Control Assoc**, 22(1):161-164, 2006a.

NG, L.C. *et al.* Role of InsP3 and ryanodine receptors in the activation of capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry by store depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. **Br J Pharmacol**, 152(1):101-111, 2007.

NOSTRO, A. *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J Med Microbiol**, 56(Pt 4):519-523, 2007.

OLIVEIRA, D.R. *et al.* Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **J Ethnopharmacol**, 108(1):103-108, 2006.

OLIVEIRA, G.A. **A ação espasmolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. e de seus constituintes majoritários envolve o bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia.** 114 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

PASCUAL, M.E. *et al.* *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J Ethnopharmacol**, 76(3):201-214, 2001.

PEIXOTO-NEVES, D. *et al.* Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundam Clin Pharmacol**, 24(3):341-350, 2010.

PINHO, L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Cienc Rural**, 42(2):326-331, 2012.

PINHO-DA-SILVA, L. *et al.* *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**, 17(10):721-725, 2010.

PORTO, R.S. **Ação do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* muell. Arg. e de um dos seus constituintes o  $\beta$ -cariofileno em músculo liso fásico de rato.** 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UECE, Fortaleza, 2010.

RANG, H.P. *et al.* **Farmacologia.** 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

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

RIVERO-CRUZ, I. *et al.* Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. **J Food Sci**, 76(2):C309-317, 2011.

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



ROUX, E. *et al.* [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations induced by muscarinic stimulation in airway smooth muscle cells: receptor subtypes and correlation with the mechanical activity. **Br J Pharmacol**, 120(7):1294-1301, 1997.

ROUX, E.; MARHL, M. Role of sarcoplasmic reticulum and mitochondria in Ca<sup>2+</sup> removal in airway myocytes. **Biophys J**, 86(4):2583-2595, 2004.

RUEDA, A.; GARCÍA, L.; GUERRERO-HERNÁNDEZ, A. Luminal Ca<sup>2+</sup> and the activity of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pumps modulate histamine-induced  $\alpha$ -ornone Ca<sup>2+</sup> release in smooth muscle cells. **Cell Signal**, 14(6):517-527, 2002.

RUSSEL, J.A. Tracheal smooth muscle. **Clin Chest Med**, 7(2):189-200, 1986.

SALIMENA, F.R.G.E.; MÚLGURA, M.E. Notas taxonômicas em *Verbenaceae* do Brasil. **Rodriguésia**, 66(1):191-197, 2015.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **Int J Food Microbiol**, 192:72-76, 2015.

SANTOS, M.M.; NUNES, M.G.S.; MARTINS, R.D. Uso empírico de plantas medicinais para tratamento de diabetes. **Rev Bras Plantas Med**, 14(2):327-334, 2012.

SARSERO, D. *et al.* Human vascular to cardiac tissue selectivity of l- and t-type calcium channel antagonists. **Br J Pharmacol**, 125(1):109-119, 1998.

SILVA, F.S. *et al.* Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharm Biol**, 54(1):25-34, 2016.

SILVA, W.J. *et al.* Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresour Technol**, 99(8):3251-3255, 2008.

SILVA, V.A. *et al.* Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras Plantas Med**, 12(4):452-455, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 467-95.

SOARES, A.M.S. *et al.* Assessment of different *Lippia sidoides* genotypes regarding their acaricidal activity against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev Bras Parasitol Vet**, 25(4):401-406, 2016.

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

SOMLYO, A.V.; SOMLYO, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, 159(1):129-145, 1968

SOUZA, F.V. *et al.* (-)-Carvone: antispasmodic effect and mode of action. **Fitoterapia**, 85:20-24, 2013.

SOUZA, M.P.; MATOS, A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC, 1991.

SWEENEY, M. *et al.* Role of capacitative  $Ca^{2+}$  entry in bronchial contraction and remodeling. **J Appl Physiol** (1985), 92(4):1594-1602, 2002.

SZENTANDRÁSSY, N. *et al.* Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. **BMC Pharmacol**, 3(9):1-8, 2003.

SZENTESI, P. *et al.* Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. **Biophys J**, 86(3):1436-1453, 2004.

TEÓFILO, T.M.N.G. **Efeito antiespasmódico do óleo essencial da *Lippia sidoides Cham.* e seus constituintes, timol, para-cimeno e beta-cariofileno, sobre o músculo liso traqueal de ratos**. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, UECE, Fortaleza, 2012.

THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. **Lumb & Jone's veterinary anesthesia**. 3<sup>o</sup> edição. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 928p.

TOSO, R.E. *et al.* Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica. **InVet**, 9(1):145-151, 2007.

TRAVASSOS, R.A. **ENVOLVIMENTO DE CANAIS PARA POTÁSSIO E DE NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS NO MECANISMO DE AÇÃO Tocolítico DO ÁCIDO 8(17),12E,14-LABDATRIENO-18-ÓICO (LABDANO-302) EM ÚTERO ISOLADO DE RATA**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UFPB, João Pessoa, 2010.

TRIGGLE, C.R.; TRIGGLE, D.J. An analysis of the action of cations of the lanthanide series on the mechanical responses of guinea-pig ileal longitudinal muscle. **J Physiol**, 254(1):39-54, 1976.

TRIGGLE, D.J. *et al.* Calcium channels in smooth muscle. **Ann N Y Acad Sci**, 560:215-229, 1989.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Cienc Farm**, 42(2):289-306, 2006.

VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. **Pharmacol Rev**, 30(2):167-208, 1978.

VOGALIS, F.; WARD, S.M.; SANDERS, K.M. Correlation between electrical and morphological properties of canine pyloric circular muscle. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 260(3):390-398, 1991.

WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Adv Physiol Educ**, 27(4):201-206, 2003.

ZHUGE, R. *et al.* Ca<sup>2+</sup> sparks act as potent regulators of excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. **J Biol Chem**, 15(3):2203-2210, 2010.



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito antiespasmolítico do óleo essencial de *Lippia sidoides* e do carvacrol no músculo liso de fundo de estômago de rato: investigação da participação dos canais de cálcio operado por voltagens", protocolada sob o CEUA nº 2928040518 (ID 000626), sob a responsabilidade de **Emmanuel Prata Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/11/2018.

We certify that the proposal "Antispasmodic effect of *Lippia sidoides* essential oil and carvacrol on rat stomach floor smooth muscle: investigation of the participation of calcium channels operated by voltages", utilizing 84 Heterogenic rats (84 males), protocol number CEUA 2928040518 (ID 000626), under the responsibility of **Emmanuel Prata Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 11/20/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [10/2018](#) a [10/2020](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [6 a 8 semanas](#)

N: [84](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [150 a 250 g](#)

Local do experimento: A manutenção e alojamento dos animais serão realizadas no Laboratório de Fisiofarmacologia Gastrointestinal - LEFFAG. O protocolo experimental será realizado em salas de experimentação adequadas para o manuseio de animais, sem ruídos e devidamente higienizadas, mantendo as condições de temperatura e ciclo claro/escuro anteriormente descritos. A eutanásia será executada em sala separada, isolada do ambiente de alojamento dos animais, impedindo a passagem de ruídos e odores provenientes da referida sala.

Fortaleza, 31 de janeiro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará