



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA



CÍCERO ANDRÉ FERREIRA MACÊDO

ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DE *Lippia*
(VERBENACEAE) INDUZEM EFEITOS TOCOLÍTICO *IN*
***VITRO* E ANTIDISMENORREICO *IN VIVO* EM ROEDORES**

CÍCERO ANDRÉ FERREIRA MACÊDO

**ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DE *Lippia*
(VERBENACEAE) INDUZEM EFEITOS Tocolítico *IN*
VITRO E ANTIDISMENORREICO *IN VIVO* EM ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Souza Silva

Feira de Santana – BA

2024

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

M12o Macêdo, Cicero André Ferreira
Óleos essenciais obtidos de espécies de *Lippia* (Verbenaceae) induzem efeitos tocolítico in vitro e antidismenorreico in vivo em roedores / Cicero André Ferreira Macêdo. – 2024.
103 f.: il.

Orientador: Fabrício Souza Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2024.

1. Planta medicinal. 2. *Lippia isignis Moldenke* (Verbenaceae). 3. *Lippia lasiocalycina Cham* (Verbenaceae). 4. Dismenorreia. 5. Tocolítica. I. Título. II. Silva, Fabrício Souza, orient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana.

CDU 582.949.1

CÍCERO ANDRÉ FERREIRA MACÊDO

“Óleos essenciais obtidos de espécies de *Lippia* (Verbenaceae) induzem efeitos tocolítico *in vitro* e antidismenorreico *in vivo* em roedores”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 24 de julho de 2024.

Documento assinado digitalmente



FABRÍCIO SOUZA SILVA
Data: 24/07/2024 13:03:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador: Prof. Dr. **Fabício Souza Silva**

Universidade Federal do Vale do São Francisco

Documento assinado digitalmente



BRUNO SILVA ANDRADE
Data: 25/07/2024 12:05:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Bruno Silva Andrade**

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Documento assinado digitalmente



ROSIMEIRE FERREIRA DOS SANTOS
Data: 26/07/2024 09:22:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^ª. Dr^ª. **Rosimeire Ferreira dos Santos**

Universidade Federal do Piauí

Documento assinado digitalmente



EDIGÊNIA CAVALCANTE DA CRUZ ARAÚJO
Data: 27/07/2024 12:40:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^ª. Dr^ª. **Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo**

Universidade Federal do Vale do São Francisco

Documento assinado digitalmente



RITA DE CÁSSIA MENESES OLIVEIRA
Data: 06/08/2024 12:26:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^ª. Dr^ª. **Rita de Cássia Meneses Oliveira**

Universidade do Estado da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me proporcionar essa conquista, uma etapa extremamente importante concluída em minha vida. À família e amigos pelo apoio e amor incondicional. Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Fabricio Souza Silva, pela oportunidade, por abrir as portas do LAFEX, pela orientação e apoio, um exemplo de dedicação na jornada científica. A UEFS por me proporcionar a oportunidade da pós-graduação, a Alberto (secretário do Programa de Biotecnologia) pela atenção e dúvidas esclarecidas. A UNIVASF por toda estrutura disponibilizada para realização deste estudo. A equipe do LAFEX, em especial a Tiago, Mariana, Pedro Modesto, Jennifer, pelo apoio nos experimentos, compartilhamento de momentos difíceis, mas também pelas risadas que ajudaram bastante nos dias de desespero. A Victoria e a Natalia, da CAFMA, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar nos experimentos, além de compartilhar momentos de alegria e crescimento pessoal. Ao LAPON em especial a professora Angélica Maria Lucchese pelo o fornecimento as espécies e extração dos óleos, muito obrigada pela parceria. Ao professor Luciano, o grande responsável pela a estatística, ele que é referência nessa área, um profissional incrível, grande exemplo a ser seguido na jornada acadêmica, tenho certeza que foram fundamentais para o sucesso do nosso trabalho. A professora Fernanda pela ajuda com a análise dos dados, gratidão. John, do Biotério, por toda ajuda e paciência na disponibilidade dos animais. Aos membros da banca (Bruno Silva Andrade, Edigênia Cavalcante da Cruz Araújo, Rosimeire Ferreira dos Santos e Rita de Cássia Meneses Oliveira) pelas correções e contribuições para a melhoria do trabalho. A todos, o meu eterno agradecimento! O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

O alívio da dor relacionada a espasmos musculares seja por problemas gastrointestinais ou do sistema reprodutor feminino, é uma preocupação constante. As plantas têm se destacado como fontes importantes para tratar condições como cólicas uterinas e intestinais, que estão associadas a uma regulação anormal da contratilidade do músculo liso. O objetivo deste estudo foi investigar o potencial farmacológico das espécies *Lippia isignis* Moldenke e *Lippia lasiocalycina* Cham na musculatura lisa uterina, encontradas na Caatinga. Foram realizadas análises químicas dos óleos, teste toxicológico de dose aguda, neurotóxica e sedativa, além de análises farmacológicas envolvendo atividade espasmolítica e antidismenorreica. Os resultados mostraram a presença destacada de timol e γ -terpineno em *L. insignis* (LIO) e Eocimenona e β -mirceno em *L. lasiocalycina* (LLO). Os óleos essenciais não apresentaram toxicidade ou danos ao sistema nervoso central dos animais estudados. Os dados indicam que LIO e LLO têm atividade espasmolítica, reduzindo significativamente as contrações musculares. No modelo *in vivo* de dismenorreia, o tratamento oral com LIO (10 mg/kg) associado a nifedipino (0,7 mg/kg) ou ácido mefenâmico (9 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções abdominais. Já O LLO (10 mg/kg) associado com nifedipino (0,7 mg/kg), escopolamina (0,35 mg/kg) e ácido mefenâmico (9 mg/kg) promoveu uma redução significativa nas contorções abdominais dos animais. Portanto, este estudo sugere que os óleos essenciais das espécies quando associado aos medicamentos padrões em dose subterapêutica potencializa o efeito terapêutico reduzindo os efeitos colaterais, sendo eficaz no tratamento da dismenorreia primária e apoiando o uso popular dessas plantas para tratar cólicas.

Palavras-chave: Útero. Tocolítica. Planta medicinal. Dismenorreia.

ABSTRACT

Pain relief related to muscle spasms, whether due to gastrointestinal problems or the female reproductive system, is a constant concern. Plants have emerged as important sources for treating conditions such as uterine and intestinal cramps, which are associated with abnormal regulation of smooth muscle contractility. The aim of this study was to investigate the pharmacological potential of the species *Lippia insignis* Moldenke and *Lippia lasiocalycina* Cham. in uterine smooth muscle, found in the Caatinga. Chemical analyses of the oils, acute dose toxicological, neurotoxic and sedative tests, as well as pharmacological analyses involving spasmolytic and antidysmenorrheal activity were performed. The results showed the prominent presence of thymol and γ -terpinene in *L. insignis* (LIO) and E-ocimene and β -myrcene in *L. lasiocalycina* (LLO). The essential oils did not present toxicity or damage to the central nervous system of the animals studied. The data indicate that LIO and LLO have spasmolytic activity, significantly reducing muscle contractions. In the *in vivo* model of dysmenorrhea, oral treatment with LIO (10 mg/kg) associated with nifedipine (0.7 mg/kg) or mefenamic acid (9 mg/kg) significantly reduced the number of abdominal contortions. LLO (10 mg/kg) associated with nifedipine (0.7 mg/kg), scopolamine (0.35 mg/kg) and mefenamic acid (9 mg/kg) promoted a significant reduction in abdominal contortions in the animals. Therefore, this study suggests that the essential oils of the species, when associated with standard medications at a subtherapeutic dose, enhance the therapeutic effect by reducing side effects, being effective in the treatment of primary dysmenorrhea and supporting the popular use of these plants to treat colic.

Keywords: Uterus. Tocolitica. Medicinal plants. Dysmenorrhea.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Efeito da administração oral do LIO (10, 30 e 100 mg/kg) na coordenação motora de camundongos.....	34
Figura 2 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) nas contrações isolada do útero espontâneas (BASAL) ou pré-contraídas com carbacol (CCh, 1µM), ocitocina (OCT, 10 ⁻² UI/mL) ou cloreto de potássio (KCl, 60 mM).....	36
Figura 3 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por carbacol 1µM na presença ou na ausência de bloqueadores dos canais de potássio.....	37
Figura 4 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por 1µM de carbacol na presença ou ausência de antagonistas adrenérgicos.....	38
Figura 5 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por 1µM de carbacol na presença ou ausência de inibidores da via NO/GCS/GMPC/PKG.....	39
Figura 6 - Efeito do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) na mobilização de Ca ²⁺ do útero isolado.....	40
Figura 7 - Efeito inibitório do óleo essencial de <i>L. insignis</i> (LIO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina.....	41

CAPITULO 2

Figura 1 - Efeito do óleo essencial de <i>L. lasiocalycinas</i> (LLO) sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental da barra giratória.....	71
Figura 2 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. lasiocalycina</i> (LLO) nas contrações isoladas do útero pré-contraídas com carbacol (CCh), ocitocina (OCT) ou cloreto de potássio (KCl).....	72
Figura 3 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. lasiocalycina</i> (LLO) nas contrações isoladas do útero induzidas por carbacol 1 µM na presença ou na ausência de bloqueadores dos canais de potássio.....	73

Figura 4 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. lasilocalycina</i> (LLO) nas contrações isolada do útero induzidas por 1µM de carbacol na presença ou ausência de antagonistas adrenérgicos.....	74
Figura 5 - Efeito relaxante do óleo essencial de <i>L. lasilocalycina</i> (LLO) nas contrações isoladas do útero induzidas por 1 µM de carbacol na presença ou ausência de inibidores da via NO/GCS/GMPC/PKG.....	75
Figura 6 - Efeito do óleo essencial de <i>L. lasilocalycina</i> (LLO) na mobilização de Ca ²⁺ nas contrações isolado do útero.....	76
Figura 7 - Efeito inibitório do óleo essencial de <i>L. lasilocalycina</i> (LLO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina.....	77
Figura 8 - Efeito inibitório do óleo essencial de <i>L. lasilocalycina</i> (LLO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina.....	78

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

01- Composição do óleo essencial de <i>L. insignis</i> por CG-EM.....	32
02-Efeito do óleo essencial de <i>L. insignis</i> sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental do campo aberto.....	35

CAPITULO 2

01- Composição do óleo essencial de <i>L. lasiocalycina</i> por CG-EM.....	69
02-Efeito do óleo essencial de <i>L. lasiocalycina</i> sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental do campo aberto.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM	Micromolar (10^{-6} mol/L)
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração de Ca^{2+} intracelular livre
ANOVA	Análise de variância
$[\text{Ca}^{2+}]$	Concentração de íons Cálcio
CaM	Calmodulina
Cav	Canais para cálcio dependentes de voltagem
CE_{50}	Concentração de uma substância que produz 50% do seu efeito máximo
SEM	Erro padrão da média
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPCRs	Receptores acoplados a proteína G
GTP	Trisfosfato de guanosina
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptor para IP ₃
LIO	Óleo essencial de <i>Lippia insignis</i>
LLO	Óleo essencial de <i>Lippia lasiocalycina</i>
MB	Azul de metileno
MLC	Cadeia leve da miosina
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina
mM	Milimolar (10^{-3} mol/L)
n°	Número de experimentos realizados em cada protocolo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVO	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.1.1 Objetivo específicos.....	23
CAPÍTULO 1	24
RESUMO	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 <i>Material vegetal</i>	27
2.2 <i>Extração do óleo essencial</i>	27
2.3 <i>Animais</i>	28
2.4 <i>Estudos de toxicidade aguda</i>	28
2.5 <i>Teste do campo aberto</i>	28
2.6 <i>Teste da barra giratória (ROTA-ROD)</i>	29
2.7 <i>Preparação de tecido</i>	29
2.8 <i>Atividade espasmolítica em útero isolado de rata</i>	30
2.9 <i>Análise do mecanismo de ação</i>	30
2.10 <i>Efeito do LIO na contorção abdominal de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária</i>	31
2.11 <i>Efeito do LIO associada a drogas na contorção abdominal de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária</i>	31
2.12 <i>Análise de dados e estatística</i>	32
3 RESULTADOS	32
3.1 <i>Análise da composição química do óleo essencial</i>	32
3.2 <i>Toxicidade oral aguda</i>	34
3.3 <i>Rota-rod</i>	34
3.4 <i>Teste do campo aberto</i>	35
3.5 <i>Efeito relaxante do LIO no útero isolada de ratas</i>	35
3.6 <i>Influência dos canais K^+ no efeito do LIO</i>	36
3.7 <i>Investigação da participação dos receptores adrenérgicos no efeito relaxante do LIO</i>	37
3.8 <i>Influência da via de NO/GCS/GMPC/PKG no efeito do LIO</i>	38
3.9 <i>Influência do LIO na mobilização de cálcio</i>	39

3.10 Efeito do LIO no modelo experimental de dismenorreia primária.....	40
4 DISCUSSÃO.....	42
5 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	51
CAPÍTULO 2.....	60
RESUMO.....	61
1 INTRODUÇÃO.....	62
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial.....	63
2.2 Determinação da composição do óleo essencial.....	63
2.3 Animais.....	64
2.4 Estudos de toxicidade aguda.....	64
2.5 Teste do campo aberto.....	65
2.6 Teste da barra giratória (rota-rod).....	65
2.7 Preparação de tecido.....	65
2.8 Atividade espasmolítica no útero isolado de rata.....	66
2.9 Análise do mecanismo de ação.....	66
2.10 Efeito da LLO nas contorções abdominais de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária.....	67
2.11 Efeito do LLO associado a drogas nas contorções abdominais de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária.....	67
2.12 Investigação dos possíveis mecanismos de ação do LLO em modelo de dismenorreia primária.....	68
2.13 Análise de dados e estatística.....	68
3 RESULTADOS.....	68
3.1 Análise da composição química do óleo essencial.....	68
3.2 Toxicidade oral aguda.....	70
3.3 Teste do campo aberto.....	70
3.4 Teste da barra giratória (rota-rod)	71
3.5 Efeito relaxante do LLO no útero isolada de ratas.....	72
3.6 Influência dos canais K^+ no efeito do LLO.....	73
3.7 Efeito relaxante do LLO na via adrenérgicos.....	74
3.8 Influência da via de NO/GCS/GMPC/PKG no efeito do LLO.....	74
3.9 Influência do LLO na mobilização de cálcio.....	76

<i>3.10 Efeito do LLO no modelo experimental de dismenorrea primária.....</i>	<i>76</i>
<i>3.11 Efeito da via de NO/GCS/GMPC, dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP e dos receptores adrenérgicos na ação do LLO.....</i>	<i>78</i>
4 DISCUSSÃO.....	79
5 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
CONCLUSÃO GERAL.....	93
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXO A.....	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento significativo nas pesquisas sobre a atividade biológica de óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais em todo o mundo. Esse interesse crescente se deve à grande importância e diversidade das espécies vegetais, que apresentam uma variedade de propriedades, incluindo atividades espasmolíticas, por exemplo. O alívio da dor e o controle de patologias relacionadas a espasmos musculares, como hipertensão, asma, cólicas uterinas e intestinais, entre outros, estão associados a disfunções na contratilidade do músculo liso. Essas questões têm sido uma preocupação constante tanto para os profissionais de saúde quanto para a população em geral, e as plantas medicinais têm oferecido respostas promissoras (GILANNI et al., 2005).

A natureza proporciona uma ampla variedade de substâncias bioativas oriundas do metabolismo vegetal que são empregadas na terapêutica, seja na forma empírica ou na forma de produto farmacêutico, e servem como base para a produção de novas formulações terapêuticas, na sua forma isolada ou associada ao fitocomplexo (NEWMAN e CRAGG, 2016).

O músculo liso, um tecido extensivamente distribuído no organismo, é constituído por células musculares lisas e desempenha um papel fundamental na homeostase. Este tecido contribui significativamente para a manutenção da pressão arterial, a respiração, a motilidade gastrointestinal e a contração uterina. Adicionalmente, o músculo liso é a principal estrutura de órgãos ocos, incluindo aqueles pertencentes aos sistemas digestivo, respiratório, vascular e urogenital (WIRTH e OFFERMANN, 2012).

A musculatura lisa, por meio de contrações por encurtamento, desempenha funções como a motilidade, a alteração das dimensões de certos órgãos e a manutenção da tensão. Embora componha apenas 5% da musculatura no organismo, pode ser encontrada revestindo as paredes de tubos e órgãos ocos, onde suas contrações resultam em modificações na forma desses órgãos (EDDINGER e MEER, 2007).

Para o estudo do músculo liso, é essencial ressaltar alguns aspectos gerais, destacando-se a importância do íon Ca^{2+} nos processos de contração e relaxamento. A presença de Ca^{2+} dentro da célula desencadeia diversos eventos intracelulares, que vão desde mecanismos de contração até secreção, transmissão sináptica, regulação

enzimática, fosforilação e desfosforilação de proteínas e transcrição gênica (CATTERALL, 2011).

O músculo liso uterino é crucial para a fisiologia contrátil, desempenhando funções essenciais durante o parto, nas complicações pré-parto, e na descamação do endométrio durante a menstruação, causando cólicas e dismenorrea, processos estes que estão intimamente ligados à camada muscular uterina e aos aspectos da reprodução feminina (GARRETT et al., 2022).

O útero humano é composto por camadas de músculo liso organizadas em direções perpendiculares, o que facilita a transmissão das contrações entre as fibras musculares. A contração das camadas longitudinal e circular resulta em diferentes alterações no formato do útero (DODDS et al., 2021). O órgão possui três camadas principais: perimétrio (tecido conjuntivo externo), miométrio (camada muscular responsável pelas contrações) e endométrio (camada interna de tecido epitelial). Durante a gestação, as fibras musculares do miométrio aumentam em número e tamanho (POTIKUL et al., 2016).

A contração da musculatura lisa é controlada por hormônios, substâncias parácrinas e neurotransmissores, enquanto a esquelética é controlada apenas pela acetilcolina. Além disso, a musculatura lisa possui propriedades elétricas variáveis e múltiplas vias de contração e relaxamento (SEOW e CY, 2019).

Os aspectos diferenciais para a anatomia uterina humana e de roedores tem-se que principalmente no fato de que o útero nos roedores consiste em tubos pares que partem dos ovários onde são separados por curtas tubas uterinas e se abrem ainda distintamente na vagina, sendo denominado útero duplo ou bifurcado, tais características são facilmente observadas em ratas de laboratório (*Rattus norvegicus*) (CONTI, 2001; ANDERSEN, 2004).

Nestes animais o útero duplo é contínuo contendo dois canais cervicais distintos que desembocam em uma vagina simples (MARTINS, 2009; MITCHELL et al., 2013b). Em ratas assim como em outras espécies, o miométrio é constituído por duas camadas distintas, a longitudinal exterior e uma camada interna circular com origem, estrutura, função e padrões de contração diferentes. Em animais com um útero bifurcado, por exemplo, na rata, o músculo circular interior e longitudinal exterior, existe uma maior facilidade de separação do que em útero de humano (VEALE et al., 2000; AGUILAR e MITCHELL, 2010).

O ciclo reprodutivo das ratas é denominado ciclo estral e dura em média 4 dias. É caracterizado por 4 estágios: proestro, estro, metaestro e diestro. No proestro há um aumento dos níveis de estrogênio, ao final desta fase, ocorre à ovulação e marca o início do ciclo estral. O estro corresponde à ovulação, onde se tem pico de progesterona. Durante o metaestro e o diestro, os hormônios retornam ao seu nível basal, revestimento uterino se regenera e o ciclo recomeça. Esses estágios causam alterações na composição do epitélio vaginal e levam a presença de células inflamatórias, que podem ser facilmente identificadas por meio de citologia vaginal (FRASIER et al., 2013; GOUVEIA et al., 2009).

Do ponto de vista experimental, sabe-se que muitos estudos, incluindo aqueles relacionados ao período gestacional e à saúde humana, são frequentemente realizados em animais de laboratório. Os roedores são amplamente utilizados como modelos experimentais devido à sua fácil obtenção, ciclo reprodutivo curto, baixo custo e facilidade de criação, além de possuírem uma fisiologia semelhante à humana. Apesar das diferenças entre o cérebro humano e o de roedores, existem estruturas análogas que se correlacionam com certos comportamentos (CASTRO, 2006).

O miométrio é um ponto de interesse comum em diversos processos fisiológicos, especialmente no processo contrátil. Na atividade uterotrópica, a ocitocina (OT) é o agonista uterino mais potente, sendo produzida no hipotálamo, armazenada na neurohipófise e também na decídua materna. A endotelina-1 e a prostaglandina F_{2a} (PGF_{2a}) são outros agonistas potentes produzidos na decídua materna. Esses agonistas atuam por meio de receptores de membrana específicos, os GPCRs, que ativam vias de sinalização através de pequenas proteínas GTPases (KOTANI et al., 2000; MITCHELL et al., 2013a).

O ciclo menstrual é um acontecimento biológico que ocorre em mulheres saudáveis no qual se caracteriza pelo fluxo sanguíneo vaginal. Esse fenômeno tem uma natureza cíclica, resultante das variações nas concentrações hormonais secretadas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (PARDINI, 2001).

A duração média do ciclo menstrual é de 28 dias, podendo ser dividido nas três fases primárias: folicular, ovulatória e lútea (MELEGARIO et al., 2006; DIAS et al., 2005). A fase folicular, que se inicia no primeiro dia da menstruação e se estende até o nono dia, pode ser dividida em duas subfases: a fase folicular inicial, caracterizada por baixos níveis dos hormônios estrogênio e progesterona, e a fase folicular média, em que

os níveis de estrogênio são altos independentemente da progesterona. Um ciclo médio de 28 dias significa que a ovulação ocorre no meio do ciclo, por volta do 14º dia. Isto acontece porque a fase ovulatória dura entre 10 e 14 dias antes da menstruação. Apenas durante este período de tempo o 17-beta-estradiol pode fornecer um feedback positivo da produção. A fase lútea inicia no fim da ovulação e dura até o início do fluxo menstrual é caracterizado por altas concentrações de estrogênio e progesterona. Estas mudanças cíclicas são muitas vezes previsíveis ao longo dos anos reprodutivos (HAWKINS e MATZUK, 2008; DELIGEOROGLOU e TSIMARIS, 2010). O estrogênio e a progesterona produzidos no tecido ovariano são os responsáveis pelas alterações locais no endométrio. A redução do nível de estrogênio e progesterona acarretam o processo de descamação do endométrio e o surgimento do fluxo menstrual. A menstruação marca o início de um novo ciclo menstrual (BOUZAS, et al., 2010). As flutuações hormonais que ocorrem nas mulheres devido às alterações de estrogênio e progesterona durante o ciclo menstrual têm impacto na fisiologia da mulher (BRAUN e HORTON, 2001).

Os ciclos menstruais são indicadores de saúde e fertilidade feminina. Entre as doenças femininas mais comuns estão as irregularidades do ciclo menstrual e a dismenorreia primária (HILLARD, 2018).

A dismenorreia é caracterizada por cólicas dolorosas e espasmódicas no abdome inferior, que ocorrem durante a menstruação (YANG et al., 2015). Ela é classificada como primária, quando resulta apenas de alterações hormonais, sem a presença de patologias pélvicas, ou como secundária, quando está associada a condições pré-existentes, como aderências uterinas, ciclos menstruais irregulares, doenças inflamatórias pélvicas e endometriose (SEZEREMETA et al., 2013; PU et al., 2015). A dismenorreia primária ocorre devido a contrações uterinas intensificadas, causadas pela produção excessiva de prostaglandinas no fluido menstrual, o que leva a contrações, hipóxia e isquemia uterinas (GUIMARÃES e PÓVOA, 2020).

A fisiopatologia da dismenorreia não é totalmente compreendida, mas evidências sugerem que se deve ao aumento da secreção de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e prostaglandina E₂ (PGE₂) no útero durante a descamação endometrial (BERNARDI M. al., 2017). Na ausência de gravidez, os níveis hormonais caem devido ao declínio da função do corpo lúteo, levando à retirada da progesterona. Isso leva à constrição das arteríolas espirais e isquemia tecidual nas camadas superficiais do

endométrio. O endométrio libera prostaglandinas, possivelmente devido à diminuição da estabilidade das membranas lisossômicas nas células endometriais (HENZL et al., 1972). Essas prostaglandinas estão envolvidas no aumento das contrações e vasoconstrição do miométrio, levando à isquemia uterina. Isso resulta na hipersensibilização das fibras da dor e, finalmente, na dor pélvica (BERNARDI M. al., 2017). As prostaglandinas são sintetizadas através da cascata do ácido araquidônico, mediada pela via da ciclooxigenase (COX). Alta concentração da ciclooxigenase-2 (COX-2) leva ao aumento de $PGF2\alpha$ durante a menstruação, sendo o mecanismo mais provável responsável pela dismenorréia primária (PAN et al., 2014; GHONEIM et al., 2015). Além disso, ao cair na circulação sanguínea, juntamente com os leucotrienos, é responsável pelos sintomas sistêmicos, como as dores de cabeça, náuseas, vômitos, tontura e a diarreia que podem acompanhar as cólicas menstruais (RYAN, 2017).

A terapia de primeira linha inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) enquanto que, a de segunda linha, inclui o uso de contraceptivos orais, podendo estar ou não associados aos AINEs (GUIMARÃES e PÓVOA, 2020; RYAN, 2017).

Os AINEs são os medicamentos mais comuns para tratar a dismenorreia primária, especialmente em casos moderados (KAPLAN et al., 2013). Embora sejam geralmente eficazes, seu uso em longo prazo pode causar efeitos colaterais, como distúrbios no fígado, sistema digestivo e rins (SIMON, 2013). As pílulas anticoncepcionais orais são uma opção de tratamento, mas são menos usadas devido às implicações para a gravidez (FOX et al., 2019). Outras terapias incluem medicamentos antiespasmódicos, magnésio, repouso, calor local, dieta leve, atividade física e acupuntura (ORTIZ e ROMERO, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), plantas medicinais são aquelas que possuem substâncias terapêuticas ou que são precursores de fármacos semi-sintéticos (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Sendo assim, os efeitos terapêuticos das plantas medicinais são atribuídos aos princípios ativos encontrados em diversas partes da planta, como sementes, raízes, flores, frutos e folhas. Essas substâncias são responsáveis por desencadear respostas fisiológicas nos organismos vivos, resultando em benefícios para a saúde (ROCHA et al., 2021).

Entre as várias moléculas bioativas estudadas, os metabólitos secundários de plantas se destacam. Diferentes dos compostos do metabolismo primário, que são

responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção celular, os metabólitos secundários realizam atividades biológicas significativas e oferecem diversas vantagens para os organismos que os produzem. Esses compostos despertam grande interesse tanto pelas respostas biológicas das plantas aos estímulos ambientais quanto pelo seu enorme potencial farmacológico (PEDROSO, ANDRADE e PIRES, 2021).

Apesar do uso de plantas medicinais como uma alternativa ou complemento aos medicamentos oferecidos pela medicina tradicional ser uma prática antiga (LORENZI e MATOS, 2002), estima-se que existam entre 25.000 e 75.000 espécies vegetais, das quais apenas 1% teve seu potencial terapêutico comprovado por estudos científicos realizados em humanos (LIMA et al., 2011).

Por isso, têm sido investigadas quais plantas e substâncias nelas contidas possuem atividade sobre a musculatura lisa em modelos experimentais (GULLO e HUGHES, 2005), além de ações gerais sobre o sistema reprodutivo para prevenir ou reduzir complicações (REDDY e SATIJA, 2010). Dessa maneira, as plantas medicinais podem se tornar uma alternativa ao uso dos medicamentos convencionais, principalmente, quando esses não são bem tolerados ou são contraindicados (VELOSO G., et al., 2021).

Os óleos essenciais possuem uma composição extremamente complexa, devido à presença de substâncias químicas altamente funcionais. As atividades farmacológicas desses óleos estão intimamente ligadas à sua composição química, que inclui substâncias de diferentes grupos funcionais, como álcoois, cetonas, terpenos, fenóis, mono e sesquiterpenos, fenilpropanonas, aldeídos, hidrocarbonetos alifáticos, entre outros (PEREIRA e GRACAS, 2012).

