



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



FABRÍCIO SOUZA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Lippia*
***thymoides* MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)**

Feira de Santana, BA
2012

FABRÍCIO SOUZA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO DE *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER (VERBENACEAE)

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

Orientador: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese

Co-orientadores: Prof. Dr. Julianeli Tolentino de Lima

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Feira de Santana, BA
2012

A minha linda filha Cecília e minha esposa maravilhosa Kilma, as motivações de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida e por ter me presenteado com uma família maravilhosa.

A meus pais **Francisco** e **Elenice**, pelo exemplo de vida e apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, vibrando comigo a cada conquista.

A meus irmãos **César**, **Sérgio**, **Flávio** e **Soráya**, pela união, conselhos, compartilhamento de alegrias e angústias, enfim, por todos os momentos que vivemos e ainda viveremos.

A minha esposa maravilhosa **Kilma**, pelo amor, carinho, compreensão, paciência e por fazer parte da minha vida. *Te amo muito!*

A **Profa. Angélica Lucchese**, minha eterna orientadora e mãe científica, por acreditar em mim, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo e por me incentivar desde a iniciação científica a seguir uma carreira acadêmica.

Aos **Profs. Jackson Guedes** e **Julianeli Tolentino**, meus co-orientadores, pelo acolhimento que me deram quando cheguei à UNIVASF, grande apoio no desenvolvimento deste trabalho e pelas conversas pouco científicas que tivemos e temos em cada encontro.

A todos os professores do Colegiado de Ciências Farmacêuticas da UNIVASF, especialmente, **Xirley Nunes**, **Gabriela Maia**, **Luciano Ribeiro** e **David Neri**, pela amizade e convivência que tivemos e teremos nas próximas décadas.

A todos os estudantes de Ciências Farmacêuticas, especialmente **Pedro Modesto**, **Pedro Guilherme** e **Henrique Ribeiro**, pelo apoio constante no desenvolvimento dos experimentos.

A **André Luis**, pela grande ajuda na realização das análises fitoquímicas e do ensaio de atividade antimicrobiana.

A **Juliane Cabral**, pelo grande apoio na realização dos experimentos de nociceção, e **Sheilla Andrade**, pelas análises morfométricas dos cortes de pele.

A **Edna Peralta**, pela colaboração na realização dos experimentos com micro-organismos.

A **Leonardo Neves** e **Roniere Alencar**, pelo apoio técnico fundamental na realização dos experimentos com animais.

A **UEFS** e **PPGBiotec**, por me proporcionarem mais uma etapa de formação acadêmica.

A **UNIVASF**, por possibilitar as condições técnicas que garantiram o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

A **todos os meus amigos e familiares** que não citei acima, mas fizeram parte deste trabalho por estarem presentes em minha vida!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

A espécie *Lippia thymoides* (Verbenaceae), conhecida popularmente como alecrim do mato ou alecrim do campo, é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de feridas, bronquite, reumatismo e febre. Neste trabalho foi investigado o perfil fitoquímico e farmacológico dessa espécie, correlacionando com o uso popular. Os óleos essenciais obtidos nas quatro estações climatológicas tiveram como constituinte majoritário o sesquiterpeno β -cariofileno. A espécie *L. thymoides* apresentou potente atividade antioxidante no ensaio de sequestro do radical DPPH, provavelmente devido ao alto teor de constituintes fenólicos. Os óleos essenciais inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, enquanto que as frações diclorometano e acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e caules inibiram o crescimento de *S. aureus*, *Micrococcus luteus* e *Bacillus cereus*. Os extratos metanólicos das folhas e caules de *L. thymoides* não estimularam a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. O extrato metanólico das folhas significativamente reduziu a temperatura retal de ratos submetidos ao ensaio de hipertermia induzida por hiperpirexia com injeção de *Saccharomyces cerevisiae*. O óleo essencial dessa espécie apresentou atividade antinociceptiva em camundongos, provavelmente pelo efeito anti-inflamatório do β -cariofileno, 1,8-cineol, canfeno e borneol. A espécie *L. thymoides* apresentou atividade espasmolítica *in vitro* em órgãos isolados, com os óleos essenciais relaxando útero de rata e aorta de rato de maneira independente do endotélio, enquanto que os extratos metanólicos e frações das folhas e caules apresentaram atividade espasmolítica em traqueia de cobaia. Este último efeito pode estar relacionado ao antagonismo competitivo com receptores muscarínicos, conforme foi observado com a fração diclorometano do extrato metanólico das folhas. Os resultados demonstram que *L. thymoides* é uma fonte de substâncias de interesse farmacêutico, explicando parcialmente a utilização popular dessa espécie no tratamento de feridas, reumatismo, febre e bronquite.

Palavras-chave: Verbenaceae. *Lippia thymoides*. Óleo essencial. Febre. Atividade antimicrobiana. Relaxamento de músculo liso.

ABSTRACT

The species *Lippia thymoides* (Verbenaceae), popularly known as “alecrim do mato” or “alecrim do campo”, is used in the folk medicine to treat wounds, bronchitis, rheumatism and fever. In this work was investigated the phytochemical and pharmacological profile of this species, correlating with its popular use. Essential oils obtained in the four seasons had as majoritary constituent the sesquiterpene β -caryophyllene. The species *L. thymoides* presented potent antioxidant activity in the DPPH assay, probably due to elevated content of phenolics. Essential oils inhibited the growth of bacteria *Staphylococcus aureus*, while the dichloromethane and ethyl acetate fractions from leaves and stems methanolic extracts inhibited the growth of *S. aureus*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*. Methanolic extracts from leaves and stems not stimulated the cutaneous wound healing in rats. Methanolic extract from leaves significantly reduced the rectal temperature in rats submitted to hyperthermia induced by hyperpyrexia with injection of the *Saccharomyces cerevisiae*. Essential oil these specie presented antinociceptive activity in mices, probably due to anti-inflammatory effect of β -caryophyllene, 1,8-cineole, camphene and borneol. The specie *L. thymoides* presented spasmolytic activity *in vitro* in isolated organs, with the essential oils relaxing rat uterus and rat aorta of endothelium-independent manner and methanolic extracts and fractions from leaves and stems relaxing guinea-pig trachea smooth muscles. This last effect might be related to competitive antagonism with muscarinic receptors, as it was observed with the dichloromethane fraction from methanolic extract of the leaves. These results showed that *L. thymoides* is a source of substances of pharmaceutical interest, explaining partially the folk use of this species to treat wounds, rheumatism, fever and bronchitis.

Keywords: Verbenaceae. *Lippia thymoides*. Essential oil. Fever. Antimicrobial activity. Smooth muscle relaxation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Descoberta e desenvolvimento de fármacos e medicamentos: abordagem convencional <i>versus</i> farmacologia reversa	21
Figura 2 – Fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais no período de 2000 a 2010, mostrando a relação com os compostos protótipos.	23
Figura 3 – Foto de <i>L. thymoides</i> em seu habitat.	54
Figura 4 – Foto da exsicata de <i>L. thymoides</i> (esquerda) e destaque da ficha de identificação (direita).	55
Figura 5 – Estruturas químicas dos constituintes dos óleos essenciais das folhas de <i>L. thymoides</i> .	79
Figura 6 – Curva de calibração do ácido gálico obtida por regressão linear a partir da determinação colorimétrica das soluções entre 50 e 500 µg/mL utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau.	80
Figura 7 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> .	82
Figura 8 – Potencial antioxidante dos extratos e frações das folhas de <i>L. thymoides</i> .	84
Figura 9 – Potencial antioxidante dos extratos e frações dos caules de <i>L. thymoides</i> .	85
Figura 10 – Atividade antioxidante dos controles positivos utilizados.	86
Figura 11 – Efeito dos extratos metanólicos das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> sobre a deposição de tecido fibroso em ratos.	91
Figura 12 – Avaliação histopatológica da área onde foi realizado o ferimento nos ratos.	92
Figura 13 – Efeito dos extratos metanólicos das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> sobre a febre induzida por hiperpirexia em ratos jovens.	94
Figura 14 – Atividade antinociceptiva do óleo essencial TOP obtido de <i>L. thymoides</i> sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	96
Figura 15 – Atividade antinociceptiva de TOP sobre os componentes neurogênico e inflamatório do estímulo nociceptivo do teste da formalina.	97
Figura 16 – Efeito de TOP sobre o tempo de latência dos camundongos submetidos ao estímulo nociceptivo no teste da placa quente.	98
Figura 17 – Efeito vasorrelaxante dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas com 1 µM de fenilefrina em anéis de aorta isolada de rato	100
Figura 18 – Efeito espasmolítico dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas com KCl 60 mM em útero isolado de rata.	101
Figura 19 – Efeito dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol 1 µM em anéis de traqueia isolados de cobaia.	102
Figura 20 – Relaxamento dos anéis de traqueia isolada de cobaia, contraídos com carbacol 1 µM, induzidos pelo extrato e frações das folhas de <i>L. thymoides</i> .	103
Figura 21 – Efeito espasmolítico do extrato e frações dos caules de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol 1 µM em traqueia isolada de cobaia.	104

Figura 22 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μ M, induzido por TFD na ausência ou presença de glibenclamida (GLI, A), 4-aminopiridina (4-AP, B) e tetraetilamônio (TEA, C). D , comparação entre os valores de CE_{50} de TFD obtidos na ausência ou presença dos bloqueadores GLI, 4-AP e TEA.	105
Figura 23 – Efeito espasmolítico de TFD sobre as contrações tônicas de anéis de traqueia pré-contraído com carbacol 1 μ M, na ausência ou presença de L-NAME.	106
Figura 24 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μ M, induzido por TFD na ausência ou presença de indometacina (A) e dexametasona (B).	107
Figura 25 – Efeito espasmolítico de TFD sobre a fração tônica da contração induzida por carbacol 1 μ M na presença ou ausência de propranolol.	108
Figura 26 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μ M, induzido por isoprenalina na ausência ou presença de TFD 50 μ g/mL e 150 μ g/mL.	109
Figura 27 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μ M, induzido por TFD na ausência ou presença de capsaicina.	110
Figura 28 – Contração dos anéis de traqueia induzida por carbacol na ausência ou presença de TFD 50 μ g/mL e 150 μ g/mL.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medicamentos derivados de produtos naturais lançados no mercado no período 2000-2010.	22
Tabela 2 – Relação das plantas cultivadas e endêmicas da caatinga mais utilizadas na medicina popular.	27
Tabela 3 – Constituintes químicos identificados em espécies de <i>Lippia</i> .	36
Tabela 4 – Atividade farmacológica descrita em espécies de <i>Lippia</i> .	45
Tabela 5 – Rendimento dos extratos metanólicos brutos e frações obtidas por partição líquido-líquido das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> .	56
Tabela 6 – Massa vegetal utilizada e codificação dos óleos essenciais das folhas de <i>L. thymoides</i> coletados nas quatro estações do ano.	57
Tabela 7 – Composição química das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade espasmolítica de músculos lisos, de acordo com o tecido utilizado.	68
Tabela 8 – Dados climatológicos mensais e teor dos óleos essenciais das folhas de <i>L. thymoides</i> obtidos nas quatro estações do ano.	75
Tabela 9 – Composição química dos óleos essenciais das folhas de <i>L. thymoides</i> .	77
Tabela 10 – Conteúdo de fenólicos totais dos extratos e frações das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> .	80
Tabela 11 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> .	81
Tabela 12 – Atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> .	83
Tabela 13 – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> .	89

LISTA DE SIGLAS

[Ca ⁺²] _i	concentração de Ca ⁺² livre intracelular
4-AP	4-aminopiridina
AcA	Ácido ascórbico
ACh	Acetilcolina
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CCh	Carbacol
CE ₅₀	Concentração da amostra capaz de promover 50% de seu efeito máximo
COX	Enzima ciclo-oxigenase
CPS	Capsaicina
DEX	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG/g	Miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de material
E _{máx}	Valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido pela amostra
FEN	Fenilefrina
GLI	Glibenclamida
IND	Indometacina
ISO	Isoprenalina
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil ester
NO	Óxido Nítrico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PIR	Pirogalol
PRP	Propranolol
QUE	Quercetina
TC	Extrato metanólico dos caules de <i>L. thymoides</i>
TCA	Fração acetato de etila do extrato metanólico dos caules de <i>L. thymoides</i>
TCD	Fração diclorometano do extrato metanólico dos caules de <i>L. thymoides</i>
TCH	Fração hexano do extrato metanólico dos caules de <i>L. thymoides</i>
TEA	Tetraetilamônio
TF	Extrato metanólico das folhas de <i>L. thymoides</i>
TFA	Fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de <i>L. thymoides</i>
TFD	Fração diclorometano do extrato metanólico das folhas de <i>L. thymoides</i>
TFH	Fração hexano do extrato metanólico das folhas de <i>L. thymoides</i>
TOI	Óleo essencial de <i>L. thymoides</i> obtida da planta coletada no inverno
TOO	Óleo essencial de <i>L. thymoides</i> obtida da planta coletada no outono
TOP	Óleo essencial de <i>L. thymoides</i> obtida da planta coletada na primavera
TOV	Óleo essencial de <i>L. thymoides</i> obtida da planta coletada no verão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS	17
2.1.1 Estratégias no desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais	18
2.1.2 O potencial biotecnológico da caatinga como fonte de substâncias bioativas	26
2.2 O GÊNERO LIPPIA	32
2.2.2 Atividade farmacológica descrita para espécies de <i>Lippia</i>	43
2.2.3 A espécie <i>Lippia thymoides</i>	53
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	55
3.2 PREPARAÇÃO E PARTIÇÃO DOS EXTRATOS	56
3.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	56
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES	58
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	60
3.5.1 Microrganismos utilizados	60
3.5.2 Preparo da suspensão de microrganismos	61
3.5.3 Determinação da CIM	61
3.5.4 Determinação da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)	62
3.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ANIMAIS UTILIZADOS	63
3.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA DE RATOS	64
3.8 ENSAIO DE FEBRE INDUZIDA POR HIPERPIREXIA	65
3.9 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	65
3.9.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	66
3.9.2 Teste da formalina	66
3.9.3 Teste da placa quente	67
3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA IN VITRO EM ÓRGÃOS ISOLADOS	67

3.10.1 Avaliação da atividade espasmolítica em aorta isolada de rato	69
3.10.2 Avaliação da atividade espasmolítica em útero isolado de rata	70
3.10.3 Avaliação da atividade espasmolítica em traquéia isolada de cobaia	71
<u>3.10.3.1 Investigação da participação de canais para K⁺ no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	71
<u>3.10.3.2 Investigação da participação da via do óxido nítrico (NO) no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	72
<u>3.10.3.3 Investigação da participação das prostaglandinas no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	72
<u>3.10.3.4 Investigação da participação de receptores β-adrenérgicos no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	73
<u>3.10.3.5 Investigação da participação da via do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	73
<u>3.10.3.6 Investigação da dessensibilização das fibras C sobre o relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	73
<u>3.10.3.7 Investigação do antagonismo muscarínico na contração induzida por CCh em traqueia pré-incubada com TFD</u>	74
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	74
4 RESULTADOS	75
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>L. thymoides</i>	75
4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>L. thymoides</i>	81
4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>L. thymoides</i>	88
4.5 EFEITO DOS EXTRATOS DE <i>L. thymoides</i> SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA EM RATOS	90
4.6 ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA DOS EXTRATOS DE <i>L. thymoides</i>	93
4.7 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>L. thymoides</i>	93
4.8 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA IN VITRO DE <i>L. thymoides</i>	98
4.8.1 Efeito dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato	99
4.8.2 Efeito dos óleos essenciais de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata	101
4.8.3 Efeito dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de <i>L. thymoides</i> sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia	102

<u>4.8.3.2 Investigação da participação de canais para K⁺ no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	104
<u>4.8.3.3 Investigação da participação da via do NO no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	106
<u>4.8.3.4 Investigação da participação das prostaglandinas no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	106
<u>4.8.3.5 Investigação da participação de receptores β-adrenérgicos no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	107
<u>4.8.3.6 Investigação da participação da via do AMPc no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	108
<u>4.8.3.7 Investigação da dessensibilização das fibras C sobre o relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh</u>	109
<u>4.8.3.8 Investigação do antagonismo muscarínico na contração induzida por CCh em traqueia pré-incubada com TFD</u>	110
5 DISCUSSÃO	112
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	141
REFERÊNCIAS	143

1 INTRODUÇÃO

A busca por novas substâncias de interesse farmacológico envolve uma série de fatores, que vão desde a necessidade populacional de medicamentos contra doenças negligenciadas ao propósito mercadológico e lucrativo das indústrias farmacêuticas mundiais. Independente do motivo que leva a descoberta de uma nova substância, várias etapas devem ser cumpridas e o elemento inicial, onde e como começar a busca, desempenha papel fundamental no sucesso final.

Historicamente, uma das principais fontes de novas moléculas, também denominadas *new chemical entities* (NCE), constitui os produtos naturais originados, principalmente, de plantas. Vários medicamentos comercializados em todo o mundo foram obtidos dessa fonte como a digoxina, morfina, penicilina, taxol, ácido acetilsalicílico, dentre outros.

Muitas ferramentas foram desenvolvidas ao longo de centenas de anos de pesquisa em produtos naturais visando à escolha adequada da fonte de possíveis NCE. Dentre elas, a quimiosistemática e a etnofarmacologia destacam-se como possíveis instrumentos para escolha bem sucedida de espécies candidatas a fornecedoras de NCE.

A quimiosistemática permite que se faça uma escolha racional da espécie, com base em informações químicas já obtidas de uma família, tribo ou gênero. Presume-se que uma dada classe química esteja presente em espécies relacionadas taxonomicamente, aumentando, assim, a probabilidade de encontrar substâncias de interesse, facilitando a escolha da espécie.

A utilização de plantas medicinais por populações em todas as faixas de renda em diversas localidades, desde tribos indígenas até os grandes centros urbanos, merece atenção no contexto da incessante pesquisa de novos medicamentos. Através da etnofarmacologia podem-se identificar espécies com uma indicação já estabelecida, mesmo que baseada no senso comum, como possível fonte de NCE. Porém, apesar do uso popular corriqueiro transmitido por várias gerações, a maioria dessas plantas não tem suas indicações cientificamente comprovadas, podendo provocar, muitas vezes, prejuízos em vez de benefícios aos usuários.

Aliando essas ideias, a validação experimental de plantas empregadas na medicina popular constitui importante tarefa da academia para com as comunidades que as utilizam,

além de fornecer subsídios para a descoberta de NCE. Porém, as pesquisas envolvendo produtos naturais no Brasil têm sido focadas na busca de seus compostos ativos em relação a uma gama de efeitos biológicos tradicionais, mostrando-se pouco produtivas quanto à descoberta de candidatos a protótipos de fármacos ou ferramentas biológicas por se esbarrarem em vários fatores limitantes. Ainda, apesar do crescente interesse em medicamentos oriundos de plantas, existe uma grande lacuna entre atividades biológicas descritas e uso popular (PUPO; GALLO; VIEIRA, 2007).

Assim, este trabalho está inserido nas linhas de pesquisa “Análise biológica de produtos naturais, recombinantes e sintéticos” e “Caracterização, conservação e manejo sustentável de recursos biológicos com potencial biotecnológico” do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, cujo escopo envolveu o estudo fitoquímico e farmacológico de uma espécie vegetal nativa da região do semiárido baiano, utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades.

A planta utilizada nesse estudo pertence à família Verbenaceae, gênero *Lippia*, o qual reúne cerca de 200 táxons, entre ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídos nos trópicos e subtropicais das Américas e África, sendo comuns nos cerrados e campos rupestres brasileiros (SOUZA; LORENZI, 2005). Várias espécies de *Lippia* são usadas pela medicina popular devido às suas propriedades terapêuticas, porém há relatos de usos contraditórios. Além disso, apesar de já terem sido identificados iridoides, terpenoides, flavonoides e alcaloides, os estudos das espécies de *Lippia* concentram-se em óleos essenciais e há poucos relatos de atividade farmacológica (PASCUAL et al., 2001b).

Analisando os aspectos envolvidos na descoberta de novas substâncias ativas a partir de produtos naturais e considerando que o potencial farmacológico desses compostos são pobremente explorados (RATES, 2001), destaca-se a relevância deste trabalho na tentativa de caracterizar fitoquímica e farmacologicamente a espécie *L. thymoides* Mart. & Schauer. Esta é uma planta nativa e endêmica da caatinga que apresenta escassez de estudos dessa natureza registrados na literatura científica de plantas medicinais.

O objetivo desse trabalho foi investigar o perfil fitoquímico e farmacológico da espécie *L. thymoides* Mart. & Schauer, coletada no semiárido brasileiro, sendo que para alcançá-lo foi necessário seguir as seguintes etapas:

- determinar o perfil químico sazonal dos óleos essenciais extraídos de *L. thymoides* coletada em quatro épocas do ano;
- determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais, extratos metanólicos e frações das folhas e caule da espécie *L. thymoides* frente à *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

- avaliar a atividade farmacológica dos extratos metanólicos brutos da espécie *L. thymoides* nos modelos de cicatrização de ferida cutânea e febre induzida por hiperpirexia em ratos;
- investigar o potencial antinociceptivo do óleo essencial de *L. thymoides* nos modelos de contorções abdominais induzida por ácido acético, placa quente e no teste da formalina;
- avaliar a atividade espasmolítica *in vitro* dos óleos essenciais de *L. thymoides* em músculos lisos de traqueia de cobaia, aorta de rato e útero de rata.
- investigar a atividade espasmolítica *in vitro* dos extratos metanólicos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* em músculo liso de traqueia de cobaia, com o estabelecimento do possível mecanismo de ação da fração diclorometano do extrato metanólico da folhas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MEDICAMENTOS

O conhecimento tradicional dos povos primitivos e indígenas acerca do potencial químico da natureza que os cercavam, pode ser considerado como fator primordial para a descoberta de substâncias tóxicas e o desenvolvimento de medicamentos ao longo do tempo. Muitas informações relacionadas à química e a atividade biológica dos produtos naturais foram obtidas a partir dos grupos étnicos que os utilizavam, transformando-se no alicerce para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Bactérias, fungos, animais e organismos marinhos tem desempenhado importante papel para a coletânea de substâncias úteis no tratamento de várias doenças, mas as plantas vêm contribuindo substancialmente com uma fantástica variedade e complexidade de metabólitos essenciais de interesse biológico. Porém, o avanço das técnicas analíticas de separação e elucidação estrutural não foi acompanhado no mesmo ritmo por testes farmacológicos para esses compostos, criando uma biblioteca de novas substâncias sem investigação dos seus potenciais em influenciar sistemas biológicos (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Uma das explicações para esse fato está registrada na história do crescimento da indústria farmacêutica. A partir de meados do século passado, houve uma expansão no programa de desenvolvimento de novos fármacos, mas o maior incentivo foi dado às substâncias obtidas por síntese. Ainda na década de 1990, com os avanços obtidos em biologia molecular e biotecnologia, as técnicas de clonagem de receptores alavancaram a química medicinal e o conceito de especificidade na resposta biológica como fator primordial para a obtenção de moléculas seletivas e eficazes (RISHTON, 2008).

As grandes companhias farmacêuticas perceberam desvantagens em trabalhar com produtos naturais, principalmente, devido à dificuldade na obtenção e provisão das substâncias, grande complexidade estrutural das moléculas, muitas vezes impossível de obter por síntese, e preocupadas com os direitos de propriedade intelectual. Soma-se a esses fatores a esperança na obtenção de coleções de compostos preparados por métodos de química combinatória (HARVEY, 2008).

Por outro lado, a comunidade científica passou a dar maior importância aos produtos naturais, com a associação de testes biológicos ao fracionamento de extratos obtidos de diversas fontes. Na base de dados *Web of Science*, do ISI Web of Knowledge (www.isiknowledge.com), quando se utiliza as palavras-chave *natural product* ou *natural products*, aparecem 2.069 relatos no período de 1945-1954 a 1990, dentre os quais mais de 50% dos estudos foram basicamente sobre fitoquímica ou síntese. Ao contrário, no período de 1991 ao dia 11 de abril de 2011, apareceram 64.258 relatos, a partir do mesmo critério de busca, sendo que 31,68% estão dentro da área de química e 23,02% compreendem estudos envolvendo farmacologia, biologia molecular e química medicinal. Esta rápida avaliação corrobora com o fato da utilização de técnicas modernas na pesquisa em produtos naturais, com a aplicação de estudos interdisciplinares na identificação de substâncias de interesse, não ficando restritos apenas a estudos químicos.

Com o mesmo raciocínio, Newman e Cragg (2007) desenvolveram uma metanálise analisando os fármacos que foram lançados no mercado no período de 1981 a 2006 e observaram que dentre as 1184 NCE apenas 30% foram obtidas exclusivamente por síntese, sendo que 52% correspondiam a produtos naturais, ou foram desenvolvidas a partir de um produto natural, ou um produto natural guiou a pesquisa de alguma forma. Em conclusão, os autores afirmam que a melhor maneira em desenvolver um novo fármaco é a partir da pesquisa de produtos naturais utilizando uma abordagem multidisciplinar, aliando tecnologias de síntese combinatória e manipulação de vias biossintéticas.

2.1.1 Estratégias no desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas medicinais

Dentre as abordagens utilizadas para a pesquisa e identificação de espécies vegetais de interesse médico, a etnofarmacologia e etnobotânica tem demonstrado ser poderosas ferramentas na busca por substâncias naturais de ação terapêutica. Através da seleção de espécies com base na indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, a escolha de uma determinada planta pode indicar um possível alvo biológico de atuação, aumentando a chance de se encontrar um possível fármaco (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). A importância desse método de pesquisa de compostos oriundos de plantas é observada pelo fato de que a maioria dos metabólitos

secundários foi descoberta a partir de investigação etnobotânica e 74% desses compostos têm o mesmo uso ou está relacionado com a utilização popular da planta (GURIB-FAKIM, 2006).

Trabalhos recentes têm resgatado e enfatizado as informações sobre utilização de plantas medicinais de farmacopeias tradicionais. Os textos antigos das Farmacopeias Anglo-Saxônicas contém descrição de mais de 300 espécies consideradas como promissoras na pesquisa de novos produtos farmacêuticos, dentre as quais a planta *Hypericum perforatum*, conhecida popularmente como erva de São João, é utilizada em muitos países (WATKINS et al., 2011). Outro exemplo corresponde às informações transmitidas por gerações na Medicina Tradicional Chinesa, que foi incorporada em uma livraria protótipo de 202 espécies botanicamente autenticadas e com estudos de controle de qualidade estabelecidos (EISENBERG et al., 2011).

A utilização de plantas com base em informações tradicionais geralmente envolve a produção de extratos vegetais contendo uma grande mistura de substâncias, que podem atuar de maneira sinérgica entre si, explicando as baixas concentrações desses compostos produzindo efeitos terapêuticos nas doses em que administrados sozinhos têm seus efeitos diminuídos ou eliminados. Estudos em modelos experimentais e em ensaios clínicos têm demonstrado que o sinergismo pode ocorrer tanto em nível farmacocinético quanto em farmacodinâmico (MA et al., 2009).

O efeito sinérgico de centenas de metabólitos secundários de um mesmo extrato com efeito biológico potencial pode proporcionar vantagens em relação a fármacos com apenas um local de ação bem definido, principalmente os que são utilizados para tratar enfermidades multifatoriais. A interação dessas substâncias em diferentes alvos (polifarmacologia) pode ocasionar o bloqueio ou acentuação de algumas vias de sinalização, gerando o conceito de rede farmacológica (*network pharmacology*), porém, a elucidação do mecanismo de ação e a biodisponibilidade das substâncias isoladamente constitui a maior barreira na pesquisa envolvendo esses produtos vegetais (GERTSCH, 2011; JI; LI; ZHANG, 2009; ULRICH-MERZENICH et al., 2010).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais tem sido estimulada pelo Ministério da Saúde e é considerada como uma área estratégica. O estabelecimento do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2009 propôs desenvolver instrumentos de fomento à pesquisa e estabelecer mecanismos de incentivo ao desenvolvimento sustentável das cadeias produtivas de plantas medicinais e fitoterápicos. O fortalecimento dessas ações se iniciou com o estabelecimento da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único

de Saúde (RENISUS), com a inserção de 71 plantas largamente utilizadas como medicinais pela população brasileira, com a função de orientar estudos e pesquisas na área de plantas medicinais e subsidiar o desenvolvimento da Relação Nacional de Fitoterápicos (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009; RENISUS, 2009). Além disso, a exploração da biodiversidade brasileira para a produção de medicamentos fitoterápicos tem sido considerada como oportunidade a ser aproveitada para o fortalecimento da indústria farmacêutica nacional (CAPANEMA; PALMEIRA FILHO, 2004).

As plantas medicinais utilizadas pela população brasileira têm sido destacadas há muito tempo como potenciais fontes de novos medicamentos. No século XIX, vários importantes naturalistas europeus visitaram o Brasil para a realização de suas pesquisas e identificaram uma grande quantidade de espécies utilizadas como medicinais, sendo até posteriormente incluídas em farmacopeias. Porém, a maior parte dessas não foi estudada em termos químicos e farmacológicos para a comprovação ou não do uso na medicina popular (BRANDÃO et al., 2008).

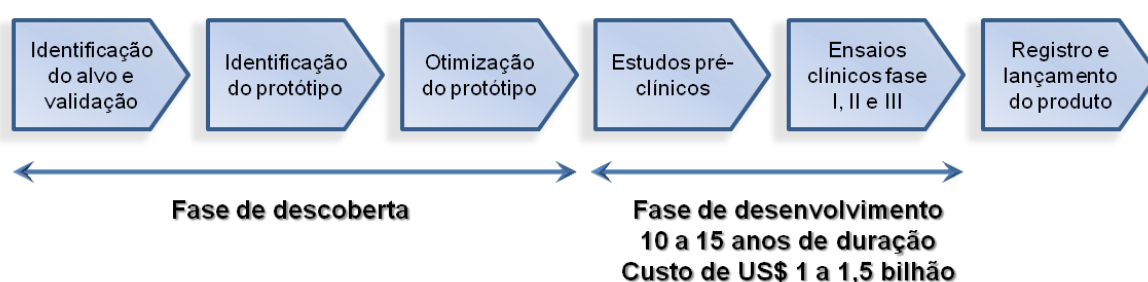
Assim, levando-se em consideração o alto custo e o longo período necessários para que as indústrias farmacêuticas desenvolvam novos fármacos, sem contar o declínio na produção de novas NCE, o mercado de fitoterápicos está emergindo como estratégico. A possibilidade de utilizar a metodologia da farmacologia reversa, onde estudos pré-clínicos e clínicos podem ser estabelecidos a partir de observações do uso tradicional de determinadas plantas, permite que um medicamento fitoterápico seja desenvolvido em um espaço de tempo menor. Concomitante a isso, estudos detalhados sobre a química e farmacologia das substâncias isoladas podem ser desenvolvidos para gerar um novo produto, proporcionando às indústrias farmacêuticas um artifício com um menor custo de pesquisa (**Figura 1**) (PATWARDHAN, 2005; PATWARDHAN; VAIDYA, 2010).

O melhor exemplo a ser dado corresponde ao desenvolvimento do fitoterápico Acheflan[®], que foi produzido a partir de conhecimentos tradicionais da planta *Cordia verbenacea*. Nesse caso, o medicamento à base do óleo essencial da espécie foi lançado como anti-inflamatório tópico e a pesquisa continuou para identificar os compostos α -humuleno e *trans*-cariofileno como os princípios ativos responsáveis pelo efeito farmacológico (FERNANDES et al., 2007; MEDEIROS et al. 2007; PASSOS et al., 2007).

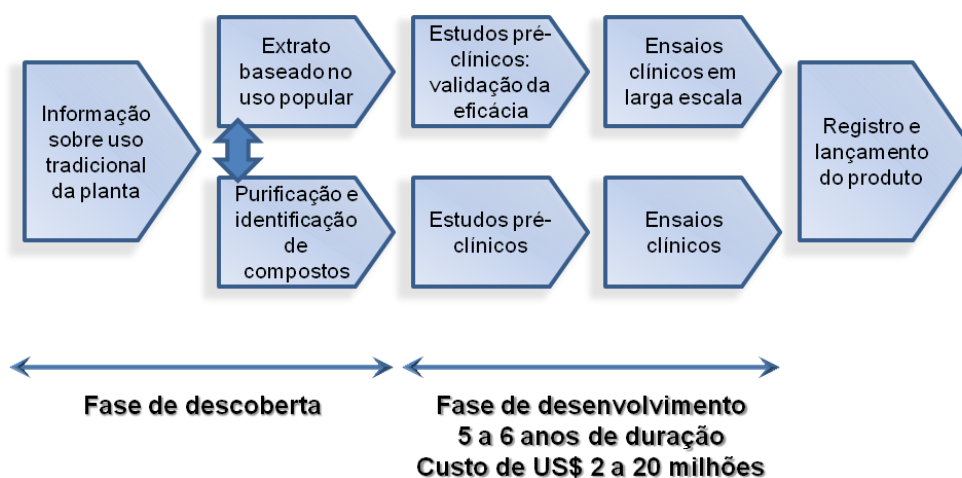
A utilização de técnicas modernas de investigação de plantas medicinais pode aperfeiçoar a identificação de substâncias de grande interesse, seja um possível candidato a fármaco ou uma nova ferramenta farmacológica. A purificação dos extratos por cromatografia

em fase sólida automatizada, aliada a técnicas modernas de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de alta pressão (CLAE) acoplada a espectrometria de massa (MS) ou até mesmo à RMN, tem possibilitado a identificação de metabólitos secundários em pequenas quantidades na planta. Com a estrutura da substância elucidada, técnicas de *screening* inverso *in silico* tem possibilitado apontar um possível alvo para o composto identificado (HARVEY, 2007; HARVEY, 2008).

Figura 1 – Descoberta e desenvolvimento de fármacos e medicamentos: abordagem convencional *versus* farmacologia reversa



a) Abordagem convencional: maior risco, tempo e investimento



b) Abordagem utilizando a farmacologia reversa de planta utilizada na medicina popular: mais rápido, econômico e seguro

Fonte: Adaptado de Patwardhan e Vaidya (2010)

Nesse sentido, indústrias farmacêuticas têm lançado no mercado vários medicamentos provenientes de produtos naturais (**Tabela 1**), compreendendo substâncias com grandes diferenças em suas estruturas químicas (**Figura 2**), podendo-se destacar a variedade de moléculas que podem ser obtidas a partir dessas fontes (KINGHORN et al., 2011; MISHRA; TIWARI, 2011; SAKLANI; KUTTY, 2008).

Tabela 1 – Medicamentos derivados de produtos naturais lançados no mercado no período 2000-2010.

Ano	Nome genérico (nome de marca)	Composto protótipo
2000	Rivastigmina tartarato (Exelon)	Fisostigmina
2000	Arteeter (Artemotil [®])	Artemisinina
2000	Galantamina HBr (Reminyl [®])	Galantamina
2000	Bexaroteno (Targretin)	Ácido Retinóico
2000	L-Dopa-metil ester (Levomet)	L-Dopa
2000	Rapacuronio brometo	Tubocurarina
2002	Nitisinona (Orfadin [®])	Leptospermona
2002	Tiotrópio brometo	Tiotrópio
2003	Miglustat (Zavesva [®])	1-Desoxinojirimicina
2004	Hidromorfona (Palladone)	Morfina
2004	Belotecan (Camtobell)	Camptotecina
2005	Dronabinol/Canabidol (Sativex [®])	Dronabinol/Canabidol
2005	Fumagilina (Flisint [®])	Fumagilina
2005	Doripenem (Finibax [®] /Doribax [™])	Tienamicina
2005	Tigeciclina (Tygacil [®])	Tetraciclina
2005	Ziconotida (Prialt [®])	Ziconotida
2005	Zotarolimus (Endeavor [™] stent)	Sirolimus
2006	Anidulafungina (Eraxis [™] /Ecalta [™])	Equinocandina B
2006	Exenatida (Byetta [®])	Exenatida-4
2007	Lisdexanfetamina (Vyvanse [™])	Anfetamina
2007	Retapamulina (Altabax [™] /Altargo [™])	Pleuromutilina
2007	Tensirolimus (Torisel [™])	Sirolimus
2007	Trabectedina (Yondelis [™])	Trabectedina
2007	Ixabepilona (Ixempra [™])	Epotilona B
2008	Metilnaltrexona (Relistor)	Naltrexona
2009	Everolimus (Afinitor [®])	Sirolimus
2009	Telavancina (Vibativ [™])	Vancomicina
2009	Romidepsina (Istodax [®])	Romidepsina
2009	Capsaicina (Qutenza [®])	Capsaicina
2010	Monobactam aztreonam (Cayston [™])	Aztreonam

Fonte: Adaptado de Mishra e Tiwari (2011) e Saklani e Kutty (2008).

Figura 2 – Fármacos desenvolvidos a partir de produtos naturais no período de 2000 a 2010, mostrando a relação com os compostos protótipos.

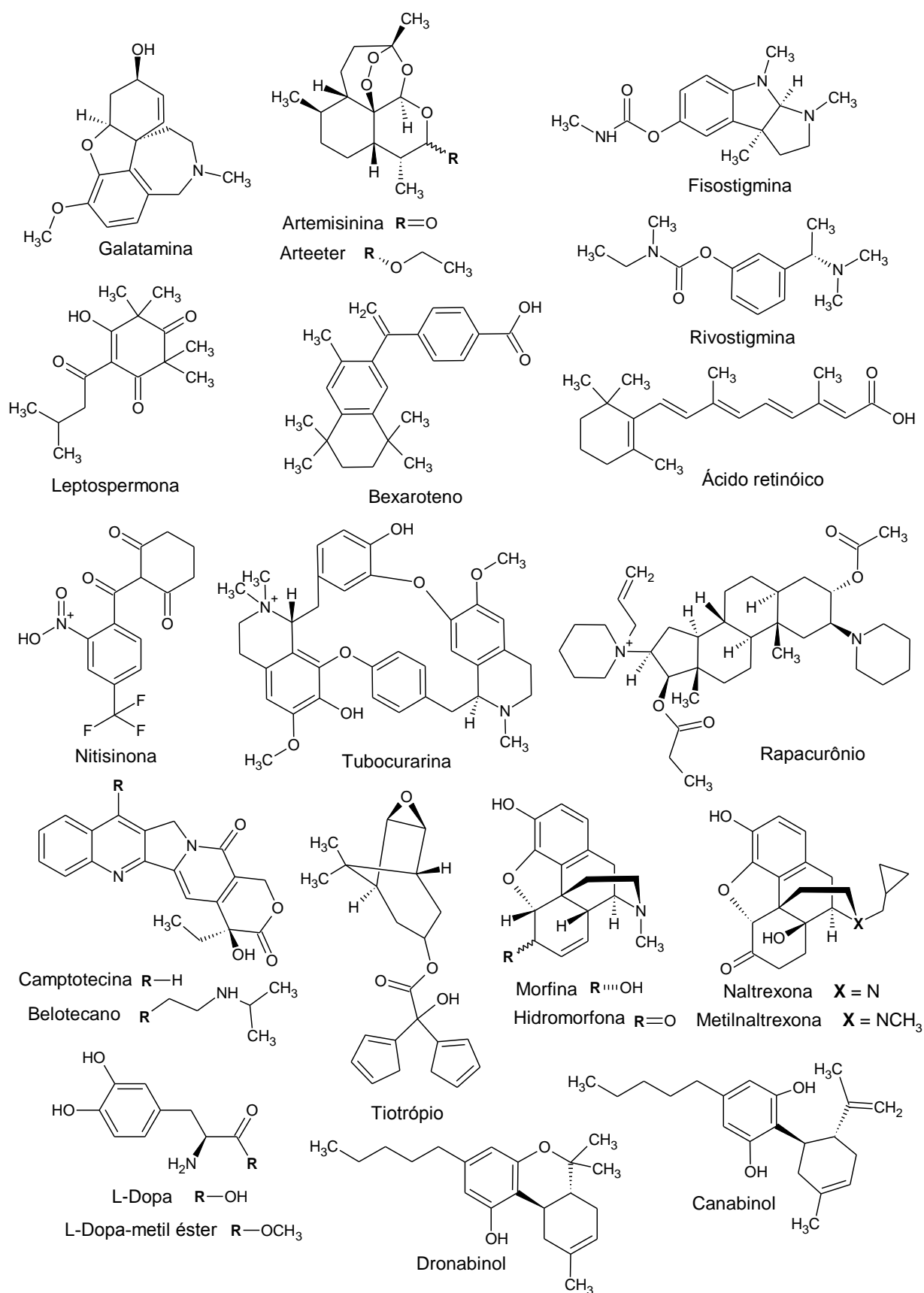


Figura 2 – Continuação.

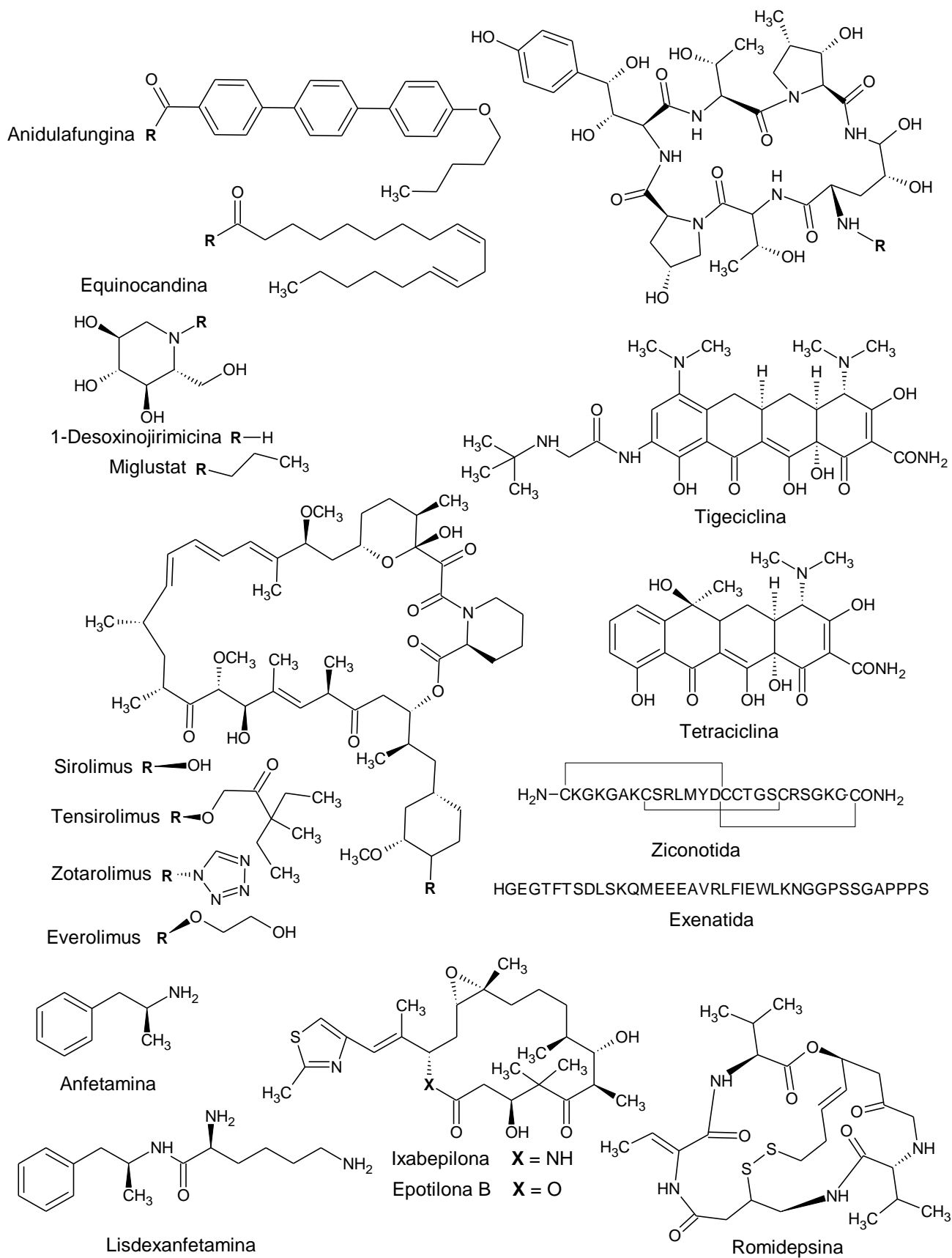
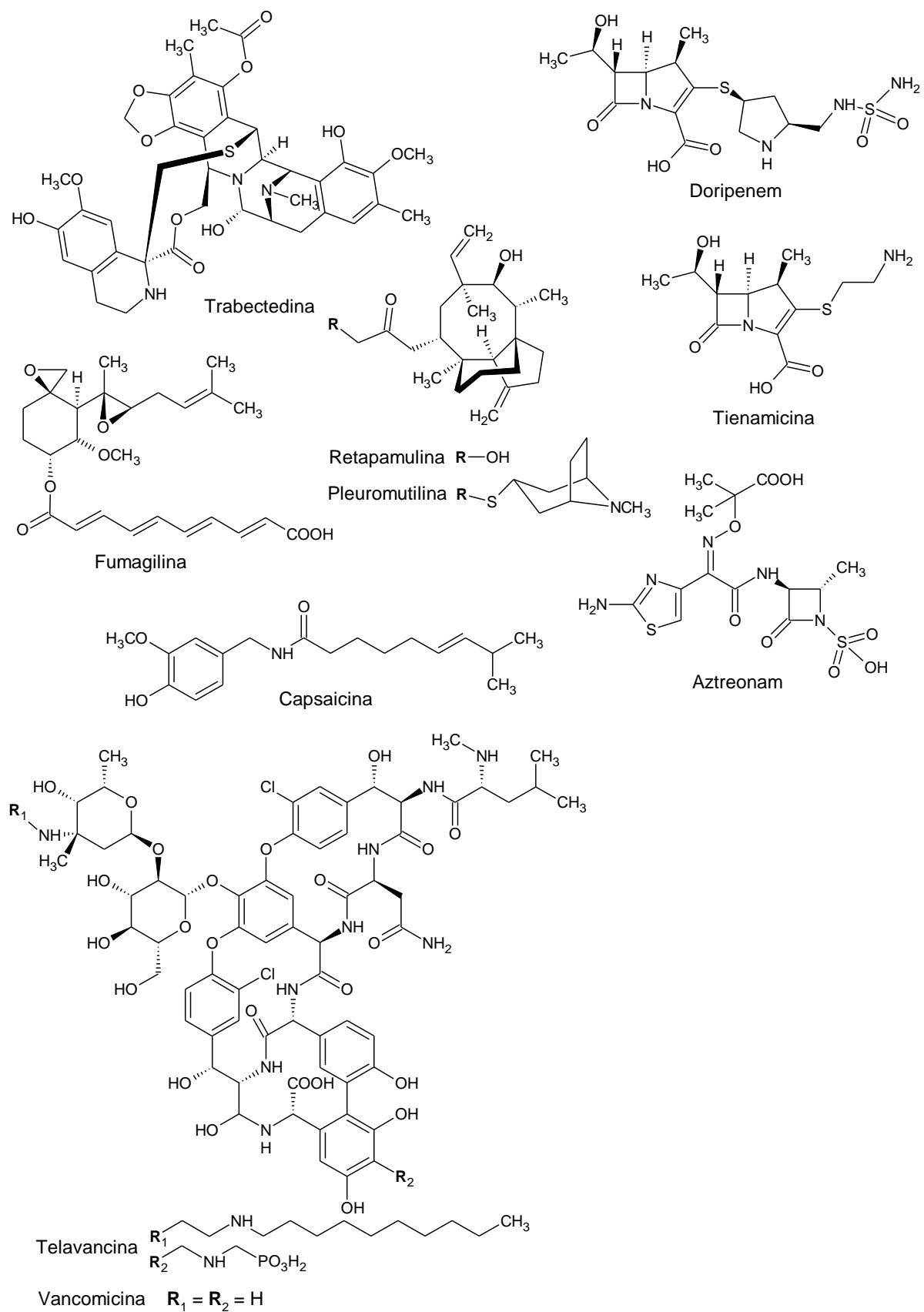


Figura 2 – Continuação.