A maioria dos óleos essenciais possui um ou dois compostos majoritários que lhes conferem características específicas entre as espécies, embora existam muitos outros componentes minoritários (BAKKALI et al., 2008). Assim, são possíveis que as substâncias majoritárias não sejam sempre as responsáveis pelas propriedades biológicas atribuídas aos óleos. O efeito pode ser devido a um constituinte em menor proporção ou a um sinergismo entre os diversos compostos presentes no óleo (BANDONI e CZEPAK, 2008; MACHADO e JUNIOR, 2011).

A composição dos óleos essenciais pode variar entre representantes da mesma espécie, pois a síntese de metabólitos secundários é influenciada por fatores como o clima, a estação do ano, as condições geográficas, o período de colheita, os fatores

genéticos da espécie, as técnicas de destilação, entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

As propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e algumas são preconizadas por apresentarem vantagens importantes, quando comparadas a outras classes de substâncias como, por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideal para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. A volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes possibilita que eles sejam rapidamente eliminados do organismo através das vias metabólicas (BANDONI e CZEPAK, 2008).

Os monoterpenos são as moléculas mais representativas dos óleos essenciais, constituindo mais de 90% de sua composição. Eles apresentam uma variedade de propriedades biológicas, como relaxante muscular, antimicrobiano, antiespasmódico, antidepressivo, anti-inflamatório, anti-hipertensivo, analgésico, anticonvulsivante e ansiolítico (SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2013).

A família Verbenaceae possui ampla distribuição geográfica, abrangendo cerca de 34 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies (ATKINS, 2004). Essas espécies são encontradas principalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas do hemisfério sul, sendo menos comuns no hemisfério norte (BUENO e LEONHARDT, 2011).

O gênero *Lippia*, pertencente à família Verbenaceae, destaca-se como um dos mais importantes dentro dessa família, englobando aproximadamente 200 espécies amplamente distribuídas nos neotrópicos. A maior diversidade das espécies é encontrada na América do Sul, com algumas espécies endêmicas na África. No Brasil, *Lippia* ocorre nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampas (PASCUAL et al., 2001; SALIMENA e MULGURA, 2015; SOUZA e LORENZI, 2005), apresentando maior prevalência no Cerrado e na Caatinga, onde é notável pelo aspecto chamativo durante a floração e pelo aroma forte e geralmente agradável. Essa espécie pode ser encontrada em quase todas as regiões brasileiras, prosperando em solos arenosos, leitos de rios e margens de lagos, em áreas com climas tropical e subtropical (GOMES, NOGUEIRA e MORAES, 2011).

As espécies da família Verbenaceae possuem diversas aplicações, incluindo usos medicinais e ornamentais (MELO et al., 2010). Ademais, essas plantas são amplamente

reconhecidas na medicina popular, pois muitas contêm compostos fitoquímicos bioativos com significativos efeitos farmacológicos (SANTOS et al., 2015).

Entre os países do continente americano, o Brasil e o México destacam-se por possuírem uma grande diversidade do gênero *Lippia*. No Brasil, o maior número de espécies do gênero *Lippia* encontra-se na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás (OLIVEIRA et al., 2007; GOMES, NOGUEIRA e MORAIS, 2011). Utilizam-se as folhas, caules ou partes aéreas com flores, comumente preparadas por infusão ou decocção, no entanto, também são usadas como macerado para aplicação tópica no uso tradicional (PASCUAL et al., 2001; MATOS, 2008; GOMES, NOGUEIRA e MORAES, 2011).

Diversas espécies do gênero *Lippia* têm propriedades medicinais comprovadas. Por exemplo, a *Lippia alba* possui ações vasorrelaxante, tocolítica e antiespasmódica (SILVA et al., 2018; PEREIRA-DE-MORAIS et al., 2019; CARVALHO et al., 2018). A *Lippia dulcis* tem atividades antiespasmódica, citotóxica, antioxidante e antiparasitária (GÖRNEMANN et al., 2008; ESCOBAR et al., 2010; ATTIA et al., 2012). A *Lippia sidoides* é anti-inflamatória, gastroprotetora, leishmanicida, citotóxica e imuno-modulatória (MONTEIRO et al., 2007; MELO et al., 2014; RAJGOPAL et al., 2015). A *Lippia multiflora* é eficaz contra malária e tem atividade antibacteriana (VALENTIN et al., 1995; BASSOLÉ et al., 2010). A *Lippia origanoides* tem propriedades antidismenorreicas (MACEDO et al., 2022). A *Lippia thymoides* é utilizada para tratar febre, bronquite, reumatismo e dor de cabeça, com ações antimicrobiana, espasmolítica e antidiarreica (SILVA et al., 2016; MENEZES et al., 2018).

A espécie *L. insignis* Moldenke, endêmica do Brasil, encontra-se no domínio fitogeográfico entre o Cerrado e a Caatinga, com ocorrência restrita à região Nordeste, especificamente no estado da Bahia (OLIVEIRA, 2014). Em virtude da exploração antrópica e irracional dos recursos naturais, esta espécie encontra-se ameaçada de extinção (BACELLAR-SCHITTINI et al., 2009). As informações referentes ao seu potencial bioativo e ao seu uso popular são ainda escassas (SANTOS, 2017). A espécie caracteriza-se como um arbusto espigado, atingindo até 3 metros de altura, com ramos delgados e indistintamente tetragonais. Suas inflorescências são axilares, apresentando brácteas ovadas de aproximadamente 0,6 cm de comprimento e coloração verde; o pedicelo mede cerca de 3 cm e a corola é labiata, variando de lilás a magenta

(SALIMENA et al., 2015; OLIVEIRA, 2014). Do ponto de vista botânico, trata-se de uma planta arbustiva, aromática, com altura aproximada de 2 metros e baixa ramificação. Suas inflorescências são paucifloras, com folhas de formato ovado-deltóide e coloração verde escura, e flores magentas, que normalmente surgem no mês de junho (SANTOS, 2017).

A espécie *Lippia lasiocalycina* Cham. é nativa do Brasil e ocorre nos estados da Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso, Paraná e São Paulo, em domínios fitogeográficos como Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Floresta Amazônica, além de apresentar registros na Bolívia. Seus sinônimos heterotípicos incluem *L. lasiocalycina* var. (SALIMENA e MULGURA, 2015). As informações acerca do potencial bioativo dessa espécie ainda são escassas (SANTOS, 2017). A planta é descrita como um arbusto que pode atingir até 2 metros de altura, com ramos aromáticos e verticais. Sua inflorescência é axilar e racemosa, e as folhas, dispostas de forma oposta, são membranáceas e ovadas, com pecíolos de cerca de 1,6 cm de comprimento (BISPO, 2015).

Diante da relevância dos produtos naturais no desenvolvimento de novos compostos bioativos, este trabalho buscou novas alternativas terapêuticas para tratar distúrbios na musculatura lisa uterina utilizando produtos naturais, com foco nas espécies *L. insignis* e *L. lasiocalycina*, pouco estudadas nessa área. A Tese foi dividida em dois capítulos e apresenta uma avaliação pré-clínica dos efeitos dos óleos essenciais combinados com doses subterapêuticas de medicamentos, analisando seu potencial terapêutico por meio de estudos *in vivo* e *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito dos óleos essenciais de *Lippia insignis* e *Lippia lasiocalycina* sobre a contratilidade uterina, em modelo experimental de dismenorreia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a composição química dos óleos essenciais de *L. insignis* e *L. lasiocalycina*;
- ✓ Avaliar a toxicidade em dose única dos óleos essenciais das espécies *L. insignis* e *L. lasiocalycina* em camundongos fêmeas.
- ✓ Investigar atividade motora nos modelos de campo aberta e rota rod.
- ✓ Avaliar o efeito espasmolítico dos óleos essenciais de *L. insignis* e *L. lasiocalycina* sobre os músculos lisos de útero isolado de rata, utilizando como parâmetros de medida a força de contração e o relaxamento;
- ✓ Investigar farmacologicamente o mecanismo de ação dos óleos essenciais das espécies *L. insignis* e *L. lasiocalycina*.
- ✓ Investigar o efeito dos óleos essenciais das espécies *L. insignis* e *L. lasiocalycina* sobre a contratilidade uterina em modelos experimentais *in vivo* de dismenorreia primária.

CAPITULO 1

Óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke induz efeito tocolítico em útero de rata virgem e reduzem contorções abdominais em modelo *in vivo* de dismenorreia

Cícero André Ferreira Macêdo^a, Tiago Feitosa Ribeiro^c, Jennifer Milene Gomes França^b, Victória Laysna dos Anjos Santos^c, Táris Maria Macedo de Santana^d, Angélica Maria Lucchese^d, Fabrício Souza Silva^{ab*}

^a Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Brazil

^b Laboratório de Farmacologia Experimental, Colegiado de Farmácia – Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) – Brazil

^c Rede Nordeste de Biotecnologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Brazil.

^d Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Ciências Exatas – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Brazil

*Corresponding author: Dr. Dr. Fabrício Souza Silva, Colegiado de Farmácia, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Av. José de Manoel S/N, Centro, Petrolina-PE, Brazil, CEP: 56304-917. Email: fssilvafarma@gmail.com phone: +55 87 2101 6862

RESUMO

O estudo investigou a atividade espasmolítica do óleo essencial de *Lippia insignis* Moldenke (LIO) em útero isolado de ratas, com foco no seu potencial no tratamento da dismenorreia. Dismenorreia refere-se às dores pélvicas durante o ciclo menstrual, sendo tratada principalmente com anti-inflamatórios não esteroides e hormônios contraceptivos. O gênero *Lippia* é conhecido por suas propriedades farmacológicas, especialmente ação espasmolítica, mas muitas espécies carecem de estudos aprofundados. **Objetivo:** avaliar o efeito do óleo essencial de *L. insignis* Moldenke (LIO) na contratilidade uterina e seu possível mecanismo e seu efeito antidismenorréico em roedores. **Métodos:** Avaliamos o efeito espasmolítico por meio de ensaios *in vitro* com útero isolado de ratas. Para avaliar a coordenação motora e a mobilidade, foram utilizados os testes rotarod e campo aberto, respectivamente. Para o estudo de toxicidade de dose única, administramos LIO na dose de 2 g/kg por gavagem. A dismenorreia foi estabelecida pela injeção de cipionato de estradiol em camundongas fêmeas. **Resultados:** No estudo de toxicidade em dose única, a administração de 2 g/kg de LIO não alterou o comportamento dos animais, sem óbitos ou sinais clínicos de toxicidade. Os testes de coordenação motora e mobilidade não revelaram efeitos adversos. LIO relaxou o útero de rata pré-contraída com 10^{-2} UI/mL de OCT, $1\mu\text{M}$ CCh ou 60mM KCl. A pré-incubação de bloqueadores 4-AP, GLIB, e TEA não alterou significativamente o efeito relaxante do LIO. Já na presença do CsCl, houve diferença significativa entre os valores de $\log\text{CE}_{50}$. A pré-incubação com propranolol, fentolamina, L-NAME, azul de metileno, ODQ, animofilina e heparina nas contrações induzidas por carbacol não alterou significativamente o efeito relaxante do LIO. A pré-incubação com LIO em meio livre de Ca^{2+} nas concentrações de 9 $\mu\text{g/mL}$, 27 $\mu\text{g/mL}$ ou 81 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a contração induzida pelo carbacol. O tratamento com LIO a 100 mg/kg por via oral, inibiu as contorções em camundongos fêmeas. Já o tratamento do LIO 10 mg/kg associado com a subdose de escopolamina 0,35 mg/kg, nifedipino 0,7 mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg inibiu as contorções em camundongos. **Conclusão:** Demonstra o efeito tocolítica e potencial antidismenorréico quando associado com as subdoses dos medicamentos, reduzindo principalmente a contorções dos animais e apresenta baixa toxicidade oral em dose única.

Palavras-chave: Verbenaceae. Efeito espasmolítico. Músculo liso. Útero. Dismenorreia.

1 INTRODUÇÃO

A dismenorreia é um termo médico usado para descrever as dores na região pélvica que ocorrem durante o período menstrual. Os sintomas da dismenorreia costumam ocorrer durante a ovulação ou imediatamente após, persistindo até o final do período menstrual em muitas mulheres. A dismenorreia primária pode persistir por anos e, em alguns casos, pode ser crônica (Fox et al., 2019; Guimarães and Póvoa, 2020), comprometendo cerca de 50% a 90% das mulheres em fase reprodutiva (Acheampong et al., 2019; E. et al., 2018). Acredita-se que ela esteja relacionada ao aumento da síntese e liberação de prostaglandinas, as quais ocasionam uma hipercontratibilidade uterina. Esse evento resulta na hipóxia e isquemia do músculo uterino, provocando a dor (Guimarães and Póvoa, 2020).

O tratamento da dismenorreia inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais e hormônios anticoncepcionais. Os anti-inflamatórios não esteroidais são comumente usados como terapia de primeira linha, mas podem ter efeitos adversos em longo prazo (Daniels et al., 2002). Os hormônios anticoncepcionais, como os contraceptivos orais, são uma opção alternativa que ajuda a reduzir o fluxo menstrual e a produção de prostaglandinas, aliviando os sintomas da dismenorreia (Sun et al., 2016).

A utilização de plantas medicinais oferece uma alternativa ao uso de medicamentos convencionais, uma vez que as terapias convencionais podem apresentar efeitos adversos que podem ser mal tolerados. Com base na literatura, há evidências de que algumas plantas medicinais possuem atividade antiespasmódica, o que pode contribuir para o alívio da dismenorreia (Pellow and Nienhuis, 2018).

O gênero *Lippia* engloba diversas espécies com elevada concentração de óleos essenciais, despertando interesse na etnofarmacologia. Algumas espécies de *Lippia* destacam por sua relevância na medicina tradicional, conforme evidenciado em estudos (Albuquerque et al., 2007; Pascual et al., 2001). No entanto, apesar dos avanços nos estudos sobre o uso de plantas medicinais desse gênero, ainda há muitas espécies que necessitam de pesquisas mais abrangentes e aprofundadas.

A pesquisa científica que aborda as propriedades químicas, farmacológicas e biológicas sobre a espécie *Lippia insignis* Moldenke é limitada. A planta é endêmica do Brasil, sendo encontrada principalmente no estado da Bahia, na região do bioma caatinga (Trindade et al., 2021).

Dado a escassez de dados científicos e o crescente interesse farmacológico em relação a esta espécie, este estudo tem como objetivo investigar a atividade espasmolítica e o possível mecanismo do relaxamento do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) em modelos *in vitro* e *in vivo*, com foco em sua possível aplicação no tratamento da dismenorrea.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *L. insignis* Moldenke (HUEFS 2432189, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) foram coletadas durante a manhã, em Janeiro de 2019, em plantas floridas e mantidas sobre cultivo no Horto Florestal (12°16'10.3"S 38°56'18.8"W), na cidade de Feira de Santana, a 234 metros acima do nível do mar, com temperatura média anual de 24°C e uma taxa de precipitação média de 848 mm por ano.

A planta foi seca à temperatura ambiente até peso constante (aproximadamente 72h). Na extração do óleo, 100g de folhas secas da espécie foram trituradas em liquidificador com água destilada e, em seguida, adicionadas em balão de vidro contendo água destilada em volume suficiente para cobertura total do material vegetal.

2.2 Extração do óleo essencial

O método de extração foi por hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger, acoplados a balões de vidro, que foram aquecidos por mantas térmicas elétricas com termostato. A extração foi conduzida durante 3 horas, contadas a partir da condensação da primeira gota. Após a extração foi separado o óleo da água e adicionado ao óleo o sulfato de sódio anidro para eliminação da água residual. Posteriormente, com o uso da pipeta do tipo Pasteur, o óleo foi coletado e acondicionado em frascos de vidros, etiquetados e armazenados a -23°C até a realização da análise química. O teor de óleo essencial (%) foi calculado pela relação entre volume de óleo e biomassa seca das folhas. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação, analisado por GC/FID e GC/MS no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON).

2.3 Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF) sob o número 0004/261120. As ratas adultas (150-250g) e as camundongas fêmeas (25-35g) foram obtidas de Biotério Central do UNIVASF e alojadas em uma sala com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) com um ciclo automaticamente programado de 12h claro/escuro. Os animais receberam alimentos (LABINA, Purina do Brasil Ltda, Brasil) e água estavam disponíveis *ad libitum*. As experiências foram realizadas entre as 7:00 e as 17:00.

2.4 Estudos de toxicidade aguda

Os procedimentos foram realizados utilizando as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) - Diretrizes 425 (OCDE, 2008a) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Agência de Vigilância Sanitária, 2013).

Neste ensaio, o LIO na dose de 2 g/kg foi administrado por gavagem, paralelamente, um grupo, com o mesmo número de animais, foi tratado com veículo (salina e 3% cremofor 0.1 mL/10g/v.o) e um grupo tratado só com solução salina. Os animais foram observados periodicamente durante as primeiras 24 h (nos 30, 60, 90, 120, 240, 480 e 720 min) após o tratamento e depois uma vez ao dia por 14 dias. No 14º dia, os camundongos foram eutanasiado sob anestesia (xilazina 10–15 mg/kg e cetamina 100–150 mg/kg) e órgãos vitais (coração, rins, pulmão, baço e fígado) foram removidos para exame macroscópico e peso relativo dos órgãos. Também avaliamos outros parâmetros, como peso corporal, ingestão de alimentos e água, diariamente, ao longo do estudo (Agência de Vigilância Sanitária, 2013; OECD,2008A)

2.5 Teste do campo aberto

Realizou o teste de campo aberto (TCA) para avaliar o comportamento locomotor de camundongos. Os animais foram tratados com solução salina (10 mL/kg, v. o.), LIO (10, 30 e 100 mg/kg, v. o.) ou diazepam (2,5 mg/kg, i.p.) e 30min após o tratamento cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto área e permitido

explorá-la por 5 min. Durante a sessão de teste de 5 min, foram avaliadas as variáveis de latência de movimento da atividade locomotora, número total de cruzamentos, o número total do levantar, número de auto-limpeza e o tempo em que os animais permaneceram parados. Limpamos a área do campo aberto com uma solução de etanol a 5% e deixamos secar depois de testar cada camundongo (Prut and Belzung, 2003).

2.6 Teste da barra giratória (ROTA-ROD)

Nesse teste, os animais foram pré-selecionados em uma sessão de treinamento 24 horas antes do teste com base na capacidade de permanecerem na barra (a 7 rpm) por 1 minuto. Grupos de animais pré-selecionados foram tratados com solução salina 0,9% (10 mL/kg, v.o), LIO (10, 30 e 100 mg/kg, v.o) ou diazepam (2,5 mg/kg, i. p.). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram colocados com as quatro patas na barra, e a queda e o tempo no rota-rod foram avaliados por 3 min nos tempos de 30, 60 e 120 min após os tratamentos (Dunham and Miya, 1957).

2.7 Preparação de tecido

Os animais foram tratados 48h antes do início dos experimentos com cipionato de estradiol (1mg/kg. por via subcutânea) para indução do estro. Após, foram eutanasiadas por deslocamento cervical e os cornos uterinos foram excisados e abertos longitudinalmente para obtenção de 4 tiras de tecido uterino de 1cm de comprimento. Em seguida, segmentos foram colocados individualmente em um banho de órgãos de 10 ml contendo a solução nutritiva Ringer-Locke (NaCl 154,0 mM, KCl 5,63 mM, CaCl₂.2H₂O 2,16 mM, Glicose 5,5 mM e NaHCO₃ 11,9 mM) aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) a 32°C e pH 7,4. Cada corno uterino foi conectado a um transdutor isométrico (Panlab, Cornellà, Barcelona, Espanha) sob uma tensão basal isotônica de 1g e deixado equilibrar por pelo menos 45 minutos, sendo lavado com uma nova solução de Ringer-Locke a cada 15 min.

2.8 Atividade espasmolítica no útero isolado de rata

Após o período de estabilização de 45 minutos duas contrações foram induzidas por carbacol (CCh) 1 μ M, ocitocina (OCT) 10⁻² UI/mL ou cloreto de potássio (KCl) 60 mM. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, o LIO, foi cumulativamente adicionado à cuba em concentrações crescentes (1, 3, 9, 27, 81, 243 e 729 μ g/mL), com um intervalo de 5 minutos entre cada adição. Além disso, um grupo experimental não foi submetido a agentes contraturantes para verificar o efeito do LIO no tônus basal do órgão. Neste caso, LIO foi adicionado cumulativamente (1, 3, 9, 27, 81, 243 e 729 μ g/mL) na cuba em intervalos de 5 minutos, após o período de estabilização de 45 minutos sem contração pré-induzida. Por fim, foi observado se os órgãos responderam à contração ao final do experimento. O LIO foi diluído em solução de cremophor EL 3% em água destilada e este veículo não teve efeito relaxante (dados não apresentados).

2.9 Análise do mecanismo de ação

Para investigar o possível mecanismo relaxante do LIO, as preparações uterinas foram montadas conforme descrito anteriormente e contraídas com CCh 1 μ M na ausência ou presença de cloreto de cério (CsCl, 5 mM), um bloqueador não seletivo dos canais para K⁺ (Zhou et al., 1996), tetraetilamônio (TEA, 5 mM), um bloqueador dos canais para potássio ativados pelo Ca²⁺ (K_{ca}) (Khan et al., 2001), 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), um bloqueador dos canais para potássio abertos por voltagem (K_v) (Aaronson et al., 2006) ou glibenclamida (GLI, 1 μ M), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Hughes and Hollingsworth, 1997), propranolol (PRO, a 10 μ M), um antagonista β -adrenérgico; fentolamina (PHE, a 1 μ M), um antagonista α -adrenérgico (Fanning et al., 2017), N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M), inibidor da óxido nítrico sintase (Munglue et al., 2013), azul de metileno (AZM, 1 μ M) inibidor não seletivo da guanilil ciclase solúvel (Evora, 2016; Naseri et al., 2008), 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-A] quinoxalina-1-ON (ODQ, 10 μ M), inibidor seletivo da guanilil ciclase solúvel (Garthwaite et al., 1995) ou aminofilina (AMI, 1 μ M) inibidor da fosfodiesterases (Hirsh et al., 2004; Lai et al., 2021), e heparina (HEP, a 10 μ M), um bloqueador dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato

(IP₃R) (Song et al., 2015). Após o período de estabilização, o LIO foi adicionado cumulativamente (1–729 µg/mL) e individualmente a cada preparação.

Para avaliar a influência da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares, duas contrações foram induzidas com CCh 10 µM em meio livre de Ca²⁺ e, antes da segunda contração, as preparações foram pré-incubadas por 20 min com água destilada ou LIO (9, 27, ou 81 µg/mL). As contrações evocadas pelo carbacol foram comparadas antes e após a adição do LIO.

2.10 Efeito do LIO nas contorções abdominais de camundongos em modelo de dismenorréia primária

Camundongos fêmeas, foram pré-tratados com cipionato de estradiol (1mg/kg/dia) por via intraperitoneal por 3 dias consecutivos. Os grupos foram então divididos (n=6) e no 4º dia os animais foram tratados via oral de acordo com os grupos experimentais: veículo (3% cremophor diluído em 0,9% NaCl), LIO 10, 30 ou 100 mg/kg, ou ácido mefenâmico 90 mg/kg. Após 60 min de tratamento, os animais receberam ocitocina por via intraperitoneal (0,4 UI/mL), e o número de contorções abdominais (caracterizada pela contorção abdominal, com rotação pélvica e alongamento das patas traseiras) foi registrado nos 30 min subsequentes (Yang et al., 2015).

2.11 Efeito do LIO associado a drogas nas contorções abdominais de camundongos em modelo de dismenorréia primária

Camundongos fêmeas, foram pré-tratados com cipionato de estradiol (1mg/kg/dia) por via intraperitoneal por 3 dias consecutivos. Os grupos foram então divididos (n=6) e no 4º dia, os animais foram tratados por via oral de acordo com os grupos experimentais: veículo (3% cremophor diluído em 0,9% NaCl), escopolamina 3,5 mg/kg, nifedipina 7 mg/kg, ácido mefenâmico 90 mg/kg, escopolamina 0,35 mg/kg, nifedipina 0,7 mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg, LIO 10 mg/kg, LIO 10 mg/kg + escopolamina 0,35 mg/kg, LIO 10 mg/kg + nifedipina 0,7 mg/kg ou LIO 10 mg/kg + ácido mefenâmico 9 mg/kg. A dosagem dessas drogas foi estimada de acordo com a dose equivalente humana estabelecida por (Nair and Jacob, 2016a). Após 60 min de tratamento, os animais receberam ocitocina por via intraperitoneal (0,4 UI/mL), e o

número de contorções abdominais foi registrado nos 30 min subsequentes (Yang et al., 2015).

2.12 Análise de dados e estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e “n” representa o número de experimentos realizados ou o número de animais por grupo experimental. Os valores de CE₅₀ foram calculados por meio de regressão não linear; log CE₅₀ μ g/mL representam o logaritmo de CE₅₀. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste t de *Student* não pareado, ANOVA *two-way* seguida do teste de comparações múltiplas de *Sidak*, teste de *Kruskal-Wallis* seguido de comparações múltiplas de *Dunntt* ou teste de *Mann-Whitney*, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para análise estatística e produção dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism[®] versão 6.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Análise da composição química do óleo essencial

A análise química do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) revelou a presença de 25 compostos terpenóides (Tabela 1), com predominância de monoterpenos e teve como constituinte majoritário o *timol* com concentração de 39,12% da amostra, seguido γ -*terpineno* (13,05%), *p-cimeno* (9,95%), *E-ocimenona* (8,03%), β -*mirreno* (6,49%) e *mircenona* (5,02%) estando os demais constituintes com um percentual abaixo de 5% na composição do óleo essencial.

Tabela 1. Composição do óleo essencial de *L. insignis* por CG-EM

Composto	IA _{lit}	IA _{calc}	Média	\pm	DP
α - <i>tujeno</i>	924	928	0.64	\pm	0.10
α - <i>pineno</i>	932	937	0.14	\pm	0.02
<i>sabineno</i>	969	977	0.16	\pm	0.02

β-mirceno	988	992	6.49	\pm	0.51
α-terpineno	1014	1022	1.94	\pm	0.19
<i>p</i>-cimeno	1020	1031	9.95	\pm	0.43
limoneno	1024	1034	3.07	\pm	0.38
<i>E</i>-β-ocimeno	1044	1049	0.66	\pm	0.02
γ-terpineno	1054	1063	13.05	\pm	1.43
linalol	1095	1107	1.29	\pm	0.22
ipsdienol	1140	1150	0.35	\pm	0.05
mircenona	1145	1156	5.02	\pm	1.02
terpinen-4-ol	1174	1192	0.33	\pm	0.02
α-terpineol	1186	1204	0.14	\pm	0.02
<i>Z</i>-ocimenona	1226	1242	1.91	\pm	0.36
<i>E</i>-ocimenona	1235	1250	8.03	\pm	1.77
timol	1289	1303	39.12	\pm	1.29
carvacrol	1298	1311	2.51	\pm	0.87
<i>E</i>-cariofileno	1417	1427	1.40	\pm	0.47
α-humuleno	1452	1464	0.35	\pm	0.13
germacreno D	1484	1489	0.34	\pm	0.10
viridifloreno	1496	1499	0.22	\pm	0.10
biciclogermacreno	1500	1504	0.41	\pm	0.12
β-bisaboleno	1505	1515	0.20	\pm	0.09
espatulenol	1577	1590	0.52	\pm	0.13
óxido de cariofileno	1582	1595	0.20	\pm	0.07
Compostos identificados			98.38		
Composto não identificados			1.62		

IA_{lit} = índice Aritmético da literatura; IA_{calc} = índice de Kovats calculado; DP = desvio padrão

3.2 Toxicidade oral aguda

No teste de toxicidade em dose única, o LIO (2 g/kg) não apresentou alteração no comportamento dos animais (ataxia, reflexo auricular, reflexo de endireitamento, anestesia, ptose, entre outros), não foram observados óbitos ou sinais clínicos de toxicidade dos animais durante o período de tempo do protocolo. Em relação à variação do peso corporal entre os animais controle e tratados, não observamos nenhuma alteração significativa. Além disso, não observamos alterações no consumo diário de comida e água pelos ratos. Na análise macroscópica dos órgãos não observamos alterações de tamanho, aparência ou cor. A análise estatística não revelou diferença significativa entre os pesos relativos dos órgãos dos grupos tratados em comparação com os grupos de controle negativo.