Fonte: Adaptado de Mishra e Tiwari (2011) e Saklani e Kutty (2008).

Outro aspecto de grande relevância na busca por substâncias bioativas de plantas corresponde à conservação da biodiversidade. A identificação de espécies com potencial farmacológico em países com uma enorme biodiversidade, como o Brasil, pode proporcionar o manejo sustentável de uma planta e garantir que a mesma seja extraída do seu habitat de maneira racional, provocando o mínimo possível de dano ao meio ambiente (CORDELL; COLVARD, 2005; KINGSTON, 2011).

2.1.2 O potencial biotecnológico da caatinga como fonte de substâncias bioativas

A geografia convencional divide a Região Nordeste brasileira nas zonas litorâneas, agreste e sertão, sendo que estas duas últimas formam a região semiárida, que compreende 925.043 km², ou seja, 55,6% do Nordeste. Esta área é ocupada pela caatinga, o único bioma exclusivamente brasileiro, que é dividida em quatro zonas de acordo com a integração entre vegetação e solo: domínio de vegetação hiperxerófila, domínio de vegetação hipoxerófila, ilhas úmidas e agreste e área de transição (SÁ; RICHÉ; FOTIUS, 2003).

A região ocupada pela caatinga possui um grande número de espécies vegetais endêmicas, porém há uma precariedade sobre seu conhecimento botânico. O maior problema relacionado a essa falta de informação é que a caatinga tem sido bastante modificada pelo homem, com os desmatamentos e culturas irrigadas levando à salinização dos solos, aumentando ainda mais a evaporação da água contida neles e acelerando o processo de desertificação. A perda dessas paisagens tem consequências graves para a manutenção da biodiversidade, podendo levar ao desequilíbrio entre as espécies e comprometer o equilíbrio biológico (CASTELLETTI et al., 2003; LEAL et al., 2005).

Como forma de estimular e garantir a conservação da biodiversidade da caatinga, os estudos envolvendo plantas utilizadas para fins terapêuticos promovem a identificação de espécies com potencial farmacológico e evita que determinada espécie seja extinta. Porém, a seleção das plantas não deve ser randômica, sendo necessária a coleta de informações locais sobre o uso na medicina popular (MARQUES; BARBOSA; AGRA, 2010).

Nesse sentido, em estudo desenvolvido por Agra et al. (2007) na região do Cariri Paraibano, 70 espécies vegetais foram indicadas como medicinais, sendo 13 destacadas dentre as mais conhecidas e utilizadas em diversas enfermidades. O principal aspecto desse estudo

foi que a maioria das plantas comercializadas nos mercados populares e empregadas com fins medicinais pela população local, é constituída de espécies nativas da caatinga.

Em outro estudo, Almeida et al. (2010) destacaram a importância das plantas nativas da caatinga na utilização popular em três comunidades rurais da Paraíba. Porém, um número expressivo de plantas exóticas também foi citado como sendo utilizadas medicinalmente, demonstrando que além das espécies nativas, outras que se adaptaram ao clima semiárido fazem parte das plantas usadas pelas comunidades locais.

Assim, pode-se observar que estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos sobre as plantas da caatinga podem fornecer subsídios para estudos químicos e farmacológicos adicionais, podendo comprovar ou não a utilização na medicina popular das espécies selecionadas (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). A **Tabela 2** destaca as principais plantas medicinais da caatinga, com base no índice de relevância de indicações populares.

Tabela 2 – Relação das plantas cultivadas e endêmicas da caatinga mais utilizadas na medicina popular.

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Anacardium occidentale</i> L.	Caju, cajueiro, cajuroxo	Antisséptico, azia, diarreia, infecção renal, inflamação na garganta e dos órgãos genitais femininos, diabetes e tuberculose
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Aroeira	Inflamação na garganta, asma, gripe, tosse, tuberculose, bronquite, azia, gastrite, dor nas costas, dor de dente, anemia, difteria, feridas na pele, inflamações nos ovário e útero e corrimento vaginal
<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Imbu, umbuzeiro, umbu	Conjuntivite, doenças venéreas, problemas digestivos, cólica, diarreia, diabetes, distúrbios da menstruação, infecções renal, problemas na garganta, antiemético e tônico
<i>Achillea millefolium</i> L.	Novalgina, mil-folhas	Febre, abscesso, acne, problemas na pele, dor de cabeça, fraqueza, intoxicação, antiespasmódico, depurativo e digestivo
<i>Acmella uliginosa</i> (Sw.) Cass.	Agrião	Cárie, asma, inflamação em geral, perda de cabelo, digestivo, depurativo, tônico e expectorante

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Helianthus annuus</i> L.	Girassol	Fraqueza, trombose, febre, úlcera, nevralgia, contusão, nevralgia, contusão, epistaxe, falta de apetite, hipercolesterolemia e emoliente
<i>Tabebuia impetiginosa</i> (Mart. ex DC.) Standl.	Pau-d'arco-roxo, ipê-roxo	Úlcera, infecções cirúrgicas, inflamação no útero, leucorreia, câncer, gengivite, problemas cardíacos, antisséptico e antimicrobiano
<i>Cordia leucocephala</i> Moric.	Piçarra, moleque-duro, nego-duro	Hemorragia, inflamação na garganta, reumatismo, indigestão, artrite, raquitismo, calmante, tônico
<i>Heliotropium indicum</i> L.	Crista-de-galo, fedegoso	Inchaço no pé, gripe, tosse, problemas hepáticos, conjuntivite, problemas renais e diurético
<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B. Gillett	Imburana, emburana, emburana-de-cambão, umburana	Problemas renais, gripe, tosse, bronquite, disfonia, odontalgia, cólica, diarreia, antiemético, tônico e cicatrizante
<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Mandacaru, babão	Problemas renais, hepáticos, e respiratórios, gripe, tosse, bronquite, úlcera, constipação, hipertensão, reumatismo, enterite, febre, expectorante, antiemético, “quentura”, sífilis e problemas na coluna
<i>Bauhinia cheilantha</i> (Bong.) Steud.	Mororó, pata-de-vaca	Diabetes, problemas na coluna, tosse, inflamação na garganta, gripe, disfonia, asma, “afinar o sangue”, depurativo, reumatismo, enxaqueca, distúrbios nervosos, falta de apetite, verminose, expectorante, calmante e tônico
<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart.	Jucá, pau-ferro	Problemas na garganta, bronquite, anemia, inchaço, dor nas costas, labirintite, problemas renais, stress e fadiga
<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.	Catingueira, catingueira-rasteira	Tosse, bronquite, infecções respiratórias, gripe, asma, gastrite, cólica, febre, azia, flatulência, diarreia, diabetes, afrodisíaco, dor no estômago e expectorante
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.	Turco	Enxaqueca, trombose, gripe, asma, diabetes, hipertensão, febre, epilepsia, malária e antiofídico
<i>Capparis flexuosa</i> (L.) L.	Feijão-bravo, feijão-de-boi	Tosse, pneumonia, gripe, problemas digestivos, doenças na pele, dor abdominal, reumatismo e antiofídico

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Capparis jacobinae</i> Moric. ex Eichler	Icó-preto, icó-verdadeiro, incó	Tosse, coqueluche, resfriado, problemas digestivos, doenças na pele, dor abdominal, intoxicação, febre, diabetes, inflamação nos pulmões, problemas cardíacos e emenagogo
<i>Maytenus rigida</i> Mart.	Bom-nome	Problemas cardíacos, renais, hepáticos e na circulação, reumatismo, impotência sexual, distúrbios da menstruação, inflamação na garganta, asma, tosse, bronquite, anemia, inflamação e infecção no ovário, úlceras na pele e vaginais
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	Mastruz	Gripe, tosse, bronquite, tuberculose, parasitose, câncer, problemas digestivos, dor de cabeça, febre, antimicrobiano, expectorante, hematoma, gastrite e digestivo
<i>Combretum leprosum</i> Mart.	Mofumbo	Bronquite, gripe, tosse, coqueluche, sudorese, difteria, azia, calmante, hemostático e expectorante
<i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urb.	Batata-de-purga	Flatulência, acne, furúnculo, depurativo, bronquite, asma, tosse, gripe, falta de apetite, parasitose, hemorroida, constipação, reumatismo, laxante e flatulência
<i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D.F. Austin & Staples	Batata-de-purga	Gripe, pneumonia, asma, bronquite, tosse, problemas cardiovasculares, parasitose, reumatismo, constipação, falta de apetite, problemas digestivos, hidropsia, sífilis, amenorreia, laxante e flatulência
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> Cambess.	Pratudo, coirama	Úlcera, gastrite, problemas nos pulmões, asma, pedras nos rins e emoliente
<i>Momordica charantia</i> L.	Melão-de-são-caetano, melão-de-sabiá	Doenças sexualmente transmissíveis, piolho, sarna, caspa, hemorroida, alergia, diabetes, parasitoses, reumatismo e diarreia
<i>Cnidocolus phyllacanthus</i> (Müll. Arg.) Pax & L. Hoffm.	Urtiga branca, favela	Hemorroida, problemas renais, doenças oftálmicas, fraturas, verrugas, problemas na pele, limpeza nos olhos, infecção urinária, inflamação no útero, ovários e próstata
<i>Croton argyrophylloides</i> Müll. Arg.	Angolinha, marmeleiro-branco, sacatinga	Dor no estômago, diabetes, doenças venéreas, “afinar o sangue”, intoxicação, dor nas costas e na cabeça

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Croton rhamnifolius</i> Willd.	Pau-de-leite, velame	Gripe, tosse, dor no estômago, distúrbios da menstruação, dor nas costas, anemia, “afinar o sangue”, hipercolesterolemia e depurativo
<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm.	Cumaru, emburana-de-cheiro, amburana	Inflamação na garganta, cólica, diarreia, problemas intestinais, liberação da placenta, dor na cabeça, gripe, tosse, bronquite, coqueluche, sinusite, asma, azia, inflamação genital, úlceras na pele, infecção urinária, antiofídico, antiespasmódico, expectorante e tônico
<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Mulungu	Inflamação na garganta, odontalgia, dor na cabeça, febre, produção de leite materno, diabetes, hipertensão, tosse, bronquite, distúrbios nervosos, insônia, hemorroida, parasitose e calmante
<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.	Alfazema-brava, alfazema-de-caboclo, sambacaitá	Dor na cabeça, odontalgia, amenorreia, problemas hepáticos, flatulência, reumatismo, gastrite, úlcera, asma, tosse e bronquite
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit.	Alfazema-brava, alfavaca-caboclo, alfazema-de-caboclo	Problemas digestivos e respiratórios, cólica menstrual, amenorreia, odontalgia, dor na cabeça, febre, gripe, gota e limpeza dos olhos
<i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) R. Br.	Cordão-de-são-francisco, cravinho	Cólica menstrual, retenção urinária, reumatismo, febre, cistite, disenteria, cálculos renais, dor no parto, paralisia, afrodisíaco, sedativo, digestivo e cicatrizante
<i>Leucas martinicensis</i> (Jacq.) R. Br.	Cordão-de-são-francisco, cordão-de-frade	Problemas renais, reumatismo, nevralgia, inchaço, flatulência, tônico, antiespasmódico e calmante
<i>Marsypianthes chamaedrys</i> (Vahl) Kuntze	Bentônica-brava, hortelã-do-mato	Tosse, bronquite, flatulência, febre, reumatismo articular, antiofídico, estimulante e digestivo
<i>Ocimum basilicum</i> L.	Manjeriço, manjeriço-roxo	Dor no ouvido, bronquite, tosse, gripe, febre, amigdalite, gengivite, diarreia, dor na cabeça, digestivo, antiespasmódico, diurético e antiemético
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Alfavaca, alfavaca-branco, quióiô	Digestivo, flatulência, problemas digestivos, gripe, tosse, prurido, expectorante, calmante, stress, dor na cabeça e fadiga

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Hortelã da folha grande, hortelã-graúdo, hortelã da folha grossa	Dor no ouvido, tosse, bronquite, amigdalite, pneumonia, gripe, constipação, problemas hepáticos, distúrbios da menstruação, disфонia, digestivo e parasitose
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim, alecrim-de-jardim	Distúrbios da menstruação, tosse, gripe, asma, cólica, febre, flatulência, digestivo, problemas intestinais, renais e hepáticos, reumatismo, sedativo, antiespasmódico e cardiotônico
<i>Allium sativum</i> L.	Alho	Picadas de insetos, disфонia, constipação, problemas digestivos, odontalgia, conjuntivite, hipercolesterolemia, antibiótico, gripe e problemas na garganta
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Babosa	Hemorroida, azia, problemas no estômago, câncer, caspa, perda de cabelo, contusão, reumatismo, parasitose, emoliente e emenagogo
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Angico, angico-de-carçoço, angico-branco	Anemia, tosse, asma, bronquite, coqueluche, inflamação nos pulmões, gripe, constipação, câncer, “afinar o sangue”, escrófula, difteria, fissuras nos pés, gastrite e expectorante,
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Jurema-preta, jurema	Odontalgia, febre, cólica menstrual, dor na cabeça, hipertensão, bronquite e tosse
<i>Argemone mexicana</i> L.	Cardo santo, cadinho	Herpes labial, febre, gripe, asma, amigdalite, bronquite, pneumonia, inflamação no útero, trombose, escrófula, fraqueza física, constipação, úlcera na pele, colagogo, laxativo, digestivo e conjuntivite
<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf	Capim-santo, capim-caboclo	Dor no estômago, gastrite, úlcera, diarreia, indigestão, falta de apetite, hipertensão, insônia, febre, tosse, calmante e diurético
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Juazeiro, Juá	Limpeza dos dentes, caspa, sarna, asma, tosse, gripe, pneumonia, tuberculose, bronquite, constipação, inflamação na garganta, indigestão, dermatite seborréica, prurido, problemas na pele, cicatrizante e expectorante
<i>Ruta graveolens</i> L.	Arruda, arruda macho	Cólica menstrual, dor na cabeça, otalgia, conjuntivite, artrite, nevralgia, parasitose, amenorreia, antiespasmódico e problemas digestivos

Espécie	Nome popular	Indicação popular
<i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn.	Quixaba, quixabeira, rompe-gibão	Úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação crônica, inflamação nos ovários, cólica, diabetes, cicatrizante, problemas renais e cardíacos
<i>Scoparia dulcis</i> L.	Vassourinha, vassourinha-de-nossa-senhora	Torção, bronquite, gripe, tosse, febre, problemas no útero, parasitose, diabetes, amenorreia e emenagogo
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.	Cidreira, erva-cidreira, melissa	Diabetes, hipertensão, cólica, diarreia, azia, falta de apetite, febre, dor na cabeça, anemia, resfriado, anticonceptivo, calmante, problemas cardíacos e gastrite

Fonte: Adaptado de Albuquerque et al. (2007).

Por outro lado, a análise ecológico-química pode fornecer a explicação para a grande quantidade de espécies com potencial farmacológico. Como a caatinga é a vegetação predominante do semiárido nordestino, região marcada pela baixa umidade e alta incidência de raios solares, pode haver nessas espécies uma “especialização metabólica” na produção de compostos fenólicos. A predominância de uma classe de metabólito secundário, em detrimento dos demais, pode restringir a utilização medicinal de uma planta, podendo induzir, assim, a incorporação pela população de espécies exóticas nesse ambiente para atender a uma demanda local e aumentar o número de plantas medicinais (ALBUQUERQUE; RAMOS; MELO, 2012).

2.2 O GÊNERO *LIPPIA*

A família Verbenaceae está incluída na ordem Lamiales e compreende cerca de 36 gêneros e 1000 espécies de distribuição pantropical, mas principalmente neotropical. No Brasil, existem 17 gêneros (*Aloysia*, *Baillonia*, *Bouchea*, *Casselia*, *Citharexylum*, *Duranta*, *Glandularia*, *Lantana*, *Lippia*, *Monochilus*, *Petraea*, *Phyla*, *Priva*, *Stachytarpheta*, *Tamonea*, *Verbena* e *Verbenoxylum*) e aproximadamente 250 espécies. As espécies desta família são ervas ou arbustos, mas algumas são árvores ou lianas e muitas são aromáticas (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Lippia* tem uma grande importância para a flora brasileira e neotropical devido a sua representatividade e utilização econômica como condimento ou pelas suas

propriedades medicinais. O nome do gênero é uma homenagem a Auguste Lippi (1678-1704), explorador e naturalista italiano, morto por nativos da Abssínia (LINNAEU, 1753 *apud* SALIMENA, 2000). Este gênero reúne cerca de 200 táxons, entre ervas, arbustos e pequenas árvores, distribuídos nos trópicos e subtropicais das Américas e África, sendo comuns nos cerrados e campos rupestres brasileiros (VELASCO-NEGEUREULA et al., 1993 *apud* VILJOEN et al., 2005; SOUZA; LORENZI, 2005). Segundo dados do *Index Kewensis*, no Brasil existem cerca de 111 espécies, no México, 44 e na África, 33 espécies (SALIMENA, 2000)

O gênero *Lippia* pode ser caracterizado por apresentar plantas arbustivas ou subarbustivas, com folhas decussadas, geralmente com indumento glandular, florescências parciais capituliformes ou espiciformes, congestas, axilares, brácteas membranáceas ou cartáceas, verdes ou coloridas, amarelas, róseas ou vináceas, ultrapassando ou não o comprimento das flores; flores sésseis, cálice comprimido, alado, induplicado, membranáceo, inconspícuo, persistente no fruto; corola hipocraterimorfa, alva, rósea, magenta, lilás ou amarelas, tubo reto ou curvo, limbo lobado, lábio superior ou adaxial lobado, lábio inferior ou abaxial único, lobos laterais; estames; ovário monocarpelar, bilocular, ovulado, estigma lateral. Fruto dividido na maturidade em dois mericarpos (TRONCOSO, 1974).

As espécies de *Lippia* estão distribuídas nas regiões áridas do sudoeste dos EUA, nas florestas tropicais decíduas da América Central e nos campos rupestres e cerrados do Brasil, regiões de altos índices de endemismos, estendendo-se até o Uruguai e região central da Argentina. Na África sua ocorrência também coincide com centros de alto endemismo, na região leste, associada às montanhas mais altas e picos alpinos (SALIMENA, 2000; SALIMENA, 2010). O gênero é de grande importância econômica devido aos diferentes usos dos óleos essenciais, sendo muitas espécies medicinais (SALIMENA, 2002).

O uso na medicina popular das plantas pertencentes ao gênero *Lippia* segue um perfil geral, na maioria dos casos sendo utilizadas as folhas ou partes aéreas e flores, preparadas na forma de infusão ou decocto e administradas por via oral. As principais indicações são para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e digestivo e para tratar infecções em geral (PASCUAL et al., 2001b).

Analisando a literatura científica, observou-se que mesmo com a grande utilização popular, as espécies de *Lippia* são pobremente estudadas quanto às atividades farmacológicas, podendo ser demonstrada pela ocorrência de apenas 240 relatos na base de dados do US National Library of Medicine do National Institutes of Health

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), sendo os estudos concentrados em algumas espécies como *L. alba*, *L. citriodora*, *L. dulcis*, *L. multiflora* e *L. sidoides*. Ainda, quando se observa a distribuição dessas espécies, apenas a primeira e a última ocorrem no Brasil, demonstrando um grande desconhecimento sobre o potencial das espécies de *Lippia* brasileiras.

2.2.1 Constituintes químicos presentes em espécies de *Lippia*

Como a maioria das espécies de *Lippia* são aromáticas, os estudos relacionados à fitoquímica desse gênero são majoritariamente dedicados à composição química dos óleos essenciais e uma menor quantidade aos constituintes não-voláteis. Uma característica importante de *Lippia* é a diferença observada na composição química dos óleos essenciais, com relatos de variação entre indivíduos da mesma espécie, mas de diferentes origens geográficas. Dentre os constituintes fixos relatados os iridoides, fenilpropanoides, naftoquinoides e flavonoides são as classes de metabólitos secundários encontrados (CATALAN; LAMPASONA, 2002). Os principais constituintes fixos e os majoritários dos óleos essenciais de espécies de *Lippia* encontram-se listados na **Tabela 3**.

L. alba, conhecida popularmente no Brasil como erva-cidreira ou cidreira, corresponde à espécie de *Lippia* mais estudada, porém há uma concentração de relatos sobre a composição química dos óleos essenciais. Nesses estudos, foram encontradas evidências da existência de cerca de sete quimiotipos, com uma grande variação na composição e concentração dos óleos essenciais. A investigação fitoquímica das folhas e raízes de *L. alba*, revelou a presença de iridoides, fenilpropanoides, flavonoides e saponinas (FARIAS et al., 2010; HENNEBELLE et al., 2008b).

A composição química dos óleos essenciais de *L. citriodora* apresentou pouca variação, mesmo considerando espécies coletadas em regiões geográficas muito diferentes como na Colômbia e Grécia, com os componentes geranial, neral e limoneno aparecendo como os majoritários (ARGYROPOULOU et al., 2007; OLIVERO-VERBEL; GÜETTE-FERNANDEZ; STASHENKO, 2009). A análise de preparações aquosas das folhas dessa espécie por CLAE acoplada à espectrometria de massas mostrou a presença de iridoides, fenilpropanoides e flavonoides como os metabólitos principais (BILIA et al., 2008).

Com utilização medicinal descrita desde o século XVII, a espécie *L. dulcis* é caracterizada por apresentar sabor adocicado, que é registrado pelo nome popular de erva

doce (*hierba dulce*) na América Latina. Os sesquiterpenos hernandulcina e 4 β -hidroxihernandulcina presentes no óleo essencial das folhas e flores são relatados como sendo centenas de vezes mais doces do que a sacarose. Dentre outras classes de constituintes encontrados estão flavonoides, iridoides e feniletanoides (KANEDA et al., 1992; ONO et al., 2005; SOUTO-BACHILLER et al., 1997).

L. multiflora é uma planta aromática largamente distribuída nos países tropicais e subtropicais, sendo seu valor econômico atribuído especialmente ao óleo essencial obtido das partes aéreas. Através dos relatos encontrados, sugere-se a caracterização de três quimiotipos de acordo com a composição em 1,8-cineol, timol, farnesil e sesquiterpenoides (FOLASHADE; OMOREGIE, 2012). Os poucos relatos sobre os constituintes fixos presentes em *L. multiflora* destacam a presença de triterpenos, flavonoides e fenilpropanoides (CHANH; KOFFI; CHANH, 1988; KANKO et al., 2004b).

A espécie *L. sidoides* é conhecida popularmente como alecrim-pimenta e corresponde a uma das espécies de *Lippia* que faz parte da vegetação decídua da caatinga. O óleo essencial dessa planta não apresenta grande variação em sua composição química, mesmo quando coletada em locais distintos, aparecendo o timol como o constituinte majoritário, sendo relatadas concentrações acima de 70 % (CAVALCANTI et al., 2010; MEDEIROS et al. 2011; MOTA et al., 2012; VERAS et al., 2012). Devido a sua grande utilização na medicina popular, *L. sidoides* foi relativamente bem explorada em relação aos metabólitos não voláteis, sendo relatados triterpeno, flavonoide, lignana e naftoquinona (COSTA et al., 2002; MACAMBIRA et al., 1986).

Tabela 3 – Constituintes químicos identificados em espécies de *Lippia*.

Espécie	Constituinte*	Referência
	Neral (27-30 %) e geranial (36-41 %) presentes no quimiotipo I; carvona (42-55 %) presente no quimiotipo II	Matos et al. (1996)
	1,8-cineol (35 %) e limoneno (18 %) presentes no quimiotipo A; limoneno (32 %) e carvona (32 %) presentes no quimiotipo B; geranial (23 %); germacreno D (25 %) presentes no quimiotipo C	Zoghbi et al. (1998)
	Linalol (65 %)	Bahl et al. (2000)
	Geranial (16 %), mirtenol/mirtenal (10 %) e neral (9 %)	Rao et al. (2000)
	Linalol (55 %)	Lorenzo et al. (2001)
	Limoneno (44 %) e piperitona (31 %)	Senatore, Rigano (2001)
	Linalol (65 %)	Bahl et al. (2002)
	Carvona (51 %) e limoneno (33 %)	Stashenko, Jaramillo, Martínez (2004)
	5,5"-dihidroxi-6,4',6",3''',4'''-pentametoxi-[C-7-O-C-7"]-biflavona e 4',4,5,5"-tetrahidroxi-6,6",3'''-trimetoxi-[C-7-O-C-7"]-biflavona	Barbosa, Lima, Silveira (2005)
<i>L. alba</i>	Linalol (76 %)	Duarte et al. (2005)
	Isonuomiosídeo, decafeoilverbascosídeo e shanzhisídeo	Barbosa et al. (2006)
	Apigenina-7-O-[(3-O-acetil)-β-D-glucopiranuronil (1 → 2)]-β-D-glucopiranuronídeo, tevesídeo, ácido geniposídico, shanzhisídeo metil éster, carioptosídeo, 8-epi-loganina, mussaenosídeo, geniposídeo, cistanosídeo F, forsitosídeo B, calceolariosídeo E, acteosídeo, isoacteosídeo, 2-acetilacteosídeo, apigenina-7-O-glucuronídeo, luteolina-7-O-glucuronídeo, apigenina-7-O-diglucuronídeo e luteolina-7-O-diglucuronídeo	Hennebelle et al. (2006)
	Teviridosídeo, mussaenosídeo e gardosídeo	Sena Filho et al. (2007)
	Verbascosídeo, calceolariosídeo E, luteolina-7-diglucuronídeo e tevesídeo	Hennebelle et al. (2008a)
	Verbascosídeo, tricina-7-O-diglucuronídeo, luteolina-7-O-glucuronídeo, ácido geniposídico, tevesídeo, 8-epi-loganina e mussaenosídeo	Timoteo et al. (2008)
	Linalol (49-66 %)	Barros et al. (2009)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. alba</i>	Limoneno (22 %) e carvona (25 %) presentes no quimiotipo carvona; neral (24 %) e geranial (31 %) no quimiotipo citral	Mesa-Arango et al. (2009)
	Carvona (35 %) e limoneno (30 %) presentes no quimiotipo carvona; geranial (23 %) e neral (20 %) presentes no quimiotipo citral	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	β -citral, carvona, hemimelitenol, germacreno D, D-limoneno, dureno, carvona e patchoulano	Sena Filho et al. (2009)
	Neral (14 %) e geranial (22 %)	Shukla et al. (2009)
	Limoneno (3-32 %), carvona (0-50 %), geranial (23-29 %) e neral (0-22%)	Escobar et al. (2010)
	Lippiasaponina I e lippiasaponina II	Farias et al. (2010)
	Neral (25 %) e geranial (33 %) presentes no quimiotipo citral; carvona (38 %) e limoneno (33 %) presentes no quimiotipo carvona/limoneno	López, Stashenko, Fuentes (2011)
	Linalol (68-79 %)	Mishra et al. (2010)
	Carvona (40 %) e limoneno (31 %)	Ocazonez et al. (2010)
	Neral (35 %) e geranial (49 %)	Maynard et al. (2011)
Neral (30 %) e geranial (32 %)	Veras et al. (2011)	
Limoneno (23 %), carvona (55 %)	Hatano et al. (2012)	
	Linalol (50 %)	Heldwein et al. (2012)
<i>L. berlandieri</i>	Timol e carvacrol	Avila-Rosa et al. (2010)
<i>L. canescens</i>	Acetosídeo, isoacetosídeo, arenariosídeo, leucosceptosídeo A, desmetoxicentaureidina, eupafolina e 6-hidroxiluteolina	Abe, Nagao, Okabe (2002)
<i>L. chevalieri</i>	Timol (27 %) e <i>p</i> -cimeno (21 %)	Bassole et al. (2003)
	β -Cariofileno (27-30 %), germacreno D (6-15 %) e elemol (12-22 %)	Mevy et al. (2007)
<i>L. citriodora</i>	Geranial (18%) e neral (12%)	Ohno et al. (2003)
	Geranial (27-39 %), neral (22-25 %) e limoneno (6-18 %)	Argyropoulou et al. (2007)
	Verbenalina, luteolina 7-O-diglucuronídeo, apigenina 7-O-diglucuronídeo, verbascosídeo, isoverbascosídeo, β -hidroxi-verbascosídeo, β -hidroxi-isoverbascosídeo e eucovosídeo	Bilia et al. (2008)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. citriodora</i>	Geranial (19 %), neral (16 %) e limoneno (11 %)	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	Neral (15-16 %) e geranial (18-19 %)	Escobar et al. (2010)
	Geranial (19 %) e neral (16 %)	Ocazionez et al. (2010)
<i>L. dulcis</i>	Verbascosídeo, 6-metil-5-herptenona, (+)-4 β -hidroxihernandulcina, (+)-hernandulcina, (-)-epihernandulcina	Kaneda et al. (1992)
	Hernandulcina (36 %) e epihernandulcina (22 %)	Souto-Bachiller et al. (1997)
	(+)-hernandulcina, (-)-epihernandulcina, (+)-animol, martinósídeo, diacetilmartinósídeo, acetosídeo e isoacetosídeo	Abe, Nagao, Okabe (2002)
	Salvigenina, eupatorina, cirsimaritina, 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetraetoxiflavona, 5,3'-dihidroxi-4',5'-tetrametoxiflavona, decafeoilverbascosídeo, acetosídeo, isoacetosídeo, 8-epiloganina, lamíídeo, lippidulcina A e epilippidulcina A	Ono et al. (2005)
	Cânfora (33 %) e hernandulcina (10 %)	Görnemann et al. (2008)
	<i>trans</i> - β -cariofileno (10 %), δ -cadineno (9 %), α -copaeno (8 %) e α -bisabolol (8 %)	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	α -Copaeno (8 %), <i>trans</i> - β -cariofileno (10 %), biciclogermacreno (8 %), δ -cadineno (9 %) e α -bisabolol (8 %)	Escobar et al. (2010)
<i>L. gracilis</i>	α -Copaeno(18 %), β -cariofileno (18 %) e δ -cadineno (15 %)	Moreno-Murillo et al. (2010)
	Carvacrol (54 %)	Pessoa et al. (2005)
	Carvacrol (42 %)	Albuquerque et al. (2006)
	Carvacrol (50 %)	Neto et al. (2009)
<i>L. grandis</i>	<i>p</i> -Cimeno (16-18 %) e timol (24-33 %)	Mendes et al. (2010)
	Carvacrol (44 %)	Guilhon et al. (2011)
<i>L. grandis</i>	timol (19-70 %), 1,8-cineol (22-56 %), carvacrol (0.2-21 %), (<i>E</i>)-nerolidol (1-21 %), α -pineno (0.1-17%)	Maia et al. (2003)
	Carvacrol (37 %) e <i>p</i> -Cimeno (12 %)	Sarrazin et al. (2012)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. graveolens</i>	Loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosídeo, ácido logânico, ácido 8-epi-logânico, carioptosídeo, ácido carioptosídico, ácido 6'-O- <i>p-trans</i> -cumaroil-carioptosídico e ácido 6'-O- <i>trans</i> -cafeoil-carioptosídico	Rastrelli et al. (1998)
	timol (26 %), <i>p</i> -cimeno (16 %)	Obledo et al. (2002)
	Luteolina-7-O-glucosídeo, taxifolina, apigenina-7-O-glucosídeo, floridizina, escutelareína, eriodictiol, luteolina, quercetina, naringenina, sakuranetina, pinocembrina e galangina	Lin et al (2007)
	<i>p</i> -Cimeno (32-42 %), timo (3-19 %) e carvacrol (7-38 %)	Arana-Sánchez et al. (2010)
	Timol (25 %), carvacrol (24 %) e <i>p</i> -cimeno (14 %)	Martinez-Velazquez et al. (2011)
	Eucaliptol (3-17 %), timol (14 %), carvacrol (13 %) e β -cariofileno (15-16 %)	Rivero-Cruz et al. (2011)
<i>L. integrifolia</i>	Integrifolian-1,5-diona e espatulenol	Catalán, Lampasona, Fenik (1993)
	5-Africanen-1 α -ol (10-17 %) e lippifoli-1(6)-en-5-ona (14-38 %)	Coronel et al. (2006)
	α -Pinenol (8 %), borneol (9 %), 4-terpinenol (8 %) e lippifoli-1(6)-en-5-ona (9 %)	Lima et al. (2011)
<i>L. javanica</i>	Piperitenona (74 %)	Manenzhe, Potgieter, Ree (2004)
	Mirceno (0,5-29 %), limoneno (0,5-52 %), ipsenona (0,8-61 %), mircenona (0,11-56 %), carvona (0,6-73 %), piperitenona (0,2-47 %)	Viljoen et al. (2005)
	4-etil-nonacosano, (<i>E</i>)-2(3)-tagetenona epóxido, mircenona, piperitenona, apigenina, cirsimaritina, 6-metoxiluteolina 4'-metil éter, 6-metoxiluteolina e 3',4',7-trimetil éter	Mujovo et al. (2008)
	Verbascosídeo e isoverbascosídeo	Olivier et al. (2010)
<i>L. junelliana</i>	Z-ocimenona (38-63 %) e <i>E</i> -ocimenona (1-37 %) presentes no quimiotipo ocimenona; dihidrocarvona (59-79 %) presente no quimiotipo dihidrocarvona; limoneno (10-41 %) e piperitenona (10-48 %) presentes no quimiotipo limoneno/piperitenona	Juliani Jr. et al. (2002)
<i>L. laxibracteata</i>	Timol (67 %)	Juliani et al. (2000)
<i>L. lacunosa</i>	Mirceno (12-15 %) e mircenona (35-64 %)	Leitão et al. (2008)
<i>L. lupulina</i>	terpinen-4-ol (41 %) no quimiotipo I; 1,8-cineol (16 %), β -cariofileno (12 %) no quimiotipo II; germacreno D (15 %), β -cariofileno (13 %) e biciclogermacreno (11 %) no quimiotipo III	Zoghbi et al. (2002)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. mexicana</i>	Lippiolídeo, ácido lippiolidólico, ácido lippiólico e cicloart-23-ene-3 β ,25-diol	Maldonado et al. (2010)
<i>L. micromera</i>	Timol (34 %) e γ -terpineno (15 %) <i>p</i> -Cimeno (13 %), γ -terpineno (13 %), metil-timil-éter (15 %), timol (29 %)	Rojas et al. (2009) Escobar et al. (2010)
<i>L. myriocephala</i>	β -cariofileno (16 %), germacreno D (11 %)	Vila et al. (2004)
<i>L. microphylla</i>	Microphyllaquinona, tecomaquinona, 6-methoxy-nafto[2,3- <i>b</i>]-furan-4,9-quinona e 7-metoxinafto[2,3- <i>b</i>]-furan-4,9-quinona	Santos et al. (2003)
	Verbascosídeo	Chanh, Koffi, Chanh (1988)
	<i>p</i> -Cimeno (24 %), timol (30 %) e timilacetate (15 %) presentes no quimiotipo A; <i>E</i> -tagentona (22 %) e <i>Z</i> -tangentona (14 %)	Lamaty et al. (1990)
	<i>Z</i> -Tagentona (11 %) e <i>E</i> -tagentona (30 %)	Pélissier et al. (1994)
	6-Epoximirceno (70 %)	Menut et al. (1995a)
	Mirtenol (27 %), linalol (12 %) e 1,8-cineol (12 %)	Menut et al. (1995b)
	Linalol (20 %) e <i>Z</i> -nerodilol (45 %)	Valentin et al. (1995)
	Neral, geranial, 1-cineol e linalol	Kanko et al. (1999)
	Limoneno (15 %), linalol (27 %) e geraniol (20 %)	Oladimeji et al. (2000)
<i>L. multiflora</i>	<i>p</i> -Cimeno (41 %), timol (19 %) e timilacetato (14 %)	Abena et al. (2003)
	Timol (30 %) e <i>p</i> -cimeno (26 %)	Bassole et al. (2003)
	1,8-Cineol (34-41 %) e geranial (14-15 %)	Kanko et al. (2004a)
	<i>n</i> -Tritriacontano, ácido ursólico e salvigenina	Kanko et al. (2004b)
	Ipsdienona (55 %), <i>Z</i> - e <i>E</i> -ocimenona (20 %), timol (42 %), timilacetato (21 %)	Agnaniet et al. (2005)
	1,8-Cineol (40 %), sabineno (11.1 %), linalool (11 %) and alpha-terpineol (10 %)	Avlessi et al. (2005)
	Linalol (29 %), germacreno D (28 %), <i>p</i> -eymeno (14-19 %), timol (30-40 %), timilacetato (14-17 %), 1,8-cineol (43-47 %) e sabineno (12-15 %)	Juliani et al. (2008)
	1,8-Cineol (61 %), sabineno (17 %) e α -terpineol (14 %)	Owolabi et al. (2009)
	<i>p</i> -Cimeno (21 %), timol (14 %) e β -cariofileno (13 %)	Bassolé et al. (2010)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. nodiflora</i>	β -Cariofileno (19 %), calameneno (20 %), 1-octen-3-ol (15 %) e álcool 2-fenetílico (16 %)	Elakovich, Stevens (1985)
	Ciclopentanofenantrenol	Balakrishnan et al. (2010)
	γ -Sitosterol	Balamurugan, Duraipandiyan, Ignacimuthu (2011)
<i>L. origanoides</i>	Timol (19 %) e carvacrol (39 %)	Oliveira et al. (2007)
	Carvacrol (44%) e timol (15%)	Stashenko et al. (2008)
	Timol (55-66 %)	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	<i>p</i> -Cimeno (11-16 %), γ -terpineno (1,5-13 %), timol (0-54 %), carvacrol (0-46 %)	Escobar et al. (2010)
	<i>p</i> -Cimeno (8-14 %), γ -terpineno (2-13 %), timol (0,15-61 %) e carvacrol (0,12-46%)	Stashenko et al. (2010)
	Timol (35-60 %) e carvacrol (0-26 %)	Vicuña, Stashenko, Fuentes (2010)
<i>L. polystachya</i>	α -Tujona (69 %) e carvona (12 %)	Gleiser, Zygadlo (2007)
<i>L. rehmannii</i>	Linalol (0,1-46 %), neral (9-31 %) e geranial (17-47 %)	Linde et al. (2010)
<i>L. rotundifolia</i>	Limoneno (8-26 %) e mirtenal (17-22 %)	Leitão et al. (2008)
<i>L. rugosa</i>	Nerol (19 %) e geraniol (52 %)	Tatsadjieu et al. (2009)
<i>L. salviaefolia</i>	Naringenina, asebogenina, sakuranetina, 6-hidroxiluteolina 7-O- β -D-glucosídeo, (2 <i>R,S</i>)-eriodictiol 7-O- β -D-glucopiranosídeo, aromadendrina, floretina, forsitosídeo B, alissonosídeo, verbascosídeo, lariciresinol 4'-O- β -D-glucopiranosídeo, (2 <i>R,S</i>)-30,40,5,6-tetrahidroxiflavanona 7-O- β -D-glucopyranosídeo, (2 <i>R,S</i>)-30,40,5,8-tetrahidroxiflavanona 7-O- β -D-glucopiranosídeo	Funari et al. (2011)
<i>L. scaberrima</i>	Limoneno (38 %) e carvona (34 %)	Regnier et al. (2008)
<i>L. schomburgkiana</i>	1,8-cineol (64 %)	Silva et al. (2009)
<i>L. sidoides</i>	Ácido palmítico, ácido esteárico, ácido beênico, ácido araquídico, ácido lignocérico, timol, carvacrol, β -sitosterol, lapachenol, isocatalponol, 6-oxo-3,4,4a,5-tetrahydro-3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano	Macambira et al. (1986)

Espécie	Constituinte*	Referência
<i>L. sidoides</i>	tectol e lippsidoquinona	Costa et al. (2002)
	Acetato do ácido oleanólico, metil-3,4-diidroxibenzoato, lapachenol, tecomaquinona I, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, quercetina, luteolina, glucoluteolina, lippisidoquinona, taxifolina e isolariciresinol	Costa et al. (2002)
	Timol (67 %)	Girão et al. (2003)
	Timol (81%)	Cavalcanti et al. (2004)
	Timol (44 %) e α -felandreno (22 %)	Costa et al. (2005)
	Timol (57 %) e carvacrol (17 %)	Botelho et al. (2007a)
	Timol (60 %)	Camurça-Vasconcelos et al. (2007)
	Timol (60 %)	Fontenelle et al. (2007)
	Timol (67 %)	Monteiro et al. (2007)
	Timol (68 %) e <i>p</i> -cimeno (14 %)	Oliveira et al. (2009)
	Timol (7-70 %) e carvacrol (0,4-46 %)	Cavalcanti et al. (2010)
	Timol (78 %)	Medeiros et al. (2011)
Timol (85 %)	Mota et al. (2012)	
Timol (85 %)	Veras et al. (2012)	
<i>L. substrigosa</i>	Germacreno D (30 %), β -cariofileno (15 %)	Silva, Sabino, Reyes (2010)
<i>L. triphylla</i>	eugenil β -glucosídeo, 4-alil-2,6-dimetoxifenol glucosídeo, icarisídeo H ₁ , apigenina, hispidulina, jaceosidina, circsilineol, eupatorina, hispidulina 7-O- β -D-glucosídeo, jaceosidina 7- β -glucosídeo, acteosídeo, isoverbascosídeo, leucosceptosídeo A, martinósídeo, cismartinósídeo, isolariciresinol, lioniresinol, (+)-isolariciresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosídeo, (+)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glucopiranosídeo, (-)-lioniresinol 3 α -O- β -D-glicopiranosídeo, 4 β ,10 α -dihidroxiaromadendrane, 4 α ,10 α -dihidroxiaromadendrane, ácido ursólico, ácido oleanólico, e ácido betulínico	Ono et al. (2008)
<i>L. turbinata</i>	α -tujona (48 %) e carvona (17 %)	Gleiser, Zygadlo (2007)
<i>L. ukambensis</i>	Cânfora (37 %) e 4-tujanol (19 %)	Chogo, Crank (1982)

* Os percentuais representam a concentração do constituinte nos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa; os demais constituintes que não apresentam percentual foram isolados através de técnicas fitoquímicas tradicionais a partir de extratos brutos.

2.2.2 Atividade farmacológica descrita para espécies de *Lippia*

Há mais de uma década, Pascual et al. (2001b) destacaram que os estudos farmacológicos das espécies de *Lippia* são focados, principalmente, na identificação de atividade antimicrobiana, antifúngica, larvicida e repelente, com preferência dada aos óleos essenciais. Considerando o que aparece atualmente nas principais bases de dados (*Web of Science* e *Pubmed*), pouco foi acrescentado à farmacologia do gênero desde 2001, sendo destacado estudos sobre atividade antiparasitária, anti-helmíntica, espasmolítica e sobre o sistema nervoso central, com a concentração dos estudos em poucas espécies. A **Tabela 4** destaca as principais atividades farmacológicas descritas para as espécies de *Lippia*.

L. alba tem sido a espécie que mais recebeu atenção dos pesquisadores, provavelmente pela larga distribuição e utilização na medicina popular para tratar diversas enfermidades, como dor no estômago, diarreia, flatulência, bronquite, tosse, gripe, hipertensão, anemia, sendo também utilizada como sedativo (HENNEBELLE et al., 2008). Assim, com o intuito de comprovar um dos usos popular dessa espécie, Zétola et al. (2002) demonstraram que *L. alba* possui efeito sedativo em camundongos, sendo relacionado a componentes não-voláteis presentes no extrato obtido por percolação. Por outro lado, Hatano et al. (2012) demonstrou que o óleo essencial de *L. alba* apresenta efeito ansiolítico em ratos, provavelmente devido à presença da R(-)-carvona presente como constituinte majoritário. A utilização de *L. alba* para o tratamento de distúrbios estomacais pode ser explicada pelo efeito antiulcerogênico que essa espécie apresentou por reduzir, em ratos, lesões gástricas de induzidas por indometacina, com efeito semelhante à ranitidina (PASCUAL et al., 2001a). Com o intuito similar, Maynard et al. (2011), investigaram o potencial do óleo essencial de *L. alba* em relaxar o músculo liso de artéria mesentérica de ratos, chegando à conclusão de que o óleo influencia o influxo de Ca^{+2} nas células musculares lisas, o que explica a utilização popular da planta no tratamento da hipertensão. Porém, a grande maioria dos estudos sobre os efeitos farmacológicos dessa espécie foram direcionados às atividades antimicrobiana e antifúngica (AGUIAR et al., 2007; DUARTE et al., 2005; MESA-ARANGO et al., 2009; SHUKLA et al., 2009; VERAS et al., 2011).

O extrato etanólico da espécie *L. dulcis* reduziu a inflamação induzida por carragenina e acetato de 12-O-decanoilforbol em ratos, um efeito que foi dependente da dose e sem diferença estatística com a indometacina (PÉREZ et al., 2005). O óleo essencial dessa espécie apresentou atividade antiespasmódica em brônquios de porco, relaxando o músculo liso pré-

contraído tanto com histamina quanto com carbacol (GÖRNEMANN et al., 2008). Esses relatos explicam, em parte, a utilização de *L. dulcis* na medicina popular para tratar inflamações e bronquite (COMPADRE; ROBBINS; KINGHORN, 1986). Abe, Nagao e Okabe (2002) testaram flavonas, feniletanoides e sesquiterpenos isolados de *L. dulcis* frente às células neoplásicas B16-F10, MK-1 e HeLa, observando vários constituintes como antiproliferativos.

A espécie *L. gracilis*, conhecida popularmente como alecrim-da-chapada, é encontrada com facilidade no nordeste brasileiro e utilizada como medicinal por comunidades para tratar gripe, tosse, bronquite, congestão nasal e dor na cabeça (ALBUQUERQUE et al., 2007). As atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo essencial de *L. gracilis* foram determinadas em ratos, sendo observado que o efeito está relacionado com a inibição da migração leucocitária, bloqueio da via do óxido nítrico (NO) e influência dos sistemas opióide e colinérgico (GUILHON et al., 2011; MENDES et al., 2010). Vários relatos também demonstraram o potencial do óleo essencial dessa espécie contra diversas linhagens de bactérias (ALBUQUERQUE et al., 2006; NETO et al., 2010; PESSOA et al., 2005).