3.3 Rota-rod

O LIO foi testado em camundongos nas doses (10, 30 e 100 mg/kg) para os possíveis efeitos na coordenação motora (**Fig. 1 A–C**), não houve alterações entre os animais que receberam tratamento com LIO e controle negativo.

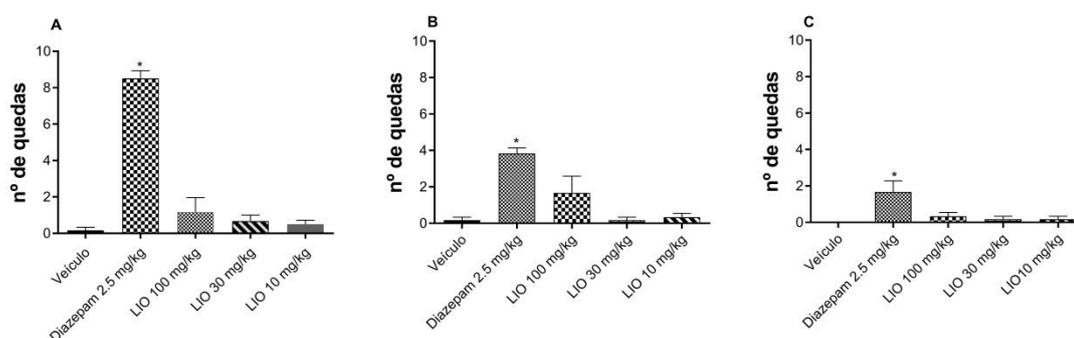


Fig. 1. Efeito da administração oral do LIO (10, 30 e 100 mg/kg) na coordenação motora de camundongos. As barras expressavam a média±SEM., n=6. **A, B e C:** representam os dados 30, 60 e 120 minutos após a administração, respectivamente. *p<0,05 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett's).

3.4 Testes de campo aberto

O LIO foi testado em camundongos para efeitos no comportamento locomotor. Os resultados obtidos mostraram que assim como os animais do controle negativo, o grupo tratado com LIO nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg não apresentou alterações sobre nenhum dos parâmetros avaliados, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito do óleo essencial de *L. insignis* sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental do campo aberto

Tratamento	Dose (mg/kg)	Número de ambulacão	Tempo de imobilização	Número de reerings	Número de grooming
C.N	–	75,83±2,41	30,00±6,86	19,50±2,54	2,16±0,30
LIO	10	40,00±3,51	32,50±12,83	12,50±1,14	1,83±0,47
LIO	30	36,67±0,95	55,17±19,79	12,17±2,16	1,33±0,21
LIO	100	36,33±0,66	67,67±27,70	9,33±0,76	1,66±0,33
Diazepam	2,5	5,66±1,22	204,2±22,07	1,50±0,84	0,50±0,22

Dados expressos em média ± SEM *(p<0,05, Teste de ANOVA one way seguido do Dunnett's test.).

3.5 Efeito relaxante do LIO no útero isolado de ratos

Nas contrações fásicas espontâneas, o LIO (1–729 µg/mL) não foi capaz de reduzir significativamente as contrações de maneira dependente da concentração. Nas contrações induzidas por OCT (10⁻² UI/mL), o LIO relaxou significativamente o útero a 27µg/mL, com valor de logCE₅₀= 1,41±0,18. Nas contrações induzidas pelo CCh (1µM), o LIO relaxou significativamente o útero a partir da concentração de 27µg/mL, apresentando valor de logCE₅₀= 1,43±0,16 e com KCl (60mM), a partir da concentração de 81µg/mL, apresentando o valor de logCE₅₀= 1,84±0,14 de forma dependente da concentração (Fig. 2)

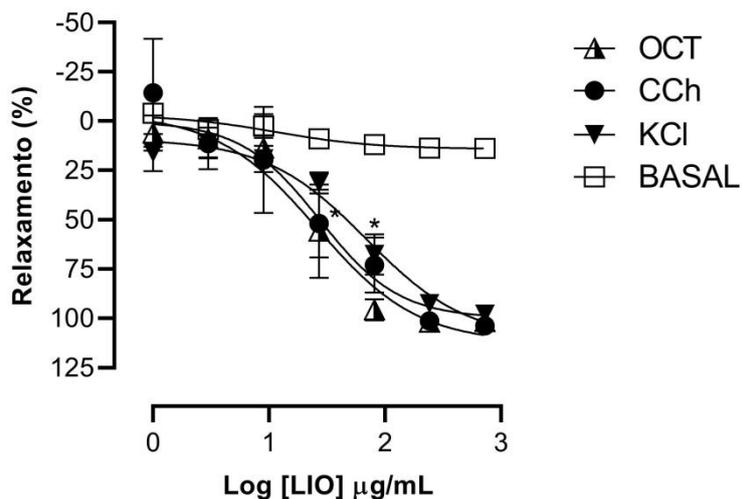


Fig. 2. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) nas contrações isoladas do útero em preparações espontâneas (BASAL) ou pré-contraídas com carbacol (CCh, 1µM), ocitocina (OCT, 10⁻²UI/mL) ou cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Dados expressos como média±SEM, n=5; *representa o relaxamento significativo quando comparado ao efeito na concentração 1µg/mL na mesma curva concentração-resposta ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak Sidak).

3.6 Influência dos canais K^+ no efeito do LIO

Investigamos a participação dos canais de K^+ no efeito LIO. Os dados mostraram que não houve diferença significativa no efeito LIO na presença de 4-AP de $\log CE_{50} = 1,28 \pm 0,20$ (Fig. 3A), GLI $\log CE_{50} = 1,61 \pm 0,06$ (Fig. 3C) ou TEA $\log CE_{50} = 1,44 \pm 0,33$ (Fig. 3D) quando comparado à ausência desse bloqueador. Na presença de CsCl $\log CE_{50} = 2,43 \pm 0,23$ (fig. 3B), foi possível observar que houve diferença significativa entre os valores de $\log CE_{50}$, quando comparados na ausência deste bloqueador.

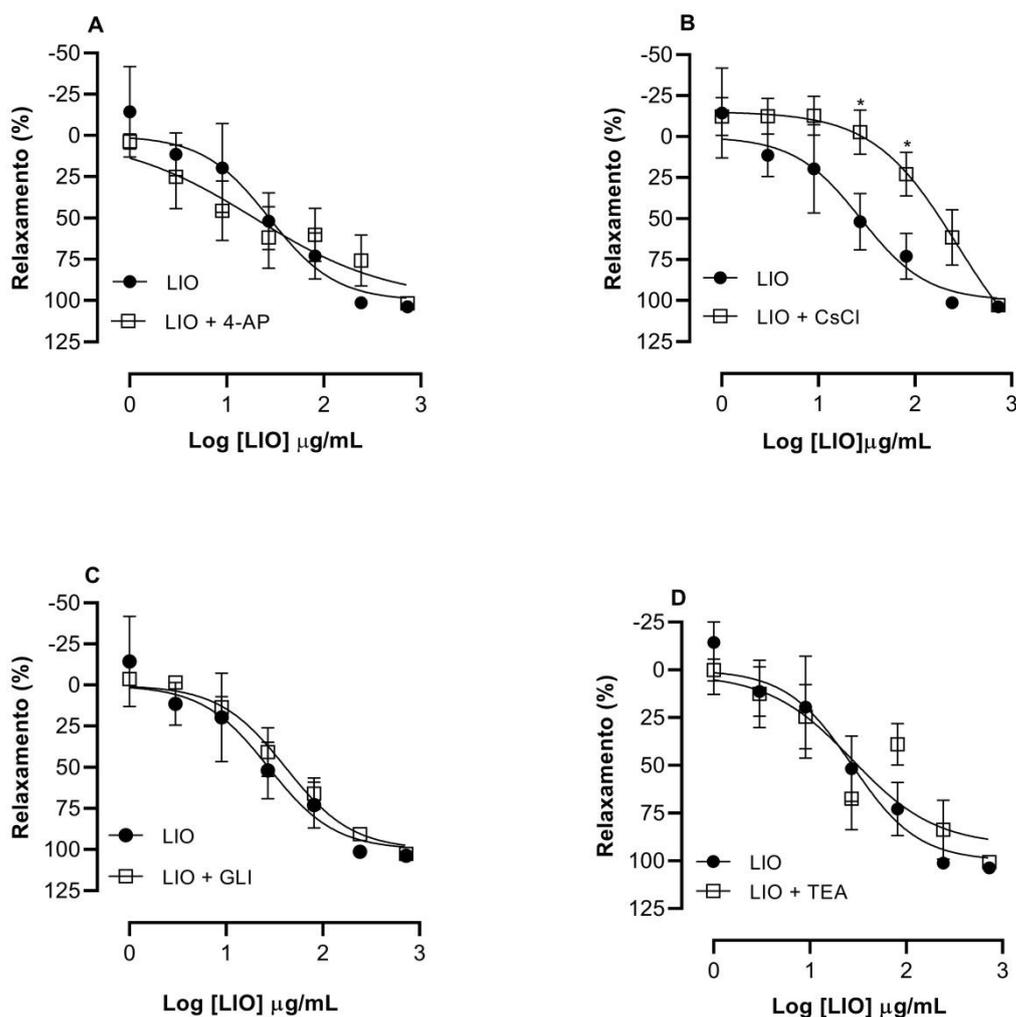


Fig. 3. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por carbacol $1\mu\text{M}$ na presença ou na ausência de bloqueadores dos canais de potássio: **A**, 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM) bloqueador dos K_v ; **B**, cloreto de céσιο (CsCl, 5 mM) bloqueador dos K_{ir} ; **C**, glibenclamida (GLIB, $1\mu\text{M}$) bloqueador dos K_{ATP} e **D**, tetraetilamônio (TEA, 5 mM) bloqueador dos K_{Ca} . ($n=5$). Dados expressos em média \pm SEM., respectivamente; *representa os efeitos significantes ($p < 0,05$, two-way ANOVA, seguindo de Holm-Sidak).

3.7 Investigação da participação dos receptores adrenérgicos no efeito relaxante do LIO

A potência do LIO ($\log\text{CE}_{50} = 1,43 \pm 0,16$) em relaxar o útero isolado pré-contraído com CCh não foi alterada quando comparada às preparações pré-incubadas com propranolol ($\log\text{CE}_{50} = 1,21 \pm 0,12$) (Fig. 4 A) ou fentolamina ($\log\text{CE}_{50} = 1,31 \pm 0,08$) (Fig. 4 B).

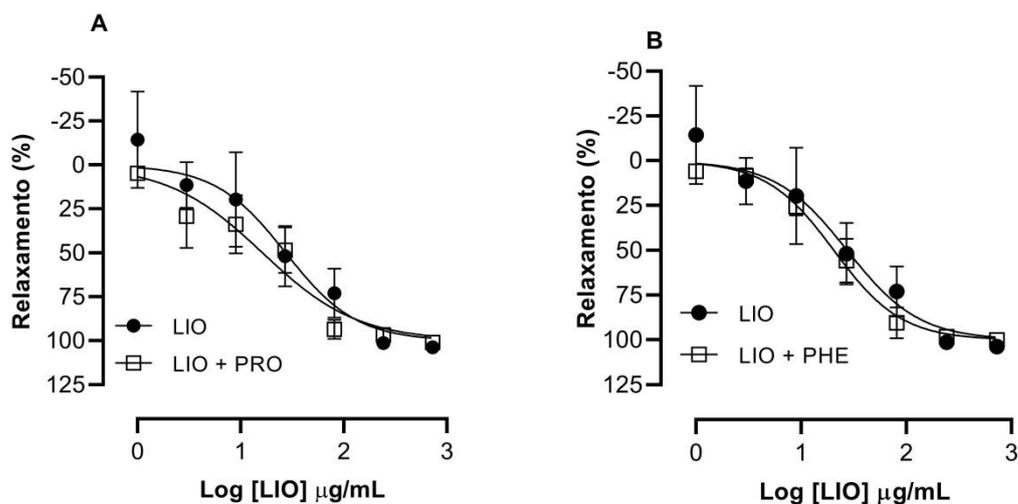


Fig. 4. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por $1\mu\text{M}$ de carbocollin na presença ou ausência de antagonistas adrenérgicos. **A**, propranolol (PRO, $10\mu\text{M}$) e **B**, fenotamina (PHE, $1\mu\text{M}$). Dados expressos com média \pm SEM, $n=5$.

3.8 Influência da via de NO/GCS/GMPC/PKG no efeito do LIO

Outra importante via de sinalização que relaxa a musculatura lisa uterina envolve a cascata NO/sGC/GMPC/PKG. Assim, a potência do LIO na presença do L-NAME foi avaliada $\log\text{CE}_{50}=1,45\pm 0,23$ e não foi possível notar qualquer alteração no efeito relaxante do LIO (Fig. 5A). Quando avaliada a atividade relaxante do LIO na presença do MB (Fig. 5B), observou-se que o LIO não apresentou diferença significativa quando comparado à ação do óleo na ausência deste inibidor, apresentando um $\log\text{CE}_{50}$ valor na presença do bloqueador de $0,85\pm 0,08$. Da mesma forma, quando a atividade relaxante do óleo foi avaliada na presença de ODQ $\log\text{CE}_{50}=1,36\pm 0,11$ (Fig. 5C) não houve diferença quando comparada na ausência do bloqueio. A ação da LIO foi verificada na presença de aminofilina, $\log\text{CE}_{50}=1,62\pm 0,11$ (Fig. 5D). Na presença do inibidor, o efeito relaxante da LIO não apresentou diferença quando comparado à ausência do inibidor.

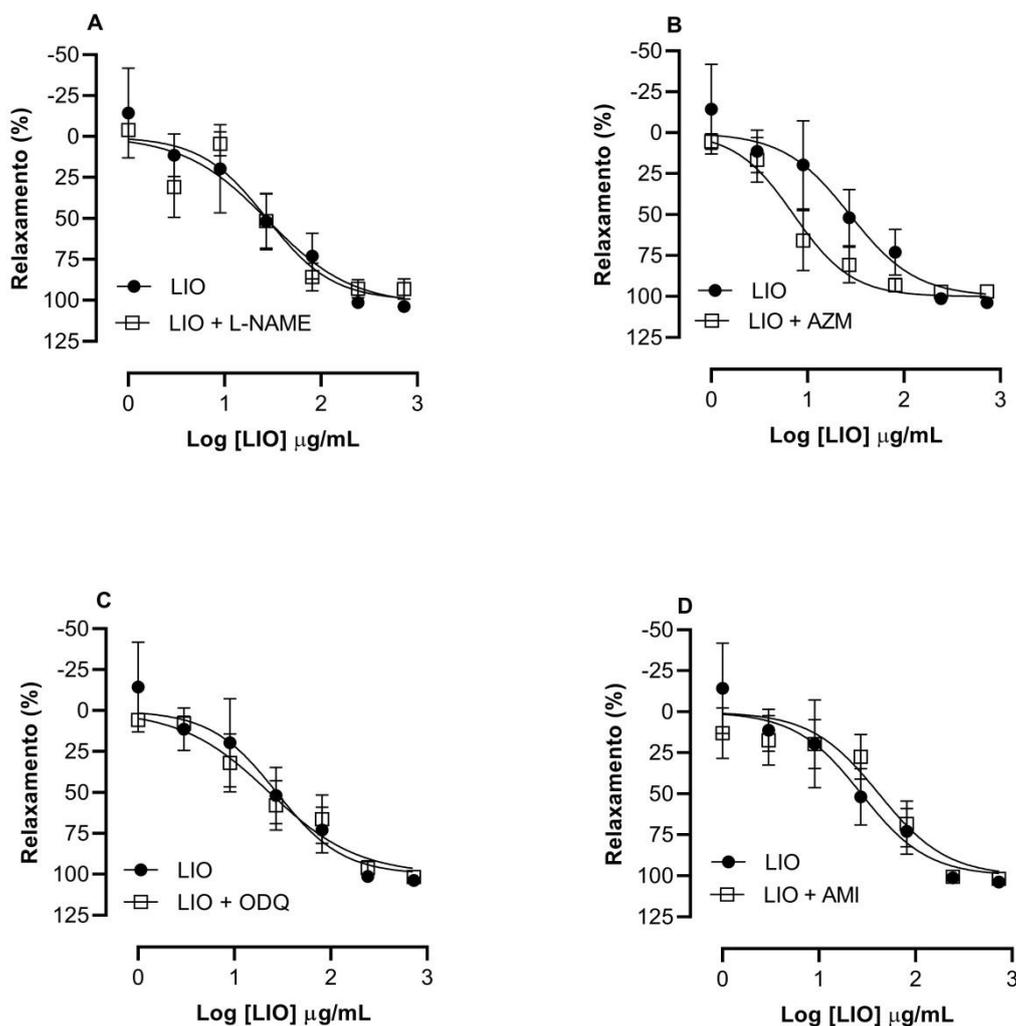


Fig. 5. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. insignis* (LIO) nas contrações isoladas do útero induzidas por 1 μM de carbacol na presença ou ausência de inibidores da via NO/GCS/GMPC/PKG: **A**, Éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME, 100 μM) inibidor da óxido nítrico sintase; **B**, azul de metileno (MB, 1 μM) inibidor solúvel da guanilil ciclase; **C**, 1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ, 10 μM) inibidor da guanilato ciclase e **D**, aminofilina (AMI, 10 μM) inibidor da fosfodiesterase. (n = 5); Dados expressos em média \pm SEM, respectivamente. *representa os efeitos significantes ($p < 0,05$, two-way ANOVA, seguindo de Holm-Sidak).

3.9 Influência do LIO na mobilização de cálcio

Quando o LIO foi pré-incubado com heparina, não foram observadas diferenças significativas com o $\log\text{CE}_{50} = 1,19 \pm 0,13$ (Fig. 6A) em comparação com as preparações sem o bloqueador ($\log\text{CE}_{50} = 1,43 \pm 0,16$), indicando que o LIO não está influenciando os IP₃R. Além disso, o efeito do LIO na mobilização de cálcio de estoques intracelulares e o meio extracelular foi investigado. Isto foi observado que o

LIO, nas concentrações 9 $\mu\text{g/mL}$ ($60,59 \pm 8,73$), 27 $\mu\text{g/mL}$ ($40,94 \pm 6,53$) e 81 $\mu\text{g/mL}$ ($3,03 \pm 1,36$), reduziu significativamente as contrações evocado por carbacol em meio livre de Ca^{2+} (Fig. 6B).

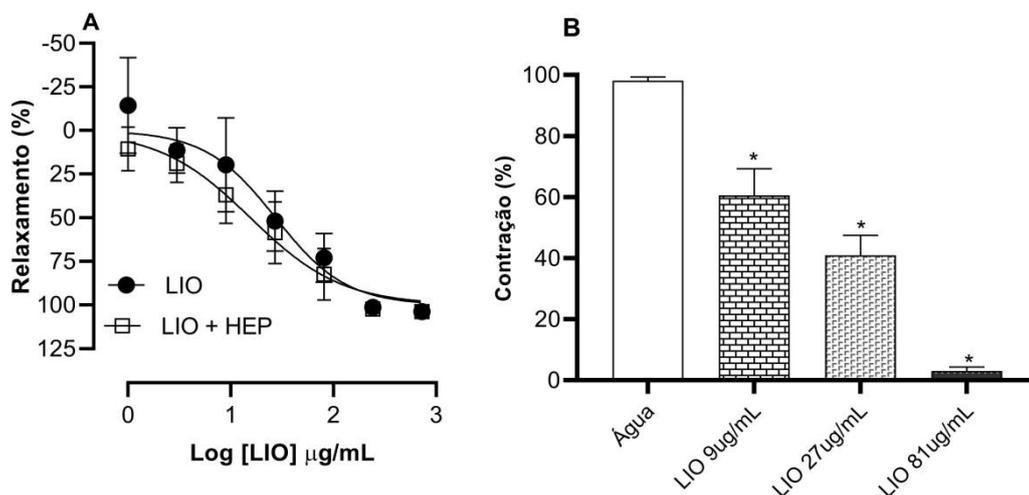


Fig. 6. Efeito do óleo essencial de *L.insignis* (LIO) na mobilização de Ca^{2+} nas contrações isolado do útero. **A**, efeito relaxante do LIO em $1\mu\text{M}$ de contrações induzidas por carbacol na ausência ou presença de heparina (HEP, $10\mu\text{M}$). Dados expressos como média \pm SEM, $n=5$. **B**, Efeito inibitório de óleo essencial de *L. insignis* em útero isolado contrações induzidas por $10\mu\text{M}$ de carbacol em meio despolarizante sem Ca^{2+} . Dados expressos como média \pm SEM, $n=5$. *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, não pareado teste *t de Student*) quando comparado com o controle (barra de H_2O).

3.10 Efeito do LIO no modelo experimental de dismenorréia primária

O tratamento com LIO (Fig. 7A), nas doses de 100 mg/kg ($11,67 \pm 0,95$) por via oral, induziu redução no número de contorções quando comparado ao veículo ($24,33 \pm 0,88$) apresentando diferença estatística significativa. Foram selecionados três medicamentos utilizados clinicamente na terapia primária da dismenorreia, e suas doses habituais utilizadas em testes em ratos foram baseadas na conversão de dose humano-animal (Nair e Jacob, 2016b). Nifedipina 7 mg/kg ($6,83 \pm 1,40$), ácido mefenâmico 90 mg/kg ($0,33 \pm 0,21$) e escopolamina 3,5 mg/kg ($9,33 \pm 0,49$) apresentaram diferença significativa no número de contorções quando comparados ao veículo (fig. 7B). O tratamento oral com LIO na dose de 10 mg/kg associado à nifedipina 0,7 mg/kg, escopolamina 0,35 mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg reduziu o número de contorções abdominais induzidas pela ocitocina ($3,33 \pm 0,95$, $13,5 \pm 0,95$ e $2,50 \pm 0,61$ respectivamente), mostrando diferenças significativas em relação ao veículo ($24,33 \pm 0,88$) (Fig. 7C).

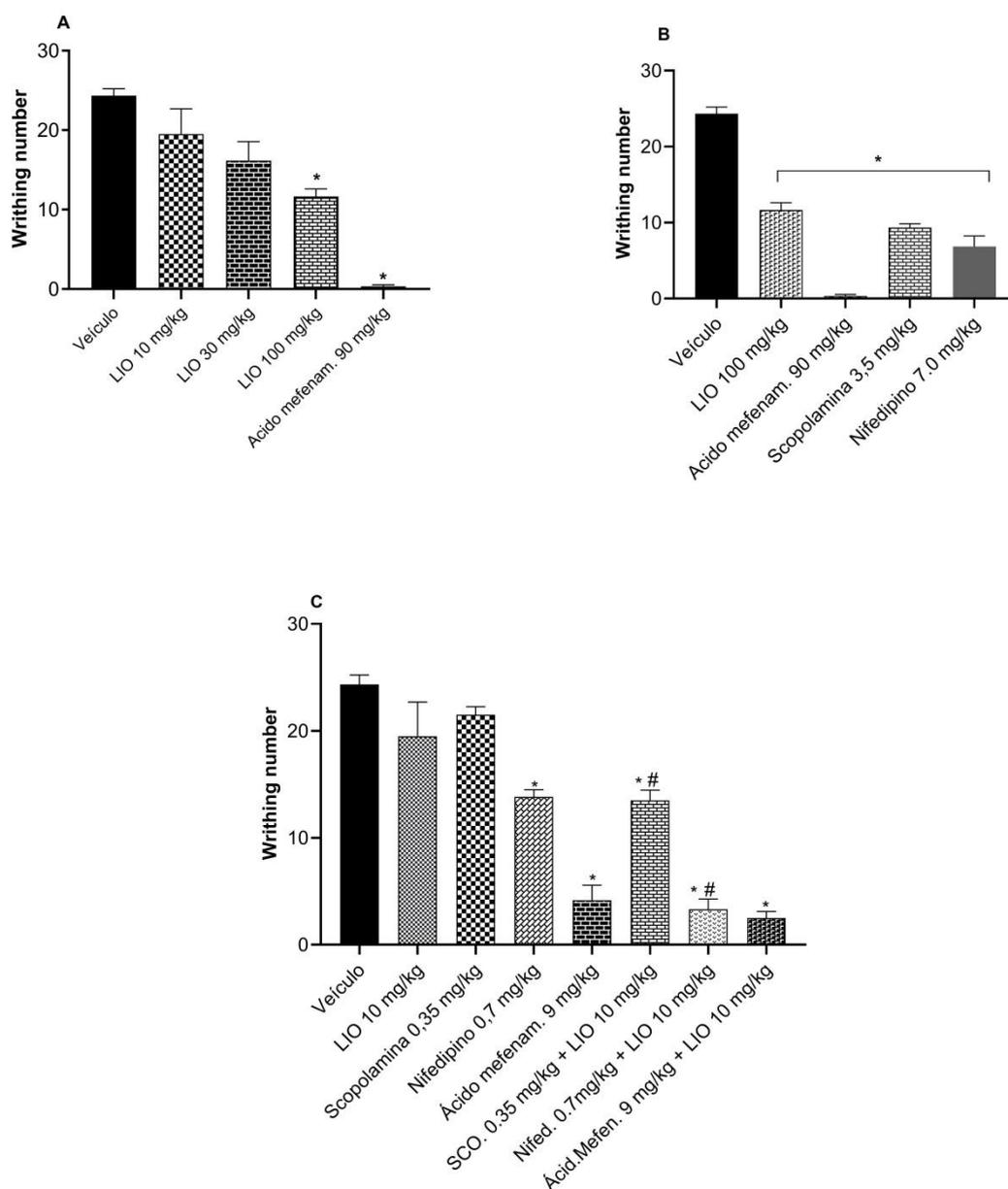


Fig. 7. Efeito inibitório do óleo essencial de *L.insignis* (LIO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina. Veículo, cremóforo a 3% diluído em solução salina a 0,9%. Todos os dados são apresentados como média \pm SEM, n=6: **A**, camundongos foram tratados nas doses 10, 30 e 100 mg/kg por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado ao Veículo; **B**, camundongos foram tratados por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) quando comparado ao Veículo; **C**, camundongos foram tratados por via oral; as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney; *efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao Veículo; #efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado com nifedipina ou escopolamina, respectivamente, sem tratamento com LIO.

4 DISCUSSÃO

A partir da análise química dos componentes do óleo essencial da espécie *Lippia insignis* Moldenke, foi possível identificar o monoterpeno timol como componente majoritário, seguido γ -terpineno, *p*-cimeno, *E*-ocimenona, β -mirceno e mircenona sendo os constituintes como potenciais marcadores sobre os possíveis efeitos do LIO em modelos farmacológicos.

Entre muitos constituintes, o timol, quimicamente conhecido como 2-isopropil-5-metilfenol, é um fenol monoterpeno aromático e é abundantemente encontrada em varias plantas aromática. Conforme Oliveira et al., (2019) um estudo realizado de caracterização química do óleo essencial de *L. insignis* Moldenke em diferentes épocas de colheita, demonstrou a presença do timol como o componente majoritário. Com relação à sua atividade biológica, na literatura existe uma série de trabalhos que relatam diversas propriedades desta molécula, dentre as quais podem ser citadas atividade antioxidante (Venu et al., 2013), bem como anti-inflamatórias, atividade cicatrizante, antinociceptiva e anestésica (Chauhan et al., 2014; Haeseler et al., 2002; Riella et al., 2012; Mendes et al., 2010).

Em uma revisão realizada por Ombito et al., (2014), sobre a composição química de algumas espécies do gênero *Lippia*, indica um grande potencial para atividades biológicas dos óleos essenciais dessas espécies, como fontes alternativas para aplicações na medicina e em outras áreas.