A planta *L. multiflora* é muito utilizada na medicina popular dos países africanos para o tratamento de problemas respiratórios e gastrintestinais, hipertensão, malária, febre, inflamação e como sedativo, sendo alguns desses usos validados cientificamente (FOLASHADE; OMOREGIE, 2012). Abena et al. (2003) demonstraram que o óleo essencial de *L. multiflora* apresenta atividade antipirética em ratos, porém não foi observado efeito anti-inflamatório em camundongos no modelo de formação de granuloma. O extrato metanólico das folhas de *L. multiflora* mostrou um potente efeito hipotensivo em ratos, sendo atribuído a um éster do ácido caféico (CHANH; KOFFI; CHANH, 1988). A utilização da planta na medicina popular para o tratamento da malária foi comprovada através de estudos *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*, sendo demonstrado que tanto a infusão das folhas quanto o óleo essencial apresentaram potente atividade sobre o parasita (BENOIT-VICAL et al., 1996; VALENTIN et al., 1995). O extrato aquoso de *L. multiflora* também apresentou profundo efeito calmante tanto em camundongos quanto em ratos, sendo atribuído à propriedade relaxante muscular (NOAMESI; ADEBAYO; BAMGBOSE, 1985).

L. sidoides, conhecida popularmente como alecrim pimenta, é muito encontrada na Região Nordeste com uma grande utilização nos programas de fitoterapia em saúde pública, aparecendo como a única espécie de *Lippia* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de

Interesse ao SUS (MATOS, 2007; RENISUS, 2009). O óleo essencial dessa espécie não apresentou toxicidade aguda em camundongos, mesmo na dose máxima de 500 mg/kg testada, e mostrou-se eficaz na proteção gástrica contra lesões induzidas por etanol e como anti-inflamatório tópico no modelo de edema induzido por acetato de 12-O-decanoilforbol, podendo esses efeitos ter sido observado devido à atividade antioxidante do óleo (MONTEIRO et al., 2007). Como *L. sidoides* é utilizada na medicina popular como antisséptico tópico de pele e mucosas, alguns trabalhos foram desenvolvidos no sentido de comprovar a atividade antimicrobiana do óleo essencial contra *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras clínicas (OLIVEIRA et al., 2006), para o tratamento da gengivite em seres humanos (RODRIGUES et al., 2009) e potencializando o efeito de gentamicina, amicacina e neomicina contra *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (VERAS et al., 2012). O óleo essencial de alecrim pimenta também apresentou atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* e em camundongos infectados com *P. berghei* (MOTA et al., 2012) e antileishmania contra *Leishmania chagasi* (OLIVEIRA et al., 2009) e *L. amazonensis*, neste parasita tendo como alvos prováveis a membrana plasmática e o metabolismo dos lipídios (MEDEIROS et al., 2011). A utilização popular de *L. sidoides* para o tratamento de distúrbios gastrintestinais pode estar relacionada à atividade antihelmíntica do óleo essencial, demonstrada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

Tabela 4 – Atividade farmacológica descrita em espécies de *Lippia*.

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. adoensis</i>	Antinociceptiva em camundongos, nos modelos de tail-flick e placa quente	Makonnen et al. (2003)
	Antipirética em camundongos	Debell et al. (2005)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tadeg et al. (2005)
<i>L. alba</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> e <i>S. pyogenes</i>	Caceres et al. (1991)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra os vírus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1)	Abad et al. (1998)
	Antinociceptiva em camundongos nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina; anti-inflamatória em ratos no modelos de edema induzido por carragenina e dextrana	Viana et al. (1998)

Espécie	Atividade	Referência
	Ansiolítica em camundongos, nos modelos de labirinto de cruz elevada e teste de campo aberto	Vale et al. (1999)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Ustilago scitaminea</i> , <i>Colletotrichum falcatum</i> e <i>Curvularia lunata</i>	Rao et al. (2000)
	Antiulcerogênica em ratos, no modelo de ulceração gástrica induzida por indometacina	Pascual et al. (2001a)
	Sedativa em camundongos, nos modelos de sono induzido por pentobarbital e <i>rota-rod</i>	Zétola et al. (2002)
	Antioxidante <i>in vitro</i> nos ensaios de DPPH e peroxidação lipídica	Ramos et al. (2003)
	Redução da frequência cardíaca <i>in vitro</i> em coração isolado de rato	Gazola et al. (2004)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra os vírus HSV-1 e poliovírus tipo 2 (PV-2)	Andrighetti-Fröhner et al (2005)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Candida albicans</i>	Duarte et al. (2005)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> e <i>Klebsiela pneumonia</i>	Sena Filho et al. (2006)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>S. intermedis</i> e <i>S. mutans</i>	Nogueira et al. (2007)
<i>L. alba</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> e <i>C. albicans</i>	Aguiar et al. (2008)
	Neurosedativa <i>in vitro</i> no ensaio de ligação dos receptores benzodiazepínico e GABA _A	Hennebelle et al. (2008)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra o vírus da febre amarela	Meneses et al. (2009)
	Citotóxica <i>in vitro</i> contra a célula HeLa dos quimiotipos citral e carvona e antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Aspergillus fumigatus</i> do quimiotipo citral	Mesa-Arango et al. (2009)
	Anticonvulsivante em camundongos, no modelo de indução de convulsões por pentilenotetrazol	Neto et al. (2009)
	Citotóxica contra <i>Artemia franciscana</i>	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	Antifúngica e inibidora da produção de aflatoxina B ₁ <i>in vitro</i> em <i>A. flavus</i>	Shukla et al. (2009)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	Escobar et al. (2010)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra o vírus da dengue	Ocazonez et al. (2010)
	Antigenotóxica <i>in vitro</i> contra bleomicina em <i>E. coli</i>	López, Stashenko, Fuentes (2011)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. alba</i>	Antioxidante no ensaio de DPPH	Fabri et al. (2011)
	Vasorrelaxante em artéria mesentérica de rato <i>in vitro</i>	Maynard et al. (2011)
	Fumigante contra <i>Callosobruchus chinensis</i>	Shukla et al. (2011)
	Sinergismo com eritromicina contra <i>S. aureus</i>	Veras et al. (2011)
	Ansiolítica em ratos, utilizando o modelo de labirinto de cruz elevada	Hatano et al. (2012)
<i>L. alba</i>	Anestésica em jundiá	Heldwein et al. (2012)
	Potencialização dos antibióticos amicacina, gentamicina e neomicina contra <i>S. aureus</i>	Veras et al. (2012)
	<i>L. alba</i>	Inibidora da sinalização celular do receptor de quimiocina tipo 5
<i>L. berlandieri</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i>	Paredes-Aguilar et al. (2007)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio do ácido tiobarbitúrico e antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Avila-Sosa et al. (2010a)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Aspergillus niger</i> e <i>Penicillium</i> spp.	Avila-Sosa et al. (2010b)
<i>L. canescens</i>	Antiproliferativa <i>in vitro</i> contra as células HeLa e B16-F10	Abe, Nagao, Okabe (2002)
<i>L. chevalieri</i>	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>B. cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. camorum</i>	Bassole et al. (2003)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>C. albicans</i>	Mevy et al. (2007)
<i>L. citriodora</i>	Antioxidante contra os radicais superóxido e hidroxil e ácido hipocloroso	Valentão et al. (2002)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Helicobacter pylori</i>	Ohno et al. (2003)
	Antioxidante no ensaio de DPPH Citotóxica contra <i>Artemia franciscana</i>	Bilia et al. (2008) Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. citriodora</i>	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	Escobar et al. (2010)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH e antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>S. haemolyticus</i>	Mothana et al. (2010)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra o vírus da dengue	Ocazonez et al. (2010)
<i>L. dulcis</i>	Antiproliferativa <i>in vitro</i> contra as células HeLa e B16-F10	Abe, Nagao, Okabe (2002)
	Antiespasmódica <i>in vitro</i> em brônquios isolados de porco	Görnemann et al. (2008)
	Citotóxica contra <i>Artemia franciscana</i>	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	Escobar et al. (2010)
<i>L. gracilis</i>	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>Salmonella</i> sp., <i>S. paratyphi</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	Pessoa et al. (2005)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>S. choleraesuis-diarizonae</i> , <i>Enterobacter asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>A. nidulans</i>	Albuquerque et al. (2006)
	Inseticida contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i>	Santiago et al. (2006)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> e em ratos infectados por <i>S. aureus</i>	Neto et al. (2009)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH; antinociceptiva em camundongos no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético; anti-inflamatória em ratos no modelo de edema de pata induzida por carragenina e em camundongo pela inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	Mendes et al. (2010)
	Antinociceptiva em camundongos nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina	Guilhon et al. (2011)

Espécie	Atividade	Referência
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Erwinia carotovora</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	Obledo et al. (2002)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sarcina lutea</i> e <i>Vibrio cholerae</i>	Hernández et al. (2003)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH	Guereca et al. (2007)
	Anti-helmíntica contra larvas de <i>Haemonchus contortus</i>	López-Aroche et al. (2008)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH e antimutagênica sobre <i>S. typhimurium</i>	Martínez-Rocha et al. (2008)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	Pozzatti et al. (2008)
<i>L. graveolens</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Sarcina lútea</i> , <i>Shigella boydii</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>S. typhi</i>	Hernandez et al. (2009)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH e antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i>	Arana-Sánchez et al. (2010)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Giardia lamblia</i>	Machado et al. (2010)
	Acaricida contra <i>Rhipicephalus microplus</i>	Martinez-Velazquez et al. (2011)
	Antiespasmódica <i>in vitro</i> em íleo isolado de cobaia e <i>in vivo</i> em ratos, no modelo de trânsito gastrointestinal	Rivero-Cruz et al. (2011)
<i>L. hermannioides</i>	Antioxidante no ensaio de DPPH e antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Bartonella cereus</i>	Fabri et al. (2011)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Ascosphaera apis</i>	Dellacasa et al. (2003)
<i>L. integrifolia</i>	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i>	Sülzen et al. (2006)
	Colerética <i>in vivo</i> e antiespasmódica <i>in vitro</i> em jejuno isolado de rato	Gorzalczany et al. (2008)
	Repelente contra <i>Triatoma infestans</i>	Lima et al. (2011)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Manenzhe, Potgieter, Ree (2004)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>K. pneumoniae</i> e <i>C. neoformans</i>	Viljoen et al. (2005)
<i>L. javanica</i>	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH	Muchuweti et al. (2006)
	Inibidora da transcriptase reversa do vírus HIV-1	Mujovo et al. (2008)
	Acaricida contra <i>Boophilus</i> spp, <i>R. evertsi evertsi</i> , <i>R. appendiculatus</i> , <i>Hyalomma</i> spp. e <i>Amblyomma</i> spp.	Madzimure et al. (2011)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. junelliana</i>	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Ascosphaera apis</i>	Dellacasa et al. (2003)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra o vírus Junin	Garcia et al. (2003)
<i>L. micromera</i>	Citotóxica contra <i>Artemia franciscana</i>	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>B. subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>A. niger</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Rojas et al. (2009)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	Escobar et al. (2010)
<i>L. microphylla</i>	Citotóxica contra as células neoplásicas HL-60, CEM, HCT8, MCF-7 e B16	Santos et al. (2003)
	Antioxidante <i>in vitro</i> nos ensaios de DPPH e oxidação induzida no β -caroteno e tóxica contra <i>Artemia salina</i>	David et al. (2007)
<i>L. multiflora</i>	Calmante em camundongos, por reduzir a atividade locomotora induzida por anfetamina, e relaxante muscular em diafragma isolado de rato	Noamesi, Adebayo, Bamgbose (1985)
	Anti-hipertensiva em ratos	Chanh, Koffi, Chanh (1988)
	Antimalárica <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i>	Valentin et al. (1995)
	Tranquilizante e analgésica em ratos	Abena, Ngondzo-Kombeti, Bioka (1998)
<i>L. multiflora</i>	Antioxidante <i>in vitro</i>	Agnaniet et al. (2005)
	Toxicidade contra <i>Artemia salina</i>	Ajaiyeoba et al. (2006)
	Antimalárica <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i>	Benoit-Vical et al. (2006)
	Pediculicida contra <i>Pediculus humanus corporis</i> e <i>Pediculus humanus capitis</i> e escabicida em humanos com escabiose	Oladimeji et al. (2000)
	Antinociceptiva em camundongos, no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, e antipirética em ratos, no modelo de hiperpirexia induzida por levedura de cerveja	Abena et al. (2003)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. multiflora</i>	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>B. cereus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Shigella dysenteria</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. camorum</i>	Bassole et al. (2003)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhii</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. albicans</i>	Kunle et al. (2003)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>T. brucei brucei</i>	Okpekon et al. (2004)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>B. cereus</i> , <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	Owolabi et al. (2009)
	Antimicrobiano <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>S. enterica</i> e <i>S. dysenteria</i>	Bassolé et al. (2010)
<i>L. nodiflora</i>	Antinociceptiva em camundongos, no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, e anti-inflamatória em ratos, no modelo de edema de pata induzida por carragenina	Ahmed et al. (2004)
	Antioxidante <i>in vitro</i> em vários ensaios	Ashokkumar et al. (2008)
	Anti-inflamatória <i>in vitro</i> via inibição da fosforilação de MAPK e translocação de NF- κ B	Balakrishnan et al. (2010)
	Antidiabética em ratos com diabetes mellitus induzida com estreptozotocina	Balamurugan, Duraipandiyan, Ignacimuthu (2011)
	Sedativa, ansiolítica e anticonvulsivante	Thirupathy, Tulshkar, Vijaya (2011)
<i>L. origanoides</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	Santos et al. (2004)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , <i>Trichophytum rubrum</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. guilliermondii</i> e <i>C. albicans</i>	Oliveira et al. (2007)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	Velasco et al. (2007)
	Antioxidante <i>in vitro</i>	Stashenko et al. (2008)
	Antiviral <i>in vitro</i> contra o vírus da febre amarela	Meneses et al. (2009)
	Citotóxica contra <i>Artemia franciscana</i>	Olivero-Verbel, Güette-Fernandez, Stashenko (2009)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	Escobar et al. (2010)

Espécie	Atividade	Referência
<i>L. organoides</i>	Antigenotóxica <i>in vitro</i> contra indução por bleomicina	Vicuña, Stashenko, Fuentes (2010)
<i>L. polystachya</i>	Inseticida contra <i>Culex quinquefasciatus</i>	Gleiser, Zygadlo (2007)
	Inseticida contra larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	Kembro et al. (2009)
<i>L. rehmannii</i>	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Rhizoctonia solani</i> e <i>Fusarium oxysporum</i>	Linde et al. (2010)
<i>L. rubela</i>	Antioxidante no ensaio de DPPH	Fabri et al. (2011)
<i>L. rugosa</i>	Inseticida contra <i>Sitophilus zeamais</i>	Ngamo et al. (2007)
	Antifúngica e inibidora da produção de aflatoxina B ₁ <i>in vitro</i> em <i>A. flavus</i>	Tatsadjieu et al. (2009)
<i>L. scaberrima</i>	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Botryosphaeria parva</i>	Regnier et al. (2008)
<i>L. schomburgkiana</i>	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH	Silva et al. (2009)
	Citotóxica <i>in vitro</i> contra as células HL60, SW1573 e CEM	Costa et al. (2001)
	Contra doença gengival em cachorros	Girão et al. (2003)
	Inseticida contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i>	Cavalcanti et al. (2004)
	Inseticida contra as larvas de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	Costa et al. (2005)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i>	Oliveira et al. (2006)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. mutans</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. mitis</i> e <i>C. albicans</i>	Botelho et al. (2007a)
	Antiplaca e antigengivite em humanos	Botelho et al. (2007b)
	Anti-inflamatória e antimicrobiana contra microorganismos orais em ratos submetidos à periodontite experimental	Botelho et al. (2007c)
	Antihelmíntica <i>in vitro</i> contra <i>Haemonchus contortus</i> e em camundongos infestados por <i>Syphacia obvelata</i> e <i>Aspicularis tetraptera</i>	Camurça-Vasconcelos et al. (2007)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Microsporium canis</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	Fontenelle et al. (2007)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH e antiulcerogênica em camundongos submetidos à ingestão de etanol	Monteiro et al. (2007)
	Antihelmíntica em ovelhas infectadas por <i>Haemonchus</i> spp. e <i>Trichostrongylus</i> spp.	Camurça-Vasconcelos et al. (2008)

Espécie	Atividade	Referência
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>L. chagasi</i>	Oliveira et al. (2009)
	Antigengivite em humanos	Rodrigues et al. (2009)
	Acaricida contra <i>Tetranychus urticae</i>	Cavalcanti et al. (2010)
<i>L. sidoides</i>	Antioxidante no ensaio de DPPH e antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>Bartonella cereus</i>	Fabri et al. (2011)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>L. amazonensis</i>	Medeiros et al. (2011)
	Antiparasitária <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i> e em camundongos infectados com <i>P. berghei</i>	Mota et al. (2012)
	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	Veras et al. (2012)
	Antioxidante <i>in vitro</i> no ensaio de DPPH	Ono et al. (2008)
<i>L. triphylla</i>	Antimicrobiana <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Shigella</i> sp. e <i>Streptococcus</i> sp.	Hernández, Tereschuk, Abdala (2000)
	Antifúngica <i>in vitro</i> contra <i>Ascosphaera apis</i>	Dellacasa et al. (2003)
<i>L. turbinata</i>	Inseticida contra <i>Culex quinquefasciatus</i>	Gleiser, Zygodlo (2007)
	Inseticida contra larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i>	Kembro et al. (2009)

2.2.3 A espécie *Lippia thymoides*

A espécie *L. thymoides* (**Figura 3**) é um arbusto de 0,5 a 1,5 m de altura, ramos glabros, quadrangulares. Folhas opostas nos ramos normais, fasciculadas nos braquiblastos, discolors, coriáceas, 0,5 a 1 cm de comprimento; pecioladas; pecíolo com 0,5 a 0,8 mm de comprimento, membranácea, oblanceolada a espatulada, ápice arredondado, margem inteira, base atenuada; venação hifódroma. Inflorescência até 6 mm de comprimento, axilares, solitárias, subglobosas, compactas, cerca de 1 cm de comprimento; brácteas imbricadas, oval-lanceoladas, ápice agudo cimeira helicoidal. Flores pediceladas, pedicelo com 0,3 a 0,4 cm de comprimento, cálice, cilíndrico, lacínios lanceolados, pubescentes externamente, glabros internamente; corola salverforme, branca a amarelo-alaranjado, lobos 1,2 a 1,5 mm de comprimento, arredondados, pubescentes externamente e glabros internamente; estames-6, tetradínamos, filetes glabros, anteras lanceoladas; ovário glabro (MELO et al., 2010; SALIMENA; SILVA, 2009). Corresponde a uma espécie nativa e endêmica do Brasil, podendo ser encontrada apenas na Bahia e Minas Gerais, em domínios fitogeográficos de

caatinga e cerrado, sendo listada no banco de dados de plantas do Nordeste (SALIMENA et al., 2010; GAMARRA-ROJAS et al., 2012). Popularmente conhecida como alecrim do mato ou alecrim do campo, esta espécie é utilizada no banho para o tratamento de feridas e as folhas são utilizadas como antipiréticas, no tratamento da bronquite e reumatismo (FUNCH et al., 2004; <http://www.liberherbarum.com/Minor/BZ/PN8182.htm>). Em estudo realizado por Almeida e Bandeira (2010) em comunidades quilombolas da Bahia, a espécie *L. thymoides* apareceu dentre as mais citadas, sendo utilizada pelas comunidades locais como medicinal e em rituais religiosos.

Em estudo realizado por Pinto (2008), seis espécies de *Lippia* coletadas na Bahia foram utilizadas na tentativa de buscar espécies de interesse farmacológico. Nessa pesquisa, identificou-se a presença de terpenos, esteroides, cumarinas, ácidos fenólicos e saponinas por meio de triagem fitoquímica na espécie *L. thymoides*. Também, por meio de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* no método da difusão em disco, observou-se que essa espécie foi ativa contra diversos patógenos, principalmente *S. aureus*. A autora enfatizou a realização de investigações posteriores visando reconhecer o potencial químico e farmacológico dessa espécie.

Figura 3 – Foto de *L. thymoides* em seu habitat.



A, planta inteira; **B**, detalhe ressaltando as folhas; **C**, detalhe ressaltando a flor.

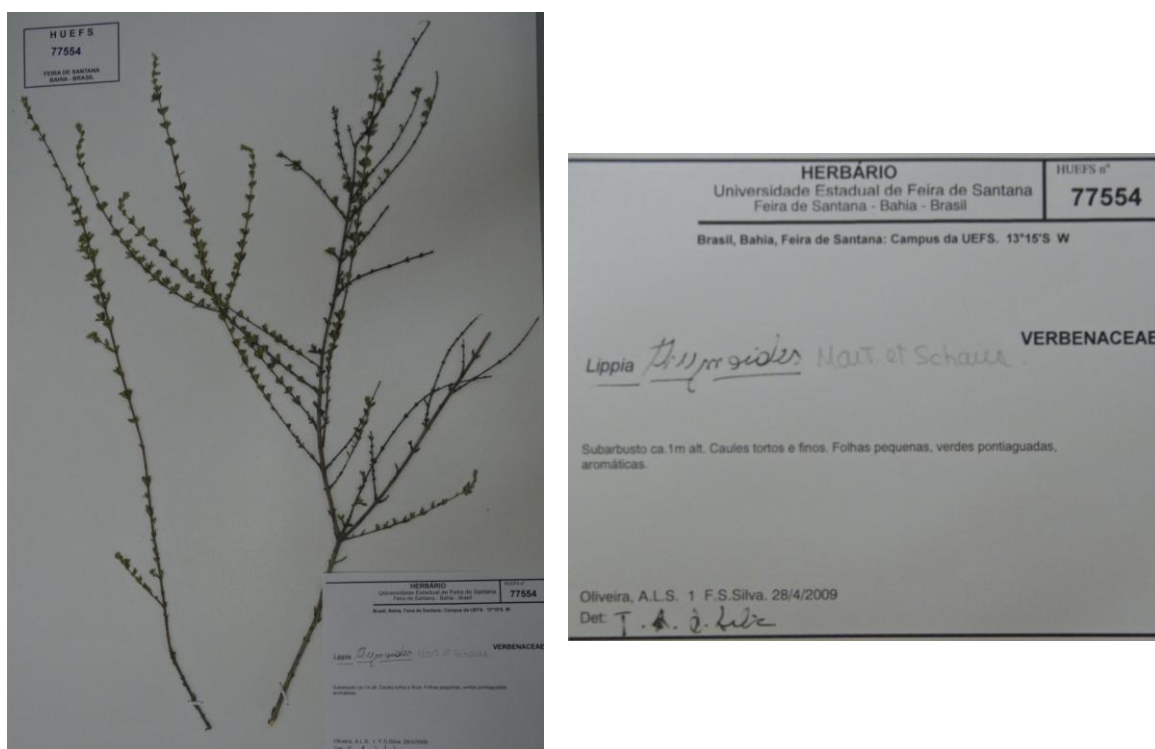
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e caules de *L. thymoides* foram coletados no Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), nas coordenadas aproximadas de 12°11'45'' sul e 38°58'05'' oeste (Google Earth v.6.0.3.2197), sempre no mesmo horário dos seguintes dias: 05 de fevereiro, 28 de abril, 24 de julho e 28 de outubro de 2009 e 28 de janeiro de 2010. Exsicatas das duas primeiras coletas foram depositadas no Herbário da UEFS (HUEFS) sob os códigos de, respectivamente, 135956 e 77554 (**Figura 4**) e identificadas pela Profa. Dra. Tânia Regina Santos Silva.

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material. Após separação das folhas e caules, estes foram pulverizados em moinho de facas e destinados a metodologias extrativas específicas.

Figura 4 – Foto da exsicata de *L. thymoides* (esquerda) e destaque da ficha de identificação (direita).



3.2 PREPARAÇÃO E PARTIÇÃO DOS EXTRATOS

O material coletado no dia 05 de fevereiro foi utilizado para obtenção dos extratos das folhas (TF) e caules (TC). Assim, 706,8 g das folhas e 3.652,8 g dos caules foram macerados em balões de fundo chato em banho ultrassônico, a 37 °C, utilizando-se como solvente o metanol. A intervalos de 30 minutos, o metanol era evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50 °C, sendo adicionado aos balões novo solvente e repetindo-se exaustivamente essa etapa até que a solução extrativa atingisse uma coloração semitransparente. O resíduo do solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão e a água foi retirada por liofilização, para obtenção dos extratos brutos TF (247,4 g) e TC (150,1 g), com rendimento de 35 % e 4,1 % a partir do material vegetal seco, respectivamente.

TF (126,4 g) e TC (70,1 g) foram submetidos à partição líquido-líquido utilizando-se solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano e acetato de etila. A massa bruta das frações, assim como as respectivas codificações são mostradas na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Rendimento dos extratos metanólicos brutos e frações obtidas por partição líquido-líquido das folhas e caules de *L. thymoides*.

Extrato (código)	Fração (código)	Massa bruta (g)	Rendimento (%)
Folhas (TF) 126,4 g	Hexano (TFH)	6,8	5,4
	Diclorometano (TFD)	11,0	8,7
	Acetato de etila (TFA)	4,5	3,6
Caules (TC) 70,1 g	Hexano (TCH)	2,1	3,0
	Diclorometano (TCD)	9,6	13,7
	Acetato de etila (TCA)	2,7	3,9

3.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Após o período de secagem, as folhas de *L. thymoides* das outras quatro coletas, sendo cada uma realizada ao final do primeiro mês de cada estação do ano, foram submetidas à análise da umidade residual em balança determinadora de umidade (Série ID Versão 1.8 Marte, São Paulo, SP), que possui como fonte de calor o infravermelho. Esse determinador provoca a desidratação de 1 g da amostra, num intervalo de tempo de dez minutos e sob

temperatura de até 100 °C. O percentual de umidade perdido pela amostra durante o aquecimento é detectado e fornecido, assim como a massa vegetal remanescente.

Após a determinação da umidade, as folhas foram utilizadas para a extração dos óleos essenciais por hidrodestilação por arraste a vapor d'água, em aparelho tipo Clevenger, durante 3 horas. Os óleos essenciais obtidos foram secos com sulfato de sódio anidro e armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados, à temperatura de cerca de -20 °C. O teor de óleo essencial foi calculado usando-se a relação massa de folhas/volume de óleo, levando-se em consideração a biomassa seca, de acordo com a fórmula: $T = \{V/[M - (M \times U/100)]\} \times 100$, onde T é o teor do óleo essencial, em %; V é o volume do óleo extraído, em mL; M é a massa vegetal bruta, em g; U é o teor de umidade presente na massa vegetal bruta, em %. Na **Tabela 6** estão descritas as datas das coletas, massa vegetal utilizada e codificação dos óleos.

Tabela 6 – Massa vegetal utilizada e codificação dos óleos essenciais das folhas de *L. thymoides* coletados nas quatro estações do ano.

Informações	Estações do ano			
	Outono	Inverno	Primavera	Verão
Código da amostra	TOO	TOI	TOP	TOV
Data da coleta	28/04/09	24/07/09	28/10/09	28/01/10
Massa vegetal seca (g)	166,1	355,0	256,0	133,4

As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas pela combinação de cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG/DIC) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Nas análises por CG/DIC foi utilizado um cromatógrafo Varian CP-3380 (Palo Alto, Califórnia, EUA), equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar Chrompack CP-SIL 5 (30 m x 0,5 mm), com espessura do filme de 0,25 µm, temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 240 °C, hélio como gás de arraste na vazão de 1 mL/min, com programa de temperatura do forno de: 60 °C a 240 °C (3 °C/min), mantendo uma isoterma de 240 °C durante 20 minutos.

As análises por CG/EM foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu CG-2010 (Kyoto, Japão), acoplado a espectrômetro de massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu, coluna capilar DB-5ms (30m x 0,25mm), com espessura do filme 0,25 µm, temperatura do injetor 220°C, gás de

arraste hélio na vazão de 1 mL/min, temperatura da interface de 240 °C, temperatura da fonte de ionização de 240 °C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60 °C a 240 °C (3 °C/min), mantendo uma isoterma de 240 °C por 20 minutos.

Antes da injeção, aproximadamente 0,01 g de cada amostra de óleo essencial foi pesada em balança analítica e diluída em 500 µL do solvente trimetilpentano. Um volume de 0,2 µL desta solução foi injetado, sob as mesmas condições supracitadas, no CG/DIC e duas vezes no CG/EM com razões de *split* de 1:100 e 1:30. Para determinação do índice de Kovats, foi efetuada uma análise no CG/DIC, onde um volume de 50 µL de uma solução a 5 % de *n*-alcanos (C₈ a C₂₄) foi adicionada às amostras de óleo que haviam sido previamente diluídas em trimetilpentano.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats de cada um dos picos, com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈ a C₂₄), de acordo com a fórmula: $I_k = (100N + 100(\log T'_{R(A)} - \log T'_{R(N)}) / (\log T'_{R(N+1)} - \log T'_{R(N)})$, onde I_k é o índice de retenção de Kovats; N é o número de átomos de carbono do padrão do alcano (C₈ a C₂₄); $T'_{R(A)}$ é o tempo de retenção do pico calculado; $T'_{R(N)}$ é o tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado; $T'_{R(N+1)}$ é o tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado.

Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, pela consulta na literatura especializada (ADAMS, 2007; JOULAIN; KONIG, 1998) e pela injeção de padrões. Já a quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS NOS EXTRATOS E FRAÇÕES

A determinação espectrofotométrica de fenóis totais foi realizada utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, com base no método descrito por Slinkard e Singleton (1977). Em cubetas de vidro, foram adicionados 40 µL de uma solução com diluição entre 50 e 500 µg/mL dos extratos e frações das folhas e caules, 3,16 mL de água destilada e 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), com agitação por 6 minutos seguida de repouso à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 600 µL de uma solução

saturada de carbonato de cálcio (Dinâmica, Brasil), seguido de agitação e repouso por 2 horas a 20 °C. Passado esse período, a absorbância de cada solução foi determinada em espectrofotômetro (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 765 nm. Para a construção da curva de calibração, uma solução estoque de 5 mg/mL de ácido gálico (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) foi diluída a soluções de concentrações equivalentes a 50, 100, 150, 250 e 500 µg/mL, sendo submetidas às mesmas condições dos extratos e frações descritos anteriormente. O conteúdo total de fenólicos totais foi calculado com a utilização da equação, obtida por regressão linear: $A = 0,001C - 0,0052$, ($R^2 = 0,9991$), onde A corresponde à absorbância registrada a 765 nm; C corresponde à concentração de fenóis, expressa como miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra (EAG/g de amostra); e R^2 é o coeficiente de correlação linear. As determinações foram realizadas em triplicata e em três experimentos independentes.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a capacidade dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* em sequestrar radicais livres, foi utilizado o método fotocolorimétrico *in vitro* do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), de acordo com o método descrito por Brand-Willians, Cuvelier, Berset (1995) com algumas modificações. Inicialmente, preparou-se soluções estoques de 1 mg/mL em etanol para cada amostra e os controles positivos ácido ascórbico (AcA), comprado de Dinâmica (Diadema, São Paulo, Brasil), butil hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA), ambos obtidos de Sigma-Aldrich, que foram diluídas para as seguintes concentrações: 243, 81, 27, 9, 3 e 1 µg/mL. A essas soluções das amostras e controles positivos (2,5 mL) adicionou-se 1 mL da solução de DPPH a 50 µg/mL. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente durante 30 minutos, sendo a absorbância mensurada em seguida em espectrofotômetro UV-visível a 518 nm, para quantificar a variação da coloração de violeta escuro para amarelo claro. Foram mantidos brancos para cada amostra e o DPPH, com a adição de 1 mL de etanol a 2,5 mL de cada amostra e 3,5 mL da solução de DPPH, respectivamente. A determinação da atividade antioxidante de cada concentração das amostras foi calculada de acordo com a fórmula: $\%C_{DPPH} = \{[AB_{DPPH}] - [AF_{amostra} - AB_{amostra}]/AB_{DPPH}\} \times 100$, onde $\%C_{DPPH}$ é o percentual de sequestro do DPPH; AB_{DPPH} é a absorbância do branco do DPPH; $AF_{amostra}$ é a absorbância final da amostra; e $AB_{amostra}$ é a

absorbância do branco da amostra. O teste foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes, sendo os resultados expressos em valores correspondentes à concentração capaz de sequestrar 50 % do DPPH e reduzir sua absorbância (CE_{50}).

Outro método de avaliação da atividade antioxidante realizado foi o método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico em uma emulsão (MIGUEL, 2010). Foram preparadas soluções estoques dos extratos, frações, óleos essenciais e controles positivos (quercetina, QUE, obtido de Sigma-Aldrich; pirogallol, PIR, obtido de Dinâmica; e ácido ascórbico, AcA) na concentração de 1 mg/mL em etanol. O β -caroteno foi dissolvido em clorofórmio (0,2 mg/mL) e a 2 mL dessa solução foi adicionado 40 mg de ácido linoleico (Vetec) e 400 mg de Tween 40 (Sigma-Aldrich), sendo o clorofórmio evaporado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C. Após essa etapa, 100 mL de água destilada foram adicionadas ao sistema sob agitação vigorosa durante 2 minutos para a formação da emulsão. A cada 3 mL desse sistema oxidante formado, foi adicionado 120 μ L das soluções estoques de 1 mg/mL previamente preparadas. O controle negativo foi realizado com a substituição das amostras por igual volume de etanol. O teste foi realizado em triplicata e em três experimentos independentes, sendo que a determinação da atividade antioxidante foi quantificada pela medida da absorbância (470 nm) do sistema oxidante, imediatamente após a adição das amostras e após 120 minutos de incubação do sistema a 50 °C, de acordo com a fórmula: $\%AA = \{[1 - (A_0 - A_t)] / (A_0^0 - A_t^0)\} \times 100$, onde %AA é o percentual de atividade antioxidante; A_0 e A_t , são as absorbâncias inicial e final das amostras, respectivamente; e A_0^0 e A_t^0 são as absorbâncias inicial e final do controle negativo.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.5.1 Microrganismos utilizados

Os testes antimicrobianos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da UEFS. As amostras de extratos foram testadas através do método da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM), sendo utilizadas as metodologias descritas no *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2002; 2003), com algumas modificações.

Os micro-organismos utilizados nos testes, cedidos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB), foram:

- *Escherichia coli* (CCMB 261) resistente à Sulfonamida e sensível à Trimetoprima;
- *Pseudomonas aeruginosa* (CCMB 268);
- *Salmonella choleraesuis* (CCMB 281);
- *Staphylococcus aureus* (CCMB 262) resistente à Estreptomicina e Dihidrostreptomicina;
- *Staphylococcus aureus* (CCMB 263) resistente à Novobiocina;
- *Micrococcus luteus* (CCMB 283);
- *Bacillus cereus* (CCMB 282);
- *Candida albicans* (CCMB 286) resistente à Fluconazol e Anfotericina B;
- *Candida parapsilosis* (CCMB288).

3.5.2 Preparo da suspensão de microrganismos

Com o auxílio de uma alça, 3 a 5 colônias isoladas da placa de repicagem do micro-organismo teste foram transferidas para um tubo contendo 1,8 mL de solução salina a 0,45%. Após a homogeneização, a densidade do inóculo foi padronizada com o auxílio de um colorímetro (bioMérieux). Para bactérias, ajustou-se a turbidez óptica a uma solução padrão na escala 0,5 de McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, e para leveduras, na escala 3 de McFarland, que corresponde a aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

3.5.3 Determinação da CIM

Às placas de 96 poços estéreis, contendo 95 μ L de Caldo Müeller-Hinton (CMH) duas vezes concentrado em cada poço, foram adicionados 90 μ L dos extratos, frações ou óleos essenciais de *L. thymoides*, em triplicata, na concentração inicial de 22 mg/mL, dissolvidos em dimetilssufóxido (DMSO, obtido de VETEC) e filtrados em membrana de acetato de celulose (0,22 μ m) estéril. A partir da concentração inicial das amostras, foram feitas diluições sucessivas, no fator de 2, com todos os poços contendo um volume final de 100 μ L após a inoculação de 10 μ L da suspensão do micro-organismo teste padronizado. Dessa

forma, a faixa de concentração dos extratos, frações e óleos essenciais estudada foi de 9,99 mg/mL (primeiro poço) a 0,08 mg/mL (último poço).

Depois de realizadas as diluições em todos os poços, foram adicionados 10 µL da suspensão de micro-organismos padronizados como descrito no item anterior, porém, tanto para as bactérias como para as leveduras a suspensão foi ajustada a uma solução padrão de McFarland de 3, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e 5×10^5 UFC/mL, respectivamente. Para as leveduras, retirou-se 10 µL dessa suspensão para inoculação nos poços, obtendo-se uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC por poço. Para as bactérias, foi preparada uma segunda suspensão retirando-se 10 µL da primeira e adicionando-se em 990 µL de solução salina a 0,45%, obtendo-se, portanto uma segunda suspensão com concentração final aproximada de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Ao inocular 10 µL desta segunda suspensão no caldo, a concentração final de bactérias foi de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ UFC por poço.

Foram feitos controles de esterilidade do meio de cultura (100 µL CMH), da viabilidade microbiana (90 µL CMH [1x] + 10 µL de da suspensão microbiana), e da esterilidade das amostras (50 µL CMH [2x] + 50 µL da amostra). O controle do DMSO foi feito em placa separada. Os controles positivos foram feitos com o antibiótico cloranfenicol (CLO, Sigma-Aldrih) e o antifúngico nistatina (NIS, Sigma-Aldrih), que foram mantidos em uma concentração estoque de 10 mg/mL.

As placas com as bactérias foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 18 a 24h e com as leveduras, a 28 °C por 48h. Após o período de incubação para cada micro-organismo, foi adicionado em cada poço 30 µL do revelador resazurina (Sigma-Aldrih), para as bactérias, e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC, Sigma-Aldrih), para os fungos. O revelador foi preparado na concentração de 10 mg/mL em água esterilizada. As placas foram colocadas de volta à temperatura de incubação, por um período de 3 horas e fez-se, então, a leitura da CIM. Foram considerados, neste trabalho, valores de CIM menores ou iguais a 2,56 mg/mL, como resultados representativos para inibição do crescimento microbiano nas condições testadas.

3.5.4 Determinação da concentração bactericida/fungicida mínima (CBM/CFM)

Para determinar a CBM/CFM, utilizou-se o conteúdo de todos os poços onde o teste de CIM revelou inibição do crescimento bacteriano e aqueles com concentração imediatamente

superior à da CIM. Assim, adicionou-se 5 µL do conteúdo a ser testado a placas de petri previamente preparadas com Ágar Mueller Hinton, no quadrante identificado correspondente ao poço. Após repetir esse procedimento para todos os poços, incubaram-se as placas em estufa por 24 e 48 horas, respectivamente, para as placas de bactérias e fungos.

Na identificação dos resultados, nos quadrante onde as alíquotas não resultaram em crescimento microbiano, considerou-se a concentração do poço amostrado como bactericida ou fungicida. Nos quadrantes onde as alíquotas resultaram em crescimento microbiano, considerou-se a concentração do poço amostrado como bacteriostático ou fungistático. Portanto, a CBM/CFM foi definida como a menor concentração do extrato, fração ou óleo essencial determinada pelo teste de CIM na qual não se observou qualquer crescimento microbiano.

3.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS ANIMAIS UTILIZADOS

Antes do desenvolvimento dos experimentos, todos os protocolos utilizados foram analisados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEFS (CEUA/UEFS), obtendo parecer favorável, número 018/2009 (ANEXO I). Foram utilizados os seguintes animais nos modelos experimentais: a) camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, com 4 a 8 semanas de idade e peso variando de 30 a 40 g, nos ensaios de atividade antinociceptiva; b) ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, para os ensaios de cicatrização de ferida cutânea e avaliação da atividade espasmolítica *in vitro* em aorta (machos, com 6 a 10 semanas de idade e peso variando de 250 a 350 g), avaliação da atividade espasmolítica *in vitro* em útero (fêmeas virgens, com 6 a 10 semanas de idade e peso variando de 150 a 250 g) e no modelo de indução de febre (machos, com 27 a 30 dias de idade e peso variando de 60 a 90 g); e c) cobaias (*Cavia porcellus*), de ambos os sexos com peso variando de 400 a 500 g, para os ensaios de avaliação atividade espasmolítica *in vitro* em traqueia. Todos os animais foram provenientes do Biotério Setorial da Universidade Federal do Vale do São Francisco, sendo mantidos em caixas adequadas, com ciclo claro escuro de 12 horas e água e ração *ad libitum*.

3.7 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA DE RATOS

No modelo de cicatrização de ferida cutânea foram utilizados ratos Wistar, divididos em 2 grupos de 30 animais cada, durante 14 e 21 dias de tratamento. Cada grupo foi separado em subgrupos de 5 animais, sendo mantidos individualmente em caixas identificadas com o grupo ao qual pertencia: controle negativo (CN), controle positivo (CP), extrato metanólico das folhas (TF100 e TF200, tratados com 100 e 200 mg/mL, respectivamente) e caules (TC100 e TC200, tratados com 100 e 200 mg/mL, respectivamente). Os extratos foram dissolvidos com DMSO 10% em álcool etílico 96 °GL, para obtenção da tintura; o grupo CP foi tratado com sulfadiazina de prata 2 % (União Química, Brasília, Distrito Federal, Brasil); o grupo CN recebeu apenas a solução utilizada para dissolver os extratos.

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram isentos de alimentação por no mínimo quatro horas e anestesiados com mistura de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (75 mg/kg). Após o estado de anestesia cirúrgica instalado, os animais foram posicionados na posição decúbito ventral em prancha operatória, depilados na região dorsal e, no centro dessa área, marcou-se com um *punch* metálico (diâmetro de 20 mm) o fragmento de epiderme para ser retirado com tesoura cirúrgica Joseph, seguido de hemostasia com pressionamento no local da lesão com gaze. A lesão provocada foi mensurada com paquímetro digital, sendo registrado o maior e o menor diâmetro. Após hemostasia, 100 µL da tintura dos extratos TF ou TC, nas concentrações 100 ou 200 mg/mL, sulfadiazina de prata 2% ou DMSO 10 % em álcool 96 °GL foram aplicados aos animais no local da ferida, sendo o tratamento repetido diariamente durante 14 ou 21 dias, sempre no mesmo horário da realização da cirurgia.

Após o tempo de tratamento para cada grupo, os animais foram anestesiados com tiopental (25 mg/mL), sendo realizada a medição do maior e menor diâmetro do ferimento, com o auxílio de um paquímetro digital, e retirada do tecido lesionado para análise histopatológica, sendo em seguida sacrificados por deslocamento cervical.

O fragmento de pele retirado foi fixado em formol 4 % em NaCl 0,9 %, sendo posteriormente processado para obtenção de lâminas para análise histopatológica. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e tricromo de Masson, sendo esta coloração utilizada para a quantificação do tecido fibroso por morfometria, utilizando um sistema semiautomático (Image Processing and Analysis System Leica Qwin plus v. 2.6, Leica, Cambridge, England), sendo o percentual de tecido fibroso determinado em relação aos campos microscópicos observados.

3.8 ENSAIO DE FEBRE INDUZIDA POR HIPERPIREXIA

Para o modelo de indução de febre foram utilizados ratos Wistar jovens, de acordo com metodologia estabelecida por Tomazetti et al. (2005). Foram divididos 9 grupos de 5 animais: controle negativo (CN) que recebeu água destilada; controle positivo que recebeu paracetamol 150 mg/kg (PAR); controle positivo que recebeu dipirona 240 mg/kg (DIP); extrato metanólico das folhas que receberam 300, 600 e 1.200 mg/kg de peso animal (TF300, TF600 e TF1200, respectivamente); e extrato metanólico dos caules que receberam 300, 600 e 1.200 mg/kg de peso animal (TC300, TC600 e TC1200, respectivamente). Os extratos metanólicos TF e TC foram dissolvidos em água destilada, a dipirona (Sanofi Aventis, São Paulo, São Paulo, Brasil) e paracetamol (Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) foram diluídos em água destilada, no momento da administração, para soluções de 50 e 100 mg/mL, respectivamente.

Dois dias anteriores ao procedimento experimental os animais passaram por uma habituação, com a administração intraperitoneal de solução salina estéril (NaCl 0,9 %), para que hipertermia por stress fosse minimizada ou inibida. Após esse período, foi realizada a indução da febre com a administração intraperitoneal de 135 mg/kg de peso animal de levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*, obtida de J. Macêdo, Fortaleza, Ceará, Brazil), suspensa em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Os animais identificados com marca na orelha e a temperatura foi medida via retal com termômetro digital lubrificado, inserindo este 2,8 cm no ânus, antes da indução da febre (T = 0 h) e a cada hora até completar 12 horas (T = 1 a 12 h) da aplicação da levedura. Após 4 horas da indução da febre, os animais receberam o veículo de dissolução dos extratos, paracetamol, dipirona ou os extratos TF e TC, sendo a variação da temperatura determinada individualmente de acordo com a fórmula: $\Delta T = T_{tn} - T_{0h}$, onde ΔT é a variação de temperatura; T_{tn} corresponde à temperatura aferida no respectivo tempo (t = 1 a 12 h) após a indução da febre; e T_{0h} é a temperatura aferida imediatamente antes da indução da febre. Ao final do experimento os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical.

3.9 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Para esse conjunto de experimentos foi utilizado o óleo essencial de *Lippia thymoides* coletado em 28 de outubro de 2009, referente à coleta da estação primavera (TOP), e foi

dissolvido no dia do experimento com Cremophor EL 3 % em solução salina estéril. Como controles positivos foram utilizados morfina (Neo Química, São Paulo, São Paulo, Brasil), dissolvido em Tween 80 (Sigma-Aldrich), e indometacina (Sigma-Aldrich), dissolvido em álcool etílico.

Em todos os experimentos de atividade antinociceptiva, os animais foram aclimatados por 2 dias no Laboratório de Fisiologia da UNIVASF, sendo submetidos a um jejum de 12 horas antes da realização dos experimentos e sacrificados por deslocamento cervical ao final dos ensaios.

3.9.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Empregando a metodologia descrita por Koster et al. (1959), animais dos grupos experimentais contendo 6 camundongos receberam, por via intraperitoneal (*i.p.*), TOP (25, 50 e 100 mg/kg de peso animal), morfina (10 mg/kg de peso animal), indometacina (20 mg/kg de peso animal) ou solução salina estéril. Após 30 minutos, injetou-se 0,1 mL/10 g de peso do animal da solução de ácido acético (Sigma-Aldrich), diluído a 0,9 % em solução salina estéril, por via *i.p.* O número de contorções abdominais (consideradas como contrações da parede abdominal seguidas por extensão das patas posteriores), foi contabilizado durante 10 minutos, iniciando-se 5 minutos após a injeção do ácido acético. O potencial antinociceptivo de TOP foi avaliado por comparação com o grupo de animais que recebeu a solução salina (controle negativo). Os resultados foram expressos como o total de contorções observadas e percentual de inibição das contorções, sendo este calculado pela fórmula: % inibição = $100 \times (\text{número de contorções do grupo controle negativo} - \text{número de contorções do grupo experimental}) / \text{número de contorções do grupo controle}$.

3.9.2 Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado de acordo com o método descrito por Hunskaar e Hole (1987), em que animais dos grupos experimentais contendo 6 camundongos receberam, por via *i.p.*, TOP (25, 50 e 100 mg/kg de peso animal), morfina (10 mg/kg de peso animal), indometacina (20 mg/kg de peso animal) ou solução salina estéril. Após 60 minutos, 20 µL de uma solução de formalina 2,5 % em solução salina (0,92 % de formaldeído) foi injetada por

via subcutânea na pata posterior direita dos animais, sendo esses colocados individualmente em uma câmara triangular contendo espelhos em dois lados, para observação do tempo de lambida na pata que recebeu a formalina, sendo esse parâmetro considerado como estímulo nociceptivo. Os animais foram observados nos tempos de 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória) após a injeção da formalina. O potencial antinociceptivo de TOP foi avaliado por comparação com o grupo de animais que recebeu a solução salina (controle negativo), sendo os resultados expressos como o tempo total de lambida da pata, em segundos.

3.9.3 Teste da placa quente

Para a análise do efeito central de TOP, foi realizado o teste da placa quente, de acordo com a metodologia estabelecida por Anker (1974). Os camundongos foram pré-selecionados no dia anterior ao da realização do experimento, colocando-os, individualmente, sobre uma placa de alumínio pré-aquecida a 55 ± 1 °C (GUILHON et al., 2011). Os animais que apresentaram o tempo de latência (tempo que o animal leva para lambida ou sacudir as patas traseiras após o contato com a placa aquecida) maior que 20 segundos foram descartados. No dia seguinte ao da seleção dos animais, grupos experimentais de 6 camundongos receberam, por via *i.p.*, TOP (25, 50 e 100 mg/kg de peso animal), morfina (10 mg/kg de peso animal) ou solução salina estéril, sendo imediatamente avaliado o tempo de latência individual ($T = 0$ minuto). Os animais foram avaliados nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após os pré-tratamentos. O potencial antinociceptivo de TOP foi avaliado por comparação com o grupo de animais que recebeu apenas a solução salina (controle negativo), sendo os resultados expressos como o tempo de latência observado nos intervalos 0, 30, 60 e 90 minutos.

3.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA *IN VITRO* EM ÓRGÃOS ISOLADOS

Os óleos essenciais, extratos e frações de *L. thymoides* foram dissolvidos em Cremophor EL 3 % em água destilada, na concentração de 10 mg/mL, sendo essa solução estoque mantida a -20 °C, com a realização da diluição necessária no momento do experimento. Todos

os agonistas e bloqueadores utilizados foram dissolvidos de acordo com a recomendação do fabricante e mantidos em soluções estoque a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo a diluição necessária realizada em água destilada no momento do experimento.

Em todos os experimentos *in vitro* para avaliação da atividade espasmolítica de músculo liso, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical seguido por secção dos vasos cervicais anteriormente à retirada do órgão (aorta de rato, útero de rata ou traqueia de cobaia), sendo esse suspenso em cubas de vidro de 10 mL de um banho de órgãos modelo EFF-321 (INSIGTH[®], Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), contendo solução nutritiva preparada no dia do experimento, com composição química descrita na **Tabela 7**, e aerados com mistura carbogênica (95 % de O_2 e 5 % de CO_2).

As contrações isométricas eram registradas através de transdutores de força modelo TRI201 (Panlab s.l.u., Barcelona, Espanha) conectados a um amplificador de sinais (INSIGTH[®]), que por sua vez estava conectado a uma placa conversora analógico/digital instalada em um microcomputador executando o programa WinDaq (DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA).

Tabela 7 – Composição química das soluções nutritivas utilizadas nos experimentos de avaliação da atividade espasmolítica de músculos lisos, de acordo com o tecido utilizado. Todos os sais possuíam grau analítico.

Solução	Concentração dos sais na cuba	Tecido utilizado
Krebs	NaCl 118,0 mM	Aorta isolada de rato e traqueia isolada de cobaia
	KCl 4,55 mM	
	MgSO ₄ .7H ₂ O 5,70 mM	
	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O 1,10 mM	
	CaCl ₂ .2H ₂ O 2,52 mM	
	NaHCO ₃ 25,0 mM	
Locke Ringer	Glicose 11,00 mM	Útero isolado de rata
	NaCl 154,0 mM	
	KCl 5,63 mM	
	CaCl ₂ 2,16 mM	
	NaHCO ₃ 5,95 mM	
	Glicose 11,0 mM	

Fonte: Adaptado de Ribeiro (2007) e Lima (2008)

Os dados obtidos dos registros foram plotados em curvas concentração-resposta, sendo ajustadas por regressão não-linear utilizando o *software* Prism 5 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) para comparação da potência e eficácia entre as amostras. A obtenção do valor de CE₅₀ (concentração do extrato, fração, óleo essencial ou agonista em que são capazes de promover 50% de seu efeito máximo) serviu como parâmetro de potência relativa e o E_{máx} (valor médio, em percentagem, do efeito máximo obtido pelo extrato, fração ou óleo essencial em relação ao maior valor possível num dado tecido) como parâmetro de eficácia relativa entre as amostra.

3.10.1 Avaliação da atividade espasmolítica em aorta isolada de rato

O tórax dos animais sacrificados foram abertos e dissecados, com a aorta torácica retirada cuidadosamente e adicionada a uma placa de petri com solução de Krebs aerada com mistura carbogênica. Os tecidos conjuntivo (túnica adventícia) e adiposo foram retirados, sendo o vaso subdividido em anéis medindo entre 3 e 5 mm de comprimento cada. Para obtenção das respostas isométricas, os anéis foram suspensos individualmente em cubas de vidro, com o auxílio de hastes de aço inoxidável conectadas a transdutores de força através de fios de algodão. Os anéis aórticos foram deixados em repouso por 60 minutos, sob uma tensão de 1 g a 37 °C e aeração constante com mistura carbogênica, sendo a solução de Krebs renovada a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização, uma contração era induzida com fenilefrina (FEN, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 µM, sendo a integridade do endotélio vascular verificada com a adição de acetilcolina (ACh, Sigma-Aldrich) à cuba na concentração de 1 µM durante a fase tônica da contração anteriormente induzida (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). O endotélio vascular era considerado íntegro quando os anéis aórticos apresentavam relaxamento induzido por ACh igual ou superior a 50% (em relação à força máxima da contração inicial). Para a verificação da participação do endotélio sobre o relaxamento induzido pelos óleos essenciais de *L. thymoides*, também foram preparados anéis com a remoção mecânica da camada endotelial, através do atrito provocado pela haste metálica em contato com a parede interna do vaso, sendo a ausência do endotélio confirmada quando não havia relaxamento, ou esse era inferior a 10%. Após a verificação da retirada ou não do endotélio, as soluções de banho eram trocadas, sendo as preparações lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs durante um período total de 30 minutos.

Estando o tecido estabilizado, uma segunda contração foi induzida com FEN (1 μ M) e durante o componente tônico dessa foram adicionados TOO, TOI, TOP ou TOV, de maneira cumulativa em concentrações crescentes (1 a 729 μ g/mL). Os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição de FEN à cuba, onde o relaxamento máximo era obtido quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais.

3.10.2 Avaliação da atividade espasmolítica em útero isolado de rata

As ratas foram tratadas de 18 a 24 horas antes da realização do experimento com dietilestilbestrol (Sigma-Aldrich), na dose de 1 mg/kg por via subcutânea para indução do estro. Após esse tempo, foram eutanaziadas por deslocamento cervical, tendo a cavidade abdominal aberta e dissecada para a retirada do útero, sendo este adicionado a um béquer de 100 mL contendo a solução nutritiva Locke Ringer. Em seguida, os dois cornos uterinos foram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e cortados em fragmentos de 1 a 2 cm, sendo cada um suspenso individualmente em cubas de vidro com o auxílio de fios de algodão e conectados a transdutores de força. Para estabilização da preparação, o órgão era mantido em repouso por 45 minutos sob tensão de 1 g a 32 °C, com a renovação da solução realizada a cada 15 minutos.

Após esse período, uma contração isométrica inicial foi induzida em cada fragmento do útero com solução de KCl 60 mM sendo a solução nutritiva do órgão substituída após atingir a contração máxima e após 15 minutos de repouso (PONCE-MONTER et al., 2008). Passado esse intervalo, novas contrações foram induzidas com KCl 60 mM, sendo adicionados cumulativamente às cubas TOO, TOI, TOP ou TOV em concentrações crescentes (1 a 729 μ g/mL) durante o componente tônico da contração, para obtenção de curvas concentração-resposta. Os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição de KCl à cuba, onde o relaxamento máximo era obtido quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais.

3.10.3 Avaliação da atividade espasmolítica em traqueia isolada de cobaia

Para todo esse conjunto de experimentos foram utilizadas cobaias, eutanaziadas por deslocamento cervical, sendo o órgão montado e estabilizado da mesma maneira nos itens a seguir, com as variações específicas da investigação do mecanismo de ação descritas nos subitens a seguir.

O tórax das cobaias foi aberto e dissecado, sendo a traqueia retirada e adicionada a uma placa de petri com solução de Krebs aerada com mistura carbogênica, para a realização da limpeza de todo o tecido conjuntivo e adiposo. O órgão foi dividido em segmentos contendo 4 a 5 anéis cartilagosos, que foram suspensos individualmente em cubas de vidro, com o auxílio hastes de aço inoxidável conectadas a transdutores de força através de linhas de algodão. Os tecidos foram deixados em repouso por 60 minutos, sob uma tensão de 1 g a 37 °C e aeração constante com mistura carbogênica, sendo a solução de Krebs substituída a cada 15 minutos. Após o período de estabilização uma primeira contração era induzida pela adição à cuba de 1 μ M de carbacol (CCh, Sigma-Aldrich), sendo a solução nutritiva do órgão substituída após atingir a contração máxima e após 15 minutos de repouso (SHAH; GILANI, 2010).

Após o tecido estar estabilizado, uma segunda contração foi induzida com 1 μ M de CCh e durante o componente tônico dessa foram adicionados TOO, TOI, TOP, TOV, TF, TFH, TFD, TFA, TC, TCH, TCD ou TCA, de maneira cumulativa, em concentrações crescentes (1 a 729 μ g/mL). Os relaxamentos foram expressos como a percentagem reversa da tensão máxima obtida pela adição de CCh à cuba, onde o relaxamento máximo era obtido quando a tensão registrada era reduzida aos níveis basais.

3.10.3.1 Investigação da participação de canais para K^+ no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com CCh, as preparações foram expostas ao inibidor dos canais para K^+ ativados por ATP (K_{ATP}) glibenclamida (GLI, Sigma-Aldrich), na concentração de 3 μ M (CUNHA et al., 2001); inibidor não seletivo dos canais para K^+ ativados pelo Ca^{+2} (K_{Ca}) tetraetilamônio (TEA, Sigma-Aldrich), na concentração de 5 mM

(JANSSEN et al., 2001); ou inibidor dos canais para K^+ abertos por voltagem (K_v) 4-aminopiridina (4-AP, Sigma-Aldrich), na concentração de 2 mM (LI et al., 1997). Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fase tônica, TFD foi adicionada às cubas, em diferentes preparações, de maneira cumulativa em concentrações crescentes (21 a 243 $\mu\text{g/mL}$), sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados, concomitantemente, experimentos na ausência dos bloqueadores.

3.10.3.2 Investigação da participação da via do óxido nítrico (NO) no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com CCh, as preparações foram expostas ao inibidor da óxido nítrico sintase N_{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Sigma-Aldrich), na concentração de 10 μM (ESTRADA-SOTO et al., 2012). Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fase tônica, TFD foi adicionada às cubas de maneira cumulativa em concentrações crescentes (21 a 243 $\mu\text{g/mL}$), sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados, concomitantemente, experimentos na ausência de L-NAME.

3.10.3.3 Investigação da participação das prostaglandinas no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com CCh, as preparações foram expostas ao inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase indometacina (IND, Sigma-Aldrich), na concentração de 10 μM (SOUSA et al., 2010); ou ao inibidor da síntese proteica e da enzima fosfolipase A_2 dexametasona (DEX, Sigma-Aldrich), na concentração de 10 μM (SCHLEMPER et al., 2005). Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fração tônica, TFD foi adicionada às cubas de maneira cumulativa em concentrações crescentes (21 a 243 $\mu\text{g/mL}$), sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência de IND.

3.10.3.4 Investigação da participação de receptores β -adrenérgicos no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com CCh, as preparações foram expostas ao antagonista β -adrenérgico não seletivo propranolol (PRP, Sigma-Aldrich) nas concentrações de 3 μ M (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2007). Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fase tônica, TFD foi adicionada às cubas de maneira cumulativa em concentrações crescentes (21 a 243 μ g/mL), sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência do PRP.

3.10.3.5 Investigação da participação da via do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração com CCh, as preparações foram expostas ao TFD nas concentrações de 50 ou 150 μ g/mL. Após a estabilização da segunda contração, durante a sua fase tônica, isoprenalina (ISO), um agonista β_2 -adrenérgico, foi adicionada às cubas de maneira cumulativa em concentrações crescentes (0,001 a 1 μ M), sendo os efeitos relaxantes registrados (GILANI et al., 2009). Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência do TFD.

3.10.3.6 Investigação da dessensibilização das fibras C sobre o relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que antes da indução da segunda contração foi adicionado às cubas o indutor da dessensibilização das fibras C capsaicina (CPS, Sigma-Aldrich), na concentração de 10 μ M, durante 30 minutos (YANG et al., 2003). Passado esse período e após 15 minutos, a solução nutritiva das cubas foram trocadas, com a segunda contração induzida com CCh quando o órgão estava estabilizado.

Durante a fase tônica dessa contração, TFD foi adicionada às cubas de maneira cumulativa em concentrações crescentes (21 a 243 µg/mL), sendo os efeitos relaxantes registrados. Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência de CPS.

3.10.3.7 Investigação do antagonismo muscarínico na contração induzida por CCh em traqueia pré-incubada com TFD

A traqueia foi montada como descrito no item 3.10.3, sendo que 20 minutos anteriormente à indução da segunda contração, as preparações foram expostas ao TFD, nas concentrações de 50 ou 150 µg/mL. Passado esse período e estando o órgão estabilizado em níveis basais, CCh foi adicionado de maneira cumulativa em concentrações crescentes (0,001 a 30 µM), sendo os efeitos contracturantes registrados e considerado a primeira contração induzida com 1 µM de CCh como o efeito máximo (MANS et al., 2004; SHAH; GILANI, 2010). Foram realizados concomitantemente experimentos na ausência do TFD.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados numéricos obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média ($X \pm e.p.m.$) e n representa o número de animais utilizados ou experimentos realizados em um dado protocolo.

Os conjuntos de dados experimentais dos ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* foram comparados estatisticamente com o grupo controle negativo e/ou positivo do protocolo correspondente, através da análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas das médias (teste de Tukey). Diferenças entre as médias dos experimentos *in vitro* foram comparadas estatisticamente usando o teste t de Student não-pareado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa Prism 5 for Windows, sendo as diferenças consideradas significantes quando o valor calculado de p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *L. thymoides*

Para observar se há variação na composição química do óleo essencial das folhas *L. thymoides* durante o ano, coletou-se a planta na última semana do primeiro mês de cada estação. Os dados climatológicos da cidade de Feira de Santana-BA, onde a planta foi coletada, apresentam características típicas do clima semiárido (**Tabela 9**), com altas temperaturas médias, alta insolação e baixa pluviosidade, com as chuvas irregulares concentradas em poucos meses. De acordo com os dados constantes na **Tabela 9**, observa-se que não houve grande variação do teor dos óleos, com TOV tendo o menor valor com 2,14 % no período de maior insolação (420,7 h) e temperatura média (28,9 °C), contrapondo-se a TOP que obteve o maior teor com 2,93 %, que foi obtido em um período que a insolação foi a segunda maior (382,4 h) e menor pluviosidade (74,1 mm). Com isso, pode-se notar que a pluviosidade e a insolação, que variaram nos meses em que as coletas foram realizadas, não influenciaram no teor do óleo de *L. thymoides*.

Tabela 8 – Dados climatológicos mensais e teor dos óleos essenciais das folhas de *L. thymoides* obtidos nas quatro estações do ano.

Informações	Código do óleo				
	TOO	TOI	TOP	TOV	
Data da coleta	28/04/09	24/07/09	28/10/09	28/01/10	
Temperatura média (° C)	25,5	23,3	26,9	28,9	
Coleta	Umidade relativa do ar (%)	82	84	70	72
	Precipitação (mm)	281,1	107,4	74,1	119,3
	Insolação total (h)	357,1	242,2	382,4	420,7
	Massa vegetal seca (g)	166,1	355,0	256,0	133,4
Teor dos óleos	Umidade residual (%)	10,79	8,72	9,45	8,52
	Volume do óleo (mL)	4,0	8,2	7,5	2,5
	Teor do óleo (%)	2,41	2,31	2,93	2,14

TOO, óleo da planta coletada no outono; TOI, óleo da planta coletada no inverno; TOP, óleo da planta coletada na primavera; TOV, óleo da planta coletada no verão.

Fonte: Estação Climatológica da UEFS.

A análise química dos óleos essenciais proporcionou a identificação de 45 constituintes, correspondendo entre 71 e 81 % do total presente nos óleos, com TOI apresentando uma maior variedade de composição (**Tabela 9**), Todos os constituintes identificados, destacados na **Figura 5**, pertencem à classe dos terpenoides, sendo que o percentual de sesquiterpenos predominou em comparação com os monoterpenos, com a maior diferença observada em TOI, apresentando duas vezes mais sesquiterpenos. Houve uma manutenção de produção de monoterpenos oxigenados nos óleos de todas as estações do ano, mantendo-se em torno de metade do total de monoterpenos não oxigenados produzidos. Por outro lado, a produção de sesquiterpenos não oxigenados predominou dentro o total de sesquiterpenos, com a menor diferença observada em TOV, com a produção de 8 vezes mais sesquiterpenos não oxigenados.

Dentre todos os constituintes, houve predominância do sesquiterpeno β -cariofileno como constituinte majoritário em todos os óleos, variando entre 17,22 % em TOO e 26,27 % em TOI. Os constituintes que apareceram em maior proporção em seguida ao β -cariofileno variaram de acordo com as estações do ano, sendo que juntamente com esse, os constituintes canfeno, cânfora, borneol e α -cariofileno representam 41,65 % de TOO; com cânfora e germacreno D representando 37,37 % de TOI; com canfeno e borneol tendo 34,22 % de TOP; e com borneol, α -cariofileno e germacreno D representando 36,61 % de TOV.

Comparando-se os dados químicos com as informações climatológicas, observa-se que houve uma tendência de *L. thymoides* em sintetizar sesquiterpenos, com destaque para o β -cariofileno, em períodos com baixas insolação e temperatura média e elevada umidade relativa do ar, como no inverno. Da mesma maneira, observa-se redução da síntese do β -cariofileno em períodos com alta insolação e baixa umidade relativa do ar, como no verão.

Como foi realizada a coleta de vários indivíduos de *L. thymoides* que cresciam em um mesmo local e em um período específico, sendo o material total de cada coleta utilizado para a obtenção do óleo de cada estação do ano, apenas obteve-se um único teor e composição química de cada óleo, sendo inviável a análise estatística.

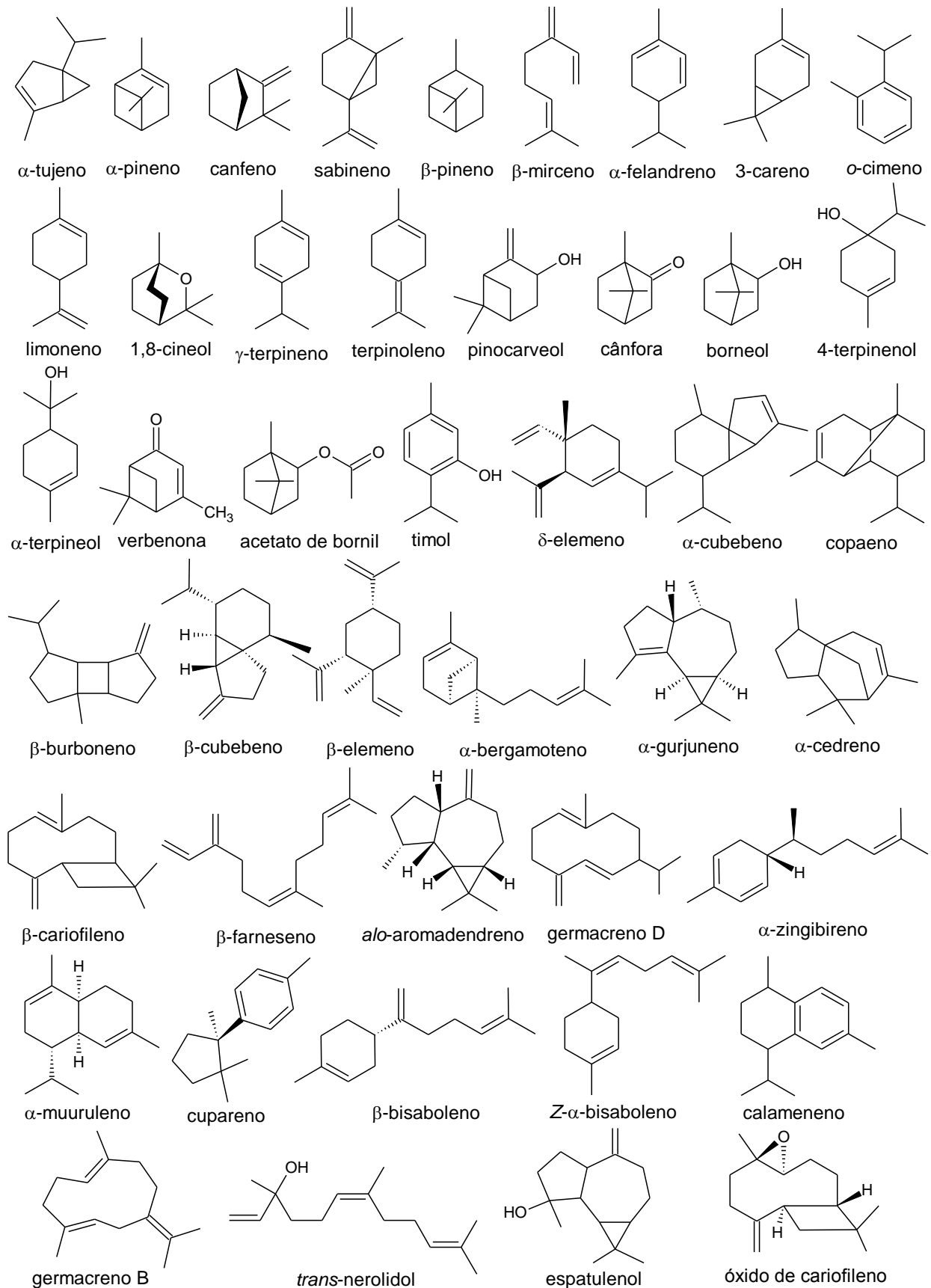
Tabela 9 – Composição química dos óleos essenciais das folhas de *L. thymoides*.

Fórmula	Constituinte	IK _L	TOO		TOI		TOP		TOV	
			IK _C	%	IK _C	%	IK _C	%	IK _C	%
C ₁₀ H ₁₆	α-Tujeno	930	930	0,11	930	0,09	930	0,27	-	-
C ₁₀ H ₁₆	α-Pineno	932	938	1,81	938	0,94	938	2,38	931	1,42
C ₁₀ H ₁₆	Canfeno	946	953	5,44	953	2,64	954	5,66	943	3,25
C ₁₀ H ₁₆	Sabineno	969	976	1,31	978	0,93	976	1,72	962	0,67
C ₁₀ H ₁₆	β-Pineno	974	980	1,16	980	0,64	980	1,43	965	1,70
C ₁₀ H ₁₆	β-Mirceno	988	991	0,94	991	0,49	991	0,94	-	-
C ₁₀ H ₁₆	α-Felandreno	1002	1007	0,08	1006	0,07	-	-	-	-
C ₁₀ H ₁₆	3-Careno	1008	1013	0,27	1013	0,23	1013	0,26	-	-
C ₁₀ H ₁₆	o-Cimeno	1022	1026	0,47	1026	0,91	1027	2,69	1027	1,12
C ₁₀ H ₁₆	Limoneno	1029	1032	3,63	1032	2,42	1032	3,75	1032	1,67
C ₁₀ H ₁₈ O	1,8-Cineol	1031	1034	3,04	1034	3,88	1034	4,50	1034	1,86
C ₁₀ H ₁₆	γ-Terpineno	1059	1061	0,51	1061	0,65	1062	1,01	1062	0,74
C ₁₀ H ₁₆	Terpinoleno	1088	1090	0,86	1090	0,47	1090	0,46	-	-
C ₁₀ H ₁₆ O	Pinocarveol	1139	-	-	1141	0,12	1141	0,22	-	-
C ₁₀ H ₁₆ O	Cânfora	1146	1146	8,61	1146	4,92	1146	3,22	1146	4,52
C ₁₀ H ₁₈ O	Borneol	1169	1168	5,33	1168	4,45	1168	7,36	1168	6,46
C ₁₀ H ₁₈ O	4-Terpinenol	1177	1178	0,83	1178	0,59	1179	0,85	-	-
C ₁₀ H ₁₈ O	α-Terpineol	1188	-	-	1190	0,23	-	-	-	-
C ₁₀ H ₁₄ O	Verbenona	1205	-	-	1203	0,79	-	-	-	-
C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Acetato de bornil	1288	-	-	1286	0,35	-	-	-	-
C ₁₀ H ₁₄ O	Timol	1290	-	-	1290	0,12	1291	0,21	1290	0,27
C ₁₅ H ₂₄	δ-Elemeno	1338	-	-	1340	0,38	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₄	α-Cubebeno	1348	1352	0,63	1352	0,60	1353	0,77	1353	0,65
C ₁₅ H ₂₄	Copaeno	1376	1378	2,47	1378	2,55	1379	3,38	1379	2,42
C ₁₅ H ₂₄	β-Burboneno	1388	-	-	1386	0,28	1387	0,40	-	-
C ₁₅ H ₂₄	β-Cubebeno	1388	-	-	-	-	1392	0,28	-	-
C ₁₅ H ₂₄	β-Elemeno	1390	-	-	1392	0,24	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₄	α-Bergamoteno	1412	1406	0,54	1407	0,29	1407	0,40	-	-
C ₁₅ H ₂₄	α-Gurjuneno	1409	-	-	1411	0,34	1412	0,38	1412	0,82

Fórmula	Constituinte	IK _L	TOO		TOI		TOP		TOV	
			IK _C	%	IK _C	%	IK _C	%	IK _C	%
C ₁₅ H ₂₄	α-Cedreno	1411	1411	0,30	1414	0,52	1415	0,82	-	-
C ₁₅ H ₂₄	β-Cariofileno	1419	1422	17,22	1423	26,27	1423	21,20	1423	19,28
C ₁₅ H ₂₄	α-Cariofileno	1454	1457	5,05	1456	3,99	1457	3,06	1457	5,48
C ₁₅ H ₂₄	β-Farneseno	1456	-	-	1463	0,44	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₄	<i>alo</i> - Aromadendreno	1460	-	-	1469	0,04	-	-	1465	0,57
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno D	1485	1483	4,80	1483	6,18	1484	4,72	1484	5,39
C ₁₅ H ₂₄	α-Zingibireno	1493	-	-	1493	1,43	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₄	α-Muuroleno	1500	1506	0,57	1498	1,67	1507	1,06	1509	2,00
C ₁₅ H ₂₂	Cupareno	1504	-	-	1506	0,78	1510	0,88	-	-
C ₁₅ H ₂₄	β-Bisaboleno	1505	-	-	1509	0,89	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₄	Z-α-Bisaboleno	1507	1509	1,12	-	-	-	-	-	-
C ₁₅ H ₂₂	Calameneno	1529	1525	4,30	1525	3,53	1526	4,75	1526	3,83
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno B	1561	-	-	-	0,00	1561	0,88	1561	1,04
C ₁₅ H ₂₆ O	<i>trans</i> -Nerolidol	1561	1564	1,57	1564	3,59	1565	1,52	1565	1,69
C ₁₅ H ₂₄ O	Espatulenol	1578	-	-	1579	0,43	-	-	1580	1,28
C ₁₅ H ₂₄ O	Óxido de cariofileno	1582	1585	1,99	1585	2,11	-	-	1586	2,64
			Monoterpenos	34,40		25,93		36,93		23,68
			Monoterpenos oxigenados	17,81		15,45		16,36		13,11
			Sesquiterpenos	40,56		56,55		44,50		47,09
			Sesquiterpenos oxigenados	3,56		6,13		1,52		5,61
			Total de identificados %	74,96		82,48		81,43		70,77
			Não identificados %	25,04		17,52		18,57		29,23

TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão; IK_L, índice de Kovats da literatura; IK_C, índice de Kovats calculado; %, percentual relativa.

Figura 5 – Estruturas químicas dos constituintes dos óleos essenciais das folhas de *L. thymoides*.



4.2 FENÓIS TOTAIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *L. thymoides*

Para determinar o teor de fenóis totais foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como composto fenólico padrão. A partir da curva de calibração construída por regressão linear (**Figura 6**), o conteúdo de fenólicos nas amostras foi expresso como mg de equivalentes de ácido gálico por g de material (EAG/g).

O conteúdo total de fenóis dos extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* está apresentado na **Tabela 10**. Através da análise dos dados por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, comparando-se os valores encontrados para TF com TFH, TFD e TFA, e TC com TCH, TCD e TCA, observou-se que todos, excetuando TC e TCD, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Utilizando-se o teste *t* de Student, observou-se que o conteúdo de fenóis de TF ($115,5 \pm 1,7$ EAG/g) e TC ($85,5 \pm 4,4$ EAG/g) foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). As frações hexânicas dos extratos das folhas (TFH) e dos caules (TCH) foram as que apresentaram menor conteúdo de fenóis, apresentando, respectivamente, $15,5 \pm 0,7$ e $14,5 \pm 2,0$ EAG/g, sendo que não foram diferentes estatisticamente. Os conteúdos de fenóis das frações TFD ($90,5 \pm 1,0$ EAG/g) e TCD ($84,2 \pm 6,1$ EAG/g) não diferiram entre si, assim como o que foi observado entre as frações acetato de etila dos extratos das folhas (TFA) e dos caules (TCA), que apresentaram os maiores valores de fenólicos, com $182,8 \pm 2,4$ e $213,6 \pm 6,1$ EAG/g, que não foram significativamente diferentes.

Figura 6 – Curva de calibração do ácido gálico obtida por regressão linear a partir da determinação colorimétrica das soluções entre 50 e 500 $\mu\text{g/mL}$ utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu.

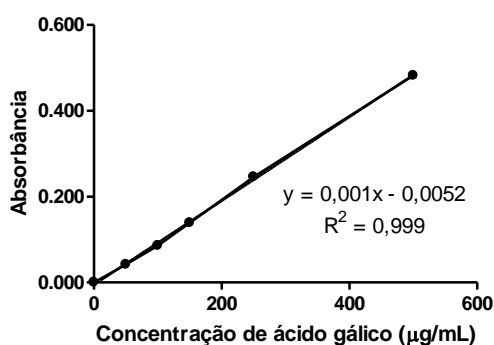


Tabela 10 – Conteúdo de fenólicos totais dos extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides*. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. de EAG/g ($n = 3$).

Amostra	Fenólicos totais (EAG/g)
TF	$115,5 \pm 1,7$
TFH	$15,5 \pm 0,7$
TFD	$90,5 \pm 1,0$
TFA	$182,8 \pm 2,4$
TC	$85,5 \pm 4,4$
TCH	$14,5 \pm 2,0$
TCD	$84,2 \pm 6,1$
TCA	$213,6 \pm 6,1$

4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *L. thymoides*

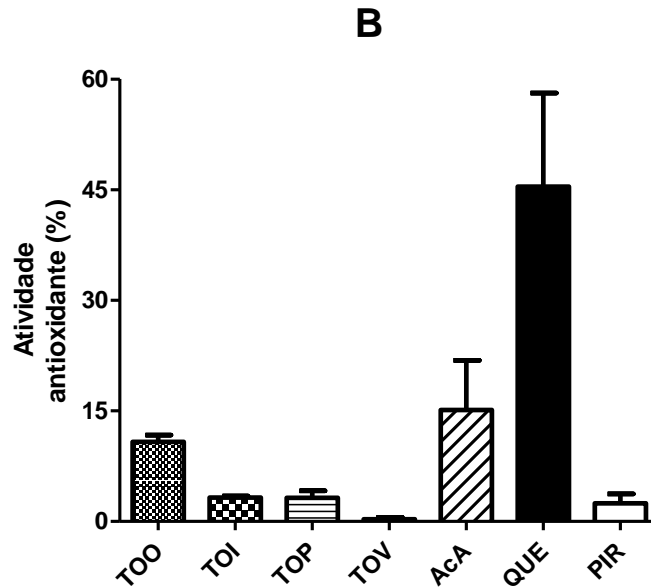
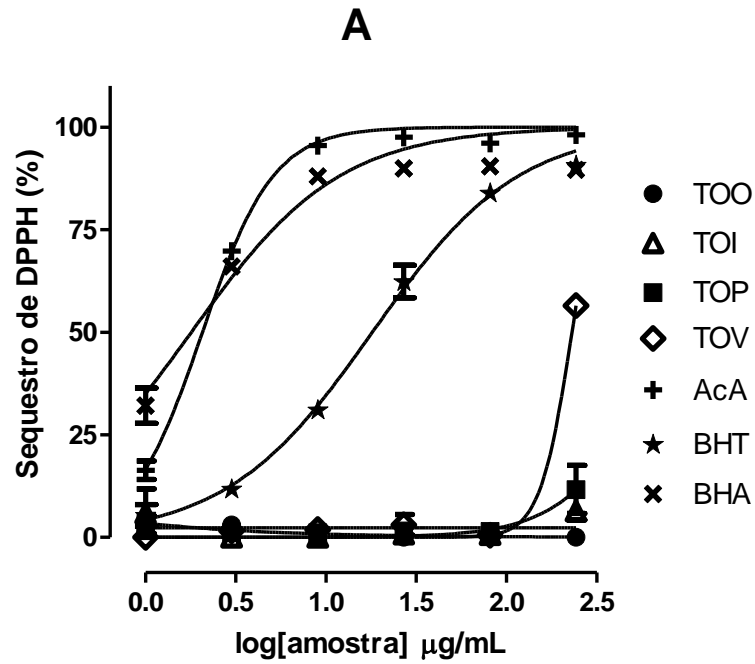
A determinação da atividade antioxidante dos óleos, extratos e frações de *L. thymoides* foi realizada pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e inibição da auto-oxidação do β -caroteno em emulsão. Conforme mostrado na **Tabela 10** e ilustrado na **Figura 7**, todos os óleos apresentaram fraca atividade antioxidante em ambos os ensaios, tanto que TOO, TOI e TOP não chegaram a efetuar 50 % de sequestro de DPPH na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$, explicando a não convergência dos dados na regressão não linear e obtenção do valor de CE_{50} .

Tabela 11 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *L. thymoides*. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. de três determinações independentes.

Amostra	Sequestro de DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	Inibição da oxidação do β -caroteno (%)
TOO	> 243,0	10,8 \pm 0,9 ^{a,b}
TOI	> 243,0	3,2 \pm 0,2 ^b
TOP	> 243,0	3,2 \pm 1,0 ^b
TOV	236,5 \pm 3,5	0,3 \pm 0,3
AcA	3,8 \pm 1,8	15,1 \pm 6,7
BHT	18,0 \pm 1,0	NT
BHA	1,8 \pm 0,2	NT
QUE	NT	45,4 \pm 12,7 ^c
PIR	NT	2,5 \pm 1,3

NT, não testado; TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão; AcA, ácido ascórbico; BHT, butilhidroxitolueno; BHA, butilhidroxianisol; QUE, quercetina; PIR, pirogalol. Todos os óleos essenciais diferiram significativamente dos controles positivos utilizados no ensaio de DPPH e QUE na inibição da oxidação do β -caroteno; ^a apresentou diferença estatisticamente significativa comparado com TOI, TOP e TOV (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$); ^b não difere significativamente de AcA (teste t , $p > 0,05$).

Figura 7 – Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *L. thymoides*.



A, corresponde aos dados do ensaio de DPPH e **B**, demonstra a inibição da oxidação do β -caroteno em emulsão. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$). TOO, óleo da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão; AcA, ácido ascórbico; BHT, butilhidroxitolueno; BHA, butilhidroxianisol; QUE, quercetina; PIR, pirogallol.

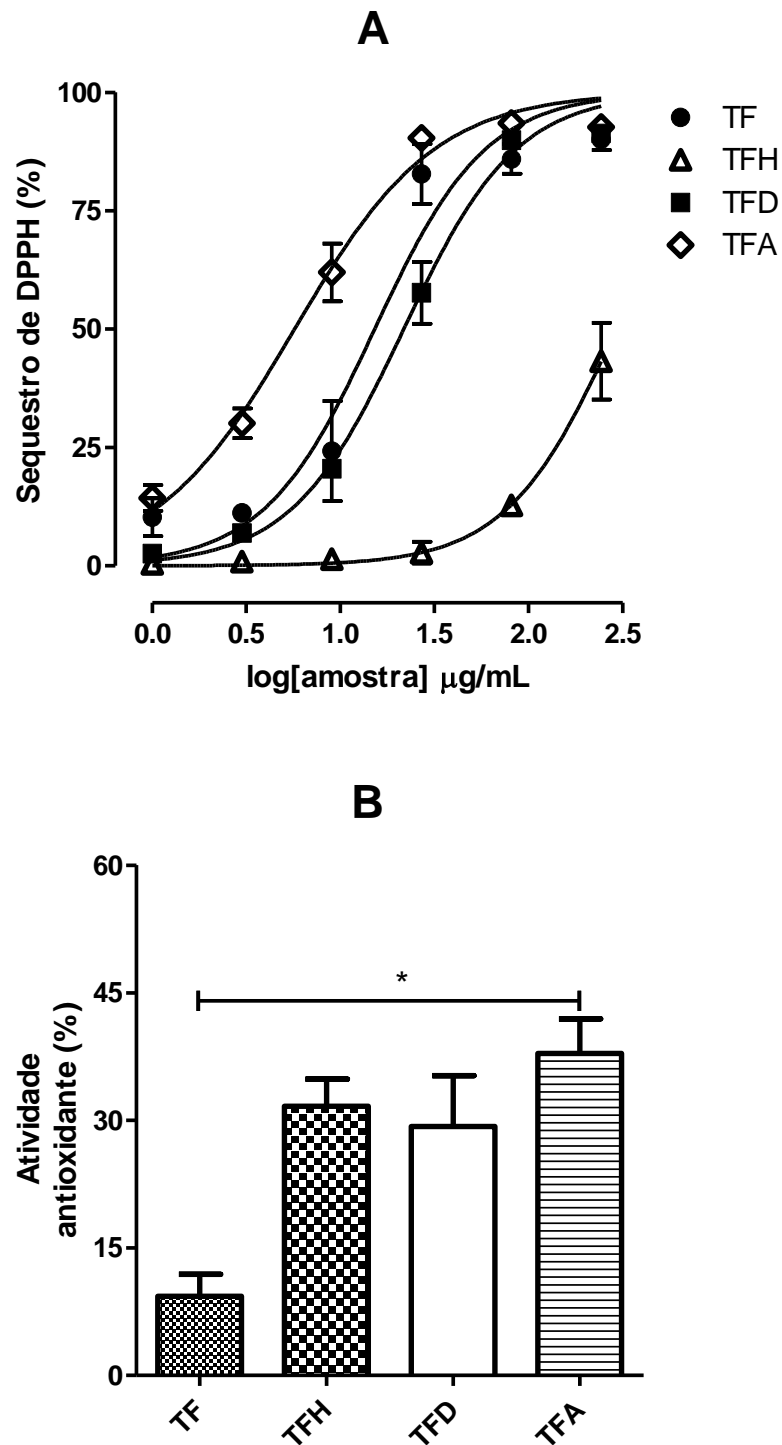
Por outro lado, os extratos e frações das folhas e caules mostraram potencial antioxidante em ambos os ensaios, variando a potência, principalmente, de acordo com a polaridade das frações (**Tabela 12** e **Figura 8, 9 e 10**). Neste ensaio, quanto menor o valor de CE_{50} , maior é a atividade antioxidante da amostra. TFH e TCH apresentaram os maiores valores de CE_{50} no ensaio de captação do radical DPPH, com $333,7 \pm 92,6$ e $585,1 \pm 186,6$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, diferindo significativamente (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) dos valores obtidos de seus respectivos extratos metanólicos TF ($15,4 \pm 1,6$ $\mu\text{g/mL}$) e TC ($18,4 \pm 2,4$ $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 12 – Atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides*. Os resultados estão expressos como média \pm e.p.m. de três determinações independentes.

Amostra	Sequestro de DPPH (CE_{50} , $\mu\text{g/mL}$)	Inibição da auto-oxidação do β -caroteno (%)
TF	$15,4 \pm 1,6$ ^{a,b,c}	$9,3 \pm 2,6$
TFH	$333,7 \pm 92,6$ ^d	$31,7 \pm 3,2$ ^{f,g}
TFD	$22,1 \pm 2,5$ ^{a,b,c}	$29,3 \pm 6,0$ ^{f,g}
TFA	$5,7 \pm 0,4$ ^{a,b,c}	$37,9 \pm 4,1$ ^{f,g}
TC	$18,4 \pm 2,4$ ^{a,b,c}	$3,7 \pm 2,5$
TCH	$585,1 \pm 186,6$ ^e	$9,4 \pm 1,0$ ^g
TCD	$14,5 \pm 1,4$ ^{a,b,c}	$12,8 \pm 0,4$ ^{f,g}
TCA	$4,5 \pm 0,2$ ^{a,b,c}	0
AcA	$5,1 \pm 1,1$	$17,8 \pm 5,6$
BHT	$13,3 \pm 1,0$	NT
BHA	$4,0 \pm 0,6$	NT
QUE	NT	$36,2 \pm 11,6$
PIR	NT	$4,9 \pm 1,7$

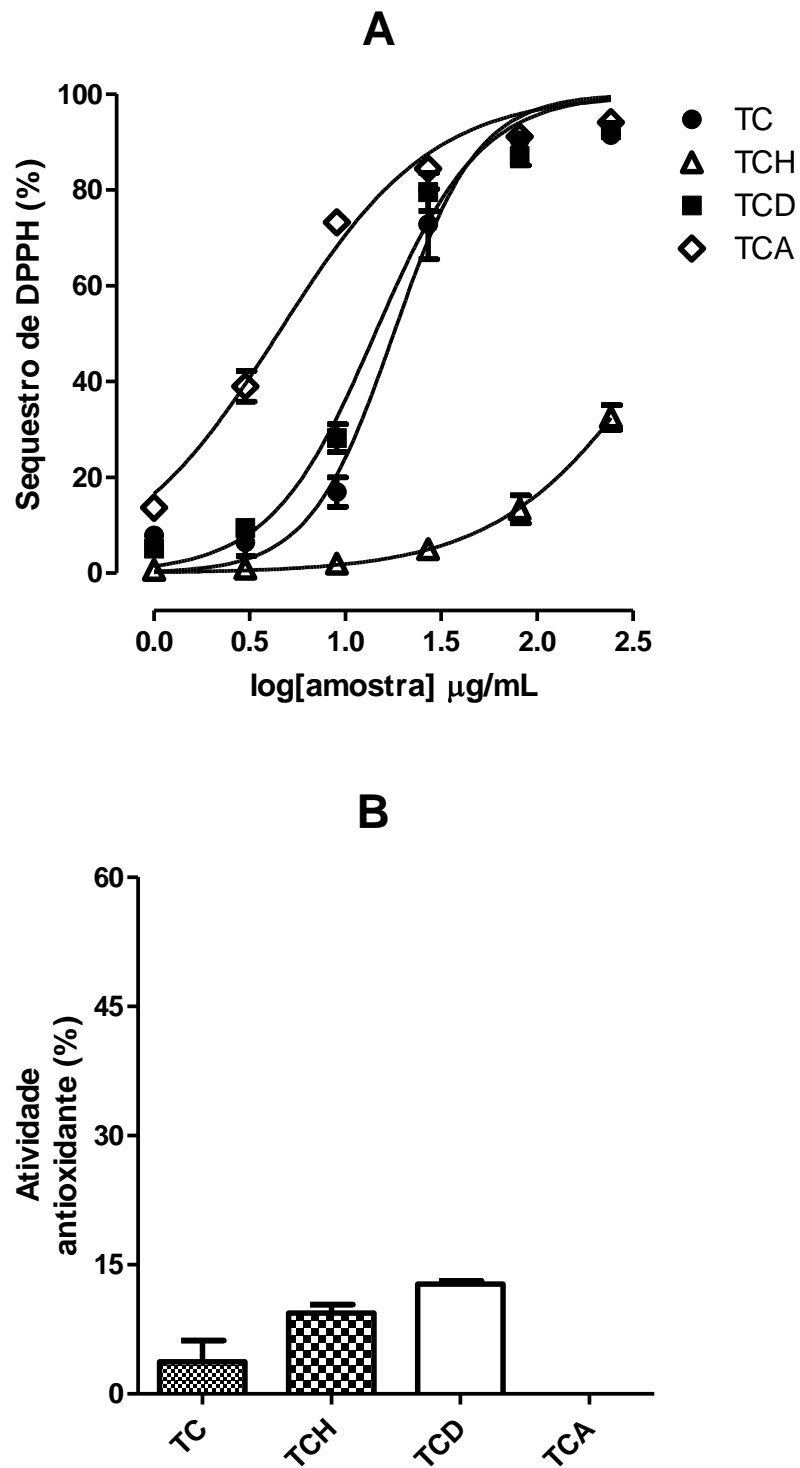
NT, não testado; TF, extrato metanólico das folhas; TFH, fração hexano de TF; TFD, fração diclorometano de TF; TFA, fração acetato de etila de TF; TC, extrato metanólico dos caules; TCH, fração hexano de TC; TCD, fração diclorometano de TC; TCA, fração acetato de etila de TC; AcA, ácido ascórbico; BHT, butilhidroxitolueno; BHA, butilhidroxianisol; QUE, quercetina; PIR, pirogalol. As comparações foram realizadas por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey; ^a não difere significativamente de AcA ($p > 0,05$) no ensaio de DPPH; ^b não difere significativamente de BHT, ($p > 0,05$); ^c não difere significativamente de BHA, ($p > 0,05$); ^d difere significativamente de TF, ($p > 0,05$); ^e difere significativamente de TC, ($p > 0,05$); ^f não difere significativamente de QUE ($p > 0,05$); ^g não difere significativamente de AcA no ensaio do β -caroteno/ácido linoleico($p > 0,05$).

Figura 8 – Potencial antioxidante dos extratos e frações das folhas de *L. thymoides*.