A *L. insignis* Moldenke (Verbenaceae) é uma espécie silvestre endêmica da região da Chapada Diamantina e encontra-se em estado vulnerável devido aos impactos das ações do ser humano sobre o ambiente, de forma exploratória, na região (Salimena and Múlgura, 2015). Assim como a maioria das espécies do seu gênero, *L. insignis* Moldenke é uma planta aromática, rica em óleo essencial composto por terpenos. Em relação ao Conhecimento etnobotânico, as espécies deste gênero são bastante utilizadas em todo o mundo como alimentos, bebidas, temperos e remédios; sendo grande parte das aplicações medicinais para problemas relacionados às queixas respiratórias, infecções pulmonares, tosse, resfriado e asma (Pascual et al., 2001).

Apesar do amplo uso de plantas medicinais voltado para a saúde em países em desenvolvimento, existem poucas informações sobre as propriedades toxicas das plantas medicinais (Araújo et al., 2017; Saad et al., 2006). Até no momento, nenhum estudo

sobre a toxicidade do óleo essencial da *L. insignis* Moldenke foi realizado. Assim, o presente estudo foi conduzido para avaliar sua toxicidade.

A mortalidade, alterações fisiológicas, aumento ou diminuição do consumo de ração e água e aumento do peso relativo dos órgãos, são critérios importantes na avaliação toxicológica (Asare et al., 2012). A administração do LIO, na dose 2g/kg, não apresentou nenhum efeito tóxico. A partir do teste realizado, foi possível estabelecer uma dose limite segura para os testes farmacológicos subsequentes.

Alguns autores sugerem que substâncias que modificam a atividade locomotora podem atuar no teste de campo aberto fornecendo informações sobre as substâncias (Silva et al., 2007). O teste do campo aberto é usado para avaliar não apenas comportamentos de ansiedade, mas também sedativo bem como efeitos de drogas na atividade locomotora (Okoli et al., 2010). Desta forma, decidimos estudar o efeito do LIO no teste de campo aberto, um modelo animal clássico usado para avaliar efeitos das drogas na atividade motora. Dessa forma o LIO nas doses 10, 30, 100 mg/kg não reduziu o número de reerings e grooming e nem houve alterações nos parâmetros motores (número de ambulação e tempo de imobilidade), indicando que o tratamento com LIO não promove efeito sedativo ou depressor sobre o sistema nervoso central dos animais.

O teste rota-rod trata-se de um modelo experimental clássico proposto para avaliar a coordenação motora ou bloqueio neuromuscular periférico (Estrada-Reyes et al., 2014; Martínez-Vázquez et al., 2012). Animais em condições normais, sem influência de substâncias que alteram o sistema nervoso central, podem ser mantidos por um longo período de tempo sobre a barra giratória. Assim, a partir do número de quedas esse teste é capaz de detectar danos neurológicos mínimos, tais como ataxia e sedação (Marques et al., 2014). Nossos achados mostraram que o LIO (10, 30 e 100 mg/kg), diferente do diazepam (2,5 mg/kg), não teve modificações na coordenação motora dos animais no teste rota rod. Dessa forma o LIO não promoveu alterações na coordenação motora dos animais.

É importante ressaltar que as comunidades tradicionais da Chapada Diamantina usam as plantas para o tratamento de várias doenças, incluindo cólicas menstruais. Como nossos dados mostraram nenhuma toxicidade do LIO sobre os parâmetros fisiológicos e no sistema nervoso central do LIO, realizamos uma avaliação

espasmolítica para avaliar o potencial de relaxamento do músculo liso uterino *in vitro*, evidenciando os usos tradicionais dessa planta.

Os resultados obtidos demonstraram que LIO apresentou efeito espasmolítico significativo, apresentando a capacidade de reduzir contrações, independentemente do agente contraturante utilizado. O LIO foi capaz de promover o relaxamento dos cornos uterinos isolados de rata pré-contraída com carbacol ou ocitocina ou cloreto de potássio, de uma maneira dependente da concentração.

Em útero de ratas e camundongas, a ocitocina e o carbacol causam uma resposta no útero, sendo que a contração inicial é desencadeada pela liberação de íons cálcio (Ca^{2+}) armazenados nas células, via IP_3 . Já a contração sustentada resulta da entrada de íons cálcio (Ca^{2+}) pelos canais de cálcio voltagem-dependentes (Ca_V). A abertura desses canais Ca_V é facilitada pela despolarização da membrana, impulsionada por uma interação entre fármacos e o processo eletromecânico.

A primeira etapa da contratilidade uterina é a ligação do agonista na proteína $\text{G}\alpha_q/11$ se liga à fosfolipase C- β , iniciando toda a cascata de estimulação do inositol-tris-fosfato e diacilglicerol. Essa estimulação inicia a saída de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, uma vez que ocorre a liberação de cálcio intracelular, a contração muscular é iniciada (Arrowsmith and Wray, 2014; Soboll et al., 2006).

Portanto, a ação relaxante do LIO foi não específica para os receptores, sugerindo que seu mecanismo de relaxamento não está ligado a um antagonismo competitivo nos receptores muscarínicos ou ocitocinas, o que indica a necessidade de explorar outros alvos importantes. Consequentemente, uma série de experimentos foi conduzida empregando bloqueadores farmacológicos em útero isolado de rata previamente contraído com carbacol, a fim de elucidar o possível mecanismo de ação relaxante do LIO.

Já é descrito na literatura que substâncias ativadoras de canais de K^+ relaxam a musculatura lisa, uma vez o efluxo de potássio leva à repolarização da membrana plasmática, responsável pela manutenção do potencial de repouso da membrana. A repolarização inadequada das células musculares lisas no miométrio pode levar a atividades uterinas aberrantes, como dismenorria e trabalho de parto prematuro (Brainard et al., 2007; Stott et al., 2014).

Os canais para potássio compreendem um grupo de proteínas que contribuem significativamente para a quiescência uterina. Nas células musculares lisas do

miotétrico, os mais abundantes e bem estudados incluem K_{Ca} , K_V , K_{ir} e K_{ATP} (Ferreira et al., 2019; Lorca et al., 2014). A variedade de canais para K^+ neste tecido refletem a multiplicidade e complexidade dos mecanismos envolvidos na regulação do tônus uterino (Brainard et al., 2007; Chan et al., 2014). Diante disso, resolveu-se avaliar uma possível participação dos canais de K^+ na ação tocolítica do LIO.

Nesse sentido, o efeito LIO foi alterado na presença do CsCl, um bloqueador de K_{ir} , indicando que esse canal para K^+ pode estar relacionado ao mecanismo de relaxamento de LIO no útero de ratas. Dentro da superfamília dos canais de potássio, os canais de potássio retificadores internos (K_{ir}) representam bons candidatos para a regulação do potencial de repouso da membrana (Crankshaw et al., 2017; McCloskey et al., 2014). Os canais de potássio retificadores internos são responsáveis por manter o potencial de membrana hiperpolarizado durante a quiescência uterina. Sem esse impulso hiperpolarizante, o útero se torna mais excitável (Smith et al., 2007).

A ativação de receptores adrenérgicos está ligada a diferentes vias de transdução de sinal e produção de segundos mensageiros, que podem levar a uma interação intracelular destas substâncias produzindo alterações na resposta celular. Isto ocorre principalmente com agonistas não seletivos α -adrenérgico e β -adrenérgico ou hormônios que se ligam a diferentes receptores (Engelhardt et al., 1997; Jana and Całka, 2021; Neto et al., 2006).

Uma via de sinalização fundamental para a manutenção do relaxamento do miotétrico é a via dependente de AMPc/PKA do AMPc. Enquanto os agonistas do receptor β_2 -adrenérgico estimulam a produção de AMPc no miotétrico, o que os torna uma escolha frequente no tratamento do parto prematuro, dismenorreia e pré-eclâmpsia, as fosfodiesterases locais (PDE) garantem o término do sinal através da degradação do AMPc em 5'-AMP inativo (Houslay and Adams, 2003). Dito isso, os resultados constataram que a curva de relaxamento, na presença dos bloqueadores propanolol e fentolamina, não alterou os efeitos relaxantes do LIO em preparações de útero isolado de rata, sugerindo que o mecanismo de ação do LIO não envolve a ativação de receptores adrenérgicos.

Uma via que também pode levar ao relaxamento, é ativação da via de óxido nítrico (NO)/guanilato ciclase solúvel (sGC)/monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). No trato genital feminino, a molécula de óxido nítrico é sintetizada pelo endométrio, miotétrico e placenta, apresentando envolvimento na regulação da fisiologia menstrual e

na quiescência uterina durante o período gestacional (Chwalisz and Garfield, 2000; Maul et al., 2005).

No músculo liso uterino, o NO ativa a guanilil ciclase solúvel (sCG), que por sua vez cliva e cicliza a guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP), que ativa a quinase dependente de cGMP (PKG), estimulando-a a fosforilar a PKA, culminando no relaxamento uterino (Zhao et al., 2015). Portanto, na presença do L-NAME, que atua inibindo a produção de óxido nítrico (NO), o LIO não apresentou diferença significativa em relação ao seu efeito sem o bloqueador. Isso sugere que o LIO não modula os níveis de NO para relaxar o útero isolado de ratas.

O azul de metileno, um inibidor não específico, pode inibir a guanilil ciclase solúvel no útero, levando ao aumento da contração muscular, o que pode ser útil em casos como sangramentos uterinos ou aborto induzido. No entanto, ele não afetou o efeito relaxante do LIO, sugerindo que o LIO modula o relaxamento uterino de forma independente da ativação da guanilil ciclase solúvel, devido à inibição parcial da sGC pelo azul de metileno (Hwang et al., 1998). Portanto, realizamos uma pré-incubação das tiras uterinas com ODQ, um bloqueador específico da guanilil ciclase solúvel (sGC). O efeito do LIO não foi afetado, o que sugere que a ativação da sGC não é necessária para o relaxamento da musculatura uterina (Buxton et al., 2001).

As fosfodiesterases são enzimas específicas que hidrolisam nucleotídeos cíclicos, determinando assim sua atividade. O equilíbrio entre as atividades de enzimas geradoras (nucleotídeos ciclases) e enzimas degradantes (fosfodiesterases) determina a atividade de fatores reguladores que afetam a atividade do órgão através de sistemas de segundo mensageiro (Beatty et al., 1979; Houslay and Adams, 2003). Estudos que utilizaram inibidores indicam que diferentes tipos de PDEs desempenham papéis distintos na regulação do tônus miométrial. A aminofilina, um inibidor não seletivo da PDE, bem conhecido por suas propriedades broncodilatadoras, foi utilizado como ferramenta farmacológica (Lugnier, 2006; Schmitz et al., 2007). Observa que aminofilina não alterou o efeito relaxante do LIO tanto na ausência quanto na presença da aminofilina sugerindo que a via dos nucleotídeos cíclicos PDEs não está envolvida no efeito relaxante induzido pelo LIO.

Na ausência de cálcio extracelular, a contração do músculo liso envolve a liberação de íons de cálcio a partir dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático (RS), que é ativada por receptores presentes na membrana do RS. Essa

ativação pode ocorrer através dos receptores de rianodina (RyR) (Lanner et al., 2010) e receptores de trifosfato de inositol (IP₃Rs), que medeiam o influxo de Ca²⁺ do RS para o citoplasma da célula (Vervloessem et al., 2015). Com resultado, observou-se que o LIO reduziu as contrações evocadas pelo carbacol em meio sem Ca²⁺, indicando uma provável inibição da liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares (Fig. 05 A). Diante da descoberta, decidiu-se realizar uma investigação sobre a contribuição dos receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃R).

A contração muscular lisa é um processo complexo que envolve a ativação de várias vias de sinalização. Uma delas é a via do inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que é uma molécula sinalizadora importante que desempenha um papel na contração da musculatura uterino. Sabe-se que a liberação de íons Ca²⁺ dos estoques intracelulares, pode ser produzida pela ativação de receptores de membrana (IP₃R), fazendo com que o influxo de cálcio ocorra levando à liberação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (Berridge et al., 2000). Portanto, a pré-incubação da heparina, um bloqueador dos receptores IP₃R, observou-se que o relaxamento promovido pelo LIO não foi alterado significativamente (Fig.05B), indicando que os canais para IP₃R ativados pelo inositol 1,4,5-trifosfato provavelmente não estão envolvidos no seu efeito.

A capacidade relaxante do LIO foi evidenciada por meio de estudos que empregaram úteros isolados de ratas. Com base nessas descobertas, o foco da investigação se voltou para examinar o papel do LIO em um modelo de dismenorreia primária, que se caracteriza por dor abdominal.

A dor observada na dismenorreia primária é atribuída à elevação ou anormal atividade uterina, caracterizada pela liberação de mediadores químicos, especialmente as prostaglandinas uterinas (Chen et al., 2013; Pan et al., 2014). A origem da dismenorreia está associada aos níveis séricos elevados de prostaglandina F₂α (PGF₂α), e leucotrienos, promovendo não apenas a intensa contração miometrial, mas também a vasoconstrição, resultando na liberação subsequente de citocinas (Chen et al., 2014; Deligeoroglou et al., 2006; Yang et al., 2015).

Portanto, há um crescente interesse na pesquisa para prevenção e tratamento da dismenorreia primária. Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), antiespasmódicos e os contraceptivos hormonais são a escolha comum para o tratamento da dismenorreia primária com alívio da dor e efeitos analgésicos, mas também podem causar dores de cabeça, náuseas, úlceras intestinais e anomalias plaquetárias (Chiang et al., 2020).

O modelo de contorções abdominais *in vivo*, induzida por ocitocina é utilizado para avaliar as contorções uterinas, o que é relevante no estudo da dismenorrea primária (Li et al., 2019). A dose de 100 mg/kg do LIO promoveu a redução estatisticamente significativa nas contorções abdominais induzidas pela ocitocina, em comparação ao grupo veículo. Esta ação provavelmente está relacionada à presença do monoterpenos como o timol componente majoritário, que foram identificados das partes aéreas das plantas através da análise por GC/FID e GC/MS (Tabela 01). Foi relatado que o timol possui efeito antiinflamatório, antiespasmódico entre outras atividades (Premrov Bajuk et al., 2022), quando utilizado individualmente. Considerando que a origem da dismenorrea primária está relacionada à produção e liberação de prostaglandinas (PGs) no músculo liso uterino (Li et al., 2019) é plausível que esses compostos químicos exerçam seus efeitos por meio da interação com os receptores de PG.

Com base nos dados apresentados na Figura 7B, os três medicamentos testados demonstraram efeito na redução das contorções abdominais induzidas pela ocitocina quando comparados ao grupo controle do veículo. O grupo tratado com ácido mefenâmico (MA) apresentou efeito estatisticamente significativo nas doses de 90 mg/kg, escopolamina (SCO) nas doses de 3,5mg/kg e a nifedipina (NIF) na dose de 7 mg/kg produziram efeito. As subdoses selecionadas para cada medicamento foram: MA (9 mg/kg), SCO (0,35 mg/kg) e NIF (0,7 mg/kg), utilizadas na continuação dos estudos.

NIF atua no útero bloqueando os canais de Ca^{2+} e impedindo o influxo desse íon para o meio intracelular, resultando na ausência de contração da musculatura lisa uterina (Wray, 2007). Portanto, sugere-se que o emprego de nifedipina pode contribuir para a melhoria da dor menstrual ao reduzir as contrações uterinas. Após o tratamento da subdose de 0,7 mg/kg de nifedipina associado a LIO de 10 mg/kg apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo veículo. Conforme indicado pelos nossos resultados, a associação de nifedipina oral com LIO resultou em uma diminuição no número de contorções em comparação ao tratamento exclusivo com nifedipina. A nifedipina é geralmente bem tolerada em mulheres com contrações uterinas prematuras, sendo dor de cabeça, rubor e inchaço os efeitos colaterais mais comuns (Ibrahim et al., 2021). É possível que a associação da dose de LIO de 10 mg/kg com nifedipina 0,7 mg/kg resulte na atenuação dos efeitos colaterais da nifedipina.

O tratamento hoje em dia para dismenorreia primária baseia-se no uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como o ácido mefenâmico que exerce sua ação principalmente através da inibição da ciclooxigenase impedindo a formação das prostaglandinas (COX) (Ju et al., 2022). Em nosso estudo, o tratamento com LIO na dose de 10 mg/kg associado com a subdose de 9 mg/kg de ácido mefenâmico apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo veículo.

A escopolamina é classificada como substância anticolinérgica que age nos receptores muscarínicos inibindo os efeitos da acetilcolina, sendo considerada como antagonista não seletivo o que pode aliviar cólicas menstruais (Lakstygil et al., 2018). Quando empregada a escopolamina, nossos resultados mostraram que a combinação do LIO na dose de 10 mg/kg associado com a subdose de 0,35 mg/kg de escopolamina teve efeito significativo quando comparado ao grupo veículo, mostrando que os receptores muscarínicos podem influenciar o efeito de LIO no número de contorções. Após seleção das subdoses, e de acordo com os dados apresentados pode-se observar que a associação do LIO com a subdose dos três medicamentos testados em doses subterapêuticas demonstrou efeito estatisticamente significativo na redução das contorções abdominais induzidas pelo ocitocina, quando comparado ao grupo controle veículo. Uma estratégia para mitigar os efeitos adversos é o uso de técnicas combinadas de medicamentos fixos, possibilitando a redução das doses administradas e, por conseguinte, diminuindo a incidência de efeitos adversos.

5 CONCLUSÃO

Verificou-se que o óleo essencial de *Lippia insignis* (LIO) possui atividade tocolítica em úteros isolados, sendo capaz de reduzir as contrações, reduzindo principalmente as contorções sem afetar a coordenação motora ou a mobilidade dos animais. Além disso, o LIO não apresentou toxicidade oral em dose única. Este estudo também demonstrou que o LIO reduziu potencialmente o número de contorções abdominais, indicando que o LIO pode ser útil no tratamento da dismenorreia primária. A combinação de dose fixa de LIO associada a doses subterapêuticas de três medicamentos utilizados na terapia antidismenorréica indica uma possível solução para minimizar os efeitos adversos desses medicamentos. Essa atividade do LIO pode ser

atribuída ao timol, que é o principal constituinte do LIO, e foram relatados seus efeitos e constituintes antiinflamatórios e analgésicos, que apresentam atividade farmacológica na musculatura lisa de diferentes órgãos.

RERERENCIAS

- Aaronson, P.I., Sarwar, U., Gin, S., Rockenbauch, U., Connolly, M., Tillet, A., Watson, S., Liu, B., Tribe, R.M., 2006. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706644>
- Acheampong, K., Baffour-Awuah, D., Ganu, D., Appiah, S., Pan, X., Kaminga, A., Liu, A., 2019. Prevalence and predictors of dysmenorrhea, its effect, and coping mechanisms among adolescents in Shai Osudoku district, Ghana. *Obstet. Gynecol. Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/5834159>
- Agência de Vigilância Sanitária, 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Anvisa 1–48.
- Almeida, R.N., 1999. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev. Bras. Farmácia* 80, 72–76.
- Araújo, M.C. de P.M., Barcellos, N.M.S., Vieira, P.M. de A., Gouveia, T.M., Guerra, M.O., Peters, V.M., Saúde-Guimarães, D.A., 2017. Acute and sub chronic toxicity study of aqueous extract from the leaves and branches of *Campomanesia velutina* (Cambess) O. Berg. *J. Ethnopharmacol.* 201, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.043>
- Arrowsmith, S., Wray, S., 2014. Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. *J. Neuroendocrinol.* <https://doi.org/10.1111/jne.12154>
- Asare, G.A., Gyan, B., Bugyei, K., Adjei, S., Mahama, R., Addo, P., Otu-Nyarko, L., Wiredu, E.K., Nyarko, A., 2012. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. *J. Ethnopharmacol.* 139, 265–272.
- Bailie, C.A.L., Vedernikov, Y.P., Saade, G.R., Garfield, R.E., 2002. Prostaglandin-induced activation of uterine contractility in pregnant rats does not involve potassium channels. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186, 453–457. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.120484>
- Beatty, C.H., Bocek, R.M., Herrington, P.T., 1979. Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in myometrium from pregnant and spayed rhesus monkeys. *Reproduction* 55, 391–400.
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of

- calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 1, 11–21.
- Brainard, A.M., Korovkina, V.P., England, S.K., 2007. Potassium channels and uterine function, in: *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Elsevier, pp. 332–339.
- Bresnitz, W., Lorca, R.A., 2022. Potassium Channels in the Uterine Vasculature: Role in Healthy and Complicated Pregnancies. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23169446>
- Buxton, I.L.O., Kaiser, R.A., Malmquist, N.A., Tichenor, S., 2001. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br. J. Pharmacol.* 134, 206–214.
- Chan, Y., van den Berg, H.A., Moore, J.D., Quenby, S., Blanks, A.M., 2014. Assessment of myometrial transcriptome changes associated with spontaneous human labour by high-throughput RNA-seq. *Exp. Physiol.* 99, 510–524.
- Chauhan, A.K., Jakhar, R., Paul, S., Kang, S.C., 2014. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis. *Int. Immunopharmacol.* 18, 340–346.
- Chen, H.-Y., Lin, Y.-H., Su, I.H., Chen, Y.-C., Yang, S., Chen, J., 2014. Investigation on Chinese herbal medicine for primary dysmenorrhea: implication from a nationwide prescription database in Taiwan. *Complement. Ther. Med.* 22, 116–125.
- Chen, Y., Cao, Y., Xie, Y., Zhang, X., Yang, Q., Li, X., Sun, J., Qiu, P., Cao, W., Wang, S., 2013. Traditional Chinese medicine for the treatment of primary dysmenorrhea: How do Yuanhu painkillers effectively treat dysmenorrhea? *Phytomedicine* 20, 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.05.003>
- Chiang, Y.F., Hung, H.C., Chen, H.Y., Huang, K.C., Lin, P.H., Chang, J.Y., Huang, T.C., Hsia, S.M., 2020. The inhibitory effect of extra virgin olive oil and its active compound oleocanthal on prostaglandin-induced uterine hypercontraction and pain—ex vivo and in vivo study. *Nutrients* 12, 1–16. <https://doi.org/10.3390/nu12103012>
- Chwalisz, K., Garfield, R.E., 2000. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum. Reprod.* 15, 96–111.
- Crankshaw, D.J., Crosby, D.A., Morrison, J.J., 2017. Effects of the KIR7.1 Blocker VU590 on Spontaneous and Agonist-Induced Contractions of Human Pregnant Myometrium. *Reprod. Sci.* D.J., Crosby, D.A., Morrison, J.J., 2017. Eff. KIR7.1

- Blocker VU590 Spontaneous Agon. Contract. Hum. Pregnant Myometrium. *Reprod. Sci.* 24, 1402–1409. <https://doi.org/10.1177/193371911668765> 24, 1402–1409. <https://doi.org/10.1177/1933719116687657>
- Daniels, S.E., Talwalker, S., Torri, S., Snabes, M.C., Recker, D.P., Verburg, K.M., 2002. Valdecoxib, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, is effective in treating primary dysmenorrhea. *Obstet. Gynecol.* 100, 350–358.
- de Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., de Freitas Lins Neto, E.M., de Melo, J.G., dos Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>
- Deligeoroglou, E., Tsimaris, P., Deliveliotou, A., Christopoulos, P., Creatsas, G., 2006. Menstrual disorders during adolescence. *Pediatr. Endocrinol. Rev. PER* 3, 150–159.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice** College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* 46, 208–209.
- E., F.-M., M.D., O.-Z., M., L.P.-F., 2018. Lifestyle and prevalence of dysmenorrhea among Spanish female university students. *PLoS One*.
- Engelhardt, S., Zieger, W., Kassubek, J., Michel, M.C., Lohse, M.J., Brodde, O.-E., 1997. Tocolytic therapy with fenoterol induces selective down-regulation of β -adrenergic receptors in human myometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1235–1242.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O.A., Dorantes-Barrón, A.M., Heinze, G., Moreno Aguilar, J., Martínez-Vázquez, M., 2014. Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of *Agastache mexicana*; An ethnomedicine of Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 153, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.057>
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., 2012. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.041>
- Evora, P.R.B., 2016. Methylene blue is a guanylate cyclase inhibitor that does not interfere with nitric oxide synthesis. *Texas Hear. Inst. J.*

<https://doi.org/10.14503/THIJ-15-5629>

- Fanning, R.A., Sheehan, F., Leyden, C., Duffy, N., Iglesias-Martinez, L.F., Carey, M.F., Campion, D.P., O'Connor, J.J., 2017. A role for adrenergic receptors in the uterotonic effects of ergometrine in isolated human term nonlaboring myometrium. *Anesth. Analg.* 124, 1581–1588. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001765>
- Ferreira, J.J., Butler, A., Stewart, R., Gonzalez-Cota, A.L., Lybaert, P., Amazu, C., Reinl, E.L., Wakle-Prabakaran, M., Salkoff, L., England, S.K., Santi, C.M., 2019. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na⁺-activated K⁺ channel, Slo2.1. *J. Physiol.* 597, 137–149. <https://doi.org/10.1113/JP276806>
- Fox, M.C., Klipping, C., Nguyen, A.M., Frenkl, T.L., Cruz, S.M., Wang, Y., Korver, T., 2019. A phase 2b multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of vaginal rings containing norgestrel acetate or etonogestrel and 17 β -estradiol in the treatment of women with primary dysmenorrhea. *Contraception* 99, 125–130.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K., Mayer, B., 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*
- Guimarães, I., Póvoa, A.M., 2020. Primary dysmenorrhea: assessment and treatment. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 42, 501–507.
- Haeseler, G., Maue, D., Grosskreutz, J., Bufler, J., Nentwig, B., Piepenbrock, S., Dengler, R., Leuwer, M., 2002. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. *Eur. J. Anaesthesiol.* 19, 571–579.
- Hirsh, L., Dantes, A., Suh, B.S., Yoshida, Y., Hosokawa, K., Tajima, K., Kotsuji, F., Merimsky, O., Amsterdam, A., 2004. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs, in: *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.026>
- Houslay, M.D., Adams, D.R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370, 1–18.
- Hughes, S.J., Hollingsworth, M., 1997. Relaxin as a relaxant of the isolated rat uterus: Comparison with its mechanism of action in vivo. *Gen. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00005-0)

- Hwang, T.L., Wu, C.C., Teng, C.M., 1998. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702181>
- Ibrahim, M.H., Elfaki, T., Elhassan, E.M., Abdelrahiem, S.K., Adam, I., 2021. The effectiveness of nifedipine/indomethacin combination therapy and nifedipine monotherapy for postponing preterm birth (25-34 weeks of gestation) in Sudanese women: a randomized clinical trial study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth* 21, 457. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-03951-x>
- Jana, B., Całka, J., 2021. Role of beta-adrenergic receptor subtypes in pig uterus contractility with inflammation. *Sci. Rep.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91184-5>
- Ju, Z., Li, M., Xu, J., Howell, D.C., Li, Z., Chen, F.-E., 2022. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. *Acta Pharm. Sin. B* 12, 2790–2807.
- Khan, R.N., Matharoo-Ball, B., Arulkumaran, S., Ashford, M.L.J., 2001. Potassium channels in the human myometrium. *Exp. Physiol.* <https://doi.org/10.1113/eph8602181>
- Lai, P.F., Young, R.C., Tribe, R.M., Johnson, M.R., 2021. Evaluating aminophylline and progesterone combination treatment to modulate contractility and labor-related proteins in pregnant human myometrial tissues. *Pharmacol. Res. Perspect.* 9, 1–18. <https://doi.org/10.1002/prp2.818>
- Lakstygala, A.M., Kolesnikova, T.O., Khatsko, S.L., Zabegalov, K.N., Volgin, A.D., Demin, K.A., Shevyrin, V.A., Wappler-Guzzetta, E.A., Kalueff, A. V., 2018. Dark classics in chemical neuroscience: atropine, scopolamine, and other anticholinergic deliriant hallucinogens. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 2144–2159.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003996.
- Li, M., Bi, J., Lv, B., Zheng, W., Wang, Z., Xiao, W., Sun, Y., Li, E., 2019. An experimental study of the anti-dysmenorrhea effect of Chinese herbal medicines used in Jin Gui Yao Lue. *J. Ethnopharmacol.* 245, 112181.
- Lorca, R.A., Prabakaran, M., England, S.K., 2014. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Front. Physiol.*

<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00289>

- Lugnier, C., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Marques, T.H.C., Branco, M.L.B.G.C., Medeiros, J.-V.R., Lima, T.C., de Sousa, D.P., de Freitas, R.M., 2014. Anticonvulsant effects of acute treatment with cyane-carvone at repeated oral doses in epilepsy models. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 421–424.
- Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Martínez-Laurrabaquio, A., López-Rubalcava, C., Heinze, G., 2012. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L.(Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 141, 908–917.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G., Garfield, R., 2005. Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery. *Curr. Pharm. Des.* 9, 359–380. <https://doi.org/10.2174/1381612033391784>
- McCloskey, C., Rada, C., Bailey, E., McCavera, S., van den Berg, H.A., Atia, J., Rand, D.A., Shmygol, A., Chan, Y., Quenby, S., 2014. The inwardly rectifying K⁺ channel KIR 7.1 controls uterine excitability throughout pregnancy. *EMBO Mol. Med.* 6, 1161–1174.
- Menezes, P.M.N., Araújo, T.C. de L., Pereira, E.C.V., Neto, J.A., Silva, D.S., Brito, M.C., Lima, K.S.B., Monte, A.P.O. do, Matos, M.H.T. de, Lima, R.S. de, Ribeiro, L.A. de A., Silva, F.S., Rolim, L.A., 2021. Investigation of antinociceptive, antipyretic, antiasthmatic, and spasmolytic activities of Brazilian *Cannabis sativa* L. roots in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 278. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114259>
- Munglue, P., Eumkep, G., Wray, S., Kupittayanant, S., 2013. The effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and L-citrulline on rat uterine contractility. *Reprod. Sci.* 20, 437–448. <https://doi.org/10.1177/1933719112459223>
- Nair, A., Jacob, S., 2016a. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Nair, A., Jacob, S., 2016b. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 7, 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>

- Naseri, M.K.G., Mohammadian, M., Naseri, Z.G., 2008. Antispasmodic effect of *Physalis alkekengi* fruit extract on rat uterus. *Iran. J. Reprod. Med.* 6, 193–198.
- Neto, M.A., Rascado, R.R., Bendhack, L.M., 2006. RECEPTORES b-ADRENÉRGICOS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR. *Bibl. Esc. em Rev.* 39, 3–12.
- Okoli, C.O., Onyeto, C.A., Akpa, B.P., Ezike, A.C., Akah, P.A., Okoye, T.C., 2010. Neuropharmacological evaluation of *Annona senegalensis* leaves. *African J. Biotechnol.* 9, 8435–8444. <https://doi.org/10.5897/AJB10.033>
- Oliveira, A.R.M.F. de, Oliveira, L.M. de, Carneiro, J.S., Silva, T.R. dos S., Costa, L.C. do B., 2019. Leaf Anatomy and Essential Oil Production in Native Species of *Lippia*. *BRAZILIAN J. Agric. - Rev. Agric.* 93, 324. <https://doi.org/10.37856/bja.v93i3.3238>
- Ombito, J.O., Salano, E.N., Yegon, P.K., Ngetich, W.K., Mwangi, E.M., 2014. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). *J. Sci. Innov. Res* 3, 460–466.
- Pan, J.-C., Tsai, Y.-T., Lai, J.-N., Fang, R.-C., Yeh, C.-H., 2014. The traditional Chinese medicine prescription pattern of patients with primary dysmenorrhea in Taiwan: a large-scale cross sectional survey. *J. Ethnopharmacol.* 152, 314–319.
- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- Pellow, J., Nienhuis, C., 2018. Medicinal plants for primary dysmenorrhoea: A systematic review. *Complement. Ther. Med.* 37, 13–26.
- Premrov Bajuk, B., Prem, L., Vake, T., Žnidaršič, N., Snoj, T., 2022. The effect of thymol on acetylcholine-induced contractions of the rat ileum and uterus under ex vivo conditions. *Front. Pharmacol.* 13, 990654.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Riella, K.R., Marinho, R.R., Santos, J.S., Pereira-Filho, R.N., Cardoso, J.C., Albuquerque-Junior, R.L.C., Thomazzi, S.M., 2012. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 143, 656–663.
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O., 2006. Safety of traditional Arab herbal

- medicine. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 3, 433–439.
- Salimena, F.R.G., Múlgura, M.E., 2015. Notas sobre o gênero *Lippia* (Verbenaceae) no Brasil. Bol. Botânica 33, 45–49.
- Schmitz, T., Souil, E., Hervé, R., Nicco, C., Batteux, F., Germain, G., Cabrol, D., Evain-Brion, D., Leroy, M.-J., Méhats, C., 2007. PDE4 inhibition prevents preterm delivery induced by an intrauterine inflammation. J. Immunol. 178, 1115–1121.
- Silva, M.I.G., de Aquino Neto, M.R., Teixeira Neto, P.F., Moura, B.A., do Amaral, J.F., de Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M.M., de Sousa, F.C.F., 2007. Central nervous system activity of acute administration of isopulegol in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 88, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.07.015>
- Smith, R.C., McClure, M.C., Smith, M.A., Abel, P.W., Bradley, M.E., 2007. The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. Reprod. Biol. Endocrinol. 5, 1–12.
- Soboll, G., Shen, L., Wira, C.R., 2006. Expression of Toll-like receptors (TLR) and responsiveness to TLR agonists by polarized mouse uterine epithelial cells in culture. Biol. Reprod. 75, 131–139.
- Song, T., Hao, Q., Zheng, Y.M., Liu, Q.H., Wang, Y.X., 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates TRPC3 channels to cause extracellular Ca^{2+} influx in airway smooth muscle cells. Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00148.2015>
- Stott, J.B., Jepps, T.A., Greenwood, I.A., 2014. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. Drug Discov. Today. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.003>
- Sun, L., Liu, L., Zong, S., Wang, Z., Zhou, J., Xu, Z., Ding, G., Xiao, W., Kou, J., 2016. Traditional Chinese medicine Guizhi Fuling capsule used for therapy of dysmenorrhea via attenuating uterus contraction. J. Ethnopharmacol. 191, 273–279.
- Trindade, S.C., Pereira-Filho, J.N., Barreto Neto, L.O., Moura, T.B. de O., Farias, A.P.F. de, Rocha Filho, J.T.R., Santos, R.P.B., Magalhães, A.O., Santos-Lima, E.K.N. dos, Carvalho-Filho, P.C., 2021. Antimicrobial activity of methanol extracts from different species of the genus *Lippia*.
- Venu, S., Naik, D.B., Sarkar, S.K., Aravind, U.K., Nijamudheen, A., Aravindakumar, C.T., 2013. Oxidation reactions of thymol: a pulse radiolysis and theoretical study.

- J. Phys. Chem. A 117, 291–299.
- Vervloessem, T., Yule, D.I., Bultynck, G., Parys, J.B., 2015. The type 2 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca^{2+} -release channel. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 1853, 1992–2005.
- Wray, S., 2007. Insights into the uterus. *Exp. Physiol.* 92, 621–631. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2007.038125>
- Yang, L., Cao, Z., Yu, B., Chai, C., 2015. An in vivo mouse model of primary dysmenorrheal. *Exp. Anim.* <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0111>
- Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W.S., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 83–94.
- Zhou, H., Chepilko, S., Schütt, W., Choe, H., Palmer, L.G., Sackin, H., 1996. Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba^{2+} block. *Am. J. Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.6.c1949>

CAPITULO 2**ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia lasiocalycina*
Cham (Verbenaceae) EM ÚTERO DE RATAS**

Cícero André Ferreira Macêdo^a, Tiago Feitosa Ribeiro^c, Nathália Andrezza Carvalho de Souza^c, Táris Maria Macedo de Santana^d, Angélica Maria Lucchese^d, Fernanda Pires Rodrigues de Almeida Ribeiro^b, Fabrício Souza Silva^{ab*}

^a Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Brazil

^b Laboratório de Farmacologia Experimental, Colegiado de Farmácia – Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) – Brazil

^c Rede Nordeste de Biotecnologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Brazil.

^d Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Ciências Exatas – Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Brazil

RESUMO

O gênero *Lippia* é bastante utilizado na medicina popular para o tratamento de indigestão, diarreia, cólicas menstruais e inflamações uterinas devido às suas propriedades farmacológicas, mas, muitas espécies carecem de estudos elucidativos a respeito de suas propriedades. **Objetivo:** investigar o efeito do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* Cham (LLO), nas atividades espasmolítica, antidismenorreico em roedores. **Métodos:** Nos ensaios de toxicidade dose única administrou LLO na dose de 2.000 mg/kg por via oral. Para avaliar a coordenação motora e a mobilidade, foram utilizados os testes rota-rod e campo aberto, respectivamente. Avaliou o efeito espasmolítico por meio de ensaios *in vitro* com útero isolado de ratas. A dismenorrea foi estabelecida pela injeção de cipionato de estradiol em camundongas fêmeas. **Resultados:** No estudo de toxicidade em dose única, a administração de 2.000 mg/kg de LLO não apresentou sinais clínicos de toxicidade ou óbitos. Os testes de coordenação motora e mobilidade não revelaram efeitos adversos. Na presença de agonistas, o LLO relaxou o útero de rata pré-contraída com OCT ($\log CE_{50} = 2,32 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$), CCh ($\log CE_{50} = 2,33 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) e KCl 60 mM ($\log CE_{50} = 2,91 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$) reduziu as contrações, independentemente do agente contraturante utilizado. A pré-incubação de bloqueadores 4-AP, CsCl, GLIB, TEA, propranolol, fentolamina, L-NAME, azul de metileno, ODQ e heparina não alterou significativamente o efeito relaxante do LLO. Já na presença de aminofilina houve diferença significativa entre os valores das $\log CE_{50}$, quando comparado com o LLO sem os bloqueadores. A pré-incubação com LLO em meio livre de Ca^{2+} nas concentrações de 27 $\mu\text{g/mL}$ ou 81 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a contração induzida pelo carbacol. No modelo *in vivo* de dismenorrea observou-se que o tratamento por via oral do LLO na dose de 100 mg/kg foi capaz de promover uma redução estatisticamente significativa. Já o tratamento do LLO 10 mg/kg associado com a subdose de escopolamina 0,35 mg/kg, nifedipino 0,7 mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg inibiu as contorções em camundongos. **Conclusão:** Constatou-se que o LLO não apresenta toxicidade, possui atividade tocolítica em útero isolado de rata. No modelo *in vivo*, observou-se que o tratamento com LLO reduziu o número de contorções abdominais induzidas pela ocitocina em camundongos fêmeas, indicando que o LLO pode ser potencialmente útil no tratamento da dismenorrea primária, apoiando o uso desta planta no tratamento de cólica.

Palavras-chave: Planta medicinal; Tocolítica; Útero; Dismenorreia

1 INTRODUÇÃO

A menstruação é um ciclo fisiológico normal que ocorre nas mulheres a cada 28 dias e que pode levar a um desconforto pélvico, embora sem inabilitá-las ou afetá-las da sua atividade diária normal. Por outro lado, a dismenorreia é uma queixa ginecológica comum em mulheres e causa dor abdominal afetando a qualidade de vida e o desempenho na escola ou trabalho das mulheres com o dismenorreia (Acheampong et al., 2019; Bettendorf et al., 2008; Fernández-Martínez et al., 2018).

A fisiopatologia da dismenorreia primária não está completamente esclarecida. Uma das teorias para explicar é a superprodução de prostaglandinas uterinas (PGs), que intensifica as contrações uterinas normais (Iacovides et al., 2015).

Devido à etiologia da dismenorreia primária baseada em PGs, os atuais agentes farmacológicos de primeira linha para o tratamento da dismenorreia primária incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e contraceptivos hormonais (Kho and Shields, 2020), podendo gerar efeitos adversos em longo prazo envolvendo os transtornos hepáticos, sistema gastrointestinal e renal (Chou et al., 2016; Drini, 2017; Utzeri and Usai, 2017). Dessa forma, existe uma clara necessidade de investigação de processos, mecanismos e moléculas que venham auxiliar no controle da doença, atenuando esses distúrbios.

Diante das reações provocadas com o uso dos medicamentos anti-inflamatórios, a pesquisa por novos tratamentos que alivia a sintomatologia sem efeitos colaterais, tornou-se crescente, sendo as plantas medicinais as principais fontes de novas pesquisas para obtenção de novos fármacos disponíveis no mercado.

O gênero *Lippia*, com espécies ricas em óleos essenciais, é amplamente utilizado como relaxante muscular e para o tratamento de bronquite, tosse e resfriados. Diversos estudos das mais diversas áreas do conhecimento estão confirmando as propriedades terapêuticas já explanadas pela medicina popular (de Albuquerque et al., 2007).

Considerando a escassez de dados científicos e o crescente interesse farmacológico, este estudo tem como objetivo investigar a atividade espasmolítica do óleo essencial de *Lippia lasiocalycina* Cham (*Verbenaceae*) (LLO) em útero isolada de ratas, direcionando sua aplicação para o tratamento da dismenorreia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração do óleo essencial

Partes aéreas de *L. lasiocalycina* Cham. (HUEFS 240988, SISGEN Cadastro nº A1C1DEB) foram coletadas durante a manhã, em Janeiro de 2019, em plantas floridas e mantidas sob cultivo no Horto Florestal (12°16'10.3"S 38°56'18.8"W), na cidade de Feira de Santana, a 234 metros acima do nível do mar, com temperatura média anual de 24°C e uma taxa de precipitação média de 848 mm por ano.

A planta foi seca à temperatura ambiente até peso constante (aproximadamente 72h). Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação, em triplicata, com algumas modificações (Silva et al., 2016). Resumidamente, 100g de folhas moídas foram extraídas com 1000 mL de água por 3h em aparelho tipo Clevenger. O óleo extraído foi seco com sulfato de sódio anidro. O rendimento da extração foi calculado em mL de óleo por 100 g de material seco. Um analisador de umidade (Série ID Marte® Versão 1.8) foi utilizado para determinar o teor de água residual das folhas secas. O óleo coletado foi então armazenado em frascos lacrados a -20 °C e protegido da luz com papel alumínio após análise (LAPRON).

2.2 Determinação da composição do óleo essencial

O óleo essencial foi analisado por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC/FID) e cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC/MS), conforme Silva et al., (2016), com algumas modificações. Amostras (20 mg) foram diluídas em 1mL de acetato de etila e 1µL do volume foi injetado. A análise quantitativa foi realizada em um modelo Shimadzu® CG-2010, com detector FID e coluna Rtx-5 (30 m × 0,25 mm de diâmetro interno, filme de 0,25 µm). As temperaturas do FID e do injetor foram de 240°C e 220°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada para 60°C com aumento de 3°C/min até atingir 240°C, e então mantida por 20 min. O gás de arraste foi o hélio a uma vazão de 1 mL/min, em modo split na proporção de 1:20. Os resultados são expressos em porcentagem relativa de cada constituinte, calculada pela normalização das áreas dos picos cromatográficos.

A análise qualitativa foi realizada em um modelo Shimadzu GC-2010, acoplado a um modelo de detector de massa GC/MS-QP 2010 Shimadzu com coluna capilar DB-5 m (30m×0,25mm×0,25µm). A porta do injetor foi aquecida a 220°C e as injeções

foram realizadas em modo split na proporção de 1:50. A temperatura do forno foi programada para 60°C com aumento de 3°C/min até 240°C, sendo então mantida por 20 min. O gás de arraste foi o hélio a um fluxo constante de 1mL/min. A temperatura da fonte de ionização foi mantida em 240°C, a energia de ionização em 70 eV e a corrente de ionização em 0,7kV. Os índices de retenção dos compostos separados foram determinados com base em uma série homóloga de n-alcenos (C8-C24). A identificação dos constituintes foi realizada por comparação de índices de retenção (índices de Kovats) com dados da literatura (Adams, 2017) e por correspondência de massa espectral com bibliotecas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST21 e NIST107).

2.3 Animais

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco (CEUA-UNIVASF) sob o número 0004/261120. Ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos e virgens, com idades entre 6 e 8 semanas e pesando entre 150 e 250g, juntamente com camundongos fêmeas da linhagem Swiss (*Mus musculus*), também adultos e virgens, com idades entre 4 e 6 semanas e pesando entre 25 e 35g, foram adquiridos do biotério central da UNIVASF. Esses animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada de 22±2°C e um ciclo de iluminação de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Receberam ração (LABINA, Purina do Brasil Ltda, Brasil) e água *ad libitum* e todas as atividades experimentais foram realizadas entre as 7:00 e as 17:00 horas.

2.4 Estudos de toxicidade aguda

Neste ensaio, o LLO na dose de 2000 mg/kg (n=5) foi administrado por gavagem, paralelamente, um grupo, com o mesmo número de animais, foi tratado com veículo (salina e 3% cremofor 0,1 mL/10g/v.o). Os animais foram observados periodicamente durante as primeiras 24 horas (30, 60, 90, 120, 240, 480 e 720 minutos) após o tratamento e depois uma vez ao dia durante 14 dias. Ao final do período de observação, todos os animais foram anestesiados (xilazina 10–15 mg/kg e cetamina 100–150 mg/kg) e os órgãos (coração, baço, fígado, estômago, pâncreas e rins) foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente. Também avaliou outros

parâmetros, como peso corporal, ingestão alimentar e hídrica, diariamente, ao longo do estudo ((OECD), 2008; Agência de Vigilância Sanitária, 2013).

2.5 Teste do campo aberto

Os animais foram tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), LLO (10, 30 e 100 mg/kg, v.o.) ou diazepam (2,5 mg/kg, i.p.) e 30 min após o tratamento cada camundongo fêmea foi colocado no centro do campo aberto área e permitido explorá-la por 5 min. Durante a sessão de teste de 5 min, foram avaliadas as variáveis de latência de movimento da atividade locomotora, número total de cruzamentos, o número total do levantar, número de auto-limpeza e o tempo em que os animais permaneceram parados. Limpou a área do campo aberto com uma solução de etanol a 5% e deixou secar depois de testar cada animal (Prut and Belzung, 2003)

2.6 Teste da barra giratória (rota-rod)

Nesse teste, os animais foram pré-selecionados em uma sessão de treinamento 24 horas antes do teste com base na capacidade de permanecerem na barra (a 7 rpm) por 1 minuto. Grupos de animais pré-selecionados foram tratados com solução salina 0,9% (10 mL/kg, v.o), LLO (10, 30 e 100 mg/kg, v.o) ou diazepam (2,5 mg/kg, i. p.). Trinta minutos após o tratamento, os animais foram colocados com as quatro patas na barra, e o número de queda no rota-rod foram avaliados por 3 min nos tempos de 30, 60 e 120 min após os tratamentos (Dunham and Miya, 1957).

2.7 Preparação de tecido

Os animais foram tratados 48h antes do início dos experimentos com cipionato de estradiol (1 mg/kg. por via subcutânea) para indução do estro. Após, foram eutanasiados por deslocamento cervical e os cornos uterinos foram excisados e abertos longitudinalmente para obtenção de 4 tiras de tecido uterino de 1 cm de comprimento. Em seguida, os segmentos foram colocados individualmente em um banho de órgãos de 10 ml contendo a solução nutritiva *Ringer-Locke* (NaCl 154,0 mM, KCl 5,63 mM, CaCl₂.2H₂O 2,16 mM, Glicose 5,5 mM e NaHCO₃ 11,9 mM) aerada com mistura carbogênica (95 % de O₂ e 5 % de CO₂) a 32°C e pH 7,4. Cada corno uterino foi conectado a um transdutor isométrico (Panlab, Cornellà, Barcelona, Espanha) sob uma

tensão basal isotônica de 1g e deixado equilibrar por pelo menos 45 minutos, enquanto era lavado com uma nova solução de *Ringer-Locke* a cada 15 minutos.

2.8 Atividade espasmolítica no útero isolado de rata

Após o período de estabilização de 45 minutos duas contrações foram induzidas por 1 μ M de CCh ou 10⁻² UI/mL de OCT ou 60 mM de KCl. Durante a fase tônica sustentada da segunda resposta, o LLO, foi cumulativamente adicionado a cuba, em concentrações crescentes (1, 3, 9, 27, 81, 243 e 729 μ g/mL), com um intervalo de 5 minutos entre cada adição. Além disso, um grupo experimental não foi submetido a agentes contraentes para verificar o efeito do LLO no tônus basal do órgão. Por fim, foi observado se os órgãos responderam à contração ao final do experimento. O LLO foi diluído em solução de cremophor EL 3% em água destilada e este veículo foi desprovido de efeito relaxante (dados não mostrados).

2.9 Análise do mecanismo de ação

Para estudar o possível mecanismo relaxante do LLO, as preparações uterinas foram montadas conforme descrito anteriormente e contraídas com CCh 1 μ M na ausência ou presença de cloreto de céσιο (CsCl, 5 mM), um bloqueador não seletivo dos canais para K⁺ (Zhou et al., 1996), tetraetilamônio (TEA, 5 mM), um bloqueador dos canais para potássio ativados pelo Ca²⁺ (K^{ca}) (Khan et al., 2001), 4-aminopiridina (4-AP, 1 mM), um bloqueador dos canais para potássio abertos por voltagem (K_v) (Aaronson et al., 2006) ou glibenclamida (GLI, 1 μ M), um bloqueador dos canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Hughes and Hollingsworth, 1997), propranolol (PRO, a 10 μ M), um antagonista β -adrenérgico; fentolamina (PHE, a 1 μ M), um antagonista α -adrenérgico (Fanning et al., 2017), N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M), inibidor do óxido nítrico sintase (Munglue et al., 2013), azul de metileno (MB, 1 μ M) inibidor não seletivo da guanilil ciclase solúvel (Evora, 2016; Naseri et al., 2008), 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo [4, 3-A] quinoxalina-1-ON (ODQ, 10 μ M), inibidor seletivo da guanilil ciclase solúvel (Garthwaite et al., 1995) ou aminofilina (AMI, 1 μ M) inibidor da fosfodiesterases (Hirsh et al., 2004; Lai et al., 2021), e heparina (HEP, a 10 μ M), um bloqueador dos receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3R) (Song et al., 2015). Após o período de estabilização, o LLO foi adicionado cumulativamente (1–729 μ g/mL) a cada preparação.

Para avaliar a influência da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, duas contrações foram induzidas com CCh 10 μM em meio livre de Ca^{2+} e, antes da segunda contração, as preparações foram pré-incubadas por 20 min com água destilada ou LLO (9, 27, ou 81 $\mu\text{g/mL}$). As contrações evocadas pelo carbacol foram comparadas antes e após a adição do LLO.

2.10 Efeito da LLO na contorção abdominal de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária

Utilizou-se camundongos fêmeas virgens que foram agrupadas ($n=6$) e mantidas com injeção de cipionato de estradiol 1mg/kg/dia por via intraperitoneal (i.p) durante 3 dias consecutivos. No 4º dia os animais foram tratados por via oral (v.o) de acordo com o grupo experimental: veículo (3% cremophor diluído em 0,9% NaCl), grupo teste (LLO 10, 30 ou 100 mg/kg) ou controle positivo (ácido mefenâmico 90 mg/kg). Após 60 minutos do tratamento, os animais receberam uma injeção i.p. de 0,4 UI/mL de ocitocina, e o número de contorções abdominais (caracterizada por contorção da parede abdominal, rotação pélvica e estiramento das patas posteriores) foi registrado por 30 minutos subsequentes (Yang et al., 2015).

2.11. Efeito do LLO associado a drogas nas contorções abdominal de camundongos fêmeas em modelo de dismenorreia primária

Camundongos fêmeas virgens foram pré-tratados com cipionato de estradiol (1mg/kg/dia) por via intraperitoneal por 3 dias consecutivos. Os grupos foram então divididos ($n=6$) e no 4º dia, os animais foram tratados por via oral de acordo com os grupos experimentais: veículo (3% cremophor diluído em 0,9% NaCl), escopolamina 3,5 mg/kg, nifedipina 7 mg/kg, ácido mefenâmico 90 mg/kg, escopolamina 0,35 mg/kg, nifedipina 0,7 mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg, LLO 10 mg/kg, LLO 10 mg/kg + escopolamina 0,35 mg/kg, LLO 10 mg/kg + nifedipina 0,7 mg/kg ou LLO 10 mg/kg + ácido mefenâmico 9 mg/kg. A dosagem dessas drogas foi estimada de acordo com a dose equivalente humana estabelecida por (Nair and Jacob, 2016a). Após 60 min de tratamento, os animais receberam ocitocina por via intraperitoneal (0.4 UI/mL), e o número de contorções abdominais foi registrado nos 30 min subsequentes (Yang et al., 2015).

2.12 Investigação do possível mecanismos de ação do LLO em modelo de dismenorreia primária

Para avaliar o possível mecanismo de ação envolvido na atividade antidismenorreica do LLO, os camundongos foram pré-tratados com glibenclamida (20 mg/kg, v.o.), bloqueador dos canais K^+_{ATP} (Piper et al., 1990), propranolol (20 mg/kg, v.o.) um antagonista β -adrenérgico (Direkvand-Moghadam et al., 2014), N ω -nitro-Larginina (70 mg/kg, v.o.), inibidor da síntese de óxido nítrico (Tiboni and Giampietro, 2000) ou Azul de metileno (50 mg/kg, v.o.) um inibidor não específico da guanilil ciclase solúvel (Tiboni et al., 2001), 30 min antes da administração do LLO (10 mg/kg, v.o.). Após 60 min de tratamento, os animais receberam ocitocina por via intraperitoneal (0.4 UI/mL), e o número de contorções abdominais foi registrado nos 30 min subsequentes (Yang et al., 2015).

2.13 Análise de dados e estatística

A exposição dos resultados foi como média \pm erro padrão da média (E.P.M). n representa o número de experimentos realizados ou quantidade de animais por grupo experimental. Os valores de CE_{50} foram calculados por $\log CE_{50}$ ($\mu\text{g/mL}$). Diferenças entre as médias foram comparadas usando o teste t de Student não-pareado, análise de variância uma via (ANOVA one-way) com pós-teste de Dunnett's ou análise de variância duas vias (ANOVA two way) seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak, sendo as diferenças consideradas significantes quando o valor calculado de p foi menor que 0,05 (* $p < 0,05$). Para análises estatísticas e produção dos gráficos utilizou-se o *software* GraphPad Prism[®] versão 6.00 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA).

3 RESULTADOS

3.1 Análise da composição química do óleo essencial

A análise química do óleo essencial das partes áreas da planta revelou a presença 25 componentes que foram caracterizados por GC/MS, representando 93,08% do total de componentes de óleo detectados, os quais estão listados (Tabela 1), com sua composição percentual e índices de retenção. Os principais componentes foram: *E-cimeno* (32,35 \pm 2,60%), *β -mirceno* (24,53 \pm 1,26%), *p-cimeno* (5,89 \pm 0,39%) e

mircenona ($5,56 \pm 1,79\%$). Esses compostos se apresentam como potenciais marcadores sobre os possíveis efeitos do LLO em modelos farmacológicos.

Tabela 1. Composição do óleo essencial de *L. lasiocalycina* por CG-EM.