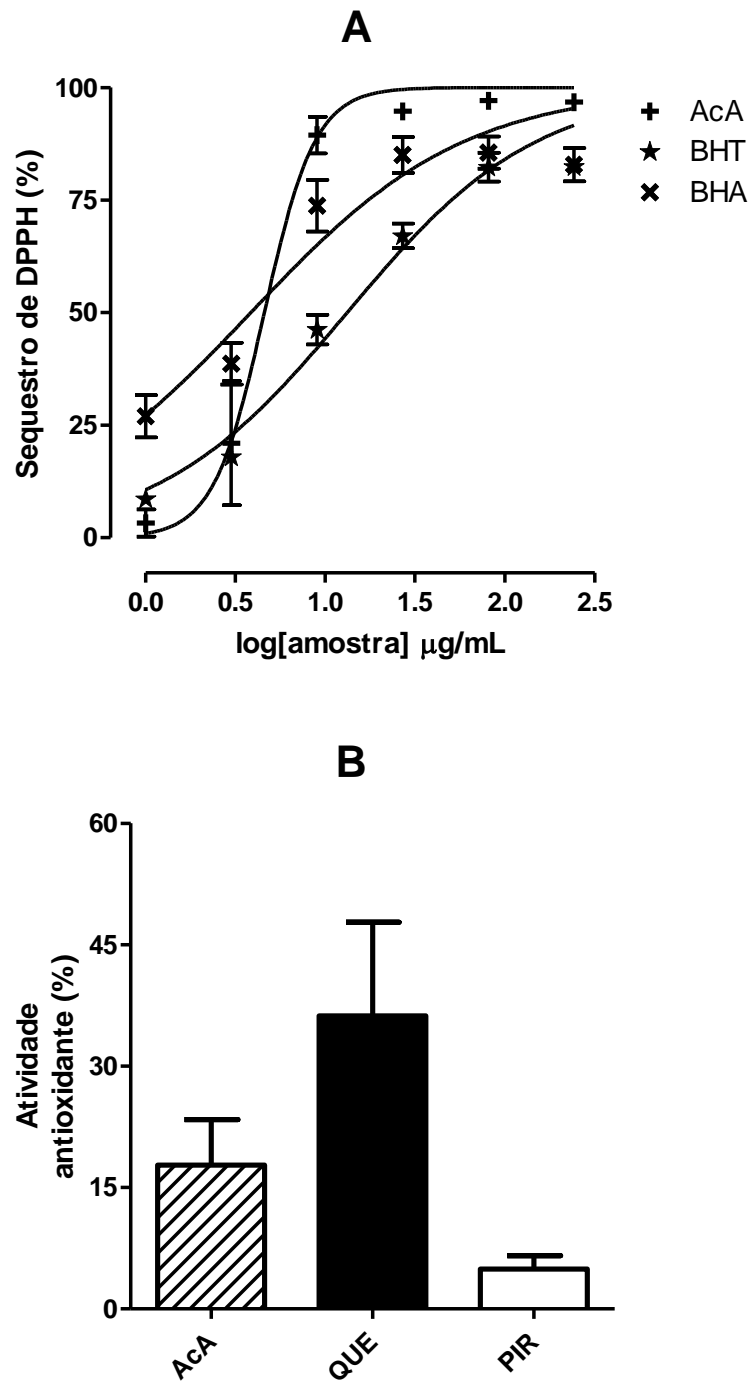
A, corresponde aos dados do ensaio de DPPH e **B**, demonstra a inibição da oxidação do β -caroteno em emulsão. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$); * representa grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). TF, extrato metanólico das folhas; TFH, fração hexano de TF; TFD, fração diclorometano de TF; TFA, fração acetato de etila de TF;

Figura 9 – Potencial antioxidante dos extratos e frações dos caules de *L. thymoides*.



A, corresponde aos dados do ensaio de DPPH e **B**, demonstra a inibição da oxidação do β -caroteno em emulsão. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$). TC, extrato metanólico dos caules; TCH, fração hexano de TC; TCD, fração diclorometano de TC; TCA, fração acetato de etila de TC.

Figura 10 – Atividade antioxidante dos controles positivos utilizados.



A, corresponde aos dados do ensaio de DPPH e **B**, demonstra a inibição da oxidação do β -caroteno em emulsão. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$); AcA, ácido ascórbico; BHT, butilhidroxitolueno; BHA, butilhidroxianisol; QUE, quercetina; PIR, pirogalo.

As frações mais potentes foram a TFA e TCA, com valores de CE_{50} de, respectivamente, $5,7 \pm 0,4$ e $4,5 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$, que diferiram significativamente entre si (teste t , $p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os valores de CE_{50} obtidos para TF, TFD e TFA e TC, TCD e TCA. Comparando-se os extratos e frações equivalentes entre si utilizando o teste t , observou-se que não houve diferença significativa em relação às potências de TF e TC, TFH e TCH e TFD e TCD. Ainda, TF, TFA, TC, TCD e TCA apresentaram valores de CE_{50} no ensaio de DPPH que não foram diferentes estatisticamente dos controles positivos AcA, BHT e BHA.

No ensaio de inibição da auto-oxidação do β -caroteno, os valores obtidos por TF ($9,3 \pm 2,6$ %) e TC ($3,7 \pm 2,5$ %) não apresentaram diferença estatística entre si. Comparando-se os extratos metanólicos com suas frações orgânicas, observou-se que apenas TFA diferiu de TF (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) e entre TC e suas frações não houve diferença significativa. As frações TFH ($31,7 \pm 3,2$ %), TFD ($29,3 \pm 6,0$ %) e TFA ($37,9 \pm 4,1$ %) foram as mais potentes, apresentando percentuais inibitórios que não foram estatisticamente significantes daquele obtido pelo controle positivo quercetina (QUE, $36,2 \pm 11,6$ %). Nesse mesmo ensaio, TFH foi três vezes mais potente que TCH, a fração equivalente do extrato do caule; da mesma maneira, TFA foi cerca de 38 vezes mais potente que TCA.

Somando-se todos os resultados obtidos, tanto para o ensaio de DPPH quanto para o de β -caroteno/ácido linoleico, pode-se observar que os extratos e frações das folhas de *L. thymoides* são mais eficazes que os seus equivalentes dos caules. Assim, com destaque para as frações TFD e TFA, ambas apresentaram baixos valores de CE_{50} para o ensaio de DPPH e elevado percentual de inibição da oxidação do β -caroteno, sem diferença estatística quando comparados aos controles positivos utilizados.

Correlacionando-se com os dados dos fenóis totais, pode-se observar que as frações que apresentaram maior conteúdo de fenólicos possuíam maior eficácia em pelo menos um dos ensaios de atividade antioxidante, como TF, TFD, TFA, TC e TCA. Porém, a fração TFH não seguiu o mesmo padrão, apresentando um dos menores valores de fenóis totais ($15,5 \pm 0,7$ EAG/g), mas com atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoleico ($31,7 \pm 3,2$ %).

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *L. thymoides*

Os óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* foram testados *in vitro* contra diversos micro-organismos pelo método da CIM, seguido pela determinação da CBM. Conforme descrito anteriormente, foram consideradas ativas as amostras que apresentarem valores de CIM menores ou igual 2,56 mg/mL.

Conforme descrito na **Tabela 14**, houve variação na atividade antimicrobiana de acordo com o micro-organismo testado, com TOO (CBM de 0,53 mg/mL) e TOP (CBM de 0,26 mg/mL) possuindo atividade bactericida contra *S. aureus*, enquanto TOV (CIM < 0,004 mg/mL) foi apenas bacteriostático e TOI não apresentou atividade significativa; TOO, TOP e TOV, mas não TOI, apresentaram efeito bacteriostático contra *M. luteus* e fungistático contra *C. albicans*. Os valores de CIM de TOO, TOP e TOV foram semelhantes ao controle positivo cloranfenicol (CLO). Os micro-organismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* e *S. cholerasuis* foram resistentes a todos os óleos essenciais.

Correlacionando a composição química com a atividade antimicrobiana, observa-se que os óleos que apresentaram maior potência e eficácia foram os que possuíam maior teor de monoterpenos e menor de sesquiterpenos. Além disso, o óleo TOI foi o único ineficaz contra todos os micro-organismos e o que apresentou maior concentração do sesquiterpeno cariofileno, sugerindo, portanto, que a atividade antimicrobiana de *L. thymoides* parece não estar relacionada a esse constituinte.

Em relação ao extrato metanólico das folhas e suas respectivas frações orgânicas, observou-se variação da atividade antimicrobiana de acordo com a polaridade da fração e micro-organismo testado, conforme descrito na **Tabela 14**. A fração TFD foi a que apresentou maior espectro de ação, sendo bactericida contra as duas linhagens de *S. aureus* e *B. cereus* e fungicida contra *C. parapsilosis*, enquanto que contra *M. luteus* e *C. albicans* apenas provocou inibição do crescimento. TFA também foi bactericida contra *S. aureus*, *B. cereus*, além de *S. cholerasuis*, porém contra *M. luteus* apenas inibiu o crescimento e não apresentou atividade antifúngica. O extrato bruto, TF, foi ineficaz contra todos os micro-organismos testados, enquanto que TFH foi apenas bacteriostático contra *S. aureus* e fungistático contra *C. parapsilosis*.

Mantendo um perfil similar ao apresentado por TF e suas frações, o extrato metanólico dos caules e suas frações orgânicas foram mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas e os fungos (**Tabela 12**). TC apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas, mas foi ineficaz contra os fungos. Quando se compara o

Tabela 13 – Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides*.

Amostra	Microrganismos (CIM e CBM em mg/mL)																	
	<i>E. coli</i> CCMB 261		<i>S. aureus</i> CCMB 262		<i>S. aureus</i> CCMB 263		<i>P. aeruginosa</i> CCMB 268		<i>S. choleraesuis</i> CCMB 281		<i>B. cereus</i> CCMB 282		<i>M. luteus</i> CCMB 283		<i>C. albicans</i> CCMB 286		<i>C. parapsilosis</i> CCMB288	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	CIM	CFM
TOO	R		<0,004	0,53	NT		R	8,43	>8,43	R		0,03	>8,43	<0,004	4,21	NT		
TOI	R		10,19	5,09	NT		NT			NT		NT		R		NT		
TOP	R		<0,004	0,26	NT		R		R	R		0,07	>8,43	<0,004	4,21	NT		
TOV	R		<0,004	>8,43	NT		R		R	R		0,03	>8,43	<0,004	>8,43	NT		
TF	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04	5,04	NT	5,04	9,94	4,97	4,97	5,04	5,04	9,94	9,94	4,97	4,97	
TFH	5,55	<11,1	1,39	2,77	2,77	2,77	NT	5,55	11,1	2,77	2,77	5,55	<11,1	9,94	9,94	2,48	4,97	
TFD	2,77	5,55	0,35	0,69	0,17	1,39	NT	2,77	5,55	0,17	0,17	0,69	<11,1	2,48	4,97	0,62	1,28	
TFA	2,77	2,77	0,35	0,69	0,35	0,69	NT	1,39	1,39	0,69	0,69	0,69	<11,1	4,47	9,94	4,97	9,94	
TC	2,56	5,12	0,62	2,56	2,56	5,12	NT	2,56	2,48	2,48	2,48	2,56	5,12	<9,94	<9,94	9,94	9,94	
TCH	2,77	11,1	2,77	5,55	2,77	5,55	NT	5,55	11,1	2,77	2,77	2,77	<11,1	9,94	9,94	2,48	4,97	
TCD	2,77	5,55	0,35	0,69	0,69	1,39	NT	2,77	2,77	0,69	0,69	0,69	1,39	9,94	9,94	4,97	9,94	
TCA	5,00	10,00	0,31	1,25	0,62	1,25	NT	1,28	2,48	0,62	1,28	1,25	1,25	9,94	4,97	4,97	4,97	
CLO	0,675	-	0,003	-	0,084	-	0,084	-	0,005	-	0,005	-	0,003	-	NT	-	NT	-
NIS	NT		NT		NT		NT		NT		NT		NT		1,25	-	2,50	-
DMSO	5,55	-	5,55	-	11,1	-	NT	-	5,55	-	5,55	-	5,55	-	NT	-	NT	-

NT, não testado; R, resistente; TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão; TF, extrato metanólico das folhas; TFH, fração hexano de TF; TFD, fração diclorometano de TF; TFA, fração acetato de etila de TF; TC, extrato metanólico dos caules; TCH, fração hexano de TC; TCD, fração diclorometano de TC; TCA, fração acetato de etila de TC; CLO, cloranfenicol; NIS, nistatina.

perfil de atividade das frações, observa-se que também houve variação de acordo com a polaridade, com TCH apresentando efeito fungistático apenas contra *C. parapsilosis*; TCD foi bactericida contra todas as Gram-positivas (as duas linhagens de *S. aureus*, *B. cereus* e *M. luteus*); e TFA, além de apresentar o mesmo perfil que TFD, foi a única fração de TC que apresentou atividade bactericida contra *S. choleraesuis*.

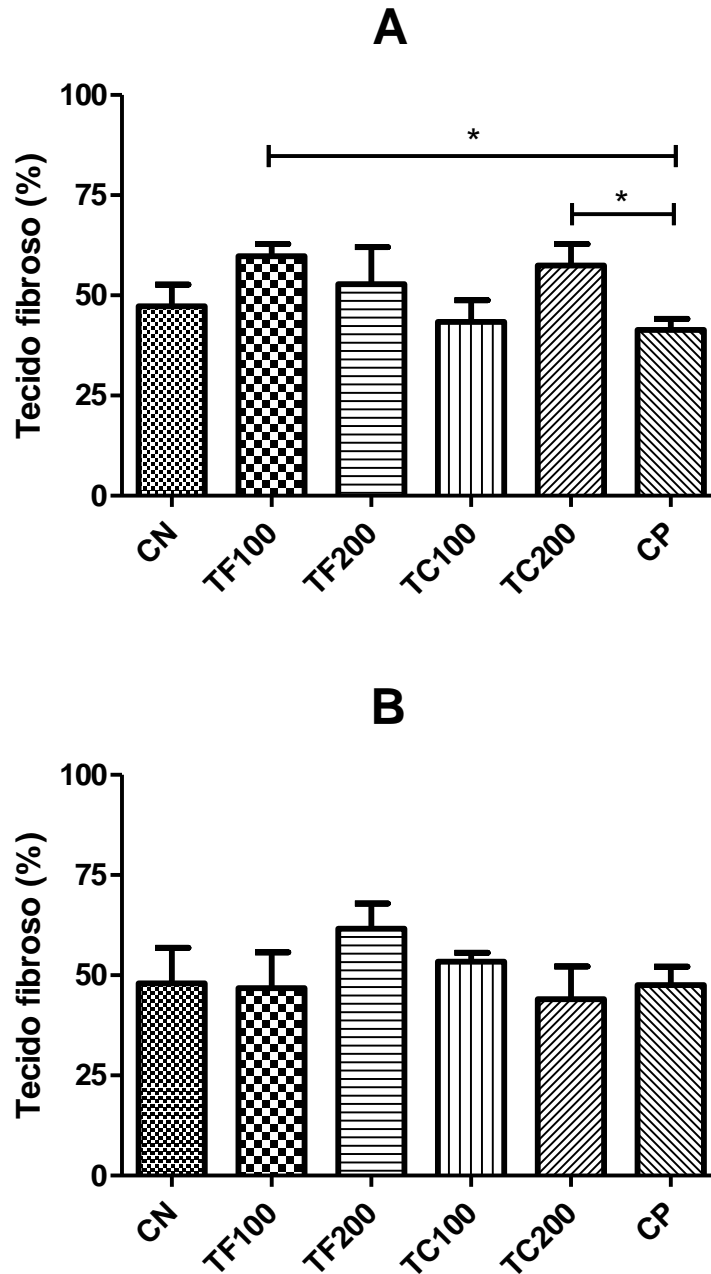
De maneira geral, observa-se que *L. thymoides* apresenta potente atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas e é ineficaz contra as Gram-negativas e os fungos, explicando o uso dessa espécie na medicina popular para o tratamento de feridas.

4.5 EFEITO DOS EXTRATOS DE *L. thymoides* SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CUTÂNEA EM RATOS

Como a espécie *L. thymoides* é utilizada na medicina popular para o tratamento de feridas, testou-se também o efeito cicatrizante dos extratos metanólicos das folhas (TF) e caules (TC) utilizando-se o modelo de cicatrização de ferida cutânea em ratos. Para tanto, os animais submetidos ao procedimento cirúrgico foram tratados topicamente com TF e TC, nas concentrações de 100 e 200 mg/mL, por 14 e 21 dias. O efeito de *L. thymoides* sobre a cicatrização foi verificado pela análise histopatológica dos fragmentos de pele retirados da região do ferimento, com a mensuração morfométrica do conteúdo de colágeno. Assim, conforme mostrado na **Figura 11**, TF e TC não estimularam a deposição de colágeno quando se compara o percentual fibroso dos grupos tratados com o controle negativo, tanto após 14 dias quanto após 21 dias. Os grupos tratados com os extratos das folhas e caules, nas concentrações de 100 e 200 mg/mL, respectivamente TF100 e TC200, apresentaram deposição de tecido fibroso superior ao grupo controle positivo tratado com sulfadiazina de prata 2 %. A **Figura 12** ilustra alguns cortes histológicos dos fragmentos de pele dos animais tratados e não tratados.

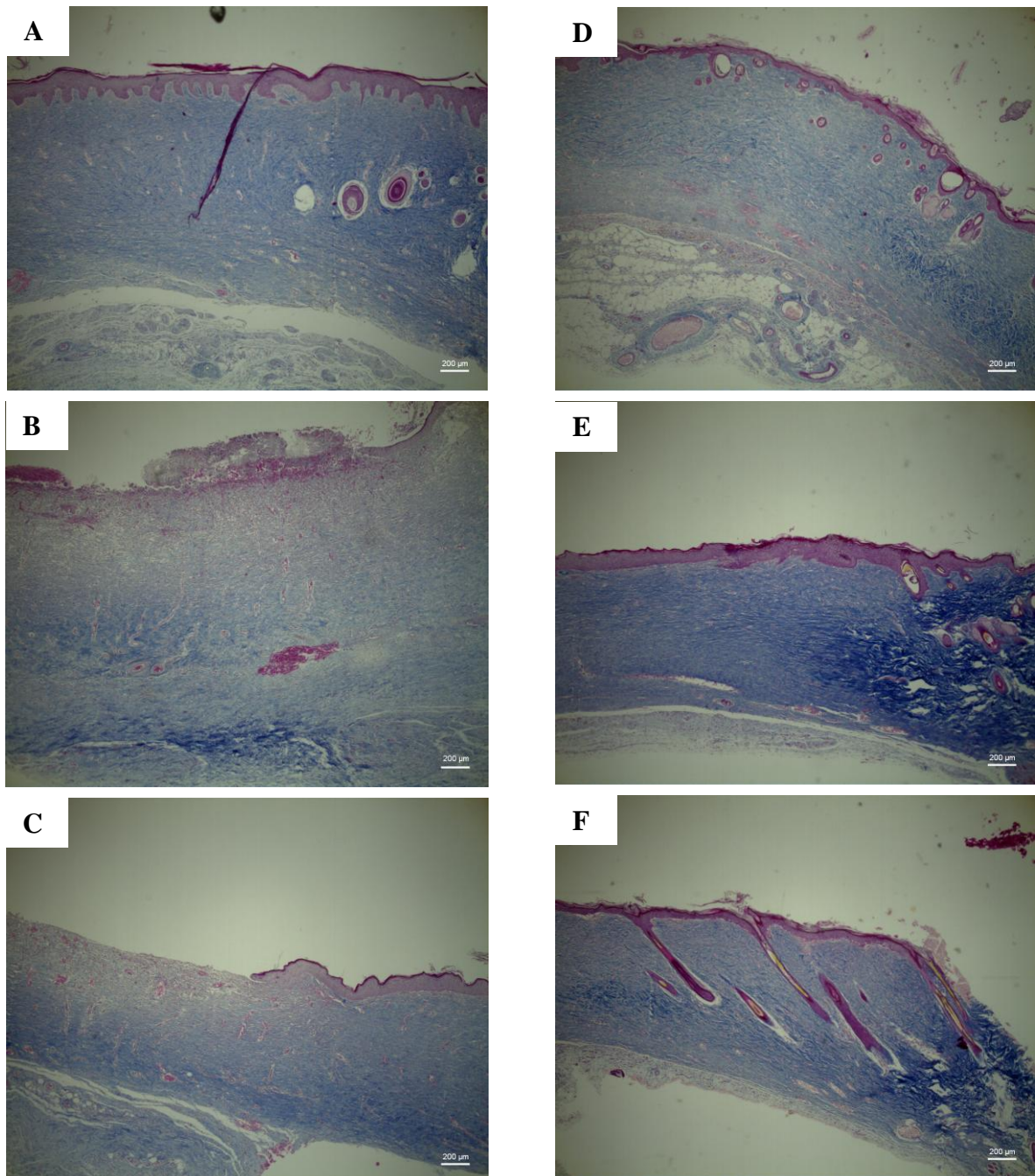
Assim, comparando-se os resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* com o efeito de *L. thymoides* sobre a cicatrização *in vivo*, pode-se inferir que a utilização popular dessa espécie no tratamento de feridas pode estar relacionada à atividade antisséptica e não ao estímulo na deposição de colágeno, que é o efeito esperado para substâncias cicatrizantes.

Figura 11 – Efeito dos extratos metanólicos das folhas e caules de *L. thymoides* sobre a deposição de tecido fibroso em ratos.



A, animais tratados por 14 dias e **B** animais tratados por 21 dias. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa grupos que apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste t , $p < 0,05$). CN, controle negativo; TF100, animais que receberam o extrato metanólico das folhas (TF) na concentração 100 mg/mL; TF200, animais que receberam TF na concentração 200 mg/mL; TC100, animais que receberam o extrato metanólico dos caules (TC) na concentração 100 mg/mL; TC200, animais que receberam TC na concentração 200 mg/mL.

Figura 12 – Avaliação histopatológica da área onde foi realizado o ferimento nos ratos. Os cortes histológicos dos fragmentos de pele dos animais após 14 dias da cirurgia indicam aumento da atividade dos fibroblastos, tanto em CN (A) quanto em TF200 (B) e TC100 (C). Após 21 dias, observou-se uma completa re-epitelização, com a substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso não modelado, tanto CN (D) quanto em TF200 (E) e TC200 (F). Em todos os cortes a coloração foi realizada utilizando o tricromo de Masson.



CN, controle negativo; TF100, animais que receberam o extrato metanólico das folhas (TF) na concentração 100 mg/mL; TF200, animais que receberam TF na concentração 200 mg/mL; TC100, animais que receberam o extrato metanólico dos caules (TC) na concentração 100 mg/mL; TC200, animais que receberam TC na concentração 200 mg/mL.

4.6 ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA DOS EXTRATOS DE *L. thymoides*

A atividade antipirética dos extratos metanólicos das folhas e caules de *L. thymoides* foi avaliada através do modelo de indução de febre por hiperpirexia em ratos jovens. Assim, quatro horas após a injeção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* os animais foram tratados com TF e TC, uma única vez, nas doses 300, 600 e 1.200 mg/kg, sendo a temperatura retal aferida a cada hora e nas oito horas seguintes. De acordo com o apresentado na **Figura 13**, TF e TC reduziram a temperatura retal dos animais de maneira dependente da dose, com TF sendo mais eficaz que TC.

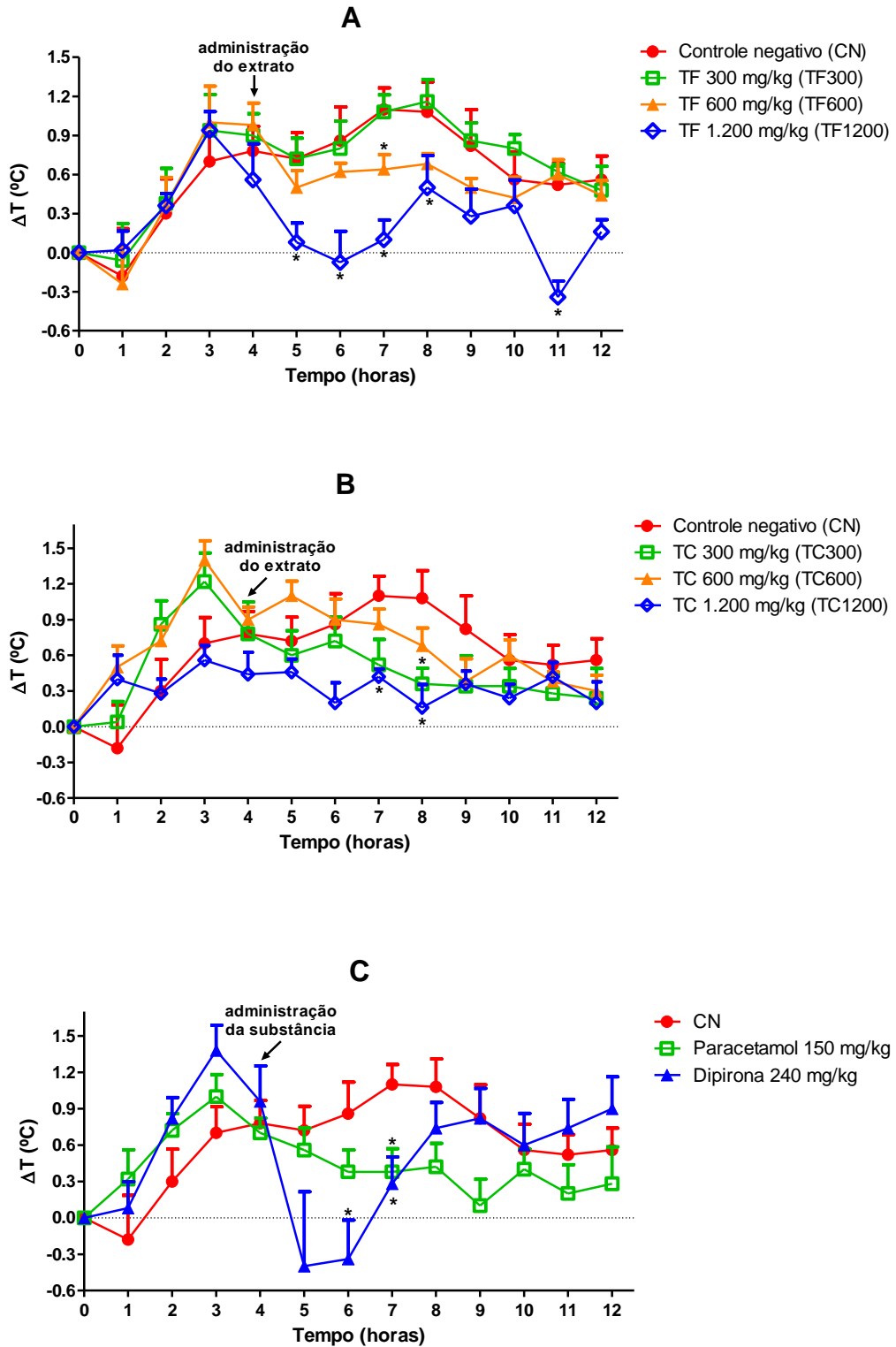
A redução da temperatura retal foi mais pronunciada em TF1200 (**Figura 13A**), com as menores temperaturas registradas após duas e sete horas da administração do extrato, podendo-se observar uma manutenção do efeito por um longo período, diferente do observado nos grupos tratados com paracetamol e dipirona. Comparando-se com o grupo que recebeu apenas água (CN), observa-se que a redução da temperatura foi significativa (teste *t*, $p < 0,05$) em TF600 no tempo 7 horas e TF1200 nos tempos 5, 6, 7, 8 e 11 horas, sendo que nesses três primeiros tempos não houve diferença estatística em relação ao grupo que recebeu dipirona.

Nos grupos que receberam TC (**Figura 13B**), a variação de temperatura foi menor do que a apresentada por TF, sendo significativa a diferença em relação à CN (teste *t*, $p < 0,05$) apenas em TC300 no tempo 8 horas e TC1200 nos tempos 7 e 8 horas. Comparando-se com o grupo que recebeu dipirona, a redução da temperatura dos animais do grupo TC1200 não foi estatisticamente significante apenas após três horas da administração do extrato.

4.7 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *L. thymoides*

Para avaliar a atividades antinociceptiva do óleo essencial de *L. thymoides* obtido na estação primavera (TOP), foram utilizados os ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente, todos desenvolvidos em camundongos. O óleo TOP foi escolhido por ser o que se tinha em maior volume dentre os demais no momento da realização dos experimentos.

Figura 13 – Efeito dos extratos metanólicos das folhas e caules de *L. thymoides* sobre a febre induzida por hiperpirexia em ratos jovens.

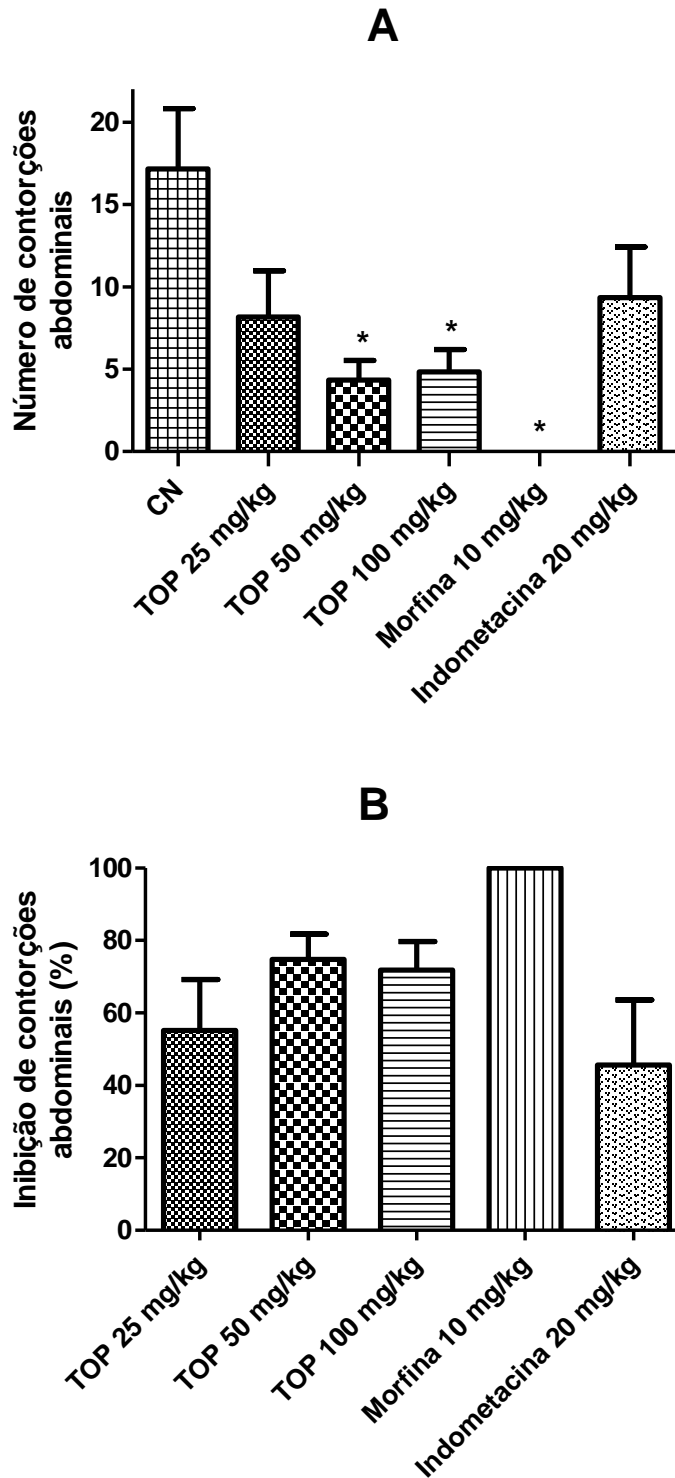


A, **B** e **C** representam os grupos de animais tratados com TF, TC e controles positivos, respectivamente. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa variações da temperatura que apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste t , $p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo (CN). TF, extrato metanólico das folhas; TC, extrato metanólico dos caules.

De acordo com o apresentado na **Figura 14**, TOP reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético, de maneira dependente da dose, sendo que os grupos que receberam 50 e 100 mg/kg do óleo apresentaram diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo (CN), que recebeu apenas solução salina. Porém, quando comparado com os grupos que receberam morfina e indometacina, nenhum dos grupos tratados com TOP apresentou diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$). A redução das contorções abdominais dos grupos que receberam TOP foi de $55,2 \pm 14,1$ % para os animais tratados com 25 mg/kg; $79,8 \pm 7,0$ % nos que receberam 50 mg/kg; e $71,8 \pm 7,9$ % para os tratados com 100 mg/kg.

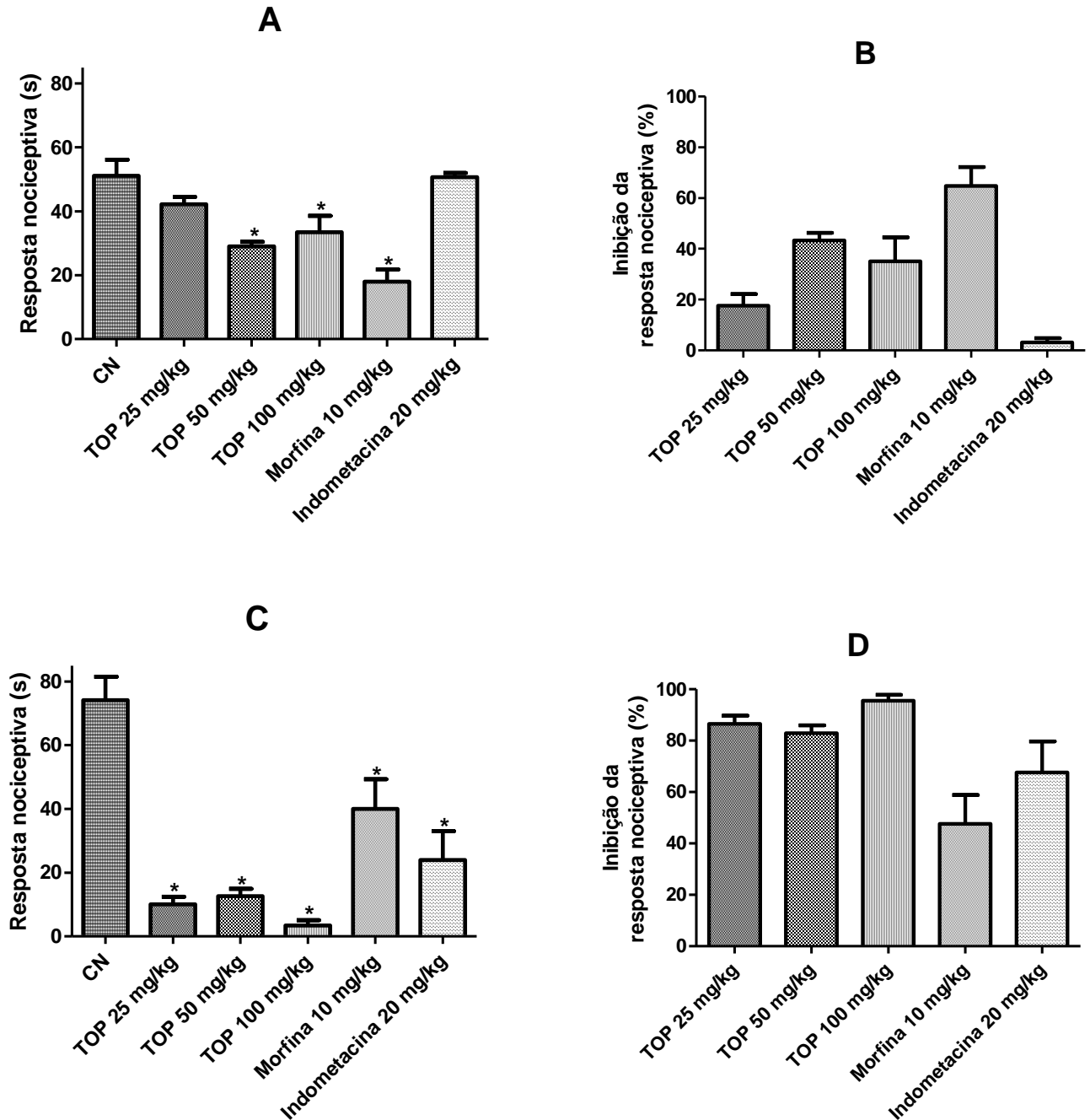
Devido ao resultado apresentado no ensaio das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, camundongos foram submetidos ao teste da formalina para distinguir se o efeito de TOP ocorre sobre o componente neurogênico ou inflamatório do estímulo nociceptivo. Dessa maneira, pode-se observar na **Figura 15A** que os camundongos que receberam 50 e 100 mg/kg do óleo essencial de *L. thymoides* reduziram o tempo de lambida na primeira fase (dor neurogênica) do teste de formalina, que foi estatisticamente significante (ANOVA, $p < 0,05$) em comparação com CN. Na segunda fase desse ensaio (dor inflamatória), a redução do tempo de lambida foi mais pronunciada do que na primeira fase, com todos os grupos que receberam TOP apresentando diferença estatística (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) em relação ao CN (**Figura 15C**). Assim, pode-se destacar que TOP foi mais eficaz na redução do estímulo nociceptivo na segunda fase, com $82,9 \pm 3,1$ % de inibição nos animais tratados com 50 mg/kg e $95,5 \pm 2,4$ % na dose 100 mg/kg (**Figura 15D**), do que na fase neurogênica, com esses mesmos grupos apresentando $43,3 \pm 3,0$ e $35,1 \pm 9,4$ % de inibição (**Figura 15B**). Ainda, TOP foi mais eficaz que a morfina na segunda fase e não foi estatisticamente diferente da indometacina.

Figura 14 – Atividade antinociceptiva do óleo essencial TOP obtido de *L. thymoides* sobre a as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.



A representa número de contorções abdominais durante 10 minutos, após a injeção do ácido acético; **B** corresponde ao percentual de inibição apresentado pelos grupos, quando comparados com o CN. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 6$); * representa grupos que apresentaram número de contorções abdominais com diferença estatisticamente significativa (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo (CN). TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera.

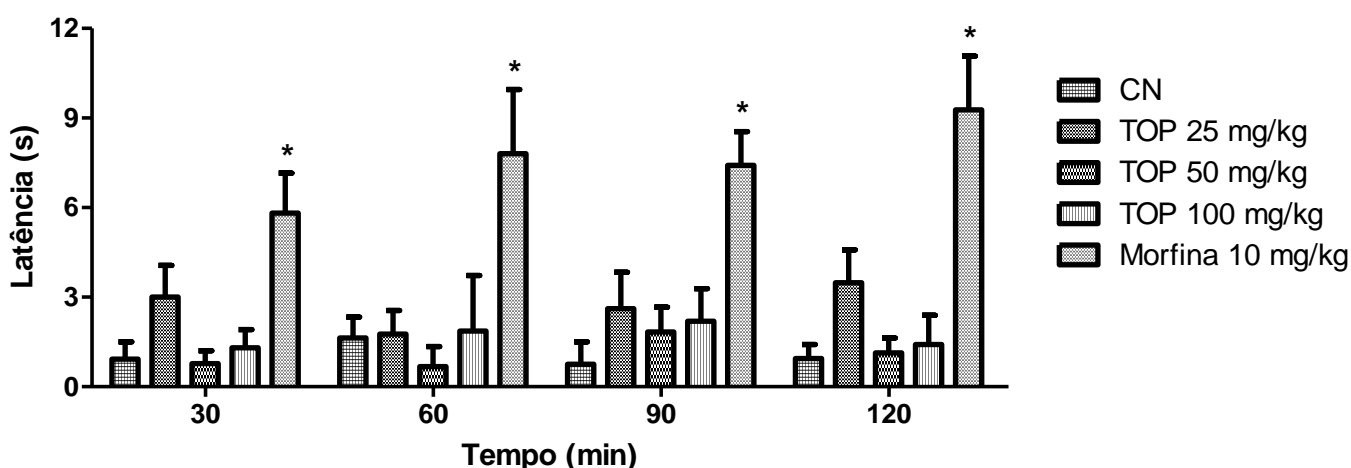
Figura 15 – Atividade antinociceptiva de TOP sobre os componentes neurogênico e inflamatório do estímulo nociceptivo do teste da formalina.



A e **B** representam o tempo de lambida e o percentual de inibição do estímulo nociceptivo, respectivamente, durante a primeira fase (dor neurogênica); **C** e **D** representam o tempo de lambida e o percentual de inibição do estímulo nociceptivo, respectivamente, durante a segunda fase (dor inflamatória). Os percentuais de inibição foram determinados em comparação com o grupo CN. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 6$); * representa grupos que apresentaram resposta nociceptiva com diferença estatisticamente significativa (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo. TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; CN, grupo controle negativo.

Devido ao resultado apresentado no teste da formalina, grupos de camundongos foram submetidos ao teste da placa quente para verificar se o efeito de TOP está relacionado às vias centrais de nocicepção. Conforme observado na **Figura 16**, os animais que receberam TOP, em quaisquer das doses testadas, não aumentaram o tempo de latência quando comparados com o grupo que recebeu apenas salina (CN), confirmando o observado no teste da formalina. Apenas o grupo tratado com morfina apresentou diferença significativa (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$) quando comparado a CN.

Figura 16 – Efeito de TOP sobre o tempo de latência dos camundongos submetidos ao estímulo nociceptivo no teste da placa quente.



Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 6$); * representa os grupos que apresentaram tempo de latência com diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo. TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera.

4.8 ATIVIDADE ESPASMOLÍTICA IN VITRO DE *L. thymoides*

Atendendo a um dos objetivos propostos, foram realizados vários protocolos experimentais *in vitro* para determinar o perfil farmacológico de *L. thymoides*, testando tanto os óleos essenciais quanto os extratos e frações das folhas e caules, sobre diversos tipos de músculos lisos. A amostra que apresentou maior potência e relaxou 100 % determinado músculo liso na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$, teve uma investigação mais detalhada para identificar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação relaxante. Nas subseções a seguir, estão descritos os efeitos dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* em cada órgão estudado.

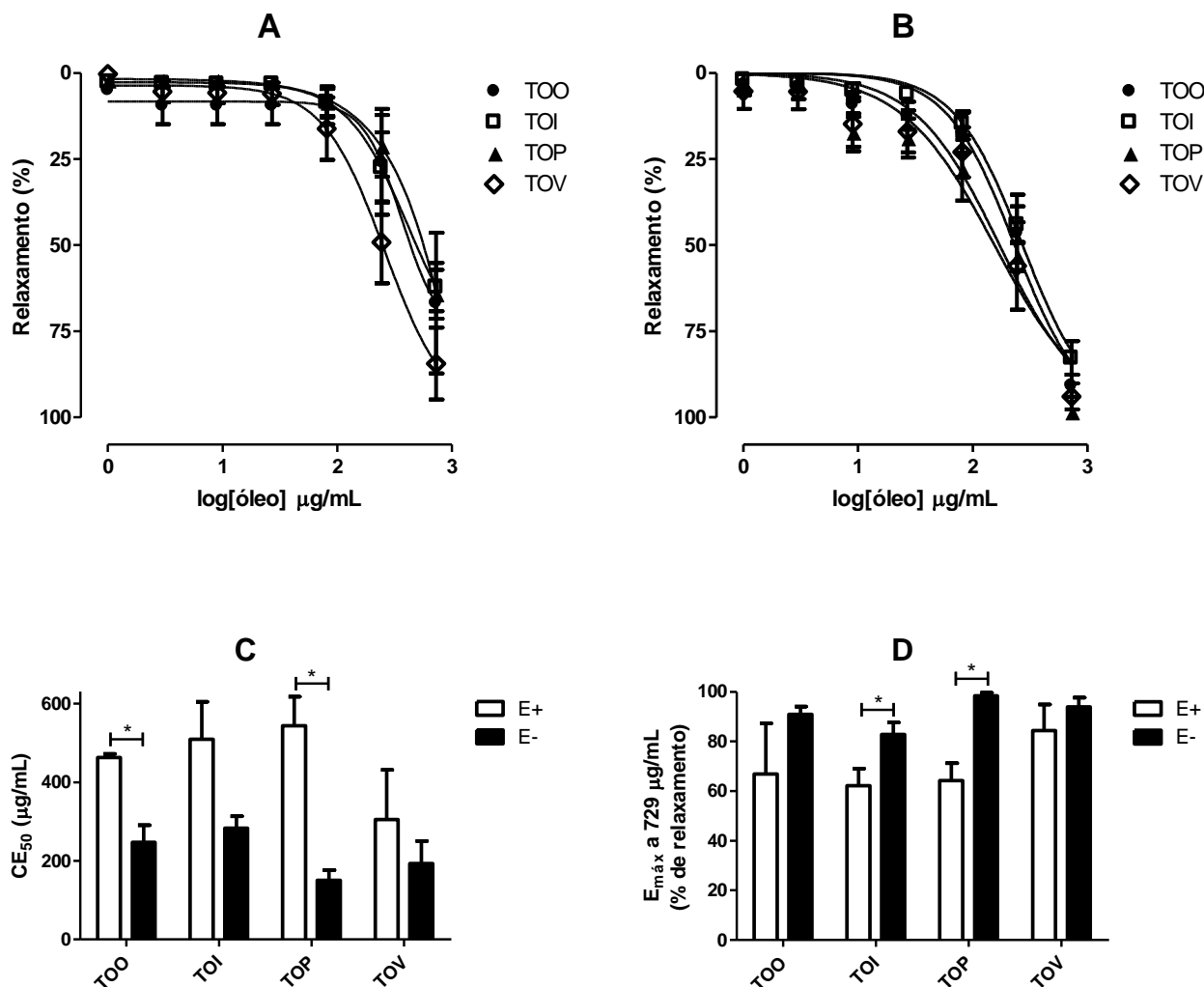
4.8.1 Efeito dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas por fenilefrina em aorta isolada de rato

Os óleos essenciais de *L. thymoides* relaxaram, de maneira dependente da concentração (1 a 729 $\mu\text{g/mL}$), os anéis de aorta isolada de rato com endotélio funcional pré-contraídos com FEN (1 μM), conforme observado na **Figura 17A**. Os valores de CE_{50} obtidos de TOO (462,8 \pm 8,9 $\mu\text{g/mL}$), TOI (511,1 \pm 95,7 $\mu\text{g/mL}$), TOP (543,9 \pm 73,9 $\mu\text{g/mL}$) e TOV (305,2 \pm 126,0 $\mu\text{g/mL}$) não diferiram significativamente entre si. Nenhum dos óleos essenciais reduziu a contração induzida por FEN aos valores basais, sendo o $E_{\text{máx}}$ obtido para TOO, TOI, TOP e TOV, na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$, 86,8 \pm 5,5 %, 62,2 \pm 7,0 %, 64,2 \pm 7,1 % e 84,4 \pm 10,5 %, respectivamente.