Composto	IAlit	IAlcalc	Média	±	DP
α -tujeno	924	928	0.29	±	0.05
α -pinene	932	931	0.21	±	0.07
sabinene	969	977	0.93	±	0.05
β -mircene	988	992	24.53	±	1.26
α -terpinene	1014	1021	0.91	±	0.12
<i>p</i> -cimeno	1020	1031	5.89	±	0.39
limonene	1024	1034	0.33	±	0.06
Z- β -ocimeno	1032	1038	0.14	±	0.01
E- β -ocimeno	1044	1049	0.83	±	0.06
γ -terpinene	1054	1063	3.83	±	1.16
linalol	1098	1106	1.34	±	0.21
mircenona	1145	1155	5.56	±	1.79
Z-ocimenona	1226	1242	3.60	±	0.35
E-ocimenona	1235	1250	32.35	±	2.60
timol	1289	1303	3.02	±	2.16
carvacrol	1298	1312	Traço	±	
piperitenonn	1340	1356	0.14	±	0.03
α -copaeno	1374	1381	0.14	±	0.03
β -elemeno	1389	1395	0.11	±	0.02
E- cariofileno	1417	1426	2.62	±	0.42
α -guaieno	1437	1441	1.45	±	0.30
α -humuleno	1452	1464	0.95	±	0.14
germacreno D	1484	1489	0.31	±	0.17
α -bulneseno	1509	1509	0.58	±	0.11
espatulenol	1577	1590	1.31	±	0.20
óxido de cariofileno	1582	1595	1.77	±	0.30
Total de composto idetificado			93.08		

IAlit = índice Aritmético da literatura; IAlcalc = índice de Kovats calculado; DP = desvio padrão

3.2 Toxicidade oral aguda

Os animais não apresentaram alterações comportamentais, mortalidade relacionada ao tratamento, durante os 14 dias após a administração oral da dose única de 2000 mg/kg do LLO. Durante a observação clínica, pelos, pele, olhos, mucosas, marcha, postura e respiração não foram observadas alterações. Sem lacrimejamento, movimentos clônicos ou tônicos, salivação, piloereção, diarreia. Os hábitos fisiológicos diários (consumo médio de água e ração) não apresentou mudança significativa quando comparado ao grupo controle negativo. Além disso, os grupos tratados não apresentaram mudanças significativas no peso corporal durante o período experimental quando comparado com o grupo controle.

Durante a análise macroscópica dos órgãos, não foram identificadas quaisquer alterações notáveis em relação ao tamanho, aparência ou cor. Ao realizar a análise estatística, não foram encontradas diferenças significativas nos pesos relativos dos órgãos no grupo tratado em comparação com o grupo de controle.

3.3 Teste do campo aberto

A avaliação da atividade neuromotora foi realizada por meio do teste de campo aberto. Os resultados indicam que a administração das doses do LLO (10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg) não tiveram impacto significativo na atividade neuromotora, comparada ao grupo controle negativo, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeito do óleo essencial de *L. lasilocalycina* sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental do campo aberto

Tratamento	Dose (mg/kg)	Número de cruzamento	Tempo de imobilização	Número de rearing	Número de grooming
Veículo	–	14,17±1,07	30,50±7,35	11,33 ±0,76	2,00±0,51
LLO	10	15,50±1,14	25,83 ± 7,46	12,50±1,36	1,5±0,42
LLO	30	14,67±1,14	38,50 ± 8,40	10,17±1,93	1,33±0,21
LLO	100	16,33±0,66	35,17 ±11,75	8,33±0,84	1,00±0,25
Diazepam	2,5	3,66±0,84	207,3 ±23,79	1,83±1,04	0,33±0,21

Dados expressos em média ± e.p.m. *(p<0,05, Teste de ANOVA one way seguido do Dunnett's test.).

3.4 Teste da barra giratória (rota-rod)

No teste Rota Rod, como demonstrado na **fig. 1**, não foram observadas alterações no número de queda após o tratamento com LLO, nas doses de 10, 30 e de 100 mg/kg comparado com o grupo controle negativo.

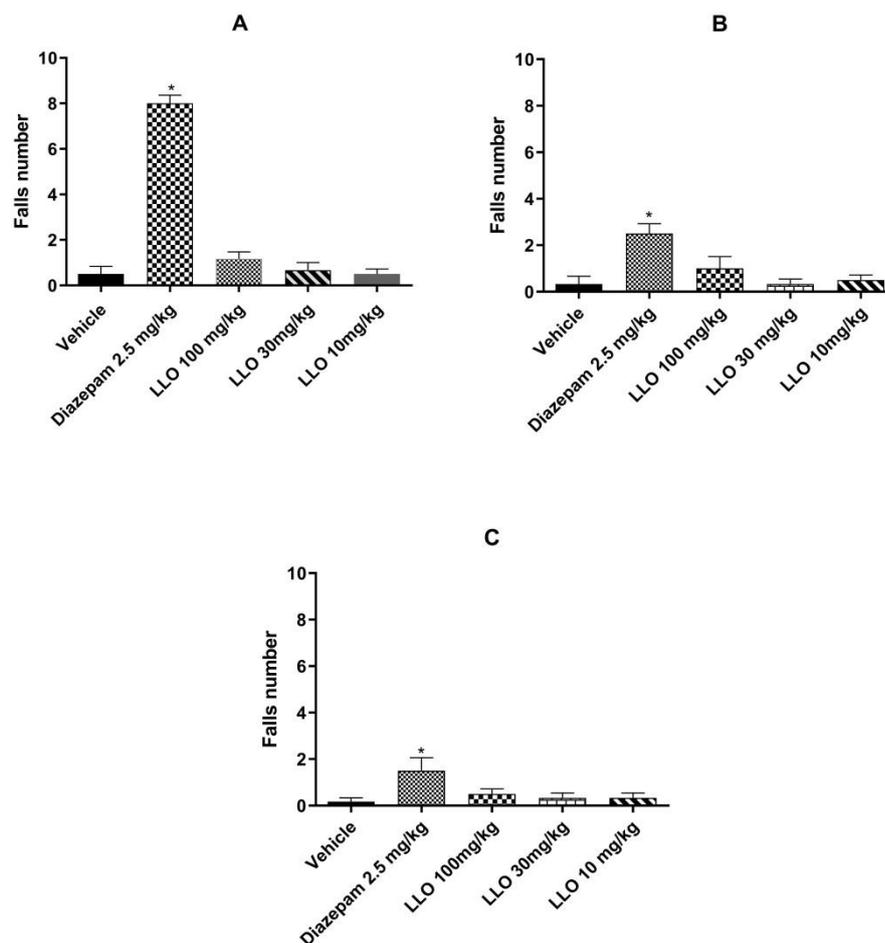


Fig. 1: Efeito do óleo essencial de *L. lasiocalycinas* sobre o sistema nervoso central de camundongos a partir do modelo experimental da barra giratória. A: Número de quedas 30 minutos após o tratamento. B: Número de quedas 60 minutos após o tratamento. C: Número de quedas 120 minutos após o tratamento. Dados expressos em média \pm e.p.m. * $p < 0,05$ (Teste de ANOVA one way seguido do Dunnett's test.).

3.5 Efeito relaxante do LLO no útero isolada de ratas

Em contrações fásicas espontâneas, LLO (1-729 $\mu\text{g/mL}$) não reduziu significativamente essas contrações de maneira concentração-dependentes, obtendo-se o valor de $\log\text{CE}_{50} = 0,99 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$. Nas contrações induzidas pela ocitocina (10^{-2} UI/mL), o LLO relaxou significativamente o útero a partir da concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$, com valor de $\log\text{CE}_{50} = 2,32 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, sendo a amplitude reduzida significativamente. Já com carbacol ($1\mu\text{M}$), o LLO relaxou significativamente o útero a partir da concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$, apresentando o valor da $\log\text{CE}_{50} = 2,33 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ e com cloreto de potássio (60 mM), a partir da concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$, apresentando o valor da $\log\text{CE}_{50} = 2,91 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$ de forma concentração dependente (**Fig. 2**). Esse efeito foi reversível após 60 minutos da remoção do LLO da cuba.

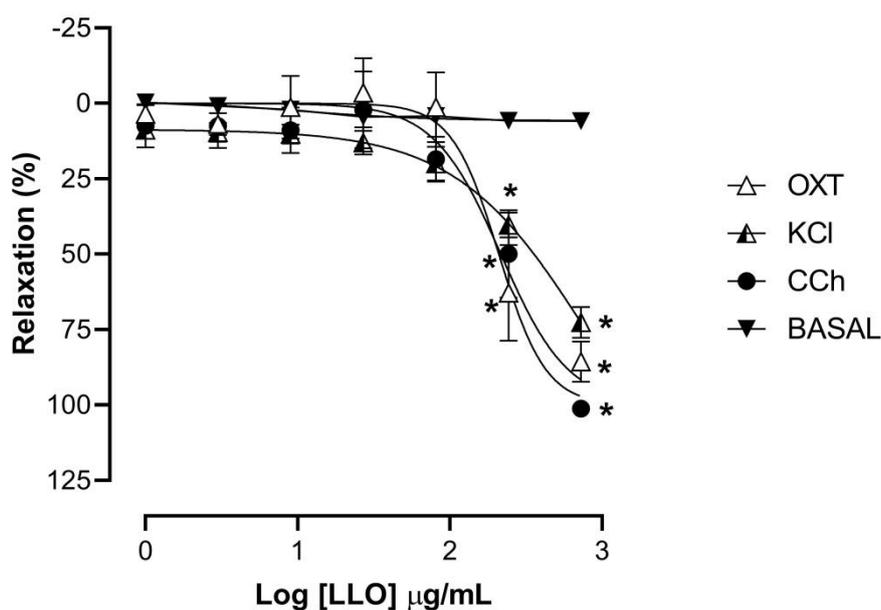


Fig. 2 Efeito relaxante do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas preparações isoladas do útero de rato em contrações pré-contraídas com carbacol (CCh), ocitocina (OXT) ou cloreto de potássio (KCl). Dados expressos como média \pm e.p.m; * representa o relaxamento significativo quando comparado ao efeito na concentração 1 $\mu\text{g/mL}$ em uma mesma curva de concentração-resposta ($p < 0,05$, ANOVA bidirecional, seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak).

3.6 Influência dos canais K^+ no efeito do LLO

A participação dos canais K^+ no tecido uterino os dados mostraram que não houve diferença significativa do efeito LLO na presença de **4-AP** de $\log CE_{50} = 2,43 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$ (**Fig. 3A**), **CsCl** $\log CE_{50} = 2,36 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$ (**Fig. 3B**), **GLI** $\log CE_{50} = 2,16 \pm 0,30 \mu\text{g/mL}$ (**Fig. 3C**) ou **TEA** $\log CE_{50} = 2,31 \pm 0,56 \mu\text{g/mL}$ (**Fig. 3D**) quando comparado com a ausência desse bloqueador.

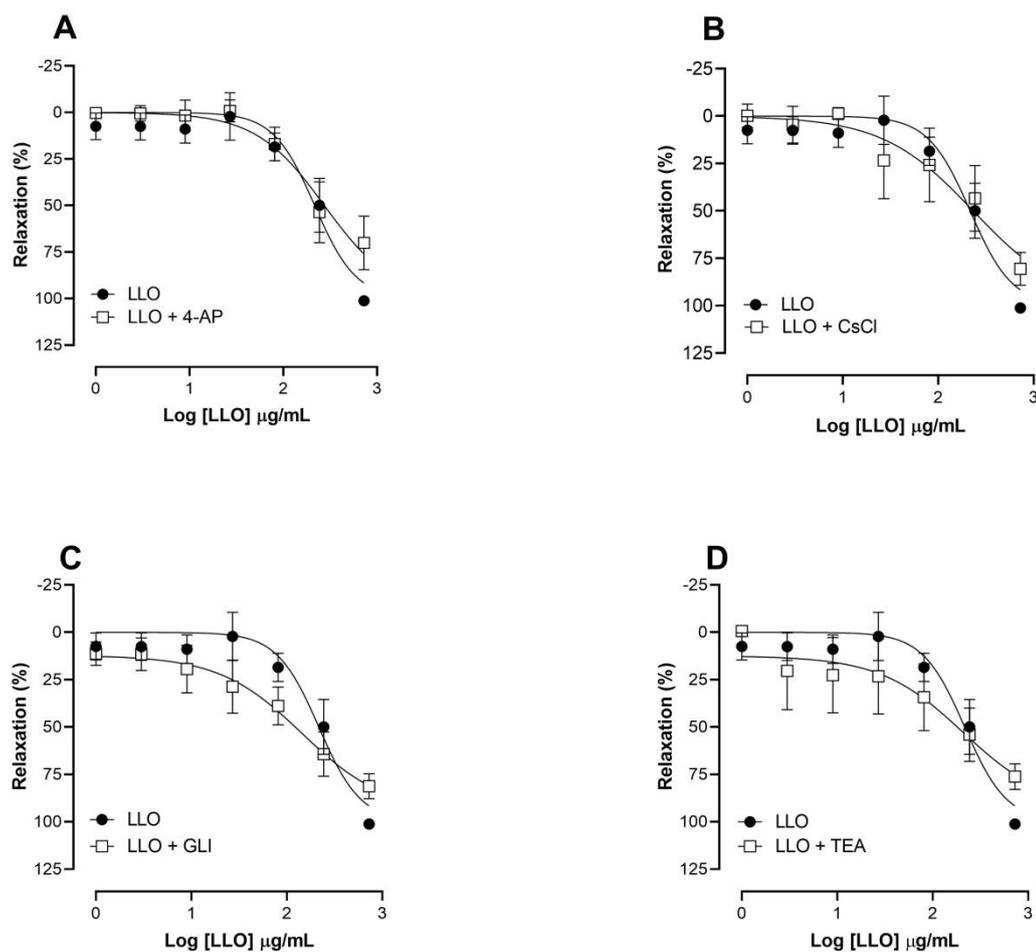


Fig. 3. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas contrações isoladas do útero induzidas por carbacol $1 \mu\text{M}$ na presença ou na ausência de bloqueadores dos canais de potássio: (A) 4-aminopiridina (4-AP) 1 mM ; (B) CsCl 5 mM ; (C) glibenclamida (GLIB) $1 \mu\text{M}$ e (D) tetraetilamônio (TEA) 5 mM . ($n = 5$). Dados expressos em média \pm e.p.m.

3.7. Efeito relaxante do LLO nos receptores adrenérgicos em útero isolado de rata

A potência do LLO ($\log CE_{50} = 2,33 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) no relaxamento do útero isolado pré-contraído com CCh não foi alterada quando comparada com as preparações pré-incubadas com propranolol ($\log CE_{50} = 2,39 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$) (**Fig. 4A**) ou fentolamina ($\log CE_{50} = 2,28 \pm 0,06$) (**Fig. 4B**).

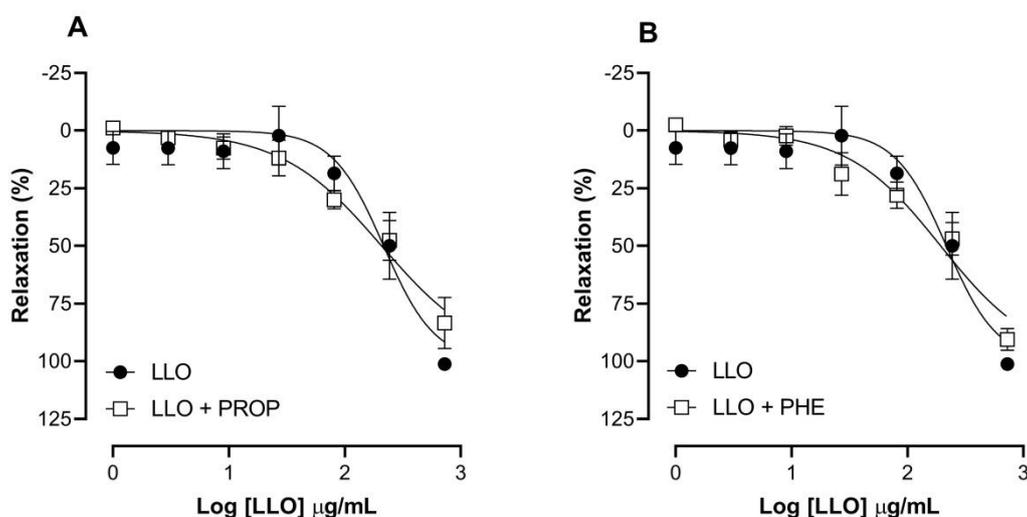


Fig. 4. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas contrações uterinas isoladas de ratos induzidas por 1 μM de carbocol na presença ou ausência de antagonistas adrenérgicos: A, propranolol (PRO, 10 μM); e B, fentolamina (PHE, 1 μM). Dados expressos como média \pm e.p.m., $n=5$.

3.8 Influência da via de NO/GCS/GMPC/PKG no efeito do LLO

Uma via para o relaxamento do músculo uterino é a cascata NO/sGC/cGMP/PKG. Assim, a potência do LLO na presença de L-NAME foi avaliada $\log CE_{50} = 2,86 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$ é possível perceber que não houve alteração no efeito relaxante do LLO (**Fig. 5A**). Quando foi avaliada a atividade relaxante do LLO na presença de MB (**Fig. 5B**), observou-se que o LLO não apresentou diferença significativa quando comparada a ação do óleo na ausência deste inibidor, apresentando o valor de $\log CE_{50} = 2,56 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$. Da mesma forma, quando se avaliou a atividade relaxante do óleo na presença de ODQ $\log CE_{50} = 2,35 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$, (**Fig. 5C**) não houve diferença quando comparada na ausência do bloqueado. Verificou-se a ação de LLO na presença de aminofilina, $\log CE_{50} = 1,67 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$ (**Fig. 5D**). Na presença

do inibidor, o efeito relaxante de LLO apresentou diferença quando comparado na ausência do inibidor.

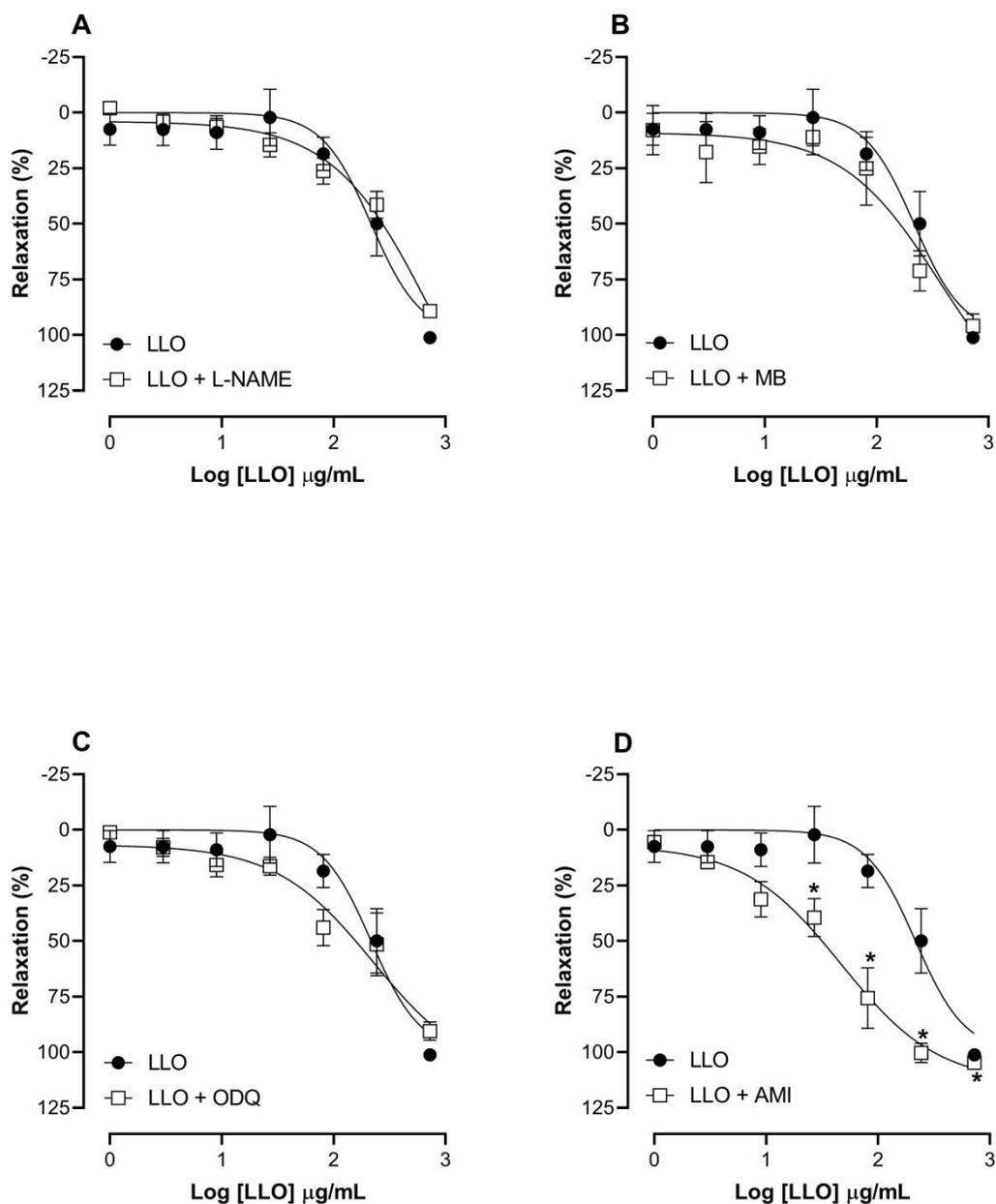


Fig. 5. Efeito relaxante do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas contrações isoladas do útero induzidas por 1 μM de carbacol na presença ou ausência de inibidores da via NO / GCS / GMPC / PKG: **A**, Éster metílico de N ω -nitro-L-arginina (L-NAME, 100 μM) inibidor da óxido nítrico sintase; **B**, azul de metileno (MB, 1 μM) inibidor solúvel da guanilil ciclase; **C**, 1H- [1,2,4] Oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-ona (ODQ, 10 μM) inibidor da guanilato ciclase e **D**, aminofilina (AMI, 10 μM) inibidor da fosfodiesterase. (n = 5); Dados expressos em média \pm e.p.m., respectivamente. *representa os efeitos significantes ($p < 0,05$, two-way ANOVA, seguindo de Holm-Sidak).

3.9 Influência do LLO na mobilização de cálcio

O efeito do LLO na mobilização de cálcio de estoques intracelulares e o meio extracelular foi investigado. Isto foi observado que o LLO, nas concentrações 27 $\mu\text{g/mL}$ ($67,19 \pm 7,20$) e 81 $\mu\text{g/mL}$ ($20,39 \pm 6,63$), reduziu significativamente as contrações evocada por carbacol em meio livre de Ca^{2+} quando comparado com o controle (**Fig. 6A**). Quando o LLO foi pré-incubado com heparina, não foram observadas diferenças significativas com o $\log\text{CE}_{50} = 1,99 \pm 0,17$ (**Fig. 6B**) em comparação com as preparações sem o bloqueador ($\log\text{CE}_{50} = 2,33 \pm 0,07$), indicando que o LLO não está bloqueador IP^3R .

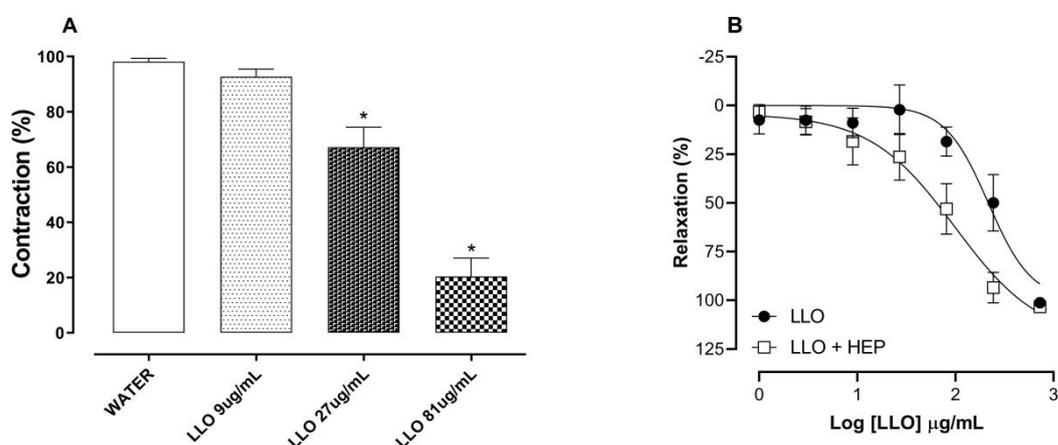


Fig. 6. Efeito do óleo essencial de *L. lasiocalycina* (LLO) na mobilização de Ca^{2+} no rato isolado contrações do útero. **A**, Efeito inibitório de óleo essencial de *L. lasiocalycina* em útero isolado contrações induzidas por $10\mu\text{M}$ de carbacol em meio despolarizante sem Ca^{2+} . Dados expressos como média \pm e.p.m., $n=5$. **B**, efeito relaxante do LLO em $1\mu\text{M}$ de contrações induzidas por carbacol na ausência ou presença de heparina (HEP, $10\mu\text{M}$). Dados expressos como média \pm e.p.m., $n=5$. *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, não pareado teste *t de Student*) quando comparado com o controle (barra de H_2O).

3.10 Efeito do LLO no modelo experimental de dismenorrea primária

O tratamento com o óleo essencial de *L. lasiocalycina*, nas doses de 10 mg/kg ($22,17 \pm 3,54$) e 30 mg/kg ($14,00 \pm 1,39$), não mostrou uma redução estatisticamente significativa ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis test) no número de contorções abdominais, quando comparado ao grupo controle negativo ($25,00 \pm 2,08$). Já a dose de 100 mg/kg ($9,83 \pm 2,49$), promoveu uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test), como ilustrado na (**Fig. 7A**). Três fármacos foram escolhidos no tratamento da dismenorrea, e suas doses padrão para estudos em camundongos foram determinadas

mediante a conversão de doses entre humanos e animais (Nair and Jacob, 2016b). Nifedipina 7 mg/kg ($6,83 \pm 1,40$), ácido mefenâmico 90 mg/kg ($0,33 \pm 0,21$) e escopolamina 3,5mg/kg ($9,33 \pm 0,49$) apresentam diferença significativa no número de contorções quando comparado com o veículo (**Fig. 7B**). O tratamento oral do LLO na dose de 10 mg/kg associado a nifedipina 0,7 mg/kg, escopolamina 0,35mg/kg ou ácido mefenâmico 9 mg/kg reduziu o número de contorções abdominais induzidas pela ocitocina ($7,50 \pm 1,60$; $12,33 \pm 2,40$ e $2,66 \pm 1,20$ respectivamente), apresentando significativa diferenças em relação ao veículo ($25,00 \pm 2,08$) (**Fig. 7C**).

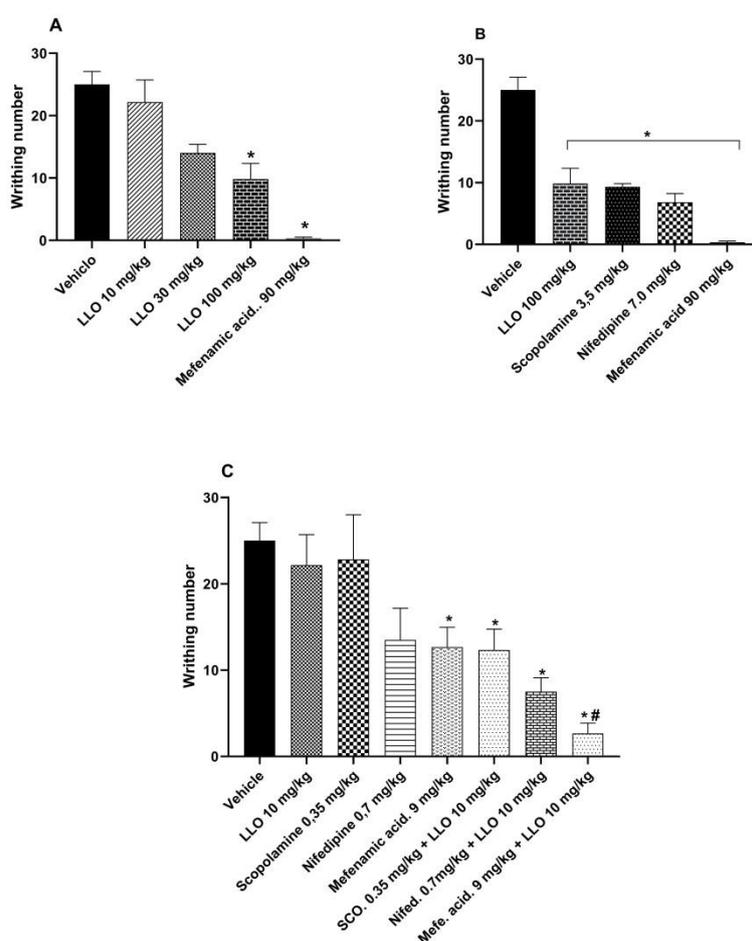


Fig. 7. Efeito inibitório do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina. Veículo, cremóforo a 3% diluído em solução salina a 0,9%. Todos os dados são apresentados como média \pm e.p.m, n=6: **A**, camundongos foram tratados nas doses 10, 30 e 100 mg/kg por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado ao Veículo; **B**, camundongos foram tratados por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Mann-Whitney) quando comparado ao Veículo; **C**, camundongos foram tratados por via oral, as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney; *efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao Veículo; #efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado com ácido mefenâmico, sem tratamento com LLO.

3.11 Efeito da via de NO/GCS/GMPC, dos canais de K^+ sensíveis ao ATP e dos receptores adrenérgicos na ação do LLO

O tratamento oral com LLO na dose de 100 mg/kg, associado a glibenclamida 20 mg/kg (**Fig. 8A**), L-Name 70 mg/kg (**Fig. 8C**) e azul de metileno 50 mg/kg (**Fig. 8D**), não demonstrou redução no número de contorções abdominais induzidas pela ocitocina (13.83 ± 2.25 ; 24.17 ± 0.94 e 17.00 ± 2.70 , respectivamente) em comparação com o veículo ($25,00 \pm 2,08$). Por outro lado, o tratamento com LLO na dose de 100 mg/kg, associado ao propranolol 20 mg/kg, resultou em uma redução no número de contorções abdominais induzidas pela ocitocina ($4,00 \pm 0,81$) (**Fig. 8B**), em comparação com o veículo ($25,00 \pm 2,08$) e também em comparação com a dose de propranolol 20 mg/kg ($21,17 \pm 3,55$).

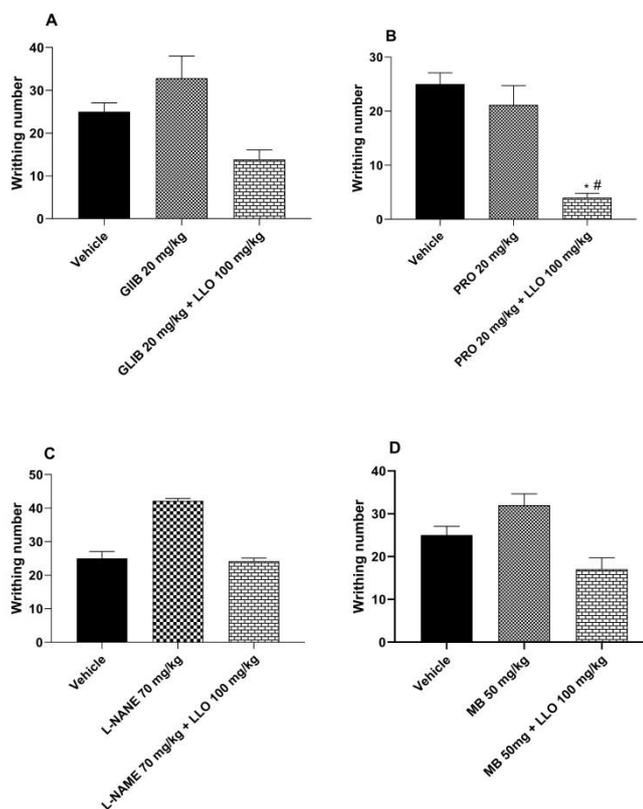


Fig. 8. Efeito inibitório do óleo essencial de *L. lasilocalycina* (LLO) nas contorções abdominais induzidas por ocitocina. Veículo, cremóforo a 3% diluído em solução salina a 0,9%. Todos os dados são apresentados como média \pm e.p.m., n=6: **A**, camundongos foram tratados na dose Glib 20mg/kg + 100mg/kg de LLO por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado ao glib 20 mg/kg; **B**, camundongos foram tratados na dose Pro. 20 mg/kg + 100 mg/kg de LLO por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado Pro. 20 mg/kg; **C**, camundongos foram tratados com L-NAME 70mg/kg + 100mg/kg do LLO por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado L-NAME. 70mg/kg; **D**, camundongos foram tratado

com azul de metileno 50 mg/kg + 100mg/kg do LLO por via oral; *representa os efeitos significativos ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn) quando comparado azul de metileno 50mg/kg; #efeito significativo ($p < 0,05$) quando comparado com veiculo.

4 DISCUSSÃO

A partir da análise química dos componentes do óleo essencial da espécie *L. lasiocalycina*, foi possível identificar os principais constituintes da espécie: *E-ocimenona* ($32,35 \pm 2,60\%$), β -*mirceno* ($24,53 \pm 1,26\%$), *p-cimeno* ($5,89 \pm 0,39\%$) e *mircenona* ($5,56 \pm 1,79\%$). Esses compostos se apresentam como potenciais marcadores sobre os possíveis efeitos do LLO em modelos farmacológicos. Resultados semelhantes quanto aos constituintes majoritários de *L. lasiocalycina* foram verificados por Bispo, 2015 que obteve o *E-ocimenona* (22,82%) como majoritário, dependendo da época de colheita. Um trabalho semelhante foi obtido por Oliveira, 2014 obtendo *E-ocimenona* (29,90%) e β -*mirceno* (17,58%) como compostos majoritários.

A composição e concentração dos compostos químicos no óleo essencial dependem do controle genético (fatores fixos) e dos estímulos promovidos por fatores do ambiente (fatores variáveis), mudando continuamente com o tempo e o espaço, como a temperatura, insolação e época do ano (Ehlert et al., 2013).

Assim como a maioria das espécies do seu gênero, *L. lasiocalycina* é uma planta com folhas aromáticas, rica em óleo essencial composto por monoterpenos e sesquiterpenos. Do ponto de vista etnobotânico, as espécies pertencentes a este gênero são amplamente empregadas globalmente como fontes de alimento, bebidas, condimentos e medicamentos. Muitas dessas aplicações medicinais são direcionadas para o tratamento de problemas respiratórios, infecções pulmonares, tosse, resfriados e asma (Pascual et al., 2001).

Os estudos toxicológicos na fase pré-clínica são uma passo obrigatório para cada medicamento desenvolvido na indústria farmacêutica (Andrade et al., 2016). Esses estudos quando realizados em um modelo animal adequado permitem identificar o potencial tóxico dos medicamentos (Parasuraman, 2011).

As plantas medicinais são, algumas vezes, erroneamente consideradas como seguros porque são de origem natural (Smeriglio et al., 2014). Atualmente, a utilização de plantas medicinal é uma prática mundialmente disseminada, sendo encorajada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), especialmente em países do hemisfério sul

(Mattos et al., 2018). O uso de plantas medicinais e seus compostos estão se expandindo a cada ano na maioria dos países devido a uma crença equivocada de que a preparação natural está livre de efeitos adversos sem considerar os casos relatados na literatura (Leenaars et al., 2019). As alterações do peso corporal servem como uma indicação sensível do estado geral de saúde dos animais (El Hilaly et al., 2004). Após 14 dias de observação, todos os animais apresentaram incremento normal no peso corporal. Pode-se afirmar que LLO não interferiu no metabolismo normal dos animais.

A metodologia do campo aberto permite diversas possibilidades sobre a ação no sistema nervoso central de substâncias. Alguns parâmetros como número de cruzamentos, tempo de imobilidade e frequência de rearing são tratadas como medidas de atividade locomotora, exploração e ansiedade (Prut and Belzung, 2003).

Assim, decidimos investigar o efeito do LLO no teste de campo aberto, um modelo animal comumente empregado para avaliar os efeitos das substâncias na atividade motora. Nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, o LLO não demonstrou redução no número de reerings e grooming, tampouco houve modificações nos parâmetros motores, como o número de ambulações e o tempo de imobilidade. Esses resultados indicam que o tratamento com LLO não exerce efeito sedativo ou depressor sobre o sistema nervoso central dos animais.

Os testes de coordenação motora são utilizados na triagem de fármacos com possível atividade miorrrelante/neurotóxica, pois são testes capazes de detectar o efeito relaxante muscular e incoordenação motora de agentes com propriedades farmacológicas, como o que acontece com muitas drogas (Baggio et al., 2012; de Moraes Pultrini et al., 2006). Os animais sob condições normais, sem a influência de substâncias que afetam o sistema nervoso central, são capazes de permanecer na barra rotativa por um período prolongado. Assim, dependendo do número de quedas, esse teste é capaz de detectar danos neurológicos mínimos, como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade (Marques et al., 2014). Observou-se então que os animais tratados com o LLO não apresentaram número de quedas da barra giratória durante o tempo proposto, ao contrário do observado com o grupo controle positivo (diazepam 2,5 mg/kg), onde os animais tratados apresentaram alteração na coordenação motora. Logo, LLO não promoveu um déficit na coordenação motora dos animais dos grupos tratados.

Os ensaios farmacológicos foram desenvolvidos com o objetivo de avaliar o efeito espasmolítico do LLO em contrações que envolvem o acoplamento

farmacomecânico e acoplamento eletromecânico. A partir da análise dos dados, observa-se que o LLO apresentou atividade espasmolítica em todas os protocolos testados, sendo capaz de promover o relaxamento dos cornos uterinos isolada de rata pré-contraída com carbacol ou ocitocinas ou ao cloreto de potássio, de uma maneira dependente da concentração.

A ocitocina é um hormônio peptídico que age em receptores de ocitocina e sua ativação induz contração do músculo liso miometral mediante o aumento intracelular de Ca^{2+} (Ferreira et al., 2019). Esse hormônio é sintetizado a partir da estimulação estrogênica e a inibição da sua síntese ocorre mediante ação da progesterona (Åkerlund, 2002). Substancias que, antagonizam os receptores de ocitocina começaram a ser utilizadas clinicamente no trabalho de parto prematuro (Eogan and McKenna, 2004). Por conta disso, a busca por novas moléculas dotadas dessa capacidade se mostram necessárias para auxiliar no tratamento de hipercontratilidade uterina (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Assim como a ocitocina, o carbacol age em receptores acoplados a proteína Gq, que são chamados de receptores muscarínicos que estimulam as contrações uterinas, e possuem vários subtipos de receptores presentes no miométrio uterino (Soboll et al., 2006).

Altas concentrações de KCl no meio externo, causam uma despolarização celular. Na celular muscular lisa, essa despolarização promove ativação de canais para Ca^{2+} voltagem-dependente, que uma vez abertos permitem o influxo desse íon para dentro da célula para que o processo de contração ocorra (Duangjai et al., 2018).

Verifica-se que o LLO apresentou atividade espasmolítica significativa em contrações uterinas induzidas por diferentes agonistas, que por sua vez agem por receptores e/ou via de transdução de sinal diferentes. A partir desse achado, deduzir que o LLO não age especificamente em um receptor ou via de transdução de sinal específica. Porém, convém destacar, que apresentou maior potência em relaxar contrações induzidas por CCH, o que não se descarta a possibilidade de possuir influência sobre a via colinérgica.

Os canais para potássio formam um grupo de proteínas que desempenham uma função crucial na preservação da inatividade uterina e têm a capacidade de regular a abertura dos canais de cálcio (CaV), controlando, dessa forma, a entrada de íons de cálcio (Ca^{2+}) nas células musculares lisas contribuindo assim para a quiescência uterina (Ferreira et al., 2019; Lorca et al., 2014; Stott et al., 2014). Diante disso, resolveu-se

avaliar uma possível participação dos canais de K^+ na ação tocolítica do LLO. Nesse sentido, o efeito do relaxante LLO não foi alterado na presença dos principais bloqueadores sugerindo que esse canal para K^+ não está relacionado ao mecanismo de relaxamento de LLO no útero de ratas.

No tratamento para os problemas associados à contratilidade do miométrio, são utilizados agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos, que induzem o relaxamento muscular através do aumento do AMP_c . Esse relaxamento é mediado pela ativação da adenilil ciclase (AC) e pela subsequente produção de AMP_c intracelular, que inibe a interação entre os filamentos de actina e miosina no músculo (Berdeaux and Stewart, 2012; Fanning et al., 2017). Nesse sentido, os resultados indicaram que a curva de relaxamento não foi afetada na presença dos bloqueadores propranolol e fenotolamina, mantendo os efeitos relaxantes do LLO em preparações de útero isolado de rata. Isso sugere que o mecanismo de ação do LLO não inclui a ativação de receptores adrenérgicos.

O óxido nítrico (NO), um gás solúvel, é produzido pela enzima constitutiva óxido nítrico sintase endotelial (NOS), que converte a arginina em NO e citrulina na presença de NADPH e outros cofatores. No trato genital feminino, o NO é sintetizado pelo endométrio, miométrio e placenta, desempenhando um papel crucial na regulação da fisiologia menstrual e na manutenção da quiescência uterina durante o período gestacional (Chwalisz and Garfield, 2000; Maul et al., 2005).

O óxido nítrico (NO) interage com o grupo heme na guanilato ciclase solúvel, modificando sua conformação e ativando a enzima responsável pela conversão do trifosfato de guanina em cGMP. Este último, por sua vez, promove o relaxamento do músculo liso adjacente (Chaud et al., 1997; Zhao et al., 2015). Portanto, na presença do L-NAME, que atua inibindo a produção de óxido nítrico (NO), o óleo não apresentou diferença significativa em relação ao seu efeito sem o bloqueador. Isso sugere que o óleo não modula os níveis de NO para relaxar o útero isolado de ratas.

Além disso, também foi utilizado azul de metileno (Fig. 04 B), um inibidor não específico da via 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico/guanilato ciclase solúvel (GMPc-GCs), que é responsável pelo efeito relaxante dependente de monofosfato do óxido nítrico no músculo liso do útero (Ignarro, 1989). Dito isso o azul de metileno não interfere no efeito relaxante do LLO, indicando que este não modula o relaxamento uterino de forma independente da ativação da guanilil ciclase solúvel, devido à inibição

parcial da sGC pelo azul de metileno (Hwang et al., 1998). Portanto, realizamos a pré-incubação das tiras uterinas com ODQ, um bloqueador específico da guanilil ciclase solúvel (sGC). Notavelmente, o efeito do LLO permaneceu inalterado, indicando que a ativação da sGC não é essencial para o relaxamento da musculatura uterina (Buxton et al., 2001).

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) constituem uma via essencial para o relaxamento do músculo liso. O aumento dos níveis de cAMP e cGMP no citosol ativa a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG), respectivamente. Estas quinases promovem o relaxamento da musculatura lisa, incluindo a ativação dos canais de potássio (K^+). A PDE degrada o cAMP e cGMP em seus metabólitos inativos, interrompendo a sinalização celular dependente desses nucleotídeos cíclicos (Houslay and Adams, 2003; Lugnier, 2006).

Assim, para examinar o envolvimento dessa via, aminofilina, um inibidor não seletivo da PDE (Lugnier, 2006), foi empregada como uma ferramenta farmacológica. Observou-se que a presença de aminofilina intensificou o efeito relaxante do LLO, sugerindo a participação da via dos nucleotídeos cíclicos PDEs, possivelmente cAMP, no mecanismo de relaxamento do LLO em útero isolado de ratas.

No útero de ratas, tanto as fontes extracelulares quanto intracelulares de Ca^{2+} desempenham um papel crucial no desenvolvimento do tônus muscular, com a entrada de Ca^{2+} nas células musculares lisas ocorrendo principalmente por meio de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_2V) (Catterall, 2000). Na ausência de cálcio extracelular, a contração do músculo liso é desencadeada pela liberação de cálcio dos estoques intracelulares do retículo sarcoplasmático (RS), ativada por receptores na membrana do RS, incluindo os receptores de rianodina (RyR) e os receptores de trifosfato de inositol (IP_3Rs), que promovem o influxo de Ca^{2+} do RS para o citoplasma celular (Lanner et al., 2010; Vervloessem et al., 2015). Como resultado, foi observado que o LLO inibiu parcialmente as contrações induzidas pelo carbacol em meio sem Ca^{2+} , sugerindo uma possível inibição da liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares. Diante desse achado, optou-se por investigar a contribuição dos receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3R).

A liberação de íons Ca^{2+} dos estoques intracelulares é induzida pela ativação dos receptores de membrana (IP_3R), resultando no influxo de cálcio e subsequente liberação do retículo sarcoplasmático, enquanto na sinalização de Ca^{2+} , estímulos extracelulares

acionam a fosfolipase C, gerando inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que, por sua vez, estimula a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE) através dos receptores IP₃ (IP₃R) (Berridge et al., 2000; Foskett et al., 2007; Prole and Taylor, 2019). Assim, ao incubar com heparina, um bloqueador dos receptores IP₃R, foi observado que o relaxamento induzido pelo LLO não foi significativamente alterado, sugerindo que os canais ativados pelo inositol 1,4,5-trifosfato provavelmente não desempenham um papel em seu efeito.

Diante dos resultados do LLO que apresentou a capacidade de relaxar o útero isolado de ratas, a próxima etapa foi investigar o papel do LLO em um modelo de dismenorreia primária, que é caracterizada por dor abdominal.

A dismenorréia primária pode ser causada por uma anormalidade da contração do músculo liso uterino, que pode ser atribuída aos níveis séricos elevados de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), leucotrienos e ocitocina promovendo intensa contração miometrial, vasoconstrição, resultando na liberação subsequente de citocinas (Chen et al., 2014; Deligeoroglou et al., 2006; Yang et al., 2015). Assim, as principais terapias farmacológicas para dismenorreia primária incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) ou pílulas anticoncepcionais orais (Marjoribanks et al., 2003; Schroll et al., 2023).

Os resultados obtidos demonstraram que o LLO na dose de 100 mg/kg foi capaz de promover uma redução estatisticamente significativa nas contorções abdominais das camundongas, em comparação ao grupo controle negativo. Uma das hipóteses para esse resultado seria a de que o óleo essencial de *L. lasiocalycina* age como antagonista aos receptores de ocitocina (OCT), que foram expressos no miométrio com a aplicação intraperitoneal de cipionato de estradiol durante o protocolo. Dessa maneira, competiu com a ocitocina em seus receptores presentes no miométrio, reduzindo, portanto, as contrações musculares promovidas por esse hormônio (Bittar and Zugaib, 2009). Portanto, o desenvolvimento de antagonistas do receptor de ocitocina pode ter valor terapêutico para a prevenção de problemas com a funcionalidade normal da musculatura lisa uterina e auxiliar na inibição do efeito da dismenorréia primária (Chen et al., 2014).

Com base nos dados apresentados na Figura 7B observou-se uma redução significativa no número de contorções no modelo de dismenorreia, comparável à eficácia da nifedipina, ácido mefenâmico e escopolamina, medicamentos amplamente empregados no tratamento de cólicas menstruais. Em vista disso, optamos por combinar

o LLO com esses medicamentos usando doses subterapêuticas no tratamento da dismenorreia.

Os bloqueadores dos canais de cálcio, como a nifedipina, reduzem a quantidade de cálcio que passa para as células musculares e, assim, impedem a sua contração. É, portanto, sugerido que a administração de nifedipina pode diminuir a dor menstrual ao inibir as contrações uterina (Proctor and Farquhar, 2006). A nifedipina é amplamente utilizada para diminuir as contrações musculares uterinas na prática clínica em obstetrícia, onde é usada para suprimir o trabalho de parto prematuro. A nifedipina também é usada para tratar a hipertensão durante a gravidez (Smith et al., 2000).

Após o tratamento com a subdose de 0,7 mg/kg de nifedipina associado a LLO de 10 mg/kg foi observado efeito significativo quando comparado ao grupo veículo. De acordo com nossos resultados, a combinação de nifedipina oral com LLO resultou em uma redução no número de contrações em comparação com o tratamento exclusivo com nifedipina. Os efeitos colaterais podem abranger edema pulmonar, dor no peito, dispepsia, constipação, câibras musculares, parestesia e poliúria (Holmes Childress and Katz, 1994). Existe a possibilidade de que a combinação da dose de LLO de 10 mg/kg com nifedipina 0,7 mg/kg possa reduzir os efeitos colaterais da nifedipina.

Outra opção terapêutica médica eficaz para a dismenorreia primária incluem os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (Marjoribanks et al., 2003). Os AINEs são altamente eficazes no alívio da dor associada à dismenorreia primária, devido à sua capacidade de inibir a formação de prostaglandinas. No entanto, os AINEs estão associados a efeitos adversos significativos, tais como gastrointestinais, como náuseas, vômitos e azia (Ju et al., 2022). Em nosso estudo, o tratamento com LLO na dose de 10 mg/kg associado com a subdose de 9 mg/kg de ácido mefenâmico apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo veículo.

A escopolamina, um antagonista do receptor muscarínico de acetilcolina, inibe os efeitos da acetilcolina, sendo considerada um antagonista não seletivo, o que pode contribuir para o alívio das cólicas menstruais (Sciorsci et al., 2018). Os medicamentos antimuscarínicos, também conhecidos como medicamentos parassimpáticos, são essencialmente antagonistas competitivos dos receptores muscarínicos, bloqueando as ações do sistema parassimpático. Eles são frequentemente utilizados no controle de espasmos musculares lisos, como agentes antiespasmódicos ou espasmolíticos, contra

hipermotilidade gastroentérica, uterina, urinária, biliar e bronquiolar (Riccardi et al., 2011).

Quando empregada a escopolamina, nossos resultados mostraram que a combinação do LLO na dose de 10 mg/kg associado com a subdose de 0,35 mg/kg de escopolamina apresentou efeito significativo quando comparado ao grupo veículo, sugerindo a influência dos receptores muscarínicos no efeito de LLO no número de contorções.

Com base nos dados apresentados nas figuras 8A a 8D, todas as quatro bloqueadores/ou inibidores testados associado com a dose de 100 mg/kg do LLO demonstraram influência na redução das contorções abdominais induzidas pela ocitocina em comparação com o grupo de controle de receptores bloqueadores/inibidores. No entanto, apenas o grupo tratado com propranolol associado com a dose de 100 mg/kg do LLO exibiu uma redução significativa em relação ao grupo veículo e ao grupo do bloqueador. Esses resultados sugerem que o LLO pode estar estimulando a adenilato ciclase e, conseqüentemente, desencadeando a cascata de relaxamento do músculo liso. Com base nos resultados apresentados, é plausível acreditar que o LLO possui uma ação antidismenorreica, possivelmente mediada por vias dos receptores adrenérgicos.

Existe uma gama de tratamentos disponíveis e alguns deles, como os agonistas dos receptores beta2-adrenérgicos, têm sido usados para tratar mulheres com dismenorreia primária, mas seus efeitos não são claros (Fedorowicz et al., 2012).

A ativação dos receptores beta 2 desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares. Isso inclui a estimulação da adenilato ciclase, resultando na produção de cAMP, que reduz os níveis de cálcio intracelular e ativa a proteína quinase A. Essas alterações inibem a quinase da cadeia leve da miosina e ativam a miosina fosfatase de cadeia leve. Além disso, os agonistas dos receptores beta 2 abrem canais de potássio ativados por cálcio, hiperpolarizando as células musculares lisas. Essa série de eventos resulta no relaxamento do músculo liso (Wallukat, 2002).

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *L. lasiocalycina* (LLO) possui atividade tocolítica em útero isolado, reduzindo as contrações tanto por vias farmacomecânicas quanto

eletromecânicas. O estudo também revela que o LLO pode potencialmente reduzir o número de contorções abdominais, sugerindo sua utilidade no tratamento da dismenorreia primária. A combinação de uma dose fixa de LLO com doses subterapêuticas de três drogas utilizadas na terapia antidismenorreica oferece uma possível solução para minimizar os efeitos adversos dessas drogas. Esses dados corroboram os resultados *in vitro* que mostraram efeito relaxante no útero isolado. No entanto, estudos clínicos são necessários para avaliar o potencial dessas combinações.

REFERÊNCIAS

- (OECD), O. for E.C. and D., 2008. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 4 Heal. Eff.
- Aaronson, P.I., Sarwar, U., Gin, S., Rockenbauch, U., Connolly, M., Tillet, A., Watson, S., Liu, B., Tribe, R.M., 2006. A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706644>
- Acheampong, K., Baffour-Awuah, D., Ganu, D., Appiah, S., Pan, X., Kaminga, A., Liu, A., 2019. Prevalence and predictors of dysmenorrhea, its effect, and coping mechanisms among adolescents in Shai Osudoku district, Ghana. *Obstet. Gynecol. Int.* <https://doi.org/10.1155/2019/5834159>
- Adams, R.P., 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Gruver, TX USA Texensis Publ.
- Agência de Vigilância Sanitária, 2013. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Anvisa 1–48.
- Åkerlund, M., 2002. Involvement of oxytocin and vasopressin in the pathophysiology of preterm labor and primary dysmenorrhea, in: *Progress in Brain Research.* [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)39030-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)39030-7)
- Almeida, R.N., 1999. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Rev. Bras. Farmácia* 80, 72–76.
- Andrade, E.L., Bento, A.F., Cavalli, J., Oliveira, S.K., Schwanke, R.C., Siqueira, J.M., Freitas, C.S., Marcon, R., Calixto, J.B., 2016. Non-clinical studies in the process of new drug development-Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 49.
- Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., de Paula Werner, M.F., Rae, G.A., Smiderle, F.R., Sasaki, G.L., Iacomini, M., Marques, M.C.A., Santos, A.R.S., 2012. Antinociception of β -d-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 872–877.
- Berdeaux, R., Stewart, R., 2012. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *Am. J. Physiol. Metab.*
- Berridge, M.J., Lipp, P., Bootman, M.D., 2000. The versatility and universality of

- calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 1, 11–21.
- Bettendorf, B., Shay, S., Tu, F., 2008. Dysmenorrhea: contemporary perspectives. *Obstet. Gynecol. Surv.* 63, 597–603.
- Bispo, L. dos P., 2015. Propagação, cultivo e produção de óleo essencial de espécies de *Lippia* (Verbenaceae) ocorrentes no Semiárido Baiano.
- Bittar, R.E., Zugaib, M., 2009. Tratamento do trabalho de parto prematuro. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 31, 415–422.
- Buxton, I.L.O., Kaiser, R.A., Malmquist, N.A., Tichenor, S., 2001. NO-induced relaxation of labouring and non-labouring human myometrium is not mediated by cyclic GMP. *Br. J. Pharmacol.* 134, 206–214.
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 521–555.
- Chaud, M., Franchi, A.M., Rettori, V., McCann, S.M., Gimeno, M.F., 1997. Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F₂ α in the estrogenized rat uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 11049–11054.
- Chen, H.-Y., Lin, Y.-H., Su, I.H., Chen, Y.-C., Yang, S., Chen, J., 2014. Investigation on Chinese herbal medicine for primary dysmenorrhea: implication from a nationwide prescription database in Taiwan. *Complement. Ther. Med.* 22, 116–125.
- Chou, C.I., Shih, C.J., Chen, Y.T., Ou, S.M., Yang, C.Y., Kuo, S.C., Chu, D., 2016. Adverse effects of oral nonselective and cyclooxygenase-2-selective nsaids on hospitalization for acute kidney injury: A nested case-control cohort study. *Med. (United States)*. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002645>
- Chwalisz, K., Garfield, R.E., 2000. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum. Reprod.* 15, 96–111.
- de Albuquerque, U.P., de Medeiros, P.M., de Almeida, A.L.S., Monteiro, J.M., de Freitas Lins Neto, E.M., de Melo, J.G., dos Santos, J.P., 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>
- de Moraes Pultrini, A., Galindo, L.A., Costa, M., 2006. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. *Life Sci.* 78, 1720–1725.
- Deligeoroglou, E., Tsimaris, P., Deliveliotou, A., Christopoulos, P., Creatsas, G., 2006. Menstrual disorders during adolescence. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* PER 3, 150–159.
- Direkvand-Moghadam, A., Jaafarpour, M., Khani, A., Taheri, S., Delpisheh, A., 2014. The effect of oral propranolol plus oxytocin versus oxytocin only on the process and outcome of labor: A double-blind randomized trial. *Iran. J. Nurs. Midwifery Res.* 19, 491–495.
- Drini, M., 2017. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aust. Prescr.* <https://doi.org/10.18773/austprescr.2017.037>
- Duangjai, A., Goh, B.-H., Lee, L.-H., Saokaew, S., 2018. Relaxant effects of *Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton flower extract on isolated rat ileum contractions and the mechanisms of action. *J. Tradit. Complement. Med.* 8, 515–520.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice** College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* 46, 208–209.
- Ehlert, P.A.D., Ming, L.C., Marques, M.O.M., Fenandes, D.M., Rocha, W.A., Luz,