Da mesma maneira que na presença de endotélio, TOO (CE_{50} = 246,9 \pm 43,7 $\mu\text{g/mL}$), TOI (CE_{50} = 282,6 \pm 30,8 $\mu\text{g/mL}$), TOP (CE_{50} = 150,3 \pm 26,3 $\mu\text{g/mL}$) e TOV (CE_{50} = 193,1 \pm 57,4 $\mu\text{g/mL}$) relaxaram os anéis de aorta sem endotélio funcional de maneira dependente da concentração (**Figura 17B**). A comparação dos valores de CE_{50} obtidos nesse conjunto de experimentos por ANOVA, seguido do teste de Tukey, não mostraram diferença significativa. O relaxamento máximo obtido dos anéis aórticos a 729 $\mu\text{g/mL}$ foram para TOO 90,9 \pm 3,2 %, TOI 82,8 \pm 4,9 %, TOP 98,5 \pm 1,1 % e TOV 93,9 \pm 3,8 %.

Comparando-se os valores de CE_{50} sobre o relaxamento de aorta pré-contraída com FEN na presença e ausência de endotélio funcional (**Figura 17C**), observou-se que TOO e TOP apresentaram potência maior em relaxar o músculo liso na ausência do endotélio do que na presença desse, com valores de CE_{50} significativamente menores (teste t , $p < 0,05$). Ainda, o $E_{\text{máx}}$ alcançado por TOI e TOP a 729 $\mu\text{g/mL}$ na ausência de endotélio foram significativamente superiores, quando comparados aos valores observados na presença desse (teste t , $p < 0,05$), conforme mostrado na **Figura 17D**.

Figura 17 – Efeito vasorrelaxante dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas com 1 μ M de felinefrina em anéis de aorta isolada de rato.

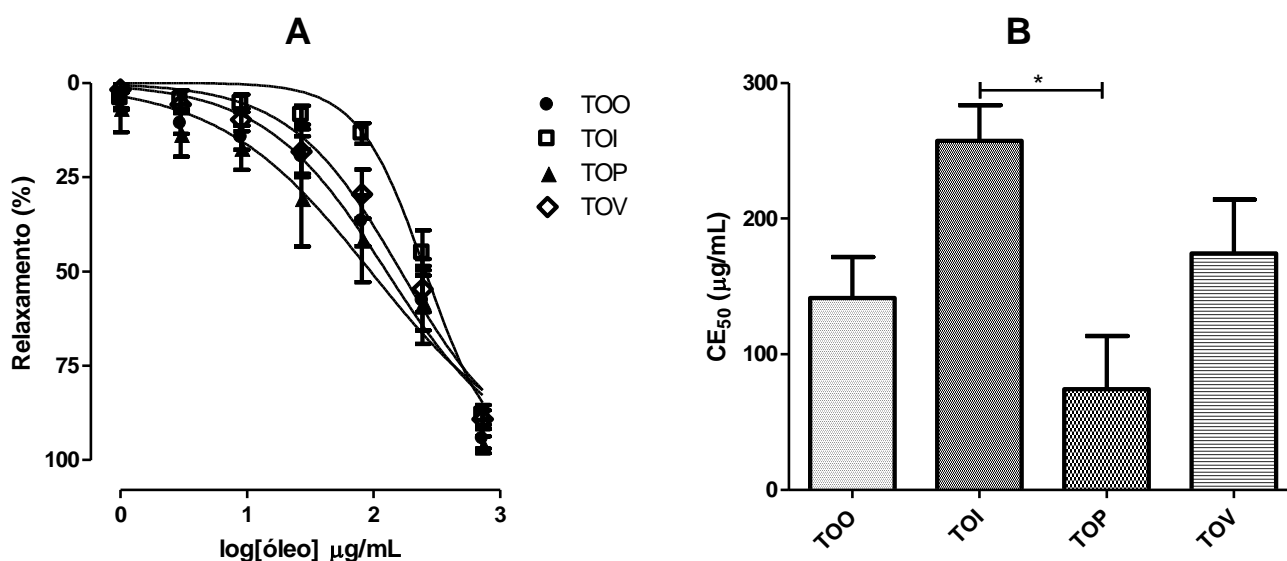


A, contrações induzidas na presença de endotélio funcional; **B**, A, contrações induzidas na ausência de endotélio funcional; **C**, valores de CE_{50} na presença (E+) ou ausência (E-) do endotélio; **D**, valores de $E_{máx}$ obtidos na presença (E+) ou ausência de endotélio (E-). Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa valores de CE_{50} ou $E_{máx}$ que apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste t , $p < 0,05$) quando comparados os valores de um mesmo óleo na presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio funcional. TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão.

4.8.2 Efeito dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata

Os óleos essenciais de *L. thymoides* relaxaram o útero de rata pré-contraído com solução despolarizante de KCl 60 mM, de maneira dependente da concentração (**Figura 18A**). Apenas os valores de CE_{50} de TOI ($257,4 \pm 26,4 \mu\text{g/mL}$) e TOP ($74,3 \pm 39,2 \mu\text{g/mL}$) diferiram significativamente (ANOVA, pós-teste de Tukey, $p < 0,05$), sendo este último o valor mais baixo dentre os óleos essenciais, com TOO apresentando CE_{50} de $141,6 \pm 30,1 \mu\text{g/mL}$ e TOV com CE_{50} de $174,4 \pm 39,7 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 18B**). Os valores de $E_{\text{máx}}$ a $729 \mu\text{g/mL}$ de TOO ($94,4 \pm 2,6 \%$), TOI ($88,0 \pm 2,6 \%$), TOP ($94,0 \pm 2,6 \%$) e TOV ($89,2 \pm 2,5 \%$) não apresentaram diferença estatística entre si (ANOVA, $p > 0,05$).

Figura 18 – Efeito espasmolítico dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas com KCl 60 mM em útero isolado de rata.

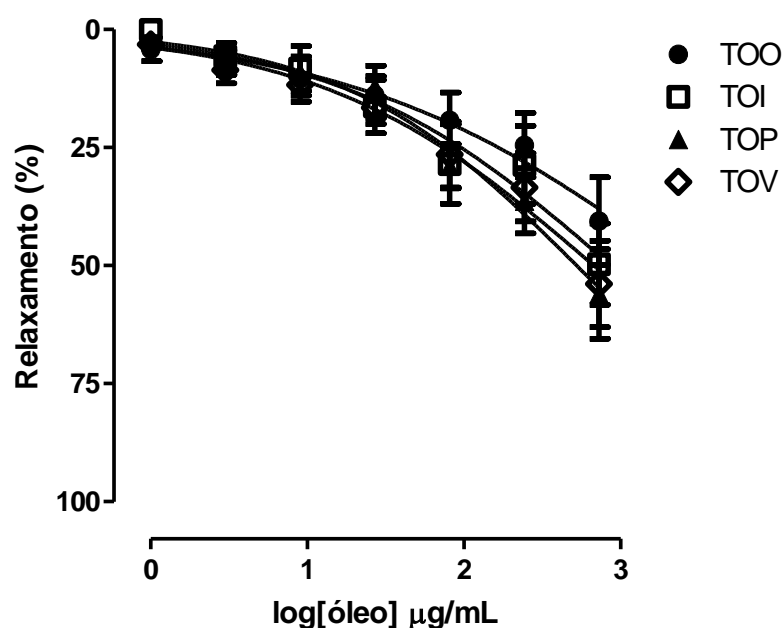


A, curvas concentração-resposta dos óleos essenciais; **B**, valores de CE_{50} dos óleos essenciais. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa valores de CE_{50} que apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$). TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão.

4.8.3 Efeito dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas por carbacol em traqueia isolada de cobaia

Os óleos essenciais de *L. thymoides* relaxaram o músculo liso traqueal de cobaia pré-contraindo com CCh (1 μ M) de maneira dependente da concentração (**Figura 19**), porém os valores de $E_{m\acute{a}x}$ obtidos a 729 μ g/mL não foram estatisticamente diferentes entre TOO (40,6 \pm 9,2 %), TOI (49,7 \pm 8,6 %), TOP (56,0 \pm 9,5 %) e TOV (53,9 \pm 9,1 %). Não foi possível determinar os valores de CE_{50} dos óleos para esse conjunto de experimentos, pois os percentuais de relaxamento obtidos para cada concentração foram muito baixos, dificultando a convergência dos dados na regressão não linear.

Figura 19 – Efeito dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol 1 μ M em anéis de traqueia isolados de cobaia.

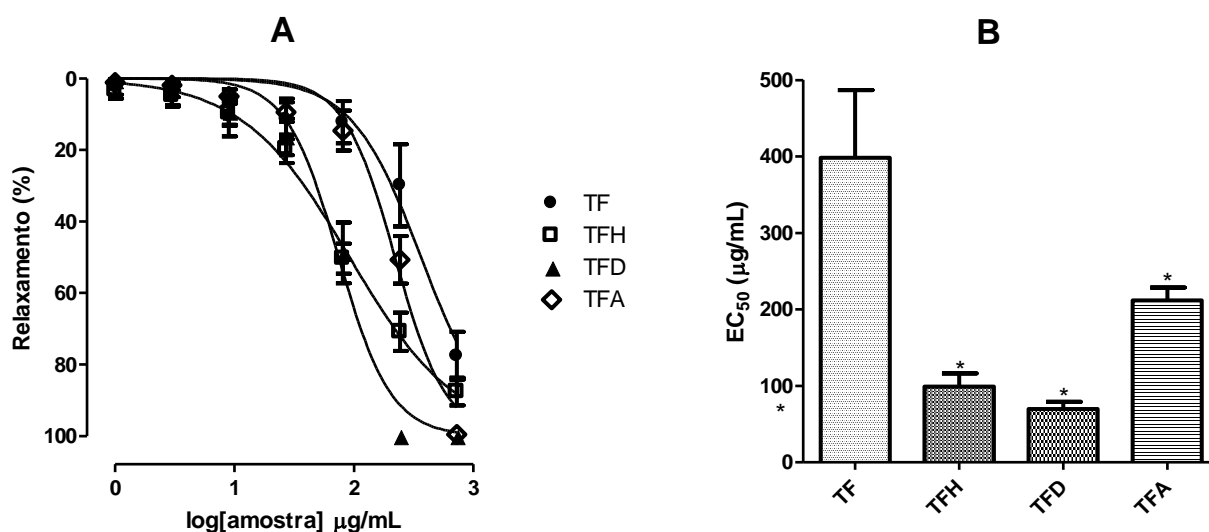


Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$). TOO, óleo essencial da planta coletada no outono; TOI, óleo essencial da planta coletada no inverno; TOP, óleo essencial da planta coletada na primavera; TOV, óleo essencial da planta coletada no verão.

Devido ao uso de *L. thymoides* na medicina popular para o tratamento de bronquite, foi realizado um estudo comparativo do efeito espasmolítico dos extratos e frações das folhas e caules sobre as contrações tônicas induzidas por CCh 1 μ M em anéis de traqueia isolados de cobaia. Como pode ser observado na **Figura 20A**, TF ($CE_{50} = 398,7 \pm 88,1 \mu$ g/mL), TFH ($CE_{50} = 98,6 \pm 17,8 \mu$ g/mL), TFD ($CE_{50} = 69,3 \pm 9,8 \mu$ g/mL) e TFA

($CE_{50} = 211,7 \pm 16,8 \mu\text{g/mL}$) induziram relaxamento do músculo liso traqueal, de maneira dependente da concentração. Comparando-se os valores de CE_{50} por ANOVA seguido do teste de Tukey, observa-se que todas as frações orgânicas foram mais potentes que TF (**Figura 20B**). A fração TFD foi a única que reduziu a contração induzida por CCh aos valores basais, alcançando o $E_{m\acute{a}x}$ de 100 % a $243 \mu\text{g/mL}$, destacando-se de TF ($E_{m\acute{a}x} = 77,6 \pm 6,7 \%$), TFH ($E_{m\acute{a}x} = 87,6 \pm 3,9 \%$) e TFA ($E_{m\acute{a}x} = 99,5 \pm 0,5 \%$), que atingiram o $E_{m\acute{a}x}$ a $729 \mu\text{g/mL}$.

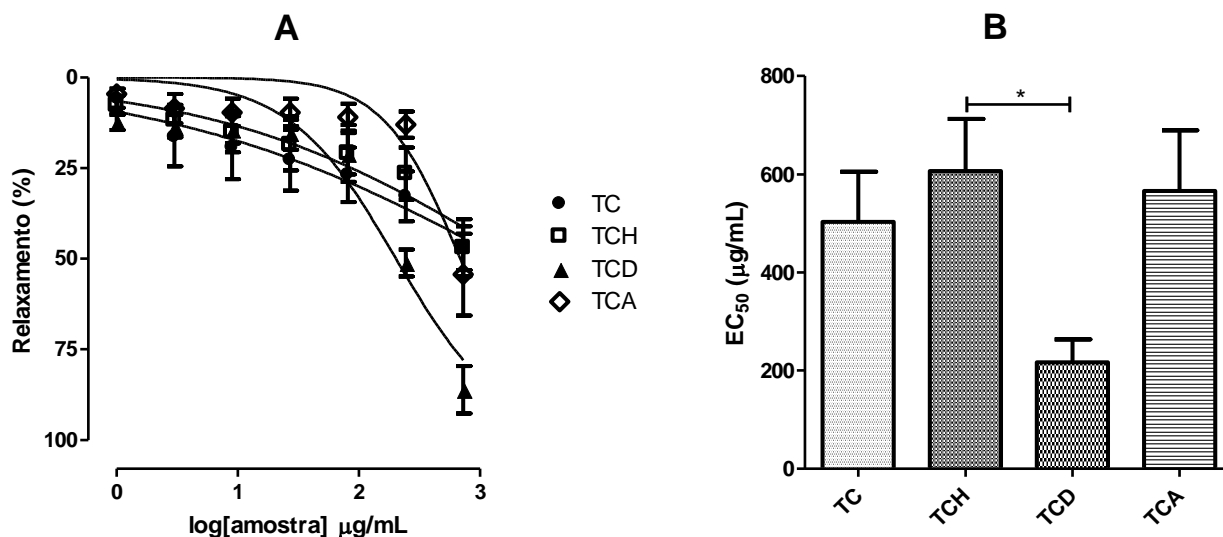
Figura 20 – Relaxamento dos anéis de traqueia isolada de cobaia, contraídos com carbacol $1 \mu\text{M}$, induzidos pelo extrato e frações das folhas de *L. thymoides*.



A, curvas concentração-resposta do extrato e frações; **B**, valores de CE_{50} do extrato e frações das folhas. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa valores de CE_{50} que apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$) em comparação com TF; a comparação entre as frações não apresentou diferença estatística. TF, extrato metanólico das folhas; TFH, fração hexano de TF; TFD, fração diclorometano de TF; TFA, fração acetato de etila de TF.

Da mesma maneira que o extrato e frações da folha, TC ($CE_{50} = 502,9 \pm 102,4 \mu\text{g/mL}$ e $E_{m\acute{a}x} = 47,1 \pm 6,1 \%$), TCH ($CE_{50} = 606,5 \pm 105,9 \mu\text{g/mL}$ e $E_{m\acute{a}x} = 57,6 \pm 12,2 \%$), TCD ($CE_{50} = 217,3 \pm 46,0 \mu\text{g/mL}$ e $E_{m\acute{a}x} = 86,1 \pm 6,6 \%$) e TCA ($CE_{50} = 565,8 \pm 123,4 \mu\text{g/mL}$ e $E_{m\acute{a}x} = 54,4 \pm 11,3 \%$) relaxaram os anéis de traqueia de maneira dependente da concentração (**Figura 21A**), porém com potência e eficácia inferior. Quando se compara os valores de CE_{50} obtidos para o extrato e frações dos caules, observa-se que TCD destaca-se como mais potente (**Figura 21B**).

Figura 21 – Efeito espasmolítico do extrato e frações dos caules de *L. thymoides* sobre as contrações tônicas induzidas com carbacol 1 μ M em traqueia isolada de cobaia.



A, curvas concentração-resposta do extrato e frações; **B**, valores de CE_{50} do extrato e frações dos caules. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$); * representa valores de CE_{50} que apresentaram diferença estatisticamente significativa (ANOVA, $p < 0,05$). TC, extrato metanólico dos caules; TCH, fração hexano de TC; TCD, fração diclorometano de TC; TCA, fração acetato de etila de TC;

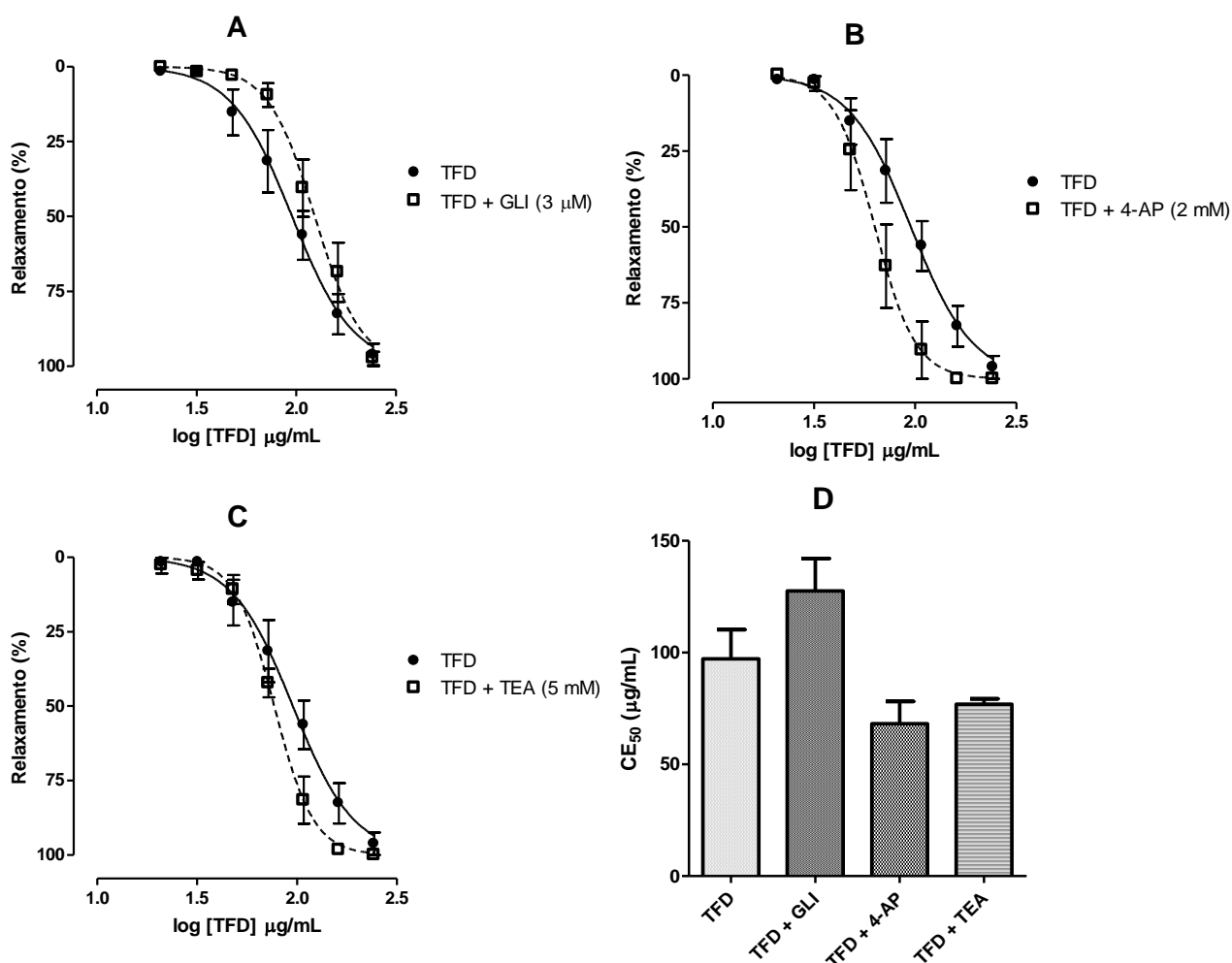
Por meio da análise pelo test t de Student, observou-se que TFH, TFD e TFA foram significativamente ($p < 0,05$) mais potentes do que as frações equivalentes do extrato dos caules. Apesar de não haver diferença estatística entre os valores de CE_{50} das frações das folhas (ANOVA, $p > 0,05$), TFD foi a única amostra que relaxou 100 % os anéis de traqueia pré-contraídos com CCh, na concentração de 243 μ g/mL, sendo esta fração escolhida para uma investigação do possível mecanismo de ação que induz relaxamento do músculo liso de traqueia. Pelo fato de TFD promover 100 % do relaxamento da traqueia numa faixa estreita de concentrações, nos experimentos a seguir utilizou-se as concentrações 21, 32, 48, 72, 108, 162 e 243 μ g/mL.

4.8.3.2 Investigação da participação de canais para K^+ no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A fração TFD relaxou, de maneira dependente da concentração, os anéis de traqueia isolada de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M na ausência ($CE_{50} = 97,2 \pm 13,0$ μ g/mL) e presença dos bloqueadores dos canais para potássio GLI ($CE_{50} = 127,5 \pm 14,5$ μ g/mL), 4-AP

($CE_{50} = 68,2 \pm 9,9 \mu\text{g/mL}$) e TEA ($CE_{50} = 76,9 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$), como pode ser observado na **Figura 22**, porém sem diferença significativa (teste t , $p > 0,05$) entre os valores de CE_{50} . Em todos os casos, a eficácia de TFD foi mantida, sendo obtido o relaxamento de 100 % na concentração 243 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 22 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μM , induzido por TFD na ausência ou presença de glibenclamida (GLI, **A**), 4-aminopiridina (4-AP, **B**) e tetraetilamônio (TEA, **C**). **D**, comparação entre os valores de CE_{50} de TFD obtidos na ausência ou presença dos bloqueadores GLI, 4-AP e TEA.

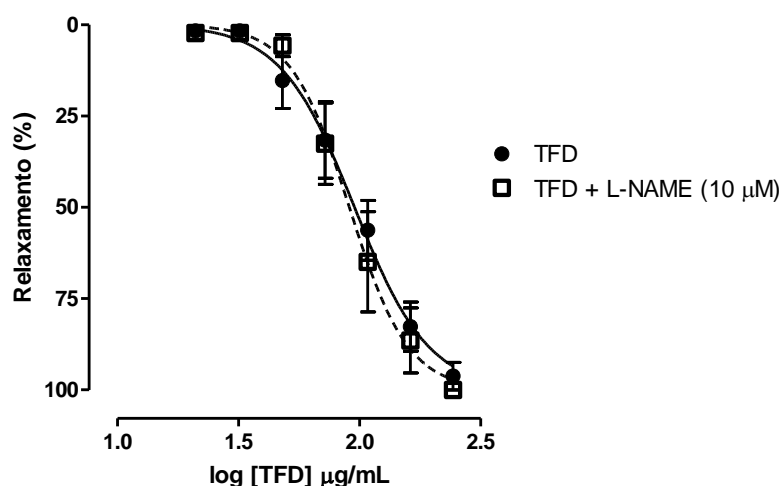


Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$). TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas.

4.8.3.3 Investigação da participação da via do NO no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A fração TFD promoveu um relaxamento dependente da concentração em anéis traqueais isolados de cobaia pré-contraídos com CCh 1 μ M, na ausência ($CE_{50} = 97,2 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$) e presença ($CE_{50} = 96,0 \pm 15,4 \mu\text{g/mL}$) de L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), com a obtenção de valores de CE_{50} que não foram estatisticamente diferentes (teste t , $p > 0,05$) entre si (**Figura 23**). Também, TFD manteve sua eficácia induzindo 100 % do relaxamento na presença de L-NAME à concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 23 – Efeito espasmolítico de TFD sobre as contrações tônicas de anéis de traqueia pré-contraído com carbacol 1 μ M, na ausência ou presença de L-NAME.



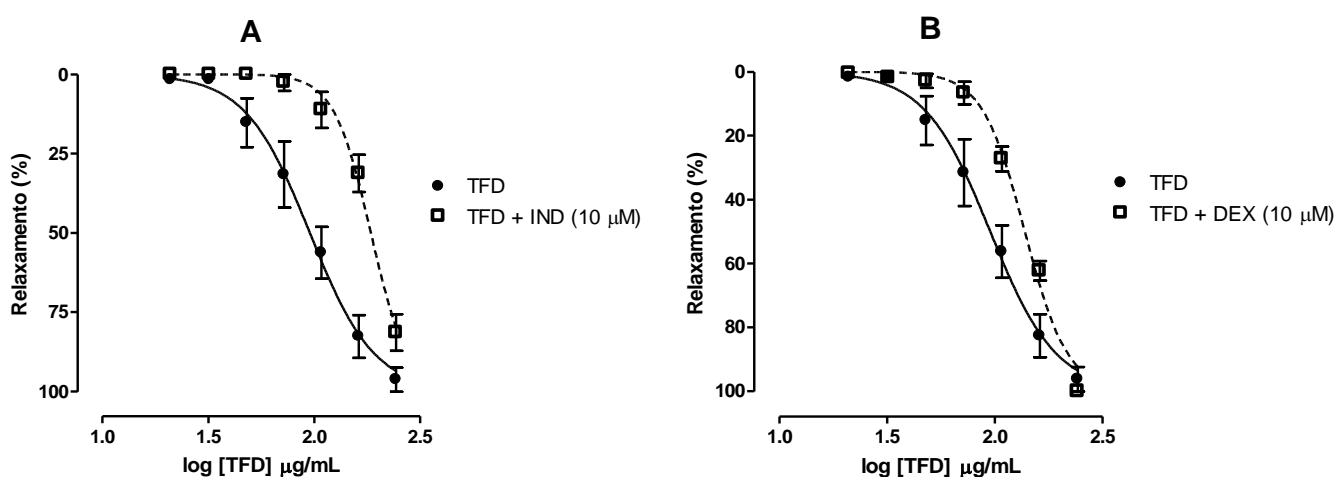
Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$). TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; L-NAME, N^G -nitro-L-arginina metil Ester.

4.8.3.4 Investigação da participação das prostaglandinas no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

O relaxamento do músculo liso traqueal induzido por TFD, de maneira dependente da concentração, não alcançou 100 % a 243 $\mu\text{g/mL}$ em contrações induzidas por CCh 1 μ M na presença de indometacina (IND), com $E_{\text{máx}} = 81,4 \pm 5,8 \%$, diferentemente do observado na ausência desse inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase (**Figura 24A**). Da mesma maneira,

houve uma redução significativa (teste t , $p < 0,05$) da potência de TFD, com o CE_{50} passando de $97,2 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$ na ausência, para $185,2 \pm 9,6 \mu\text{g/mL}$ na presença de IND. Porém, quando se induziu a contração dos anéis de traqueia na presença de dexametasona (DEX), seguido da adição cumulativa de TFD (21 a $243 \mu\text{g/mL}$) na fração tônica, houve relaxamento total do músculo liso traqueal a $243 \mu\text{g/mL}$, com o valor de CE_{50} ($138,2 \pm 4,8 \mu\text{g/mL}$) não sendo diferente estatisticamente (teste t , $p > 0,05$) do observado na ausência de DEX (**Figura 24B**).

Figura 24 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol $1 \mu\text{M}$, induzido por TFD na ausência ou presença de indometacina (**A**) e dexametasona (**B**).

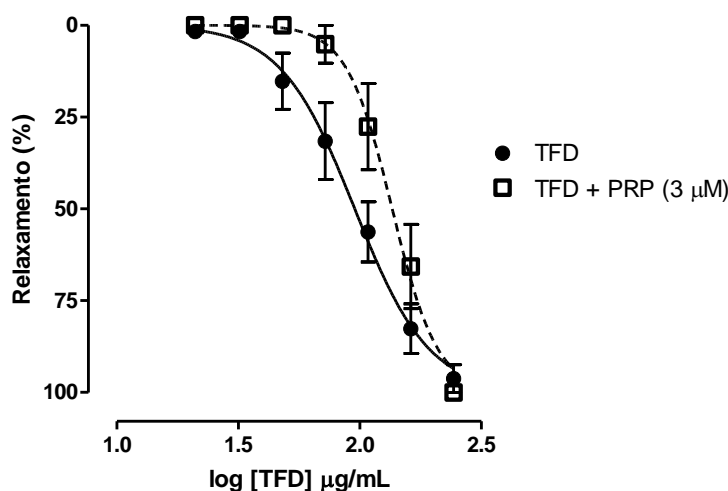


Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$ a 5). TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; IND, indometacina; DEX, dexametasona.

4.8.3.5 Investigação da participação de receptores β -adrenérgicos no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A fração TFD induziu o relaxamento do músculo liso traqueal pré-contraído com CCh $1 \mu\text{M}$, de maneira dependente da concentração, na presença do antagonista β -adrenérgico não seletivo propranolol (PRP, $CE_{50} = 132,5 \pm 13,1 \mu\text{g/mL}$), conforme apresentado na **Figura 25**, que não foi diferente estatisticamente (teste t , $p > 0,05$) do relaxamento observado na ausência do bloqueador ($CE_{50} = 97,2 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$). Ainda, o $E_{\text{máx}}$ não foi alterado na presença de PRP, alcançando 100 % de relaxamento a $243 \mu\text{g/mL}$.

Figura 25 – Efeito espasmolítico de TFD sobre a fração tônica da contração induzida por carbacol 1 μM na presença ou ausência de propranolol.

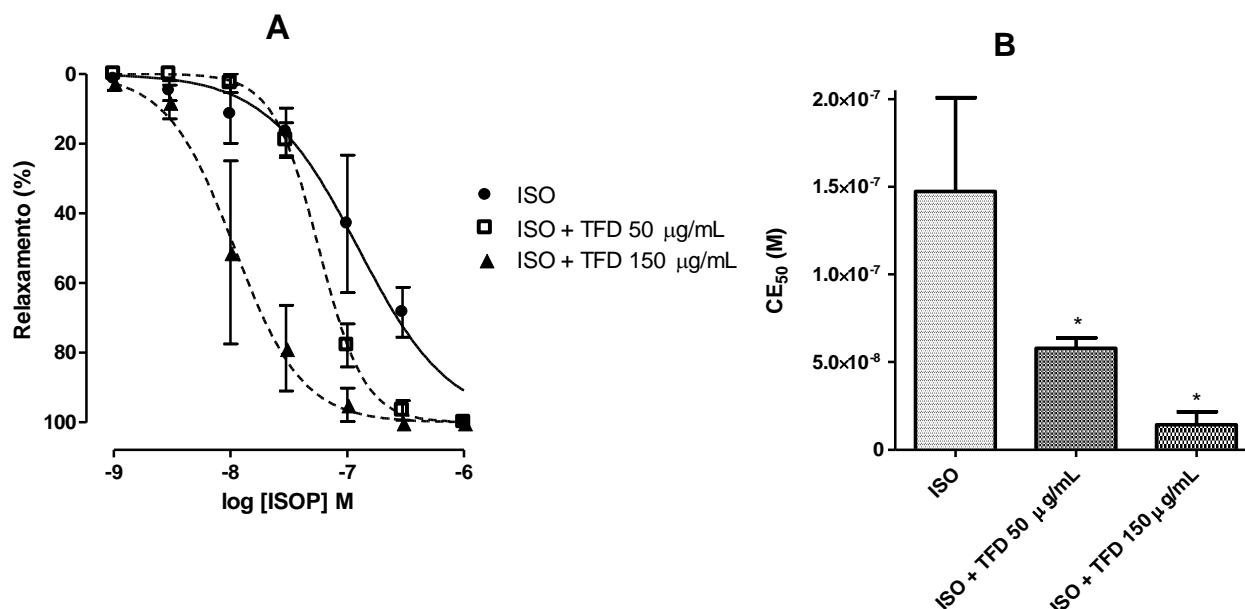


Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 5$). TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; PRP, propranolol.

4.8.3.6 Investigação da participação da via do AMPc no relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

O relaxamento do músculo liso traqueal, após contração induzida com CCh 1 μM , provocado pela adição cumulativa de isoprenalina (10^{-9} a 10^{-6} M), com CE_{50} de $14,7 \pm 5,3 \times 10^{-8}$ M, apresentou diferença significativa (teste t , $p < 0,05$) das preparações pré-incubadas com TFD 50 e 150 $\mu\text{g/mL}$, com valores de CE_{50} de $5,8 \pm 0,6 \times 10^{-8}$ e $1,4 \pm 0,7 \times 10^{-8}$ M, respectivamente (**Figura 26**). Ainda, observa-se um claro deslocamento da curva contração-resposta de ISO pré-incubada com TFD 150 $\mu\text{g/mL}$ para a esquerda, indicando potencialização do efeito de relaxante de isoprenalina.

Figura 26 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μM , induzido por isoprenalina na ausência ou presença de TFD 50 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$.

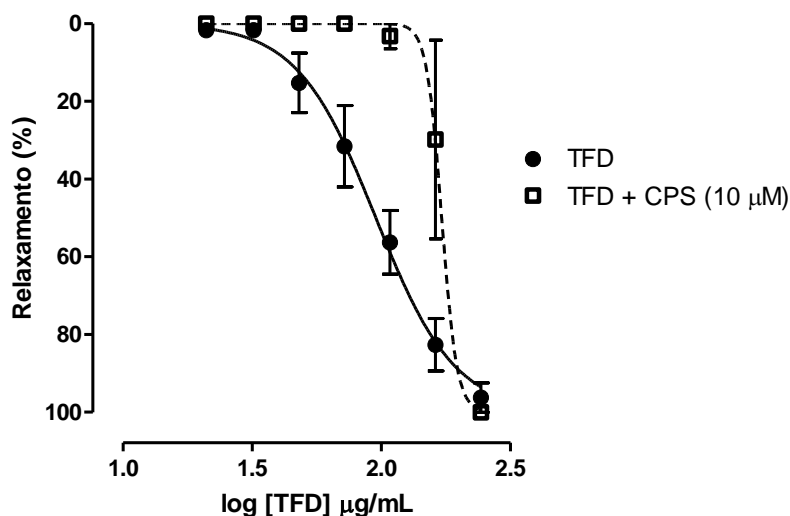


A, curvas concentração resposta de ISO e **B**, comparação entre os valores de CE_{50} obtidos, ambos sendo plotados na presença ou ausência de TFD. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$). * representa valores de CE_{50} que apresentaram diferença estatisticamente significativa (teste t , $p < 0,05$) em comparação com ISO. TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; ISO, isoprenalina.

4.8.3.7 Investigação da dessensibilização das fibras C sobre o relaxamento induzido por TFD em traqueia pré-contraída com CCh

A contração induzida por CCh 1 μM nos anéis de traqueia dessensibilizados pela incubação prévia com 10 μM de capsaicina (CPS), um agonista de receptores vanilóides, reduziu aos valores basais com a adição cumulativa de TFD (21 a 243 $\mu\text{g/mL}$), de maneira dependente da concentração (**Figura 27**). Porém, houve um aumento do valor de CE_{50} de $97,2 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$ na ausência de CPS, para $173,6 \pm 22,2 \mu\text{g/mL}$ na presença, que foram significativamente diferentes (teste t , $p < 0,05$).

Figura 27 – Relaxamento dos anéis de traqueia, pré-contraído com carbacol 1 μM , induzido por TFD na ausência ou presença de CPS.

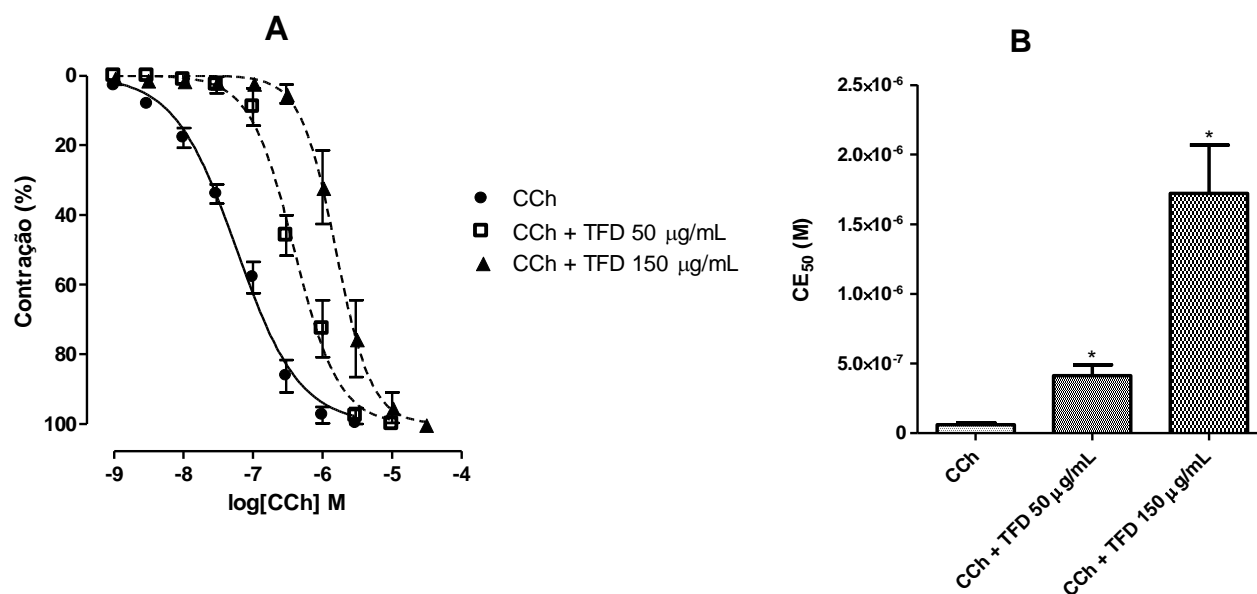


Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 3$ a 5). TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; CPS, capsaicina.

4.8.3.8 Investigação do antagonismo muscarínico na contração induzida por CCh em traqueia pré-incubada com TFD

A adição cumulativa de CCh (10^{-9} a 3×10^{-5} M) às preparações de anéis de traqueia isolada de cobaia provocou contrações do músculo liso, dependente da concentração, que foram antagonizadas com a prévia adição de TFD às cubas, sendo evidenciado no deslocamento das curvas concentração-resposta para a direita (**Figura 28A**). Houve redução da potência do CCh quando as contrações eram induzidas na presença de TFD 50 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CE}_{50} = 41,2 \pm 7,8 \times 10^{-8}$ M) e 150 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{CE}_{50} = 172,2 \pm 34,8 \times 10^{-8}$ M), com ambos apresentando diferença estatística (teste t , $p < 0,05$) em relação ao valor de CE_{50} ($6,2 \pm 1,1 \times 10^{-8}$ M) obtido na ausência da fração diclorometano (**Figura 28B**). Pelo fato de não haver redução do efeito máximo do CCh, sendo obtido contração de 100 % na ausência ou presença de TFD, pode-se inferir que possivelmente houve um antagonismo competitivo.

Figura 28 – Contração dos anéis de traqueia induzida por carbacol na ausência ou presença de TFD 50 $\mu\text{g/mL}$ e 150 $\mu\text{g/mL}$.



A, curvas concentração resposta de CCh e **B**, comparação entre os valores de CE_{50} obtidos, ambos sendo plotado na presença ou ausência de TFD. Os dados estão apresentados como média \pm e.p.m. ($n = 4$); * representa valores de CE_{50} que apresentaram diferença estatisticamente significante (teste t , $p < 0,05$) em comparação com CCh. TFD, fração diclorometano do extrato metanólico das folhas; CCh, carbacol.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado, através de estudos químicos e farmacológicos, o potencial biotecnológico da espécie *Lippia thymoides*, tendo como objeto de estudo os óleos essenciais e os extratos metanólicos e frações das folhas e caules.

Os óleos essenciais das folhas, obtidos nas quatro estações do ano, tiveram como constituinte majoritário o sesquiterpeno β -cariofileno e pequenas variações nos demais constituintes. Estudos *in vitro* demonstraram que esses óleos não possuem atividade antioxidante, têm seletividade na atuação como antimicrobiano em bactérias Gram-positivas e induzem relaxamento dependente da concentração em aorta isolada de rato, útero isolado de rata e, em menor extensão, traqueia isolada de cobaia. Através de modelos animais de nocicepção, ficou evidenciado um possível efeito antinociceptivo e/ou anti-inflamatório do óleo essencial coletado na primavera.

Estudos *in vitro* mostraram que os extratos metanólicos e frações das folhas e caules de *L. thymoides* possuem potente atividade antioxidante, seletividade de ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e tem a capacidade de relaxar o músculo liso traqueal de cobaia, com um possível efeito anticolinérgico da fração diclorometano do extrato metanólico das folhas, corroborando com o uso popular para o tratamento da bronquite. Ainda, em modelos animais relacionados ao uso da planta na medicina popular, foi evidenciado que *L. thymoides* não possui efeito cicatrizante nas concentrações e via de administração testados e o extrato metanólico das folhas apresenta atividade antipirética, este sendo relacionado ao uso comum para o tratamento da febre.

Como acontece com uma grande parte das espécies do seu gênero, *L. thymoides* é uma planta com folhas aromáticas, rica em óleo essencial composto primordialmente por terpenos. Estes metabólitos secundários têm sua estrutura variada de acordo com a adição das unidades de isopreno (C_5H_8), sendo sintetizados nas plantas a partir de precursores da via do mevalonato, piruvato ou gliceraldeído 3-fosfato (PALLARDY, 2008). Os substratos iniciais para a biossíntese dos terpenos são dimetilalil difosfato, geranyl difosfato, farnesil difosfato e geranylgeranyl difosfato que darão origem, respectivamente, aos hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos ou diterpenos, por ação de enzimas pertencentes à família terpeno sintases. Induções na variação da expressão dessas enzimas são responsáveis pela variação do conteúdo de terpenos das plantas (THOLL, 2006).

Assim, vários estudos têm sido realizados na tentativa de identificar a variabilidade sazonal da composição química dos óleos essenciais de diversas espécies, na tentativa de estabelecer relações entre a composição química e variação ambiental (BARROS et al., 2009; CORONEL et al., 2006; MÜLLER-RIEBAU et al., 1997; SAYURI et al., 2010).

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Lippia* são constituídos quase que exclusivamente por terpenos e considerando-se que pode haver variação da constituição de acordo com as condições ambientais, procedeu-se a avaliação sazonal da composição química de *L. thymoides*, através de coletas em quatro períodos distintos, correspondendo às quatro estações climatológicas. Observou-se que em todas as amostras de óleo analisadas, o constituinte majoritário foi o sesquiterpeno β -cariofileno, com variações na concentração de acordo com a época da coleta, sendo encontrado em maior quantidade em TOI, que foi obtido no inverno.

Está bem estabelecido na literatura de que fatores abióticos, como incidência de chuvas, disponibilidade de água, radiação solar e stress induzido por ozônio, e bióticos, como presença de insetos, fungos e coexistência com outras plantas, podem alterar a produção e emissão dos componentes voláteis das plantas (LINDSKOG; POTTER, 1995; MAFFEI, M. E., 2010; ORMEÑO; FERNANDEZ; MÉVY, 2007). Com essa avaliação, observou-se que houve uma tendência de *L. thymoides* em sintetizar uma maior quantidade do sesquiterpeno β -cariofileno no inverno, enquanto que a produção desse composto foi menor no verão. Possivelmente, não só os fatores climáticos influenciaram a síntese desse constituinte, mas a inter-relação da planta com vários organismos em seu ambiente de sobrevivência.

De acordo com Barros et al. (2009), a biossíntese do β -cariofileno acontece pela ciclização do cátion difosfato de nerolidila entre C11-C1, associado à desprotonação do C9, levando à formação do α -humuleno; este, por sua vez, sofre ciclização, formação de uma ligação adicional entre C2-C10 e, por fim, desprotonação do C15. A enzima β -cariofileno sintase, isolada de *Artemisia annua*, é responsável pela ciclização do farnesil difosfato a β -cariofileno, sendo o α -humuleno formado em menor quantidade. A atividade dessa enzima é dependente de cátion divalente, preferencialmente o Mg^{+2} , e a expressão ocorre na maioria dos tecidos, exceto nas raízes (CAI et al., 2002).

A regulação da expressão da β -cariofileno sintase foi associada a vários fatores, principalmente os relacionados à defesa indireta da planta. Em *Mikania micrantha*, uma erva daninha invasiva, a expressão dessa enzima foi acentuada pelo aumento da concentração de CO_2 e quando a planta foi lesada, sendo ainda o β -cariofileno associado a efeito alelopático

sobre a germinação de sementes de várias espécies (WANG et al., 2010; WANG et al., 2010). Em diversas variedades de milho, a expressão de β -cariofileno sintase é induzida, de maneira independente, pela presença de insetos herbívoros tanto nas raízes quanto em demais partes da planta, sendo o β -cariofileno associado à atração de nematoides entomopatogênico e vespas (KÖLLNER et al., 2008). Dessa forma, a maior produção do β -cariofileno em *L. thymoides* pode estar relacionada à defesa contra insetos herbívoros ou à competição com outras plantas em seu habitat.

O padrão de constituição química dos óleos essenciais de *L. thymoides*, mesmo com as variações encontradas de acordo com a época da coleta, condiz com o observado nas espécies de *Lippia*. Os monoterpenos cânfora, borneol, 1,8-cineol e limoneno, presentes nos óleos em concentrações maiores que 4%, aparecem como majoritários, respectivamente, em *L. dulcis* (GÖRNEMANN et al., 2008), *L. integrifolia* (LIMA et al., 2011), *L. lupulina* (ZOGHBI et al., 2002) e *L. multiflora* (AVLESSI et al., 2005; MENUT et al., 1995b) e *L. rotundifolia* (LEITÃO et al., 2008), *L. scaberrima* (REGNIER et al., 2008) e *L. alba* (ZOGHBI et al., 1998).

Dentre as espécies de *Lippia* que possuem sesquiterpenos em meio aos constituintes majoritários dos óleos essenciais, o β -cariofileno aparece com percentual maior que 15 % em *L. chevalieri* (MEVY et al., 2007), *L. dulcis* (MORENO-MURILLO et al., 2010), *L. graveolens* (RIVERO-CRUZ et al., 2011), *L. myriocephala* (VILA et al., 2004), *L. nodiflora* (ELAKOVICH; STEVENS, 1985) e *L. substrigosa* (SILVA; SABINO; REYES, 2010).

Diante disso, percebe-se que os resultados da composição química dos óleos de *L. thymoides* apresentados neste trabalho corroboram com a quimiosistemática do gênero *Lippia*, cujas espécies poderão ser correlacionadas genotipicamente de acordo com o expressão das terpeno sintases através de estudos de biologia molecular.

Os poucos estudos que identificaram constituintes fixos de espécies de *Lippia* evidenciaram um padrão na presença de ácidos fenólicos, flavonoides e fenilpropanoides. Essas classes de metabólitos secundários pertencem a um dos grupos mais numerosos e largamente distribuídos de substâncias das plantas, que são os compostos fenólicos ou polifenóis, sendo provenientes das vias biossintéticas do chiquimato e acetato (BRAVO, 1998).

Uma das formas de quantificar o conteúdo total de fenóis nos extratos das plantas é a determinação fotocolorimétrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O mecanismo químico envolvendo esse método não está totalmente compreendido, mas acredita-se que há

uma redução do molibdênio, do estado superior de oxidação (Mo^{+6}), a estados inferiores de oxidação (Mo^{+5} ou Mo^{+4}), com a coloração da solução passando de amarelo para a azul e sendo acompanhado espectralmente e a intensidade da cor azul proporcional ao teor de compostos fenólicos (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Possivelmente, a alteração da oxidação do Mo^{+6} acontece devido à presença de grupos fenólicos ou outros componentes potencialmente oxidáveis presentes nos extratos (MIGUEL, 2010a).

Em *L. thymoides* constatou-se que o conteúdo de fenólicos totais foi significativamente maior nos extratos das folhas ($115,5 \pm 1,7$ EAG/g) do que dos caules ($85,5 \pm 4,4$ EAG/g). Ainda, houve concentração dos constituintes fenólicos nas frações orgânicas mais polares, como as obtidas com a partição líquido-líquido dos extratos metanólicos com acetato de etila (TFA = $182,8 \pm 2,4$ EAG/g e TCA = $213,6 \pm 6,1$ EAG/g). Os valores totais de fenólicos nas frações obtidas com diclorometano (TFD = $90,5 \pm 1,0$ EAG/g e TCA = $84,2 \pm 6,1$ EAG/g) podem refletir a presença de fenóis menos polares. Esses valores do conteúdo de fenóis totais são similares ou superiores a reconhecidas fontes de compostos fenólicos, como o chá verde, chá preto, repolho, cenoura, brócolis, maçã, amora e uva (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Apesar do conteúdo de fenólicos totais do extrato das folhas ser superior ao encontrado para o dos caules, relatos têm indicado que os compostos incluídos nesse grupo podem estar presentes em quaisquer dos órgãos das plantas (FALLEH et al., 2008; RIIHINEN et al., 2008).

Levando-se em consideração as características químicas dos compostos fenólicos, a natureza hidrofílica dessas moléculas indica que podem ser concentradas em extratos obtidos com solventes polares. (TSAO, 2010). Um estudo comparativo entre solventes utilizados para extração e o conteúdo total de fenólicos de *Camellia sinensis* e *Ilex paraguariensis*, foi verificado que os extratos obtidos a partir de solventes mais polares tinham o conteúdo total de fenólicos superior (TURKMEN; SARI; VELIOGLU, 2006). No processo de fracionamento e purificação de compostos fenólicos Dai e Mumper (2010) recomendam o tratamento do extrato bruto com solventes menos polares, como hexano, diclorometano ou clorofórmio, para a retirada de constituintes apolares e extração em fração sólida para a eliminação de compostos polares não fenólicos.

Através da comparação do conteúdo total de fenólicos apresentados nesse estudo com os metabólitos secundários presentes em outras espécies de *Lippia*, pode-se deduzir que *L. thymoides* pode conter flavonoides, ácidos fenólicos ou fenilpropanoides, com

concentração nas frações acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e caules.

O metabolismo regular das plantas, principalmente durante a fotossíntese, tem sido associado à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente o H_2O_2 formado pela enzima superóxido dismutase a partir do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A neutralização desses radicais livres geralmente é realizada nos cloroplastos, utilizando o ciclo de oxidação-redução do ascorbato. Porém, as plantas podem sofrer uma série de stress bióticos e abióticos e promover uma descompensação na neutralização dos ERO. Nesse ponto, os constituintes fenólicos têm sido associados à defesa das plantas no sentido de promover atividade antioxidante sobre o excesso de ERO produzido (SAKIHAMA et al., 2002).

Com essa consideração, vários trabalhos têm sido realizados na tentativa de correlacionar o conteúdo total de fenólicos, determinado através da utilização do reagente Folin-Ciocalteu, com a atividade antioxidante de extratos vegetais. O teor de fenólicos dos extratos obtidos com solventes polares apresentam valores mais elevados e estes são mais potentes como antioxidantes (ALMEIDA et al., 2011; LIANG; YUE; LI, 2010; STANKOVIC et al., 2012; TAWAHA et al., 2007).

Outros trabalhos, contudo, demonstraram que a atividade antioxidante pode não estar relacionada aos compostos fenólicos, tendo outros componentes, como óleos essenciais, vitaminas, carotenoides, etc., uma participação significativa do potencial antioxidante das espécies vegetais testadas (JAVANMARDI et al., 2003; KÄHKÖNEN et al., 1999; TERPINC et al., 2012). Por isso, além dos extratos metanólicos e frações das folhas e caules de *L. thymoides*, foi analisada a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais obtidos.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que os óleos essenciais da planta em estudo não apresentaram atividade antioxidante significativa, ao contrário do que foi demonstrado com os extratos e frações das folhas e caules. Com exceção das frações TFH e TCH, que apresentaram baixo teor de fenólicos, os extratos metanólicos e demais frações das folhas e caules tiveram a atividade antioxidante no ensaio de DPPH que não foi diferente estatisticamente dos controles positivos BHT, BHA e ácido ascórbico e foi diretamente relacionada aos valores de fenóis totais obtidos.

Na avaliação da capacidade antirradicalar, amostras são deixadas reagir com o radical estável DPPH \bullet , que apresenta coloração violácea intensa e forte absorção a 515 nm. Caso as amostras contenham substâncias capazes de sequestrar radicais livres pela doação de prótons ou elétrons ao radical DPPH \bullet , a absorbância é reduzida de maneira estequiométrica em relação ao número de elétrons retirados ou estabilizados, promovendo descoloração da

solução (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Na presença de uma molécula com capacidade de sequestrar o radical DPPH•, a doação de prótons a esse pode promover a formação de um novo radical proveniente do composto antioxidante (A•). Se A• não é totalmente estabilizado, inúmeras outras reações podem acontecer, sendo necessária uma nova reação para estabilização desse novo radical formado (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997).

Considerando os mecanismos químicos envolvidos no sequestro do radical DPPH•, supõe-se que a atividade antioxidante de extratos vegetais pode estar relacionada à presença de substâncias com grupos hidroxila livres, como compostos fenólicos (MENSOR et al., 2001). A reação do DPPH• com os fenóis (ArOH) ocorre através da doação do próton H ou a transferência de elétrons de ArOH ou seu ânion fenóxido (ArO⁻) ao DPPH•. A contribuição de uma ou outra via depende da natureza do solvente e/ou potencial redox das espécies envolvidas, sendo que na presença de solventes apolares a primeira reação é favorecida enquanto que a segunda é potencializada por solventes capazes de formar ligações de hidrogênio com ArOH e grande número de hidroxilas nos compostos fenólicos (VILLAÑO et al., 2007).

A partir da análise química dos óleos essenciais de *L. thymoides* e correlacionado com as características químicas do ensaio de sequestro de DPPH•, pode-se explicar a baixa potência e eficácia antirradicalar daqueles pelo fato da escassez de constituintes fenólicos. Apesar dos monoterpenos oxigenados estarem em maior proporção do que os não oxigenados, as estruturas químicas dos primeiros não favorecem a doação de prótons ou a transferência de elétrons para o DPPH•, sendo que o único composto fenólico, o timol, possui apenas uma hidroxila livre e aparece com menos de 1 % nos em todos os óleos.

O óleo essencial de *L. gracilis*, de maneira similar, apresentou atividade antioxidante relativamente baixa, com CI₅₀ de 162.2 µg/mL no ensaio de DPPH•, que pode ser explicado pelo fato de que timol, metil timol e carvacrol, que são fenóis, apenas representaram cerca de 50 % da constituição do óleo (MENDES et al., 2010). Relatos envolvendo óleos essenciais de espécies distintas de *Lippia* corroboram com a explicação de que hidroxilas fenólicas, presentes dos constituintes dos óleos essenciais, são importantes para o sequestro de radicais DPPH• (BOZIN et al., 2006; KULISIC et al., 2004; SACCHETTI et al., 2005).

Correlacionando o conteúdo de fenólicos dos extratos e frações das folhas e caules da planta estudada com a capacidade de sequestro do DPPH•, pode-se inferir que possivelmente

a potência e eficácia antioxidante das frações mais polares, como TFA e TCA, estão relacionadas à presença de constituintes fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides.

Esses achados foram semelhantes ao descrito para *L. graveolens*, em que o potencial antioxidante dessa espécie foi condizente com alto teor fenólico dos extratos metanólicos testados (MARTÍNEZ-ROCHA et al., 2008). Da mesma maneira, Hennebelle et al. (2008) identificaram flavonoide e feniletanoides, mas não iridoides, como constituintes de *L. alba* que apresentaram capacidade em sequestrar o DPPH•. Em *L. triphylla*, a atividade antioxidante foi mais potente entre os ácidos fenólicos, isolados a partir do extrato metanólico (ONO et al, 2008). Outras espécies com atividade antioxidante no ensaio do DPPH• relatada foram *L. citriodora* (MOTHANA et al., 2010), *L. hermannioides*, *L. rubella* e *L. sidoides* (FABRI et al., 2011) e *L. microphylla* (DAVID et al., 2007).

Outro método que foi utilizado para avaliar o potencial antioxidante de *L. thymoides* referiu-se à capacidade dos óleos essenciais, extratos ou frações orgânicas da planta em sequestrar ou neutralizar os radicais peróxido formado do ácido linoleico em emulsão. Esses radicais atacam as ligações duplas do β -caroteno e, conseqüentemente, induzem a perda de sua coloração laranja, mas a presença de um agente antioxidante pode prevenir este ataque e manter a colocação do carotenoide (MIGUEL, 2010b).

Como a realização dessa técnica envolve a formação de uma emulsão óleo em água, a capacidade de uma substância em evitar a oxidação do β -caroteno deveria ser mais eficaz entre os antioxidantes menos polares, seguindo a teoria do paradoxo polar (KOLEVA et al., 2002). Essa teoria parte do princípio em que a oxidação lipídica acontece nas interfaces dos sistemas, com os antioxidantes não polares sendo acumulados nas gotículas lipídicas e/ou na interface óleo-água e os que apresentam características mais polares são mais efetivos em óleos, pelo fato de acumularem-se na interface óleo-ar onde há uma alta concentração de oxigênio (MCCLEMENTS; DECKER, 2000).

Contrariando a teoria do paradoxo polar, vários trabalhos têm demonstrado que as características físico-químicas dos antioxidantes, que determinam a inibição ou estabilização da oxidação lipídica, não dependem apenas da polaridade, mas uma série de fatores como concentração do constituinte, temperatura, características do sistema teste, dentre outros (CHAIYASIT; MCCLEMENTS; DECKER, 2005; SCHWARZ et al., 2000; ZHONG; SHAHIDI, 2012).

A demonstração de que as frações menos polares TFH ($31,7 \pm 3,2$ %) e TFD ($29,3 \pm 6,0$ %) apareceram dentre as mais efetivas na inibição da auto-oxidação do β -caroteno

atende ao disposto na teoria do paradoxo polar. Caso os óleos essenciais tivessem algum constituinte com atividade antioxidante, nesse ensaio apareceria com maior eficácia, o que não foi observado. Um fato surpreendente foi a inibição da auto-oxidação do β -caroteno pela fração TFA ($37,9 \pm 4,1$ %), já que esta deve, teoricamente, possuir uma maior concentração de constituintes polares.

A combinação dos resultados de fenóis totais, sequestro dos radicais DPPH• e inibição da oxidação do β -caroteno demonstra que a fração TFA pode conter constituintes fenólicos que são capazes de estabilizar radicais já formados e prevenir a oxidação provocada por peróxidos lipídicos. Levando-se em consideração apenas o fator polaridade, pode-se deduzir que o(s) constituinte(s) antioxidante(s) de TFA pode(m) apresentar característica anfifílica, interagindo tanto com a parte apolar quanto polar do agente emulsificante Tween 40 utilizado para formar a emulsão.

Pelo fato de haver um crescente interesse na identificação de antioxidantes de origem natural para utilização em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (NUNES et al., 2012), ressalta-se a importância desse trabalho na identificação de *L. thymoides*, uma espécie nativa e endêmica da caatinga, como uma possível fonte de metabólitos secundários de interesse econômico.

A associação entre a função de defesa que os metabólitos secundários desempenham com a necessidade da identificação de novas moléculas com potencial antimicrobiano, indica que as plantas podem se tornar fontes de substâncias de interesse médico. A confirmação dessa observação reside no fato de que vários constituintes provenientes de plantas utilizadas na medicina popular são empregados no tratamento de infecções (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003; SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2008). Vários metabólitos têm sido indicados como fontes de agentes antimicrobianos, como alcaloides, compostos fenólicos, terpenos e óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004).

A utilização de informações obtidas na medicina popular tem sido utilizada como uma forma de rastrear possíveis plantas de interesse farmacológico na terapêutica antimicrobiana, especialmente quando se refere aos dados obtidos de pesquisas brasileiras (SOUZA et al., 2004). Nesse sentido, como a espécie *L. thymoides* é utilizada popularmente no tratamento de feridas, foi realizado uma investigação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, extratos e frações das folhas e caules frente a bactérias e fungos.

Neste trabalho foi demonstrado que os óleos essenciais TOO e TOP foram os mais eficazes contra *Staphylococcus aureus* CCMB 262, apresentando efeito bactericida, enquanto

que contra *Micrococcus luteus* CCMB 283 apenas inibiram o crescimento, sendo esse efeito observado também com TOV.

Como o sesquiterpeno β -cariofileno é o constituinte majoritário em todos os óleos, provavelmente esse constituinte parece não ser o principal responsável pelo efeito antimicrobiano, já que TOI não foi eficaz em quaisquer dos micro-organismos testados e esse óleo é o que apresenta maior concentração do β -cariofileno. O contrário foi observado para TOV, já que este foi o único a apresentar efeito em dois micro-organismos e possui a menor concentração do β -cariofileno. Porém, relatos têm demonstrado a importância desse constituinte para atividade antimicrobiana, como o óleo essencial de *Zingiber nimmonii*, que contém aproximadamente 70 % de uma mistura de α - e β -cariofileno e foi eficaz na inibição de fungos e bactérias Gram-positiva e negativa (SABULAL et al., 2006). Outro estudo demonstrou que o β -cariofileno pode atuar na defesa das plantas que o produz, pois apresentou atividade antimicrobiana contra o fitopatógeno *Pseudomonas syringae* (HUANG et al., 2012).

Como houve diferença de atividade antimicrobiana entre os óleos de *L. thymoides*, a possível explicação pode estar na variação na composição e concentração dos constituintes dos óleos. Essa afirmação pode ser corroborada com os resultados obtidos a partir de óleos essenciais ricos em germacreno D, cânfora, borneol e canfeno, que demonstraram serem eficazes contra fungos e bactérias Gram-positivas e negativas (ALVA et al., 2012; CÁRDENAS et al., 2012; WANG; KONG; ZHANG, 2006).

O mecanismo pelo qual os óleos essenciais podem inibir o crescimento ou eliminar os micro-organismos envolvem diferentes formas de ação, sendo em parte devido às suas características hidrofóbicas. Como resultado disso, os constituintes dos óleos podem atravessar a membrana plasmática e se ligar a componentes celulares essenciais para a vida dos micro-organismos (EDRIS, 2007). Estudos têm demonstrado que alguns monoterpenos promovem desorganização da membrana lipídica das bactérias, sendo dependente da diferença de carga da membrana bacteriana, o que sugere que o mecanismo envolve a interação com componentes críticos (CRISTANI et al., 2007; TROMBETTA et al., 2005). Da mesma maneira, os sesquiterpenoides são sugeridos como compostos que causam aumento na permeabilidade da membrana, facilitando que outros agentes antimicrobianos penetrem na célula e provoquem o efeito biocida (KURODA; NAGASAKI; OHTA, 2007).

Os óleos essenciais de várias espécies de *Lippia* têm sido relatados como potenciais fontes de compostos antimicrobianos, apresentando tanto efeitos bacteriostáticos quanto

bactericidas em micro-organismos Gram-positivos e negativos (ALBUQUERQUE et al., 2006; BASSOLE et al., 2003; MEVY et al., 2007; OHNO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Outro aspecto relevante de óleos voláteis de *Lippia* ricos em monoterpenos corresponde à Potencialização de fármacos antimicrobianos, provavelmente devido à desorganização da membrana plasmática das bactérias, permitindo que aqueles a atravessem com maior facilidade (VERAS et al., 2011; VERAS et al., 2012).

O extrato TF não apresentou efeito considerado significativo e TC apenas inibiu crescimento de *S. aureus* CCMB 262. Diferentemente, as frações TFD, TFA, TCD e TCA foram potentes contra as duas cepas de *S. aureus* (CCMB 262 e 263) e *Bacillus cereus* CCMB 282. Apenas TFD apresentou considerável atividade fungicida contra *Candida parapsilosis* CCMB288.

As frações que apresentaram significativa atividade antimicrobiana foram as que demonstraram maior teor de fenóis totais, indicando uma correlação entre a presença dessas classes de metabólitos secundários com o efeito sobre micro-organismos. Os compostos fenólicos possuem um amplo espectro de ação sobre bactérias e fungos, apresentando como alvos de ação desde a membrana plasmática dos micro-organismos a inativação de enzimas essenciais em processos metabólicos essenciais (COWAN, 1999).

Os flavonoides, que são os constituintes fixos encontrados em espécies de *Lippia*, apresentam variados mecanismos de ação como inibição da síntese de ácidos nucleicos, alteração da função da membrana plasmática e inibição do metabolismo energético (CUSHNIE; LAMB, 2005). As naftoquinonas, outra classe de metabólito de importância no gênero *Lippia*, têm sido demonstradas como moléculas com atividade antimicrobiana, provavelmente formando complexo com enzimas citoplasmáticas ou adesinas presentes na parede celular bacteriana (MACHADO et al., 2003).

Devido ao gênero *Lippia* se constituir de plantas aromáticas, ricas em óleos essenciais, há uma concentração dos estudos de atividade antimicrobiana nesses compostos. Os poucos estudos que visaram a avaliação do potencial dos constituintes fixos sobre bactérias e fungos demonstraram que não só os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana, mas também extratos obtidos de técnicas fitoquímicas convencionais, como os obtidos de *L. alba* e *L. sidoides* (AGUIAR et al., 2008; FABRI et al., 2011).

Os dados apresentados nesse trabalho identificam a espécie *L. thymoides* como uma possível fonte de compostos com atividade antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram-positivas. *S. aureus* é um patógeno oportunista que coloniza a pele e mucosas de maneira assintomática em humanos normais e é a principal causa de infecções de feridas

cutânea, quando as barreiras físicas são violadas (O'RIORDAN; LEE, 2004). *M. luteus* também é uma bactéria que vive na pele humana e raramente provoca doenças infecciosas como artrite séptica, meningite ou endocardite (MILTIADOUS; ELISAF, 2011). *B. cereus* é a mais comum bactéria formadora de esporos que está presente em solos e ambientes de produção de alimentos. Dentre as infecções que pode provocar, encontram-se meningite, infecções do trato respiratório, cutâneas, intestinais, urinárias entre outras (BOTTONNE, 2010). *C. parapsilosis* é um fungo comensal da pele humana, com patogenicidade limitada na pele intacta. Está entre os principais fungos que causam infecções invasivas, como endocardite, meningite, peritonite dentre outras, mas também pode provocar onicomicoses (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

Assim, a atividade antimicrobiana *in vitro* de *L. thymoides* condiz com a utilização popular da espécie no tratamento de infecções cutâneas provocadas principalmente por bactérias. A seletividade de ação dos óleos e frações dos extratos testados sobre bactérias Gram-positivas indica que a morfologia dos micro-organismos influencia drasticamente a atividade antimicrobiana e, provavelmente, a presença da membrana externa exclusivamente nas bactérias Gram-negativas influenciou a ação de *L. thymoides* sobre essas.

Seguindo o objetivo de correlacionar o uso popular de *L. thymoides* com dados experimentais, testou-se o potencial dos extratos TF e TC em estimular a cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Observou-se que, nas concentrações testadas, não houve diferença significativa entre os animais tratados com a tintura dos extratos e os que receberam apenas o veículo.

O processo de cicatrização de feridas agudas, como lesões traumáticas, queimaduras ou feridas criadas cirurgicamente, envolve três fases: (1) fase inflamatória, com duração de minutos a dias, envolve a resposta vascular caracterizada pela coagulação sanguínea e hemostasia, incluindo também as repostas celulares como a infiltração leucocitária e liberação de citocinas; (2) fase proliferativa, com duração de dias a semanas, envolve a formação do epitélio para cobrir o ferimento e do tecido de granulação, com proliferação dos fibroblastos, deposição de matriz extracelular e desenvolvimento de novos vasos sanguíneos; e (3) fase de remodelamento, com duração de semanas a meses, envolve a restauração da integridade estrutural e funcional do tecido (KISSELEVA; BRENNER, 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

Como o interesse estava em avaliar a influência dos extratos de *L. thymoides* em acelerar o processo cicatricial, decidiu-se investigar a ação desses sobre a fase proliferativa, através da determinação da deposição de colágeno após 14 e 21 dias de tratamento dos

animais. A análise dos cortes histológicos e comparação dos grupos tratados com os extratos e controle negativo não evidenciou diferença estatística, demonstrando que *L. thymoides* não possui efeito indutor sobre os fibroblastos na deposição da matriz extracelular.

Contrariamente, várias espécies que são utilizadas na medicina popular para o tratamento de feridas apresentaram efeito sobre modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Schmidt et al. (2009) mostraram que espécies popularmente usadas influenciam pelo menos um dos processos envolvidos na cicatrização de feridas, como apoptose, migração de fibroblastos, liberação do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), dentre outros. A confirmação experimental do uso popular de *Arrabidaea chica* foi determinada pelo estímulo da produção de colágeno e da migração de fibroblastos *in vitro*, sendo sustentado pelo aumento da área de deposição de colágeno *in vivo* (JORGE et al., 2008).

Por outro lado, a liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por neutrófilos durante a fase inflamatória tem função primordial na defesa contra micro-organismos. Porém, o excesso de ERO pode oprimir os inibidores de protease que normalmente protegem as células e matriz extracelular. Por isso a utilização de agentes que atuem como antioxidantes podem auxiliar o processo cicatricial, pela redução dos danos provocados pelas ERO (HOUGHTON et al., 2005).

A partir da correlação dos dados obtidos do ensaio de DPPH com a cicatrização de ferida cutânea em ratos, pode-se observar que, apesar da potência de TF e TC em sequestrar radicais livres, não houve acentuação da deposição de colágeno. Isso indica que a atividade antioxidante de *L. thymoides* não influencia na cicatrização de feridas ou não é suficiente, na concentração testada, para neutralizar o excesso de ERO formado pela infiltração de neutrófilos.

Outro aspecto que pode melhorar a cicatrização é a diminuição ou eliminação de micro-organismos nas feridas. Os extratos TF e TC não apresentaram atividade antimicrobiana significativa, mas suas respectivas frações diclorometano (TFD e TCD) e acetato de etila (TFA e TCA) foram eficazes contra patógenos que comumente provocam infecções cutâneas. Diante disso, pode-se inferir que a utilização de *L. thymoides* na medicina popular, indicada para o tratamento de feridas, pode estar relacionada ao efeito antisséptico ou inibidor da proliferação de micro-organismos no local do ferimento e não ao estímulo da cicatrização pela indução dos fibroblastos e deposição de colágeno.

A espécie *L. thymoides* também é indicada na medicina popular para tratar estados febris. Levando-se em consideração essa informação, desenvolveu-se o modelo de febre induzida por levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae*) em ratos jovens e comparou-se

o efeito de TF e TC em reduzir a temperatura retal dos animais. Os resultados desse ensaio demonstraram que ambos os extratos reduziram a temperatura dos ratos de maneira dependente da dose, porém TF foi mais eficaz do que TC.

A parede celular do fungo *S. cerevisiae* é composta por glicanos, quitina e manoproteínas. Estas moléculas correspondem a polipeptídeos altamente glicosilados, principalmente através de ligações covalentes com resíduos de asparagina (LIPKE; OVALLE, 1998). As manoproteínas intactas induzem febre em ratos, após injeção intraperitoneal ou intracerebroventricular, que parece ser iniciado pela produção de óxido nítrico (NO) ou indução de citocinas. Como o tratamento prévio dos animais com indometacina inibiu a elevação da temperatura, acredita-se que as prostaglandinas estão diretamente envolvidas na resposta fisiopatológica (ATAOĞLU et al., 2000; DOĞAN et al., 1999).

Neste estudo, o modelo de indução de febre utilizado foi o estabelecido por Tomazetti et al. (2005), em que a levedura de cerveja foi aplicada por via *i.p.* em ratos jovens. Este modelo experimental foi escolhido pelo baixo custo apresentado, sensibilidade aos fármacos antipiréticos convencionais e menor tempo de instalação da febre, que atingiu o pico de temperatura entre 3 e 4 horas após a inoculação da levedura.

A redução da temperatura retal dos ratos ocorreu com a aplicação oral de TF nas doses de 600 e 1.200 mg/kg, sendo que os animais tratados com essa dose apresentaram uma redução semelhante ao observado pela administração da dipirona. Apesar da dose necessária de TF para reduzir a temperatura dos animais com febre foi cinco vezes maior do que a da dipirona, deve-se considerar que os extratos brutos de plantas constituem em uma mistura incalculável de metabólitos secundários, com variadas concentrações na mistura. Observando o fato de que o efeito de TF foi dependente da dose, pode-se considerar que o(s) princípio(s) ativo(s) de *L. thymoides* responsáveis pela atividade antipirética está(ão) em concentração muito baixa no extrato metanólico, sendo necessário uma elevação da dose para observação do efeito.

Além disso, a via de administração oral foi escolhida pelo fato de a utilização da planta se dá com a preparação de chá para o tratamento da febre. A via oral de administração do extrato pode ter ocasionado redução dos níveis plasmáticos necessários para a redução da febre, já que o efeito de primeira passagem que ocorre no fígado pode ter proporcionado a metabolização de uma fração significativa da(s) substância(s) ativa(s).

A atuação de substâncias antipiréticas pode está relacionada tanto a efeitos periféricos quanto a nível do sistema nervoso central (SNC). Assim, a redução da produção de citocinas pirogênicas, como interleucina-1 β e TNF- α , e a interferência sobre a adesão leucocitária

periféricamente e redução dos níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) por inibição da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) na área pré-óptica do hipotálamo anterior (POHA), são considerados os principais alvos de ação dos fármacos antipiréticos disponíveis na terapêutica (ARONOFF; NEILSON, 2001). Contudo, para o estabelecimento do estado febril é necessário que os mediadores periféricos alcancem a POHA e induzam uma desregulação da temperatura corporal (BLATTEIS; SEHIC; LI, 2000).

Com essa consideração, *L. thymoides* pode atuar em dois níveis: (1) reduzindo a produção de mediadores inflamatórios periféricos que atuam como pirógenos endógenos; e/ou (2) inibindo a produção de PGE₂ na POHA por inibição da COX-2. Neste último caso, há a necessidade da(s) substância(s) ativa(s) atravessar(em) a barreira hematoencefálica, o que justifica a necessidade de uma dose maior de TF para que alcance a concentração adequada no local de ação e reduzir os níveis de PGE₂. Assim, os dados obtidos com o modelo experimental de febre induzida por hiperpirexia valida a utilização de *L. thymoides* na medicina popular.

Resultados similares foram observados com as espécies *L. adoensis* e *L. multiflora*, confirmando a utilização na medicina popular dessas plantas. O óleo essencial desta última, rico em monoterpenos, apresentou atividade antipirética em ratos com febre induzida por levedura de cerveja, mas não apresentou atividade anti-inflamatória (ABENA et al., 2003). Os extratos aquoso e etanólico de *L. adoensis* reduziram a temperatura de camundongos após indução de pirexia, de maneira dependente da dose (DEBELLA et al.; 2005).

A importância histórica das plantas tradicionalmente utilizadas para o tratamento da dor de diversas etiologias, põe a determinação do perfil antinociceptivo de espécies com esse uso popular como uma importante estratégia na identificação de constituintes de interesse farmacológico. Nesse contexto, os óleos essenciais de plantas aromáticas têm despertado interesse para serem utilizados em produtos farmacêuticos no tratamento da dor (SOUSA, 2011).

Assim, como um dos objetivos na determinação do perfil farmacológico de *L. thymoides* foi a determinação da atividade antinociceptiva, testou-se o potencial de TOP em camundongos submetidos a três modelos experimentais de nocicepção. Os dados apresentados mostraram que TOP reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e a resposta nociceptiva após injeção subcutânea de formalina, mas não foi capaz de aumentar o tempo de latência dos camundongos submetidos ao estímulo térmico no teste da placa quente.

A dor corresponde a uma resposta subjetiva que o organismo apresenta quando é submetido a algum estímulo potencialmente nocivo. Em tecidos normais, esse estímulo

corresponde a um aviso que ativa reações fisiológicas adequadas para evitar uma possível lesão. Em tecidos ou órgãos que sofreram lesão, a instalação de um processo inflamatório provoca sensibilização de nociceptores a responderem a estímulos que normalmente são inócuos ou não provocam sensação dolorosa (SCHAIBLE; EBERSBERGER; NATURA, 2011).

A transmissão dessas informações acontece por meio dos nociceptores, que são terminações nervosas aferentes presentes em várias partes do corpo, com variado grau de densidade, que gera impulsos para a medula espinhal. A transmissão desses impulsos acontece através das fibras A- δ mielinizadas de condução rápida, fibras C não mielinizadas de condução lenta ou fibras A- β altamente mielinizada que transmite apenas propriocepção e toque. Esses nociceptores reagem ao dano celular em resposta a uma grande variedade de moléculas inflamatórias como trifosfato de adenosina (ATP), fator de crescimento do nervo (NGF), TNF- α , bradicinina, PGE₂, serotonina (5-HT) e prótons (H⁺), que atuam provocando sensibilização e reduzindo o limiar dos nervos (VOSCOPOULOS; LEMA, 2010).

Dessa forma, os modelos animais de nocicepção indicam quais possíveis vias nociceptoras estão envolvidas e a participação ou não de mediadores inflamatórios, de tal forma que os candidatos a drogas analgésicas podem influenciar diretamente a via de transmissão da dor ou reduzir a produção de mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores.

A nocicepção induzida pela injeção *i.p.* de ácido acético corresponde a um modelo experimental largamente utilizado na pesquisa de novos agentes anti-inflamatórios e/ou analgésicos. As reações estereotipadas de camundongos submetidos a esse ensaio são provocadas pela rápida difusão do ácido acético na cavidade peritoneal, onde os prótons ativam os canais receptores de potencial transiente vaniloide 1 (TRPV1) polimodais nas fibras C, além de induzir a liberação de bradicinina e PGE₂ que atuam sensibilizando a nocicepção (IKEDA et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2009).

Com a constatação de que TOP reduziu consideravelmente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, propõe-se que o óleo essencial de *L. thymoides* pode atuar tanto como antagonista dos receptores TRPV1 ou inibindo de alguma maneira a atuação de bradicinina, PGE₂ e NO. Porém, nesse modelo experimental não há distinção entre o estímulo nociceptivo direto e o componente inflamatório da nocicepção.

A partir dessa observação, considerou-se relevante a realização do teste da formalina, que é considerado como um dos mais preditivos modelos experimentais de dor aguda (BARS;

GOZARIU; CADDEN, 2001). A nociceção induzida pela formalina apresenta duas fases características: a fase neurogênica ou primeira fase, correspondendo a ativação direta de nociceptores que são sensíveis a fármacos analgésicos centrais; e a fase inflamatória ou segunda fase, onde há sensibilização dos nociceptores devido a liberação de mediadores inflamatórios, sendo a resposta reduzida na administração de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais ou esteroidais (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Os dados obtidos no teste da formalina mostram que TOP reduziu a resposta nociceptiva significativamente nas duas fases, porém com maior eficácia na fase inflamatória. Nesta, houve uma redução de 95 % do estímulo nociceptivo nos animais tratados com 100 mg/kg de TOP. Quando se compara os animais tratados com indometacina (20 mg/kg), um inibidor não seletivo da COX, com os que receberam 25 mg/kg TOP, observa-se que houve uma eficácia e potência semelhantes, indicando um possível efeito anti-inflamatório de *L. thymoides*. Durante a fase neurogênica de ensaio, observou-se um pequeno efeito antinociceptivo, que pode ser correlacionado pela variação de constituintes presentes em TOP, possivelmente com alguns apresentando efeito sobre o SNC e outros inibindo de alguma forma a sensibilização dos nociceptores provocada pelos mediadores inflamatórios liberados. Para confirmar se o efeito de TOP está relacionado ou não com a inibição das vias centrais da transmissão nociceptiva, realizou-se o teste da placa quente.

O estímulo térmico captado pelos nociceptores periféricos em tecidos intactos é transmitido pelas fibras C e A- δ , após ativação de receptores TRPV1 e contribuição dos receptores P2Y₂ ativados pelo ATP, ao corno dorsal da medula espinhal. A partir daí, o estímulo nociceptivo é transmitido por via glutamatérgica aos centros superiores no cérebro por neurônios ascendentes, que expressam o receptor NK1 para a substância P, chegando ao tálamo, substância cinzenta periaquedutal e área parabraquial. Do tálamo, o estímulo nociceptivo é transmitido a várias áreas do córtex cerebral, referida como a “matriz da dor” que pode ou não ser ativadas durante uma experiência dolorosa particular. As vias descendentes partem do tronco cerebral, com função de facilitar, via transmissão serotoninérgica, ou inibir, via transmissão noradrenérgica e GABAérgica, o estímulo nociceptivo (D’MELLO; DICKENSON, 2008; MALIN et al., 2008).

Assim, quando um droga apresenta atividade antinociceptiva no teste da placa quente, provavelmente atua promovendo inibição da transmissão ascendente do estímulo nociceptivo para o SNC, através da ativação de receptores opióides ou inibição da transmissão glutamatérgica; inibição da facilitação do estímulo nociceptivo na via descendente, através do bloqueio dos receptores 5-HT; ou estimulação da via inibitória descendente, atuando sobre os

neurônios GABAérgicos ou adrenérgicos. Como não houve aumento da latência dos camundongos tratados com TOP, sugere-se que o mecanismo antinociceptivo de *L. thymoides* está relacionado à inibição de alguma via periférica de nocicepção.

Dentre os constituintes presentes em TOP, os que apareceram como majoritários foram os monoterpenos canfeno (5,66 %), 1,8-cineol (4,50 %) e borneol (7,36 %) e os sesquiterpenos β -cariofileno (21,20 %), germacreno D (4,72 %) e calameneno (4,75 %), que podem estar diretamente relacionados aos efeitos observados.

O canfeno é um monoterpeno bicíclico que demonstrou inibir a produção de NO em macrófagos ativados *in vitro*, um importante efeito ligado à nocicepção, já que o esse mediador inflamatório liberado durante o processo inflamatório pode sensibilizar os nociceptores (TIWARI; KAKKAR, 2009). O óleo essencial das partes aéreas de *Rosmarinus officinalis*, em que o canfeno é um dos constituintes majoritários, apresentou atividade antinociceptiva em ratos (MARTÍNEZ et al., 2009).

A ação antinociceptiva do 1,8-cineol foi demonstrada no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da formalina, sendo que neste o monoterpeno inibiu as resposta nociceptiva nas duas fases e não foi revertido pelo antagonista de receptores opióides naloxona (SANTOS; RAO, 2000). Liapi et al (2007) demonstrou que o 1,8-cineol apresenta efeito antinociceptivo a nível da medula espinhal ou supraespinhal, pois reduziu a nocicepção de ratos submetidos aos testes da placa quente e *tail flick*, que não foi revertido pela naloxona. Essas informações indicam que o 1,8-cineol pode atuar tanto a nível periférico quanto a nível central, de maneira independente dos receptores opióides.

Através de estudos sobre receptores GABA_A recombinantes, foi demonstrado que o borneol acentuou a ação do GABA e apresentou efeito direto na ativação desse mesmo receptor, com atuação superior ao diazepam em baixas concentrações do GABA (GRANGER; CAMPBELL; JOHNSTON, 2005). Em outro estudo, a atividade do borneol foi demonstrada pela inibição não competitiva dos receptores nicotínicos em células bovina *in vitro*, ação que foi similar à lidocaína (PARK et al., 2003). Correlacionando esses dados com as vias de nocicepção, provavelmente o borneol pode acentuar a inibição GABAérgica e alterar a transmissão sináptica por influenciar na atividade dos receptores nicotínicos.

O sesquiterpeno β -cariofileno é uma reconhecida substância com efeito anti-inflamatório, que atua inibindo a liberação ou ativação de diversos mediadores inflamatórios, como TNF- α , PGE₂, IL-1 β e histamina, além de inibir a expressão de enzimas que são induzidas por processo inflamatório, como COX-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

Todos esses efeitos provavelmente estão relacionados com a inibição da ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (FERNANDES et al., 2007). Uma possível vantagem terapêutica do β -cariofileno é a proteção gástrica devido a sua atividade antiulcerogênica, já que um dos grandes problemas relacionados à utilização dos anti-inflamatórios é o dano estomacal (TAMBE et al., 1996). Ainda, estudos moleculares indicam que o β -cariofileno é um agonista seletivo do receptor canabinoide CB₂, cuja ativação reduz a expressão de TNF- α e IL-1 β e pode reduzir a hiperalgesia provocada pela inflamação (BURSTEIN; ZURIER, 2009; GERTSCH et al., 2008; QUARTILHO et al., 2003)

Não foram encontrados relatos de atividade antinociceptiva do germacreno D e calameneno isoladamente, porém óleos essenciais de várias espécies contendo esses sesquiterpenos reduziram a nocicepção em distintos modelos animais (ESTEVES et al., 2005; FRANCO et al., 2011; SOUSA et al., 2008).

Mesmo com a observação de que os constituintes majoritários apresentam algum tipo de ação antinociceptiva ou anti-inflamatória, não se deve desconsiderar a possibilidade do efeito sinérgico que a mistura de todos os componentes possam apresentar. Isso pode ser ratificado pelo fato de que cada constituinte pode influenciar, mesmo em pequenas concentrações, quaisquer das vias periféricas e/ou central de nocicepção. Ainda, convém destacar que este é o primeiro relato de atividade antinociceptiva de *L. thymoides* que corrobora com a utilização popular da espécie no tratamento do reumatismo.

Os óleos essenciais obtidos de espécies de *Lippia* vêm demonstrando a capacidade de relaxar diferentes músculos lisos em preparações de órgãos isolados. *L. alba* induziu o relaxamento de artéria mesentérica isolada de rato, possivelmente por inibição do influxo de Ca⁺² (MAYNARD et al., 2011) e *L. graveolens* apresentou efeito espasmolítico sobre contrações induzidas por histamina e carbacol em íleo isolado de cobaia (RIVERO-CRUZ et al., 2011). Dentre os constituintes majoritários presentes nos óleos, o β -cariofileno inibiu o tônus basal e apresentou efeito antiespasmódico em íleo isolado de rato (LEONHARDT et al., 2010) e o borneol relaxou os anéis de aorta isolada de rato, provavelmente por redução do influxo de Ca⁺² (SILVA-FILHO et al., 2011).

Considerando essas observações e que a identificação de espécies com atividade relaxante de músculos lisos é estratégica na pesquisa em produtos naturais, procedeu-se a avaliação farmacológica *in vitro* dos óleos essenciais de *L. thymoides* sobre preparações de órgãos isolados. Os resultados demonstraram que os TOO, TOI, TOP e TOV induziram relaxamento nos músculos lisos de aorta de rato, útero de rata e traqueia de cobaia de maneira

dependente da concentração, porém houve uma significativa seletividade de ação desses óleos sobre a aorta e útero.

Os músculos lisos estão largamente distribuídos no corpo dos mamíferos, principalmente nos vasos sanguíneos, vias aéreas e sistemas gastrintestinal, reprodutivo e urinário, desempenhando importantes funções no controle da pressão arterial, peristalse gastrintestinal, motilidade uterina e fluxo de ar para os pulmões. Anormalidades na contratilidade desses músculos podem provocar várias enfermidades, como hipertensão, asma e dismenorreia, sendo necessário um rigoroso controle (RUAN; ZHOU; CHAN, 2011).

A contração dos músculos lisos é regulada por mudanças na concentração do Ca^{+2} intracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_i$), possuindo uma enorme variação dos mecanismos moleculares que podem levar a isso. De maneira geral, o aumento do $[\text{Ca}^{+2}]_i$ acontece por dois principais mecanismos: entrada de Ca^{+2} proveniente do meio extracelular e liberação de Ca^{+2} dos estoques intracelulares. Os canais para Ca^{+2} sensíveis a voltagem (Ca_V), receptores de potencial transiente (TRP), receptores purinérgicos (P2X), canais para Ca^{+2} ativados por receptor (ROC), canais para Ca^{+2} ativados pelo esvaziamento dos estoques intracelulares (SOC) e canais para Ca^{+2} ativados por estiramento (SAC), todos presentes na membrana plasmática das fibras musculares lisas, são os principais meios de entrada desses íons (GUIBERT; DUCRET; SAVINEAU, 2008; HILL-EUBANKS et al., 2012).

O principal reservatório intracelular de Ca^{+2} corresponde ao retículo sarcoplasmático (SR), que possui em sua membrana duas proteínas responsáveis pela liberação do Ca^{+2} : receptores do inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) e receptores de rianodina (RyR). Estes são ativados pelo aumento do $[\text{Ca}^{+2}]_i$, tendo a sensibilidade variada de acordo com a isoforma da proteína. A ativação de receptores acoplados à proteína G_q promove a ativação da enzima fosfolipase C (PLC), que hidrolisa especificamente o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), com o IP_3 ativando o IP_3R e estimulando a liberação do Ca^{+2} armazenado no SR (FLOYD; WRAY, 2007; WRAY; BURDYGA, 2010).

A elevação do $[\text{Ca}^{+2}]_i$ permite a interação desse íon com quatro domínios seletivos ao Ca^{+2} na proteína calmodulina, formando o complexo Ca^{+2} /calmodulina (CaM). A CaM reverte o estado de autoinibição da cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), induzindo uma mudança conformacional que desloca a sequência autoinibitória da superfície do centro catalítico e ativando a enzima. A MLCK, por sua vez, realiza fosforilação da cadeia leve da miosina (RLC), promovendo a estimulação da atividade ATPase do domínio globular da miosina e a interação actina-miosina, sendo essa etapa o ápice da contração muscular (HONG et al., 2011; WAYMAN et al., 2011).

Essas etapas correspondem aos mecanismos gerais que levam à contração do músculo liso, podendo haver variação de acordo com o tecido envolvido. Dentre essas etapas, o aumento do $[Ca^{+2}]_i$ é crucial para o prosseguimento do desenvolvimento da contração muscular, sendo o principal alvo direto ou indireto de fármacos com atividade espasmolítica.

Na aorta, a contração induzida pela fenilefrina ocorre devido à ativação do receptor α_1 -adrenérgico, que pertence a classe dos receptores acoplados à proteína G. Nesse caso, a ativação da proteína G_q promove o aumento do $[Ca^{+2}]_i$ mediado pelo IP_3 , ativação da MLCK pela CaM e estímulo à interação actina-miosina. A presença do endotélio íntegro pode constituir um dos mecanismos de relaxamento, já que a ativação dos receptores muscarínicos M_3 nas células endoteliais promove a elevação do $[Ca^{+2}]_i$ e ativação da enzima NOS via CaM. O NO produzido pela NOS difunde facilmente através das membrana plasmática da célula endotelial e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) na fibra muscular lisa, promovendo a síntese do segundo mensageiro monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG). Esta, por sua vez, promove a fosforilação de vários alvos intracelulares provocando o relaxamento do músculo liso vascular (PRIVIERO; WEBB, 2010).

Nesse trabalho, foi demonstrado que os óleos essenciais de *L. thymoides* atuaram de maneira independente do endotélio, já que todas as amostras testadas apresentaram CE_{50} substancialmente menores na ausência de endotélio. Como o β -cariofileno foi o componente majoritário em todos os óleos, pode-se inferir que esse constituinte não é o principal responsável pelo mecanismo espasmolítico de *L. thymoides* sobre o músculo liso vascular, já que TOP, o óleo essencial mais potente, não foi o que apresentou maior concentração do β -cariofileno. Dentre os outros constituintes majoritários, o borneol (7,36 %) apresentou efeito vasorrelaxante *in vitro* em aorta isolada de rato (SILVA-FILHO et al., 2011).

Os valores mais elevados de CE_{50} dos óleos essenciais, principalmente TOP, nas preparações de aorta com endotélio funcional íntegro podem ser explicados pelo fato de que uma parte da mistura dos constituintes esteja induzindo a produção de fatores contracturantes derivados do endotélio (EDCF), como ânions superóxido, endoperóxidos, tromboxano A_2 e endotelina-1, antagonizando o efeito espasmolítico de outros constituintes. Pode-se descartar a possibilidade de ativação direta de receptores nas fibras musculares vasculares que induzam a contração, pelo fato de que na ausência do endotélio funcional há relaxamento do músculo liso, com valores menores de CE_{50} do que na presença de endotélio.

A presença de EDCF foi evidenciada em ratos espontaneamente hipertensos, sendo

demonstrado que a ativação de receptores M_3 promove a produção de espécies reativas de oxigênio que ativam a COX-1 e há aumento da produção de endoperóxidos, especialmente prostaglandina H_2 (PGH_2), que ativam receptores para tromboxano nas fibras musculares lisas (VANHOUTTE; BOULANGER, 1995; YANG et al., 2003). Esses indícios propõe um efeito duplo dos constituintes dos óleos de *L. thymoides*, estimulando ou antagonizando o relaxamento muscular.

A utilização de substâncias espasmolíticas em contrações indesejadas de músculo uterino pode ser considerada como uma importante ferramenta terapêutica. No caso de útero não gravídico, a liberação de prostaglandinas durante a descamação do endométrio pode provocar espasmos dolorosos, decorrentes das contrações fásicas. Por outro lado, contrações similares a essas, ocorridas fora do tempo esperado em mulheres grávidas, pode expulsar prematuramente o feto e provocar danos à saúde desse e da mãe (YOUNG, 2007).

Quando preparações de útero isolado de rata são postas em contato com soluções despolarizantes, como KCl 60 mM, há o desenvolvimento de um acoplamento eletromecânico, principalmente controlado pelo influxo de Ca^{+2} através de canais Cav . O aumento do $[Ca^{+2}]_i$ induz a ativação dos receptores RyR, dos canais SOC e de Cl^- ativados por Ca^{+2} presentes na membrana plasmática. A elevação do Ca^{+2} citosólico promove a ativação da MLCK e facilitação da interação actina-miosina, enquanto que o Cl^- participa na manutenção da despolarização das fibras musculares uterinas (BERRIDGE, 2008).

Os óleos essenciais de *L. thymoides* induziram relaxamento de preparações de músculo liso de útero de rata pré-contraído com KCl 60 mM, de maneira dependente da concentração, com TOP apresentando maior potência em relação aos demais óleos. Como o acoplamento eletromecânico está diretamente relacionado ao aumento do $[Ca^{+2}]_i$, pode-se propor que a atuação de *L. thymoides* sobre o relaxamento do músculo liso uterino está relacionado, provavelmente, ao bloqueio do influxo de Ca^{+2} ou ativação de componentes hiperpolarizantes, como os canais para K^+ de grande condutância (BK_{Ca}) e pequena condutância (SK_{Ca}) ativados pelo Ca^{+2} (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Como a espécie *L. thymoides* apresenta indicação popular no tratamento de bronquite, utilizou-se de preparações de traqueia isolada de cobaia para a avaliação do potencial espasmolítico dos óleos essenciais, extratos metanólicos e frações das folhas e caules dessa espécie. Apesar dos óleos essenciais promoverem o relaxamento de maneira dependente da concentração, o mais eficaz em relaxar o músculo liso traqueal foi TOP, que atingiu o $E_{máx}$ de 56 % a 729 $\mu\text{g/mL}$. Esse resultado indica que os óleos essenciais de *L. thymoides* não estão relacionados à indicação da planta no tratamento de problemas respiratórios.