- J.M.Q., Silva, R.F., 2013. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) NE Br.]. *Rev. Bras. Plantas Med.* 15, 72–77.
- El Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2004. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga reptans* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 91, 43–50.
- Eogan, M., McKenna, P., 2004. Delaying preterm delivery at the threshold of viability. *J. Obstet. Gynaecol. (Lahore)*. 24, 459–460.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., 2012. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *J. Ethnopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.041>
- Evora, P.R.B., 2016. Methylene blue is a guanylate cyclase inhibitor that does not interfere with nitric oxide synthesis. *Texas Hear. Inst. J.* <https://doi.org/10.14503/THIJ-15-5629>
- Fanning, R.A., Sheehan, F., Leyden, C., Duffy, N., Iglesias-Martinez, L.F., Carey, M.F., Campion, D.P., O'Connor, J.J., 2017. A role for adrenergic receptors in the uterotonic effects of ergometrine in isolated human term nonlaboring myometrium. *Anesth. Analg.* 124, 1581–1588. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001765>
- Fedorowicz, Z., Nasser, M., Jagannath, V.A., Beaman, J.H., Ejaz, K., van Zuuren, E.J., 2012. Beta2-adrenoceptor agonists for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Fernández-Martínez, E., Onieva-Zafra, M.D., Parra-Fernández, M.L., 2018. Lifestyle and prevalence of dysmenorrhea among Spanish female university students. *PLoS One* 13, e0201894.
- Ferreira, J.J., Butler, A., Stewart, R., Gonzalez-Cota, A.L., Lybaert, P., Amazu, C., Reinl, E.L., Wakle-Prabakaran, M., Salkoff, L., England, S.K., Santi, C.M., 2019. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na⁺-activated K⁺ channel, Slo2.1. *J. Physiol.* 597, 137–149. <https://doi.org/10.1113/JP276806>
- Foskett, J.K., White, C., Cheung, K.H., Mak, D.O.D., 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels. *Physiol. Rev.* <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2006>
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K., Mayer, B., 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol. Pharmacol.*
- Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81, 629–683.
- Hirsh, L., Dantes, A., Suh, B.S., Yoshida, Y., Hosokawa, K., Tajima, K., Kotsuji, F., Merimsky, O., Amsterdam, A., 2004. Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs, in: *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.05.026>
- Holmes Childress, C., Katz, V.L., 1994. Nifedipine and its indications in obstetrics and gynecology. *Obstet. Gynecol.* <https://doi.org/10.1097/00006250-199404000-00024>
- Houslay, M.D., Adams, D.R., 2003. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370, 1–18.
- Hughes, S.J., Hollingsworth, M., 1997. Relaxin as a relaxant of the isolated rat uterus: Comparison with its mechanism of action in vivo. *Gen. Pharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00005-0)
- Hwang, T.L., Wu, C.C., Teng, C.M., 1998. Comparison of two soluble guanylyl cyclase

- inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702181>
- Iacovides, S., Avidon, I., Baker, F.C., 2015. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. *Hum. Reprod. Update* 21, 762–778.
- Ignarro, L.J., 1989. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* 65, 1–21.
- Ju, Z., Li, M., Xu, J., Howell, D.C., Li, Z., Chen, F.-E., 2022. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. *Acta Pharm. Sin. B* 12, 2790–2807.
- Khan, R.N., Matharoo-Ball, B., Arulkumaran, S., Ashford, M.L.J., 2001. Potassium channels in the human myometrium. *Exp. Physiol.* <https://doi.org/10.1113/eph8602181>
- Kho, K.A., Shields, J.K., 2020. Diagnosis and management of primary dysmenorrhea. *Jama* 323, 268–269.
- Lai, P.F., Young, R.C., Tribe, R.M., Johnson, M.R., 2021. Evaluating aminophylline and progesterone combination treatment to modulate contractility and labor-related proteins in pregnant human myometrial tissues. *Pharmacol. Res. Perspect.* 9, 1–18. <https://doi.org/10.1002/prp2.818>
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., Hamilton, S.L., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003996.
- Leenaars, C.H.C., Kouwenaar, C., Stafleu, F.R., Bleich, A., Ritskes-Hoitinga, M., De Vries, R.B.M., Meijboom, F.L.B., 2019. Animal to human translation: A systematic scoping review of reported concordance rates. *J. Transl. Med.* 17, 1–22.
- Lorca, R.A., Prabakaran, M., England, S.K., 2014. Functional insights into modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. *Front. Physiol.* <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00289>
- Lugnier, C., 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol. Ther.* 109, 366–398.
- Marjoribanks, J., Proctor, M., Farquhar, C., Sangkomkarn, U.S., Derks, R.S., 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea, in: *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001751>
- Marques, T.H.C., Branco, M.L.B.G.C., Medeiros, J.-V.R., Lima, T.C., de Sousa, D.P., de Freitas, R.M., 2014. Anticonvulsant effects of acute treatment with cyane-carvone at repeated oral doses in epilepsy models. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 421–424.
- Mattos, G., Camargo, A., de Sousa, C.A., Zeni, A.L.B., 2018. Medicinal plants and herbal medicines in Primary Health Care: the perception of the professionals/Plantas medicinais e fitoterapicos na Atencao Primaria em Saude: percepcao dos profissionais. *Cien. Saude Colet.* 23, 3735–3745.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G., Garfield, R., 2005. Nitric Oxide and its Role During Pregnancy: From Ovulation to Delivery. *Curr. Pharm. Des.* 9, 359–380. <https://doi.org/10.2174/1381612033391784>
- Munglue, P., Eumkep, G., Wray, S., Kupittayanant, S., 2013. The effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and L-citrulline on rat uterine contractility. *Reprod. Sci.* 20, 437–448. <https://doi.org/10.1177/1933719112459223>
- Nair, A., Jacob, S., 2016a. A simple practice guide for dose conversion between animals

- and human. *J. Basic Clin. Pharm.* <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Nair, A., Jacob, S., 2016b. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.* 7, 27. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>
- Naseri, M.K.G., Mohammadian, M., Naseri, Z.G., 2008. Antispasmodic effect of *Physalis alkekengi* fruit extract on rat uterus. *Iran. J. Reprod. Med.* 6, 193–198.
- Oliveira, A.R.M.F. de, 2014. Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia*.
- Parasuraman, S., 2011. Toxicological screening. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2, 74.
- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez Mata, D., Villar, A., 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *J. Ethnopharmacol.* [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)
- Piper, I., Minshall, E., Downing, S.J., Hollingsworth, M., Sadraei, H., 1990. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. *Br. J. Pharmacol.* 101, 901–907. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14178.x>
- Proctor, M., Farquhar, C., 2006. Diagnosis and management of dysmenorrhoea. *Br. Med. J.* <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7550.1134>
- Prole, D.L., Taylor, C.W., 2019. Structure and function of IP3 receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11, a035063.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3–33.
- Riccardi, C., Rossi, F., Cuomo, V., 2011. Farmacologia. Principi di base e applicazioni terapeutiche, in: *Farmacologia. Principi Di Base e Applicazioni Terapeutiche*. Edizioni Minerva Medica, pp. 1–1125.
- Schroll, J.B., Black, A.Y., Farquhar, C., Chen, I., 2023. Combined oral contraceptive pill for primary dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Sciorsci, R.L., Piccinno, M., Rizzo, A., 2018. Scopolamine butylbromide decreases the xylazine-mediated contractility in bovine pregnant uteri. *Theriogenology* 108, 348–353.
- Silva, F.S., Menezes, P.M.N., Sá, P.G.S. de, Oliveira, A.L. de S., Souza, E.A.A., Almeida, J.R.G. da S., Lima, J.T. de, Uetanabaro, A.P.T., Silva, T.R. dos S., Peralta, E.D., 2016. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. *Pharm. Biol.* 54, 25–34.
- Smeriglio, A., Tomaino, A., Trombetta, D., 2014. Herbal products in pregnancy: experimental studies and clinical reports. *Phyther. Res.* 28, 1107–1116.
- Smith, P., Anthony, J., Johanson, R., 2000. Nifedipine in pregnancy. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 107, 299–307.
- Soboll, G., Shen, L., Wira, C.R., 2006. Expression of Toll-like receptors (TLR) and responsiveness to TLR agonists by polarized mouse uterine epithelial cells in culture. *Biol. Reprod.* 75, 131–139.
- Song, T., Hao, Q., Zheng, Y.M., Liu, Q.H., Wang, Y.X., 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates TRPC3 channels to cause extracellular Ca^{2+} influx in airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajplung.00148.2015>
- Stott, J.B., Jepps, T.A., Greenwood, I.A., 2014. KV7 potassium channels: A new therapeutic target in smooth muscle disorders. *Drug Discov. Today.* <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.003>
- Tiboni, G.M., Giampietro, F., 2000. Inhibition of nitric oxide synthesis causes preterm delivery in the mouse. *Hum. Reprod.* 15, 1838–1842.

- Tiboni, G.M., Giampietro, F., Lamonaca, D., 2001. The soluble guanylate cyclase inhibitor methylene blue evokes preterm delivery and fetal growth restriction in a mouse model. *In Vivo* 15, 333–337.
- Utzeri, E., Usai, P., 2017. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i22.3954>
- Vervloessem, T., Yule, D.I., Bultynck, G., Parys, J.B., 2015. The type 2 inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca²⁺-release channel. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 1853, 1992–2005.
- Wallukat, G., 2002. Die β -adrenergen Rezeptoren. *Herz* 27, 683–690.
- Yang, L., Cao, Z., Yu, B., Chai, C., 2015. An in vivo mouse model of primary dysmenorrhea. *Exp. Anim.* <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0111>
- Zhao, Y., Vanhoutte, P.M., Leung, S.W.S., 2015. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 83–94.
- Zhou, H., Chepilko, S., Schütt, W., Choe, H., Palmer, L.G., Sackin, H., 1996. Mutations in the pore region of ROMK enhance Ba²⁺ block. *Am. J. Physiol.* <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.6.c1949>

CONCLUSÃO GERAL

Acredita-se que os objetivos do estudo foram alcançados, visto que foi possível descrever as relações de influência das plantas medicinais na dismenorreias e analisar a relação de plantas medicinais associada com as drogas com a fisiopatologia dos principais distúrbio da musculatura lisa uterina, principalmente da dismenorreias. O estudo também proporcionou uma compreensão aprofundada sobre o uso de plantas medicinais, especificamente os óleos essenciais das espécies *Lippia insignis* e *Lippia lacilocalycina*, como potenciais tratamentos para os sintomas das dismenorreias. Esses achados reforçam a importância dos estudos sobre espécies de *Lippia* e destacam a relevância da biotecnologia na medicina natural. A utilização de plantas medicinais como *L. insignis* e *L. lasiocalycina* pode oferecer alternativas naturais e eficazes para o tratamento da dismenorreia, com o potencial de minimizar os efeitos adversos associados às terapias convencionais. A combinação de produtos naturais com drogas utilizadas na clínica médica apresenta-se como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos, proporcionando benefícios significativos para as mulheres que sofrem de dismenorreia. Em suma, os resultados deste estudo não apenas confirmam a eficácia dos óleos essenciais dessas espécies no tratamento de cólicas uterinas, mas também promovem uma maior integração entre a biotecnologia e a medicina natural. Isso abre caminho para novas pesquisas e desenvolvimento de terapias baseadas em produtos naturais, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de pacientes com dismenorreia e outras condições associadas à contratilidade anormal do músculo liso.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W.S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia lasiocalycina* Cham. (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 236–240, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.007>

ANDERSEN, M.L. et al. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, Editora Cromosete, p.167, 2004.

ANDRÉS, M.F. et al. Nematicidal activity of essential oils: a review. **Phytochemical Review**, v.11, p.371-390, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9263-3>

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x>

ATKINS S. Verbenaceae. *In*: Kubtzki K & Kadereit JW (eds.) The families and genera of vascular plants. Vol. 7. **Springer-Verlag**, Berlin. p. 449-468, 2004.

ATTIA, M.; KIM, S.; RO, D.K. Molecular cloning and characterization of (+)-epi- α -bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in *Lippia dulcis*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 527, n. 1, p. 37-44, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.07.010>

BACELLAR-SCHITTINI et al. Avaliação do estado de fragmentação de áreas de Caatinga importantes para a conservação da biodiversidade da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco. **XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, p. pp. 3511-3518, 2009.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BANDONI, A.L.; CZEPACK, M.P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitoria: **Edufes**, p. 624, 2008.

BERNARDI M, LAZZERI L, PERELLI F, REIS FM, PETRAGLIA F. Dysmenorrhea and related disorders. **F1000Res**. v. 56, p. 1645, 2017. <https://10.12688/f1000research.11682.1>

BISPO, L.P. **Propagação, cultivo e produção de óleo essencial de espécies de *Lippia* (Verbenaceae) ocorrentes no semiárido baiano**. 2015. 86 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, 2015.

BIZZO, H.R ; HOVELL, A.M.C .; REZENDE, C.M. Óleos essenciais brasileiros: visão geral, desenvolvimentos e perspectivas. **Química Nova** , v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOUZAS, I.; BRAGA, C.; LEÃO, L. Ciclo menstrual na adolescência. **Adolescência & Saúde, Rio de Janeiro**, v. 7, n. 3, p. 59-63, 2010.

BRAUN B, HORTON T. Endocrine regulation of exercise substrate utilization in women compared to men. **Exerc Sport Sci Rev.** v. 29, p.149-54. 2001. [https:// 0091-6631/2904/149-154](https://0091-6631/2904/149-154)

BUENO, O.L.; LEONHARDT, C. Distribuição e potencial paisagístico dos gêneros *Citharexylum* L. e *Verbenoxylum* Tronc. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, v. 66, n. 1, p. 47-60, 2011.

CARVALHO, P.M.M. et al. Effect of the *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil and its main constituents, citral and limonene, on the tracheal smooth muscle of rats. **Biotechnology reports**, v. 17, p. 31-34, 2018. <https://10.1016/j.btre.2017.12.002>

CASTRO, V.L. Estudo Experimental em Ratos da Interação Mãe-Filhote Expostos e Agroquímicos. **Embrapa**, p. 1-7, 2006.

CATTERALL, W.A. Voltage-gated calcium channels. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 8, p. a003947, 2011. <https://10.1101/cshperspect.a003947>

CHAUDHRY, S.R.; CHAUDHRY, K. Anatomy, abdomen and pelvis, uterus round ligament. v 2 p.4, 2018. [PMID: 29763145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29763145/)

CHEN, Hsing-Yu et al. Investigation on Chinese herbal medicine for primary dysmenorrhea: implication from a nationwide prescription database in Taiwan. **Complementary therapies in medicine**, v. 22, n. 1, p. 116-125, 2014. <https://10.1016/j.ctim.2013.11.012>

CONTI C. Revisión anatómica y funcional del aparato reproductor del ratón. In: Serie Ponencias. Manual de técnicas básicas de criopreservación de gametos y embriones de ratón. Madr: **Ciemat.Avda. Complutense**, 2001.

DELIGEOROGLOU E, TSIMARIS P. Menstrual disturbances in puberty. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**; 24(2):157-171, 2010. [https:// 10.1016/j.bpobgyn.2009.11.001](https://10.1016/j.bpobgyn.2009.11.001)

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002. <https://doi.org/10.3390/ijpb13010003>

DIAS, E.; SIMÃO, D.E.; NOVAIS, J.S. Effect of the different phases of the menstrual cycle in a test of 10RM. **Fitness & Performance Journal**, Rio de Janeiro, v. 4, no. 5, p. 288-292, 2005.

DODDS, K. N. et al. Identification of a novel distension-evoked motility pattern in the mouse uterus. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 321, n. 3, p. 317-327, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00327.2020>

EDDINGER, Thomas J.; MEER, Daniel P. Myosin II isoforms in smooth muscle: heterogeneity and function. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 293, n. 2, p. C493-C508, 2007. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00131.2007>

ESCOBAR, P., et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200013>

FIGUEIREDO, A.C; PEDRO, L.G.; BARROSO, J. G. Plantas aromáticas e medicinais. Óleos essenciais e voláteis. **Revista da APH N. °**, v. 114, p. 30, 2014.

FOX, M.C. et al. A phase 2b multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to evaluate the efficacy and safety of vaginal rings containing norgestrel acetate or etonogestrel and 17 β -estradiol in the treatment of women with primary dysmenorrhea. **Contraception**, v. 99, n. 2, p. 125–130, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2018.10.009>

FRASIER, C. R. et al. Stage of the estrous cycle does not influence myocardial ischemia-Reperfusion injury in rats (*Rattus norvegicus*). **Comparative Medicine**, v. 63, n. 5, p. 416–421, 2013. [PMCID: PMC3796752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/)

GARRETT, A.S. et al. Modeling and experimental approaches for elucidating multi-scale uterine smooth muscle electro- and mechano-physiology: A review. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 1–18, 2022. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.1017649>

GHONEIM, I. M. et al. Effect of oxytocin and PGF2 α on chlortetracycline absorption from the uterus of early postpartum camels (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 645-649, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.028>

GILANNI, A.H. et al. Presence of antispasmodic, antidiarrheal, antisecretory, calcium antagonist and acetylcholinesterase inhibitory steroidal alkaloids in *Sarcococca saligna*. **Planta Medica**, v. 71: p. 120-125, 2005. <https://doi.org/10.1055/s-2005-837777>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702011000100005>

GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 166–169, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.009>

GOUVEIA, A. et al. The effects of diazepam on the elevated T-maze are dependent on the estrous cycle of rats. **Psychology & Neuroscience**, v. 2, n. 2, p. 227-233, 2009. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2009.2.016>

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic plants and their bioactive constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 207–220, 2011. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250317>

GUIMARÃES, A.G.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Monoterpenes with analgesic activity: a systematic review. **Phytotherapy research**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2013. <https://doi.org/10.1002/ptr.4686>

GUIMARÃES, I.; PÓVOA, A.M. Primary Dysmenorrhea: Assessment and Treatment. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 42, n. 8, p. 501–507, 2020. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1712131>

GULLO, V.P.; HUGHES, D.E. Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 2, n. 3, p. 281-286, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.08.002>

HAWKINS SM, MATZUK MM. The menstrual cycle: basic biology. **Ann NY Acad. Sci.** v. 1135, p.10-18, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>

HENZL, M.R. et al. Lysosomal concept of menstrual bleeding in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 34, n. 5, p. 860-875, 1972. <https://doi.org/10.1210/jcem-34-5-860>

HILLARD PJ. Puberty, menarche, and the menstrual cycle: what do we know, and what do we teach? **J Pediatr Adolesc Gynecol.** v. 31 p.331, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2018.05.004>

HOFMANN, F.; FEIL, R.; KLEPPISCH, T.; SCHLOSSMANN, J. Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 1–23, 2006. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11682.1>

JANNUZZI, H. et al., Avaliação agrônômica e identificação de quimiotipos de erva cidreira no Distrito Federal. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000400006>

KAPLAN, M. NAZIROGLU, M. GÜNEY, AND M. AYKUR, “Nonsteroidal anti-inflammatory drug modulates oxidative stress and calcium ion levels in the neutrophils of patients with primary dysmenorrhea,” **Journal of Reproductive Immunology**, vol. 100, no. 2, pp. 87–92, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.10.004>

KOTANI, M. et al. Multiple signal transduction pathways through two prostaglandin E receptor EP3 subtype isoforms expressed in human uterus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 4315–4322, 2000. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6989>

LI, Zhenyu et al. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4423-4429, 2003.

<https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3210>

LIMA, R.K et al., Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 664-671, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MACÊDO, C. A. et al. *Lippia organoides* essential oil induces tocolytic effect in virgin rat uterus and inhibits writhing in a dysmenorrhea mouse model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 290, p. 115099, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115099>

MACHADO, B.F.M.T.; JUNIOR, A.F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MALIK, M.; ROH, M.; ENGLAND, S. K. Uterine contractions in rodent models and humans. **Acta Physiologica**, v. 231, n. 4, p. 1–17, 2021. <https://doi.org/10.1111/apha.13607>.

MARTINELLI, G. e MORAES, M.A. Livro vermelho da flora do Brasil.: Andrea Jakobsson: **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2013.

MARTINS, L.L. Ovarios salpingohisterectomia em cutias: técnicas anestésica e cirúrgica, análise morfológica uterina e microbiológica da vagina e do útero *Dasyprocta azarae*, Lichtenstein, p.1823, 2009.

MELEGARIO, S.M. et al. A influência do ciclo menstrual na flexibilidade em praticantes de ginástica de academia. **Revista brasileira de medicina do esporte**, v. 12, p. 125-128, 2006.

MELO, J.I et al. Verbenaceae sensu lato em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 3, p. 41-47, 2010.

MELO, R.C. **Atividade inseticida de quimiotipos de *Lippia gracilis* sobre *Diaphania hyalinata* e *Cryptolestes ferrugineus***. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em agricultura e biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, p.49, 2014.

MITCHELL, B.F. et al. The uterine myocyte as a target for prevention of preterm birth. **Facts, views & vision in ObGyn**, v. 5, n. 1, p. 72, 2013b.

MONTEIRO, M. V. B., et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 378–382, 2007.

NEW-MAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

OGUT, O.; BROZOVICH, F. V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 35, n. 4, p. 347-355, 2003.

OLAFSDOTTIR, L.B. *et al.* Natural history of irritable bowel syndrome in women and dysmenorrhea: a 10-year follow-up study. **Gastroenterology research and practice**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/534204>

OLIVEIRA, A.R.M.F. **Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia***. 2014. 116 p. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2014.

OLIVEIRA, C.J.; ARAÚJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Goiânia, v. 9, n. 1, p. 93-105, 2007.
<https://doi.org/10.5216/ree.v9i1.7138>

ORTIZ R. M. I.; ROMERO Q. L. C. Dysmenorrhea: the most common and mismanaged chronic pain in women. **Medwave**, v. 13, n. 3, p. 1-3, 2013.
<http://doi.org/10.5867/medwave.2013.03.5656>

PAN, J. C. *et al.* The traditional Chinese medicine prescription pattern of patients with primary dysmenorrhea in Taiwan: a large-scale cross sectional survey. **Journal of ethnopharmacology**, v. 152, n. 2, p. 314-319, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.002>

PARDINI DP. Alterações hormonais da mulher atleta. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, p. 343-51, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302001000400006>

PASCUAL, M.E. *et al.*, *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00234-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00234-3)

PEDROSO, R.D.S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.1590/S0103-73312021310218>

PEREIRA, R. C. A.; MOREIRA, A. L. M. **Manjeriço: cultivo e utilização** – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

PEREIRA, R.J.; GRAÇAS, C.M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PEREIRA-DE-MORAIS, L. *et al.* Tocolytic activity of the *Lippia alba* essential oil and its major constituents, citral and limonene, on the isolated uterus of rats. **Chemico-**

biological interactions, v. 297, p. 155-159, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.006>

POTIKUL, C; TANGJITGAMOL, S; KHUNNARONG, J; ET AL. **Uterine sarcoma: clinical presentation, treatment and survival outcomes in thailand.** *asian pac j cancer prev.* v. 17(4), p.1759-1767, 2016.

<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.4.1759>

PU BC, FANG L, GAO LN, LIU R, LI AZ (2015) Animal study on primary dysmenorrheal treatment at different administration times. **Evid Based Complement Alternat Med**: v.3, p.1-8, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/367379>

ROCHA, L.P.B da *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v.10, n.10, p. 44101018282, 2021.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18282>

RYAN, S. A. The Treatment of Dysmenorrhea. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 2, p. 331–342, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2016.11.004>

SALIMENA, F. R. G.; MULGURA, M. 2015. **Lippia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15170>>. Acesso em: 21 de Set. 2023.

SANTOS, A.C. B.; NUNES, T. S.; COUTINHO, T. S.; SILVA, M. A. P. Uso popular de espécies medicinais da família Verbenaceae no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 17, n. 4 supl II, p. 980-991, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_083

SANTOS, D. R. **Atividade inseticida de extratos e óleos essenciais de espécies do gênero Lippia contra Callosobruchus maculatus (Fabricius, 1775) e Nasutitermes corniger (Motschulsky, 1885).** 2017. 106 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana - BA, 2017.

SCHMIDT M et al. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. **Pharmacol Rev** 65(2): 670-709, 2013. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003707>

SEOW, C. Y. Myosin crossbridge, contractile unit, and the mechanism of contraction in airway smooth muscle: A mechanical engineer's perspective. **Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy**, v. 2, n. 1, p. 010804, 2019 <https://doi.org/10.1115/1.4042479>

SEZEREMETA, D.C. et al. Dysmenorrhoea: Occurrence in the Life of Academics of the Health Area. **Biological and Health Sciences**, vol.15, nº 2, p. 123-126, 2013.

- SILVA, F.S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 25-34, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1005751>
- SILVA, R.E.R. et al. Vasorelaxant effect of the *Lippia alba* essential oil and its major constituent, citral, on the contractility of isolated rat aorta. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 792-798, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.073>
- SILVEIRA, J.C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 8, n. 15, p. 20139-20152, 2012.
- SIMON, L.S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their risk: a **story still in development**. 2013. <https://doi.org/10.1186/ar4173>
- SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu Potencial Bioativo e Importância na Medicina Veterinária e Aquicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 1, p. 109–123, 2013.
- SOUSA, D.P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, p. 2233–2252, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16032233>
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Verbenaceae. In: V. C. Souza; H. Lorenzi (ed.), **Botânica sistemática**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa. 768 p., 2005.
- TOMAZZONI, M.I; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêuta. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, p. 115-121, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0104-07072006000100014>
- VALENTIN, A. et al. Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1439-1442, 1995. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00522-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00522-9)
- VEALE, D.J.H.; OLIVER, D.W.; HAVLIK, I. The effects of herbal oxytocics on the isolated “stripped” myometrium model. **Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1381-1388, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00719-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00719-0)
- VEIGA JUNIOR, V.F.;PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants: Safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>
- VELOSO G.C.A et al. Flavonoids from *Varronia dardani* (Taroda) JS Mill (cordiaceae) and the evaluation of spasmolytic activity of its crude ethanolic extract. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4197-4201, 2021. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1753737>

WALLACE, S; KEIGHTLEY, A.; GIE, C. Dysmenorrhoea. **The Obstetrician & Gynaecologist**, v. 12, n. 3, p. 149-154, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2014.07.003>

WIRTH, A.; OFFERMANN, S. G-Protein-Coupled Receptors in Smooth Muscle. **Muscle - Biology and Mechanisms of Disease**, p. 1145-1153, 2012. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043703>

WRAY, S.; NOBLE, K. Sex hormones and excitation–contraction coupling in the uterus: the effects of oestrous and hormones. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n.4, p. 451-461, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01665.x>

YANG, L. et al. An in vivo mouse model of primary dysmenorrhea. **Experimental animals**, v. 64, n. 3, p. 295–303, 2015. <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0111>

ANEXO A - Declaração da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UNIVASF



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Certificado de autorização

Certificamos que o projeto intitulado: "INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS OBTIDOS DE ESPÉCIES DE *Lippia* (VERBENACEAE) EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO*", registrado com o nº 0004/261120, sob a responsabilidade de Cicero André Ferreira Macêdo - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em 26/11/2020.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino (<input checked="" type="checkbox"/>) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 31/03/2021 a 28/12/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Cavia porcellus</i> ; <i>Rattus norvegicus</i> *; <i>Mus musculus</i> **
Nº de animais	260 M; 440 F*; 744 M e 216 F** = 1660
Peso/Idade	300-500 g / 8 a 12 semanas; 150-250 g / 6 a 8 semanas*; 25-35 g / 6 a 8 semanas**
Sexo	Ambos
Origem	Biotério Central da UNIVASF

Em: 16/03/2021

Diego César Nunes da Silva
DIEGO CÉSAR NUNES DA SILVA
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 CEUA/UNIVASF