A obstrução das vias aéreas provocada por doenças inflamatórias, como a asma, constitui um problema de saúde pública que eleva os índices de morbidade da população. Devido à característica multifacetada dessa doença, o tratamento pode envolver desde fármacos anti-inflamatórios esteroidais a broncodilatadores que atuam diretamente sobre a árvore respiratória para aumentar o diâmetro necessário ao fluxo de ar para os pulmões.

Diferentemente dos óleos essenciais, foi demonstrado que os extratos e frações das folhas e caules relaxaram eficientemente o músculo liso em preparações de traqueia isolada de cobaia após contração induzida por carbacol (CCh), porém com variação da potência e eficácia. As frações de TF foram significativamente mais potentes que o extrato metanólico bruto, enquanto que apenas a fração TCD foi mais potente que TC, mas sem diferença significativa.

A indicação na medicina popular de *L. thymoides* para o tratamento de bronquite, encorajou a tentativa de desvendar o mecanismo responsável pelo relaxamento do músculo liso traqueal. Diante da variação de resultados apresentados pelos extratos e fases das folhas e caules, procedeu-se uma análise comparativa e TFD foi escolhido para prosseguir com as análises por ser a única amostra que apresentou o $E_{m\acute{a}x}$ de 100% na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$.

A instalação do processo inflamatório é um evento crucial no desenvolvimento fisiopatológico da asma. Como consequência reacional na adaptação crônica, há um remodelamento induzido pelos mediadores inflamatórios liberados, que dentre alguns efeitos destaca-se a acentuação da neurotransmissão colinérgica, confirmada pela hiper-responsividade do músculo liso na presença de agonistas muscarínicos (JOHNSON; KNOX, 1997; KISTEMAKER et al., 2012).

Devido à importância da via colinérgica sobre a resposta do músculo liso das vias aéreas, o agonista muscarínico carbacol (CCh) foi escolhido para indução das contrações em traqueia isolada de cobaia. A contração do músculo liso traqueal induzida pelo CCh é decorrente da ativação dos receptores M_3 acoplados à proteína G_q presentes nessas células, que ativa a PLC para a geração de IP_3 , que, por sua vez, ativa os IP_3R no retículo sarcoplasmático e libera o Ca^{+2} dos estoques intracelulares. Porém, há também a entrada de Ca^{+2} do meio extracelular, provavelmente por canais de cátions não seletivos e/ou ROC, com pouca participação dos Ca_v , sendo este fato demonstrado pela ineficácia dos bloqueadores de canais de Ca^{+2} em tratar a broncoconstrição (JANSSEN et al., 2001; MEURS et al., 1989).

Os principais mecanismos pelos quais drogas espasmolíticas provocam relaxamento do músculo liso traqueal em cobaia, após contrações induzidas por CCh, envolvem: (1) ativação

de canais para K^+ , promovendo repolarização ou hiperpolarização da fibra muscular lisa; (2) estimulação da produção de NO e subsequente ativação da PKG; (3) estimulação da liberação de prostaglandinas, principalmente PGE_2 , a partir do epitélio intacto; (4) ativação dos receptores β -adrenérgicos; (5) estimulação da via do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC); (6) inibição da liberação de neuropeptídeos pelas fibras C; e (7) antagonismo do receptor muscarínico M_3 .

Os canais específicos para K^+ correspondem a um grupo de canais iônicos que exercem efeito fundamental na modulação da excitabilidade celular. No estado de repouso tanto das células excitáveis quanto das não excitáveis, a concentração de K^+ intracelular é pelo menos 25 vezes maior do que no fluido extracelular. Conseqüentemente, o efluxo de K^+ contribui diretamente na repolarização e ou hiperpolarização das células em contrapartida à despolarização ocasionada pela entrada de Na^+ e Ca^{+2} e efluxo de Cl^- (LAWSON, 1996).

Os principais canais para K^+ envolvidos na repolarização ou hiperpolarização das fibras musculares lisas da traqueia são os canais para K^+ sensíveis a voltagem (K_V), ativados pelo ATP (K_{ATP}) e ativados pelo Ca^{+2} (K_{Ca}). Os K_V correspondem à maior família de canais iônicos sensíveis a voltagem, atuando diretamente na repolarização das células após a deflagração do potencial de ação ou hiperpolarizando-as, caso estejam em repouso (YU; CATTERALL, 2004). Os K_{Ca} estão presentes tanto nas fibras musculares lisas quanto no epitélio das vias aéreas, sendo ativados fisiologicamente pelo aumento do $[Ca^{+2}]_i$ e induzem hiperpolarização e/ou despolarização das fibras e estimulação da produção de fatores relaxantes derivados do epitélio (EpDRF) nas células epiteliais (TAMAOKI et al., 1997). Os K_{ATP} exercem papel crucial na regulação do tônus muscular em diversos tipos de músculo liso, sendo sensíveis não só pelo ATP, mas também pela proteína cinase dependendo de AMPC (PKA) e PKG. Além disso, agentes contracturantes podem estimular a PKC e esta inibir os K_{ATP} (FLAGG et al., 2010).

A participação dos canais para K^+ na ação de *L. thymoides* foi verificada com a construção de curvas concentração-resposta, através da adição cumulativa de TFD em preparações de músculo liso de traqueia isolada de cobaia contraído com CCh na presença ou ausência de 4-aminopiridina (bloqueador dos K_V), tetraetilamônio (bloqueador dos K_{Ca}) e glibenclamida (bloqueador dos K_{ATP}). Como não houve diminuição significativa da CE_{50} de TFD na presença de todos os bloqueadores, os dados sugerem que a atividade espasmolítica dessa fração não está relacionada à ativação de canais para K^+ .

A produção de NO no epitélio é semelhante ao ocorrido do endotélio vascular, sendo que o efeito final da via de sinalização é a ativação da PKG na fibra muscular lisa, que

fosforila vários alvos intracelulares e promovem o relaxamento. A utilização da ferramenta farmacológica L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, permitiu a verificação da influência dessa via no relaxamento provocado por *L. thymoides* em músculo liso traqueal pré-contraído com CCh. Observou-se que o CE_{50} de TFD não sofreu alteração com a presença do L-NAME, indicando que a produção de NO pelo epitélio não está relacionado com a atividade espasmolítica dessa fração.

Hay et al. (1986) demonstraram que a camada epitelial da traqueia de cobaia desempenha importante papel na regulação do tônus e relaxamento do músculo liso, com a participação direta dos derivados prostanoídes nesses controles. A cascata enzimática para a formação das prostaglandinas é iniciada pela ativação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2), que cliva fosfolipídios na face intracelular da membrana plasmática e libera o ácido araquidônico, substrato da COX e lipo-oxigenase (LOX). Essas enzimas são responsáveis pelos mediadores derivados do epitélio responsáveis tanto pela contração quanto relaxamento do músculo liso (ALBERGHINA, 2010; HOLTZMAN, 1992).

Estudos têm demonstrado que a PGE_2 é o principal produto da COX que atua sobre o músculo liso das vias aéreas, atuando principalmente sobre os receptores EP_2 e EP_4 , com a ativação desses levando a ativação da proteína G_s que, por sua vez, ativa a ciclase de adenilil a catalisar a formação de AMPc a partir do ATP (SPINA, 1998; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007). A ablação dos receptores EP_2 em camundongos prejudicou significativamente o relaxamento do músculo liso traqueal em resposta a PGE_2 , enquanto que a ativação dos receptores EP_4 em traqueia de cobaia inibiu a produção e/ou secreção da endotelina, com ambas as evidências indicando que o PGE_2 atua protegendo a árvore respiratória contra estímulo contracturantes (FORTNER; BREYER; PAUL, 2001; PELLETIER et al., 2001).

Diante disso, para verificar se a ação de TFD sobre o músculo liso traqueal pré-contraído com CCh é dependente da produção de prostaglandinas, construiu-se as curvas concentração-efeito após a adição cumulativa de TFD na presença de indometacina (IND), um inibidor não seletivo da COX. Foi observado que neste protocolo experimental houve redução do $E_{máx}$, passando de 100 % a 81,4 % na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$, e elevação da CE_{50} , de $97,2 \pm 13,0 \mu\text{g/mL}$ na ausência, para $185,2 \pm 9,6 \mu\text{g/mL}$ na presença de IND. Isso indicou que, de alguma maneira, TFD estava induzindo a síntese e/ou liberação de PGE_2 a partir do epitélio e que esse mediador era parcialmente responsável pelo relaxamento do músculo liso traqueal pré-contraído de traqueia.

Para confirmar a participação da PGE_2 no relaxamento do músculo liso traqueal, incubou-se também na presença de dexametasona (DEX). Essa substância pertence à classe

dos anti-inflamatórios esteroidais, atuando na inibição da PLA₂ de maneira indireta, através da estimulação da produção da anexina I e pela inibição do NF-κB que induz a expressão da PLA₂ (MURAKAMI; KUDO, 2004; RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Foi demonstrado que a presença da DEX em preparações de vias aéreas de cobaia *in vitro* por pelo menos 10 minutos é suficiente para a estimulação da produção da anexina I, que inibe a PLA₂ e evita a liberação do ácido araquidônico a partir de lipídios da membrana plasmática (BLACKWELL et al., 1978; FILEP et al., 1993; FLOWER, 1988;)

Dessa forma, se o efeito espasmolítico de *L. thymoides* fosse dependente de PGE₂, na presença de DEX haveria alteração da potência e eficácia de TFD e confirmaria o resultado apresentado na presença de IND. Porém, não houve alteração significativa no valor de CE₅₀ de TFD na presença de DEX e o E_{máx} foi de 100 % a 243 µg/mL. Assim, a redução do efeito relaxante de TFD na presença de IND pode ser explicado pelo direcionamento do ácido araquidônico liberado fisiologicamente para a produção de derivados da LOX, como leucotrienos, que induziram contração do músculo liso traqueal e, assim, potencializaram o efeito de CCh e antagonizaram TFD (MARTIN et al., 1997).

Outro mecanismo envolvido no relaxamento do músculo liso traqueal é a ativação dos receptores β₂-adrenérgicos e como são receptores acoplados à proteína G_s, os eventos posteriores envolvem a ativação da ciclase de adenilil, formação do AMPc e ativação da PKA. O relaxamento provocado pela PKA é ocasionado pela fosforilação de proteínas celulares específicas, regulando a expressão de diversos genes, provocando a inibição de agentes estimuladores da contração, como a enzima MLCK, e ativando proteínas relacionadas à repolarização e/ou hiperpolarização das fibras musculares lisas, como os canais K_{Ca} (BILLINGTON; PENN, 2003; KOTLIKOFF; KAMM, 1996).

Os receptores β₂-adrenérgicos são ativados por catecolaminas endógenas, como adrenalina e noradrenalina, que induzem relaxamento do músculo liso das vias aéreas em resposta às contrações induzidas por diversos mediadores. Devido a esse antagonismo funcional e a grande expressão desses receptores nas vias aéreas, fármacos agonistas β₂-adrenérgicos são amplamente utilizados em indivíduos que sofrem de asma, porém o uso contínuo dessas drogas podem induzir a dessensibilização dos receptores β₂ e diminuir a eficácia das respostas (BARNES, 1998).

Nesse estudo foi demonstrado que a presença de propranolol (PRP), um antagonista β-adrenérgico não seletivo, em preparações de traqueia isolada de cobaia pré-contraída com CCh não influenciou significativamente o relaxamento provocado por TFD. Essa observação

indica que o mecanismo de *L. thymoides* sobre o músculo liso traqueal corresponde a um relaxamento que não envolve a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos presentes nesse tecido.

Além da ativação do receptor, a transdução de sinal da via do AMPc pode ser estimulada de maneira independente de receptor. Ribeiro (2007) realizou um estudo do mecanismo de ação do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico, fornecendo evidências de que essa substância age provavelmente ativando diretamente a enzima ciclase de adenilil, da mesma forma que a forskolina o faz. A inibição da enzima fosfodiesterase, que atua hidrolisando e inativando AMPc, corresponde a outra forma de estimular o relaxamento do músculo liso traqueal, já que os níveis desse segundo mensageiro permanecem elevados, com contínua ativação da PKA e fosforilação de proteínas específicas (RAHIMI et al., 2010).

Com essa consideração, construiu-se curvas concentração-resposta da isoprenalina (ISO), um agonista β_2 -adrenérgico seletivo, em preparações de traqueia isolada de cobaia pré-contráidas com CCh na presença ou ausência de TFD. Observou-se um claro deslocamento da curva concentração-resposta para a esquerda de ISO na presença de 150 $\mu\text{g/mL}$ de TFD, indicando potencialização da via do AMPc.

As fibras C são vias aferentes com importante função na nocicepção, sendo responsáveis pela liberação de diversos mediadores periféricos como peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e as taucicinininas neurocinina A, neurocinina B e substância P. A principal forma de estimulação das fibras C é a ativação dos receptores TRPV1, sendo que em cobaias estão largamente distribuídas no sistema respiratório (WATANABE et al., 2005). O papel dos mediadores liberados a partir das fibras C sobre a fisiologia do trato respiratório é controverso, com as observações de que os efeitos protetores ou prejudiciais variam de acordo com a espécie (SPINA et al., 1998).

Em camundongos, a substância P promove o relaxamento do músculo liso traqueal de maneira dependente dos receptores EP₂ (FORTNER; BREYER; PAUL, 2001). Em ratos, a estimulação das fibras C promove liberação da substância P, que ativa os receptores NK₁ no epitélio e induz formação de PGE₂, o qual promove relaxamento do músculo liso das vias aéreas (SZAREK et al., 1998). Em cobaias, a estimulação dos receptores NK₁ e NK₂ induz despolarização do músculo liso traqueal, sendo também atribuído à manutenção do tônus basal (GIRARD et al., 1997; SKOGVALL; ARNER; GRAMPP, 1998). Porém, Figini et al. (1996) encontraram evidências farmacológicas da existência de dois subtipos de receptores NK₁ na traqueia de cobaia, sendo um responsável pela contração, que é ativado pelo agonista

seletivo septide, e outro pelo relaxamento mediado pela estimulação da liberação de NO, que é insensível ao agonista seletivo septide.

A ferramenta farmacológica mais utilizada para avaliar a participação das fibras C e os neuropeptídeos por elas liberadas sobre a contração do músculo liso das vias aéreas corresponde à dessensibilização provocada pela capsaicina (CPS). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que tratamentos específicos com a CPS provocam depleção dos neuropeptídeos liberados pelas fibras C, tendo como efeito principal a acentuação da resposta colinérgica em músculo liso das vias aéreas de cobaia, através do acoplamento dos receptores NK₁ e/ou NK₂ aos muscarínicos M₃ (STRETTON; BELVISI; BARNES, 1992; VAN HOOFF et al., 1998)

Diante disso, a pré-incubação das preparações de traqueia isolada de cobaia com CPS por 30 minutos promoveu redução significativa da potência de TFD, com o CE₅₀ passando de $97,2 \pm 13,0$ µg/mL na ausência de CPS, para $173,6 \pm 22,2$ µg/mL na presença, mas o E_{máx} não foi alterado. Isso demonstra que a exacerbação da resposta colinérgica mediada pelos receptores das taquicininas influenciou o relaxamento do músculo liso traqueal induzido por TFD, levando a suposição de que o efeito de *L. thymoides* pode ser antagonizado, pelo menos parcialmente, pelos mediadores liberados pelas fibras C. Como não houve redução do E_{máx} de TFD, provavelmente o antagonismo pode ser competitivo entre os sistemas envolvidos na reposta contrátil desse protocolo experimental. Além disso, pode-se afirmar que a ação de TFD não está relacionada à ativação direta do receptor NK₁ insensível ao septide, nem à liberação de taquicininas que ativam esse receptor, já que foi demonstrado anteriormente que o bloqueio da produção de NO por L-NAME não influenciou o relaxamento induzido por TFD e o NK₁ insensível ao septide atua por essa via.

A identificação de substâncias que atuem inibindo a ação colinérgica sobre a excitação do músculo liso das vias aéreas é de extrema importância para o tratamento de condições patológicas em que há exacerbação desse efeito. A acetilcolina não só induz contração muscular através da ativação dos receptores M₃, mas também age sobre a produção de muco remodelamento tecidual em indivíduos com asma. Porém, os fármacos anticolinérgicos disponíveis atualmente na terapêutica, além de serem eficazes no bloqueio da contração muscular lisa das vias aéreas, apresentam uma série de problemas relacionados à dose eficaz, efeitos adversos e seletividade dos receptores muscarínicos (GOSENS et al., 2006; MOULTON; FRYER).

Assim, a avaliação do efeito anticolinérgico de *L. thymoides* foi realizada através da pré-incubação das preparações de traqueia isolada de cobaia com TFD, seguida da adição

cumulativa CCh às cubas. Os resultados demonstram que houve uma elevação significativa da CE_{50} do CCh de $6,2 \pm 1,1 \times 10^{-8}$ M na ausência de TFD, para $41,2 \pm 7,8 \times 10^{-8}$ M na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ de TFD e $172,2 \pm 34,8 \times 10^{-8}$ M com 150 $\mu\text{g/mL}$ de TFD. Numericamente, CCh foi 6 vezes menos potente na presença de 50 $\mu\text{g/mL}$ de TFD e teve a potência reduzida por 27 vezes na presença de 150 $\mu\text{g/mL}$ de TFD. A análise das curvas concentração-resposta observa-se um deslocamento da curva de CCh para a direita quando TFD foi incubado previamente à adição do agonista, comportamento referente a um antagonismo competitivo de TFD, já que não houve redução do $E_{\text{máx}}$ do CCh.

O antagonismo competitivo é caracterizado quando um fármaco não possui atividade intrínseca, mas tem afinidade pelo mesmo local de ação do agonista em um determinado receptor. A característica padrão de tal antagonismo é o deslocamento paralelo, de maneira dependente da concentração, da curva concentração-resposta do agonista sem alteração da resposta máxima, refletindo deslocamento do antagonista do receptor pelo agonista. Por outro lado, quando um fármaco antagonista desloca-se do sítio de ligação muito lentamente, observa-se redução do efeito máximo do agonista após adição de concentrações crescentes do antagonista e, por isso, esse evento é referido como antagonismo não competitivo (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

A fração TFD do extrato das folhas de *L. thymoides* provavelmente contém metabólito(s) secundário(s) que tem a capacidade de interagir com os receptores muscarínicos M_3 sem ativá-lo, sendo essa afirmação confirmada pelo fato de que a simples adição de TFD às cubas em todos os protocolos utilizados não induziu contração do músculo liso traqueal. Além disso, a interação desse(s) constituinte(s) com o receptor M_3 acontece de maneira reversível, com a observação de que a adição cumulativa de CCh às cubas pré-incubadas com TFD promoveu contração do músculo liso traqueal de maneira dependente da concentração com a obtenção do efeito máximo de CCh.

Diante do exposto, constata-se mais uma validação da utilização popular de *L. thymoides*, nesse caso indicada para o tratamento da bronquite. A correlação dos dados apresentados indica que o relaxamento do músculo liso traqueal induzido por TFD é, provavelmente, proveniente de competição de constituinte(s) presente(s) nessa fração pelo mesmo receptor do CCh, sendo corroborado pelos seguintes fatos: (1) o deslocamento do CCh do receptor M_3 reduziu a formação de IP_3 e conseqüente liberação de Ca^{+2} a partir dos estoques intracelulares, o que provocou potencialização dos efeitos de ISO através do antagonismo funcional da PKA ativada pelo AMPc; e (2) o acoplamento entre os receptores

M₃ e NK₁ e/ou NK₂, induzido pela depleção de taquicininas das fibras C, reduziu a potência mas não a eficácia de TFD.

Os dados apresentados nesse trabalho revelam o grande potencial farmacológico da espécie *Lippia thymoides*, planta endêmica da caatinga, através de relatos inéditos de várias formas de ação em diversos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Essa diversidade farmacológica está diretamente relacionada com a variedade de metabólitos secundários que os óleos essenciais e extratos das folhas e caules podem apresentar, sendo *L. thymoides* exposta como uma fonte imensurável de substâncias de interesse farmacêutico.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste trabalho indicam que a espécie *Lippia thymoides* Mart. & Schauer é uma possível fonte de substâncias com diversas atividades farmacológicas, validando seu uso na medicina popular para o tratamento de feridas, febre, reumatismo e bronquite.

A avaliação da composição química dos óleos essenciais obtidos de *L. thymoides*, coletada nas quatro estações do ano, evidenciou que o constituinte majoritário em todas as amostras foi o sesquiterpeno β -cariofileno, variando entre 17 e 26 %.

A determinação do conteúdo de fenóis totais mostrou que *L. thymoides* é uma espécie rica em constituintes fenólicos, com uma concentração maior dessas substâncias nas frações mais polares, como a acetato de etila, obtidas a partir dos extratos metanólicos das folhas e caules.

A avaliação da atividade antioxidante evidenciou que *L. thymoides* possui substâncias, presentes nos extratos e frações das folhas e caules, mas não nos óleos essenciais, capazes de sequestrar radicais livres, como o DPPH, mas não de prevenir oxidação de compostos em meios oxidáveis, como o β -caroteno na presença do ácido linoleico.

Os óleos essenciais foram efetivos contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* e a levedura *Candida albicans*. Por outro lado, as frações diclorometano e acetato de etila dos extratos metanólicos das folhas e caules foram os mais efetivos contra *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *M. luteus*.

A aplicação tópica dos extratos metanólicos das folhas e caules de *L. thymoides* não estimulou a cicatrização das feridas cutâneas. Esse dado indica que o uso popular dessa espécie provavelmente está relacionado ao efeito antisséptico, como evidenciado nos ensaios de atividade antimicrobiana.

O extrato metanólico das folhas de *L. thymoides* reduziu, quando administrados por via oral, a temperatura retal de ratos com hipertermia induzida pela injeção intraperitoneal de *Saccharomyces cerevisiae*. Como essa planta é utilizada na medicina popular para o tratamento da febre, esse resultado indica as folhas de *L. thymoides* é uma possível fonte de substâncias antipiréticas.

O óleo essencial de *L. thymoides* coletado na primavera apresentou efeito antinociceptivo em camundongos submetidos ao ensaio das contorções abdominais induzidas

pelo ácido acético e no teste da formalina, mas não no teste da placa quente. Isso indica um provável efeito anti-inflamatório do óleo testado, provavelmente devido à presença do β -cariofileno, canfeno, borneol e 1,8-cineol, explicando o uso popular dessa espécie no tratamento do reumatismo. Para confirmar essa observação é necessária a avaliação desse óleo em modelos animais de inflamação.

Os óleos essenciais de *L. thymoides* induziram relaxamento do músculo liso de útero de rata e aorta de rato (de maneira independente do endotélio), mas não de traqueia de cobaia. Essa seletividade de ação pode estar relacionada a mecanismos de relaxamento em comum do útero e aorta, sendo necessária uma investigação mais detalhada, tanto do óleo bruto quanto dos constituintes isolados, para identificar os possíveis locais de ação.

A avaliação do potencial espasmolítico dos extratos e frações de *L. thymoides* em traqueia isolada de cobaia identificou a fração diclorometano do extrato metanólico das folhas como a mais potente. Os resultados revelaram que o efeito relaxante pode estar relacionado ao antagonismo muscarínico dessa fração, o que possibilita uma possível explicação para utilização popular de *L. thymoides* no tratamento da bronquite.

Diante de todas essas evidências, a espécie *L. thymoides* destaca-se como uma planta medicinal de grande interesse farmacêutico, sendo uma possível fonte de candidatos a fármacos. Os dados apresentados nesse estudo guiarão novas pesquisas na tentativa de isolar e identificar os possíveis constituintes ativos, sendo a fração diclorometano do extrato metanólico das folhas a mais promissora fonte de metabólitos secundários de interesse. Depois de identificados os constituintes, estudos *in vitro* de indução do metabolismo secundário de *L. thymoides* determinará as condições ideais em que essas possíveis substâncias de interesse são sintetizadas, com a consequente otimização do processo de purificação desses metabólitos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. et al. Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytoterapy Research**, v. 11, p. 198-202, 1997.
- ABE, F.; NAGAO, T.; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants 9. Aerial parts of *Lippia dulcis* and *Lippia canescens*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 920-922, 2002.
- ABENA, A. A. et al. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 231-236, 2003.
- ABENA, A. A.; NGONDZO-KOMBETI, G. R.; BIOKA, D. Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. **Encephale**, v. 24, p. 449-454, 1998.
- ADAMS, R.B. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured, 2007. p.804.
- AGRA, M. F. et al. Sinopse da flora medicinal do Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 323-330, 2007.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 114-140, 2007.
- AGUIAR, J. S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia Alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 436-440, 2008.
- AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, p. 725-744, 2010.
- AGNANIET, H. et al. Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 34-38, 2005.
- AHMED, F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia nodiflora* Linn. **Pharmazie**, v. 59, p. 329-330, 2004.
- AJAIYEoba, E. O. *In vitro* cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. **Phytomedicine**, v. 13, p. 295-298, 2006.
- ALBERGHINA, M. Phospholipase A₂: new lessons from endothelial cells. **Molecular Research**, v. 80, p. 280-285, 2010.
- ALBUQUERQUE, C. C. et al. Antimicrobial action of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 527-535, 2006.

ALBUQUERQUE, U, P. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALBUQUERQUE, U, P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALBUQUERQUE, U, P; RAMOS, M. A.; MELO, J. G. New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 197-201, 2012.

ALECRIM-DO-CAMPO. Disponível em
<<http://www.liberherbarum.com/Minor/BZ/PN8182.htm>> Acesso em: 11 abril 2012.

ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. A comparison of knowledge about medicinal plants for three rural communities in the semi-arid region of northeast of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 674-684, 2010.

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysoarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, p. 367-374, 2011.

ALMEIDA, V. S.; BANDEIRA, F. P. S. F. O significado do uso de plantas da caatinga pelos quilombolas do Raso da Catarina, município de Jeremoabo, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, p. 195-209, 2010.

ALVA, M. et al. Bioactivity of the essential oil of an argentine collection of *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v. 7, P. 245-248, 2012.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. Antiviral evaluation of plants from Brazilian atlantic tropical forest. **Fitoterapia**, v. 76, p. 374-378, 2005.

ANKIER, S. I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 27, p. 1-4, 1974.

ARANA-SÁNCHEZ, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, p. 585-590, 2010.

ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72-80, 2008.

ARGYROPOULOU, C. et al. Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 831-837, 2007.

ARONOFF, D. M.; NEILSON, E. G. Antipyretics: mechanisms of action and clinical use in fever suppression. **American Journal of Medicine**, v. 111, p. 304-315, 2001.

ASHOKKUMAR, D. et al. Antioxidant and free radical scavenging effects of *Lippia nodiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 762-771, 2008.

ATAOĞLU, H. et al. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats. Role of nitric oxide and cytokines. **Life Sciences**, v. 67, p. 2247-2256, 2000.

AVILA-SOSA, R. et al. Fungal inactivation by mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) essential oil added to amaranth, chitosan, or starch edible films. **Journal of Food Science**, v. 75, M127-133, 2010.

AVLESSI, F. Aromatic plants of tropical West Africa. Part XIV. Chemical and biological investigation of *Lippia multiflora* Mold. essential oil from Benin. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 405-407, 2005.

BAHL, J. R. et al. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 127-132, 2002.

BAHL, J. R. et al. Composition of linalool rich essential oil from *Lippia alba* grown in Indian plains. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 199-200, 2000.

BALAKRISHNAN, G. et al. Molecular basis of the anti-inflammatory property exhibited by cyclo-pentano phenanthrenol isolated from *Lippia nodiflora*. **Immunological Investigations**, v. 39, p. 713-739, 2010.

BALAMURUGAN, R.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 667, p. 410-418, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191-203, 2006.

BARBOSA, F. G. et al. Iridoid and phenylethanoid glycosides from *Lippia alba*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 819-821, 2006.

BARBOSA, F. G.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R. Total NMR assignments of new [C-7-O-C-7 "]-biflavones from leaves of the limonene-carvone chemotype of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 334-338, 2005.

BARNES, P. J. Pharmacology of airway smooth muscle. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 158, p. S123-S132.

BARROS, F. M. C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 861-867, 2009.

BASSOLÉ, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, p. 209-212, 2003.

BASSOLÉ, I. H. N. et al. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, v. 15, p. 7825-7839, 2010.

BENOIT-VICAL, F. et al. Confirmation, *in vitro*, de l'activité antimalarique de certaines plantes d'origine africaine utilisées en médecine traditionnelle. **Médecine d'Afrique Noire**, v. 43, p. 393-400, 1996.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **Journal of Physiology**, v. 586, p. 5047-5061, 2008.

BILIA, A. R. et al. HPLC-DAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and evaluation of the antioxidant activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, p. 463-470, 2008.

BILLINGTON, C. K.; PENN, R. B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. **Respiratory Research**, v. 4, 2, 2002.

BLACKWELL, G. J. et al. Phospholipase A₂ activity of guinea-pig isolated perfused lungs: stimulation, and inhibition by anti-inflammatory steroids. **British Journal of Pharmacology**, v. 62, p. 79-89, 1978.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E.; LI, S. Pyrogen sensing and signaling: old views and new concepts. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p. S168-177, 2000.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007a.

BOTELHO, M. A. et al. Effect of a novel essential oil mouthrinse without alcohol on gingivitis: a double-blinded randomized controlled trial. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, p. 175-180, 2007b.

BOTELHO, M. A. et al. *Lippia sidoides* and *Myrachondruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 471-478, 2007c.

BOTTONE, E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 382-398, 2010.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 1822-1828, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANDÃO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 141-148, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

_____. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, 2006.

BURSTEIN, S. H.; ZURIER, R. B. Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 11, p. 109-119, 2009.

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

CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases .1. screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 193-208, 1991.

CAI, Y. et al. A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 523-529, 2002.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288-294, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. et al. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 167-170, 2008.

CAPANEMA, L. X. L.; PALMEIRA FILHO, P. L. A cadeia farmacêutica e a política industrial: uma proposta de inserção do BNDES. Disponível em <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set1902.pdf> Acesso em 12 abril 2012.

CÁRDENAS, J. et al. Essential oil composition and antibacterial activity of *Monticalia greenmaniana* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v. 7, p. 243-244, 2012.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569-571, 2003.

CASTELLETTI, C. H. M. et al. Quanto ainda resta da caatinga? Uma estimativa preliminar. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003. p. 719-734.

CATALAN, C. A. N.; LAMPASONA, M. E. P. The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In: KINTZIOS, S. E. **Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia***. Londres: Taylor & Francis, 2002. p. 127-149.

CATALAN, C. A. N.; LAMPASONA, M. E. P.; FENIX, I. J. S. Structure and conformation of a humulenedione from *Lippia integrifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 381-385, 1993.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 541-544, 2004.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 829-832, 2010.

CHAIYASIT, W.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4982-4988, 2005.

CHANH, P. H.; KOFFI, Y.; CHANH, A. P. H. Comparative hypotensive effects of compounds extracted from *Lippia multiflora* leaves. **Planta Medica**, v. 54, p. 294-296, 1988.

CHOGO, J.; CRANK, G. Essential oil and leaf constituents of *Lippia ukambensis* from Tanzania. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 186-188, 1982.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. CLSI document M7-A6. CLSI, , Pennsylvania, USA, 2003.

_____. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição**. CLSI document M7-A6. CLSI, , Pennsylvania, USA, 2002.

- COMPADRE, C. M.; ROBBINS, E. F.; KINGHORN, A. D. The intensely sweet herb, *Lippia dulcis* Trev.: historical uses, field inquiries, and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 15, p. 89-106, 1986.
- CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 5-14, 2005.
- CORONEL, A. C. et al. Chemical composition, seasonal variation and a new sesquiterpene alcohol from the essential oil of *Lippia integrifolia*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 839-847, 2006.
- COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 304-309, 2005.
- COSTA, S. M. O. et al. Chemical constituents from *Lippia sidoides* and cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 792-795, 2001.
- COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham.) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 66-67, 2002.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- CRISTANI, M. et al. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6300-6308, 2007.
- CUNHA, J. F. et al. The mechanism of gentisic acid-induced relaxation of the guinea pig isolated trachea: the role of potassium channels and vasoactive intestinal peptide receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p. 381-388, 2001
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.
- DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010.
- DAVID, J. P. et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian *Caatinga* plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.
- DEBELL, A. et al. *In vivo* antipyretic studies of the aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Ajuga remota* and *Lippia adoensis*. **Ethiopian Medical Journal**, v. 43, p. 111-118, 2005.
- DELLACASA, A. D. et al. *In vitro* activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 282-285, 2003.
- D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8-16, 2008.

- DOĞAN, M. D. et al. Polyssaccharide mannan components of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall produce fever by intracerebroventricular injection in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 509-512, 1999.
- DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 16, p. 385-393, 2003.
- DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- EISENBERG, D. M. et al. Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic biological evaluation - rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration. **Fitoterapia**, v. 82, p. 17-33, 2011.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.
- ELAKOVICH, S. D.; STEVENS, K. Volatile constituents of *Lippia nodiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 48, p. 504-506, 1985.
- 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, p. 184-190, 2010.
- ESTEVEZ, I. et al. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.
- ESTRADA-SOTO, S. et al. Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 513-518, 2012.
- FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 840-846, 2011.
- FALLEH, H. et al. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 372-379, 2008.
- FARIAS, M. R. et al. Triterpenoid saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 927-933, 2010.
- FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569 n. 3, p. 228-236, 2007.
- FIGINI, M. et al. Evidence that tachykinins relax the guinea-pig trachea via nitric oxide release and by stimulation of a septide-insensitive NK₁ receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 1270-1276, 1996.
- FILEP, J. G. et al. Relaxation by dexamethasone of isolated guinea-pig airways precontracted with endothelin-1. **European Journal of Pharmacology**, v. 240, p. 315-318, 1993.

- FLAGG, T. P. et al. Muscle K_{ATP} channels: recent insights to energy sensing and myoprotection. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 799-829, 2010
- FLOWER, R. J. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **British Journal of Pharmacology**, v. 94, p. 987-1015, 1988.
- FLOYD, R.; WRAY, S. Calcium transporters and signaling in smooth muscles. **Cell Calcium**, v. 42, p. 467-476, 2007.
- FOLASHADE, K. O.; OMOREGIE, E. H. Essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke: a review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 15-23, 2012.
- FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 27, p. 627-650, 1927
- FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.
- FORTNER, C. N.; BREYER, R. M.; PAUL, R. J. EP₂ receptors mediate airway relaxation to substance P, ATP, and PGE₂. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 281, p. L469-L474, 2001.
- FRANCO, C. R. P. et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693-1699, 2011.
- FUNARI, C. S. et al. Interconverting flavanone glucosides and other phenolic compounds in *Lippia salviaefolia* Cham. ethanol extracts. **Phytochemistry**, v. 72, p. 2052-2061, 2011.
- FUNCH, L. S. et al. **Plantas úteis: Chapada Diamantina**. São Carlos: Rima, 2004.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 27, p. 373-376, 1980.
- GAMARRA-ROJAS, C. F. L. et al. **Cheklis das plantas do Nordeste**. Disponível em <<http://www.cnip.org.br/bdpm/checklistNE.pdf>>. Acesso em 11 abril 2012.
- GARCIA, C. C. et al. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1073-1075, 2003.
- GAZOLA, R. et al. *Lippia alba*, *Melissa officinalis* and *Cymbopogon citratus*: effects of the aqueous extracts on the isolated hearts of rats. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 477-480, 2004.
- GERTSCH, J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. **Planta Medica**, v. 77, p. 1086-1098, 2011.
- GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 9099-9104, 2008.

GILANI, A. H. et al. Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of *Nepeta cataria* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 405-411, 2009.

GIRÃO, V. C. C. et al. A clinical Trial of the effect of a mouth-rinse prepared with *Lippia sidoides* Cham essential oil in dogs with mild gingival disease. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 95-102, 2003.

GIRARD, V. et al. Effects of tachykinins and capsaicin on the mechanical and electrical activity of the guinea-pig isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 841-848, 1997.

GLEISER, R. M.; ZYGADLO, J. A. Insecticidal properties of essential oils from *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 101, p. 1349-1354, 2007.

GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 166-169, 2008.

GORZALCZANY, S. et al. Choleric and antispasmodic effects of *Lippia integrifolia* aqueous extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 16-20, 2008.

GOSENS, R. et al. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. **Respiratory Research**, v. 9, 73, 2006.

GRANGER, R. E.; CAMPBELL, E. L.; JOHNSTON, G. A. R. (+)- and (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1101-1111, 2005.

GUERECA, M. C. G. et al. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieffi* Schauer). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, p. 43-49, 2007.

GUILHON, C. C. et al. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 406-413, 2011.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drug of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening source. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, p. 480-484, 2007.

_____. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HASHIBA, E. et al. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and β -adrenoceptor activity. **Anesthesia and Analgesia**, v. 89, p. 191-196, 1999.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 238-243, 2012.

HAY, D. W. P. et al. Airway epithelium modulates the reactivity of guinea-pig respiratory smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 11-18, 1986.

HEGDE, V. R. et al. Three new compounds from the plant *Lippia alba* as inhibitors of chemokine receptor 5 (CCR5). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 5339-5342, 2004.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 436-443, 2012.

HENNEBELLE, T. et al. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 256-258, 2008a.

_____. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008b.

_____. Phenolics and iridoids of *Lippia alba*. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 727-730, 2006.

HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK, M. L.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 317-322, 2000.

HERNANDEZ, T. et al. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* HBK (Verbenaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, v. 8, p. 295-300, 2009.

HERNÁNDEZ, T. et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.

HILL-EUBANKS, D. C. et al. Calcium signaling in smooth muscle. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1-20, 2011.

HOLTZMAN, M. J. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 303-329, 1992.

HONG, F. et al. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, p. 135-146, 2011.

HOUGHTON, P. J. et al. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an exemple. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 100-107, 2005.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, M. et al. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, p. 997-1008, 2012.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JANSSEN, L. J. et al. Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1142-1151, 2001.

JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, p. 547-550, 2003.

JI, H-F.; LI, X-J.; ZHANG, H-Y. Natural products and drug discovery. **EMBO Reports**, v. 10, p. 194-200, 2009.

JOHNSON, S. R.; KNOX, A. J. Synthetic functions of airway smooth muscle on asthma. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 288-292, 1997.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 361-366, 2008.

JOULIN, D., KONIG, W.A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: EB-Verl, 1998.

JULIANI, H. R. et al. Chemical diversity of *Lippia multiflora* essential oils from west Africa. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 49-55, 2008.

JULIANI, H. R. et al. Chemical constituents of the essential oil of *Lippia laxibracteata* (Verbenaceae). **Planta Medica**, v. 66, p. 567-568, 2000.

JULIANI JR., H. R. et al. Intraspecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (mold.) tronc. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 163-170, 2002.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KANEDA, N. et al. (+)-4b-Hydroxyhernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1136-1141, 1992.

KANKO, C. et al. Composition and intraspecific variability of the leaf oil of *Lippia multiflora* Mold. From the Ivory Coast. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 153-158, 1999.

- KANKO, C. et al. Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, 1039-1042, 2004a.
- KANKO, C. et al. Contribution à l'étude phytochimique de *Lippia multiflora* (Verbenaceae). **Comptes Rendus Chimie**, v. 7, p. 1029-1032, 2004b.
- KEMBRO, J. M. et al. Effects of the essential oils of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) on the temporal pattern of locomotion of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1119-1127, 2009.
- KINGHORN, A. D. et al. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1539-1555, 2011.
- KINGSTON, D. G. I. modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496-511, 2011.
- KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A Mechanism of fibrogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, p. 109-122, 2008.
- KISTEMAKER, L. E. M. et al. Regulation of airway inflammation and remodeling by muscarinic receptors: perspectives on anticholinergic therapy in asthma and COPD. **Life Sciences**, doi: j.lfs.2012.02.021, 2012.
- KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.
- KÖLLNER, T. G. et al. A maize (*E*)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defence responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. **Plant Cell**, v. 20, p. 482-494, 2008.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.
- KOTLIKOFF, M. I.; KAMM, K. E. Molecular mechanisms of β -adrenergic relaxation of airway smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 115-141, 1996
- KOUMAGLO, K. H. et al. Geranial and neral, major constituents of *Lippia multiflora* Moldenke leaf oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 237-240, 1996.
- KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.
- KUMARESAN, P. T.; TULSHKAR, A.; VIJAYA, C. Neuropharmacological activity of *Lippia nodiflora* Linn. **Pharmacognosy Research**, v. 3, p. 194-200, 2011.
- KUNLE, O. et al. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v. 10, p. 59-61, 2003.

- KURODA, M.; NAGASAKI, S.; OHTA, T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the C₅₅ lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to β -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 425-432, 2007.
- LAMATY, G. et al. 2-Methyl-6-methylene-7-octen-4-one, a constituent of *Lippia multiflora* essential oil. **Phytochemistry**, v. 29, p. 521-522, 1990.
- LAWSON, K. Potassium channel activation: a potential therapeutic approach? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 70, p. 39-63, 1996.
- LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 139-146, 2005.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.
- LEITÃO, S. G. et al. Analysis of the chemical composition of the essential oils extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbeceae) by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1388-1393, 2008.
- LEONHARDT, V. et al. Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeiflorus* and its main constituent β -caryophyllene on rat isolated ileum. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, p. 749-758, 2010.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 9-18, 2007.
- LI, L. et al. Bradykinin, lemakalim and sodium nitroprusside relax the mouse trachea *in vitro* by different mechanisms. **Life Sciences**, v. 7, p. PL67-PL73, 1997.
- LIANG, T.; YUE, W.; LI, Q. Comparison of the phenolic content and antioxidant activities of *Apocynum venetum* L. (Luo-Bu-Ma) and two of its alternative species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 4452-4464, 2010.
- LIAPI, C. et al. Antinociceptive properties of 1,8-cineole and β -pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. **Planta Medica**, v. 73, p. 1247-1254.
- LIMA, B. et al. Essential oils of medicinal plants from the Central Andes of Argentina: chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, p. 924-936, 2011.
- LIMA, J. T. **Mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo de seu análogo sintético**. 2008. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa.

- LIN, L-Z. et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 261-369, 2007.
- LINDE, J. H. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 37-42, 2010.
- LINDSKOG, A.; POTTER, A. Terpene emission and ozone stress. **Chemosphere**, v. 30, p. 1171-1181, 1995.
- LÓPEZ-AROCHE, U. *In vitro* nematocidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Journal of Helminthology**, v. 82, p. 25-31, 2008.
- LÓPEZ, M. A. et al. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 479-488, 2011.
- LORENZO, D. et al. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown from Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 356-359, 2001.
- LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 3735-3740, 1998.
- MA, X. H. et al. Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 579-588, 2009.
- MACAMBIRA, L. M. A. et al. Naphthoquinoids from *Lippia sidoides*. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 310-312, 1986.
- MACHADO, M. et al. Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 106, p. 1205-1215, 2010
- MACHADO, T. B. et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 279-284, 2003.
- MADZIMURE, J. et al. Acaricidal efficacy against cattle ticks and acute oral toxicity of *Lippia javanica* (Burn F.) Spreng. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 481-489, 2011.
- MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 612-631, 2010.
- MAIA, J. G. S. et al. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, p. 417-420, 2003.

- MAKONNEN, E. et al. Analgesic properties of some Ethiopian medicinal plants in different models of nociception in mice. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 1108-1112, 2003.
- MALDONADO, E. et al. Lupane triterpenes with a δ -lactone at ring E, from *Lippia Mexicana*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1969-1972, 2010.
- MALIN, S. A. et al. Thermal nociception and TRPV1 function are attenuated in mice lacking the nucleotide receptor P2Y₂. **Pain**, v. 15, p. 484-496, 2008.
- MANENZHE, N. J.; POTGIETER, N.; REE, T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2333-2336, 2004.
- MANS, D. R. A. et al. Spasmogenic effect of a *Solanum melongena* leaf extract on guinea pig tracheal chains and its possible mechanism(s). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 329-333, 2004.
- MARQUES, J. B.; BARBOSA, M. R. V.; AGRA, M. F. Efeitos do comércio para fins medicinais sobre o manejo e a conservação de três espécies ameaçadas de extinção, em duas áreas do cariri oriental paraibano. In: GARIGLIO, M. A. et al. (Org.). **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga**. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro, 2010.
- MARTÍNEZ, A. L. et al. Antinociceptive effect and CG/MS analysis of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from its aerial parts. **Planta Medica**, v. 75, p. 508-511, 2009.
- MARTÍNEZ-ROCHA, A. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, p. 1-5, 2008.
- MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Acaricidal effects of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, p. 822-827, 2011.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.
- MATOS, F. J. A. et al. Essential oil composition of two chemotypes of *Lippia alba* grown in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 695-698, 1996.
- MAYNARD, L. G. et al. Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, p. 694-698, 2011.
- MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 1270-1282, 2000.
- MEDEIROS, M. G. F. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v. 60, p. 237-241, 2011.

- MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 5, p. 618-627, 2007.
- MELO, J. I. M. et al. Verbenaceae *sensu lato* em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, v. 23, p. 41-47, 2010.
- MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.
- MENESES, R. et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, 2009.
- MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.
- MENUT, C. et al. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XVII. 6,7-Epoxy-myrcene, the major unusual constituent of *Lippia multiflora* S.L. Moldenke essential oil from the central African Republic. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 10, p. 75-77, 1995a.
- MENUT, C. et al. Aromatic plants of tropical west Africa. III. Chemical composition of leaf essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Benin. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 331-333, 1995b.
- MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 878-884, 2009.
- MEVY, J. P. et al. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, v. 101, p. 682-685, 2007.
- MEURS, H. et al. Muscarinic receptors in human airway smooth muscle are coupled to phosphoinositide metabolism. **European Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 369-371, 1989.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 291-312, 2010.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.
- MILTIADOUS, G.; ELISAF, M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature. **Journal of Medical Case Reports**, v. 5, 251, 2011.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

- MISHRA, R. K. et al. Analysis of linalool content in the inflorescence (flower) essential oil and leaf oil of *Lippia alba* cultivar 'kavach'. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 3-7, 2010.
- MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLOS One**, v. 4, e7596, 2009.
- MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant affects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 378-382, 2007.
- MORENO-MURILLO, B. et al. Essential Oil from Leaves of *Lippia dulcis* Grown in Colombia. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 613-614, 2010.
- MOTA, M. L. et al. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, p. 658-664, 2012.
- MOTHANA, R. A. A. et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, p. 323-330, 2010.
- MOULTON, B. C.; FRYER, A. D. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 44-52, 2011.
- MUJOVO, S. F. et al. Bioactive compounds from *Lippia javanica* and *Hoslundia opposita*. **Natural Product Research**, v. 22, p. 1047-1054, 2008.
- MÜLLER-RIEBAU, F. J. et al. Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 4821-4825, 1997.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 3-35, 2004.
- NETO, A. C. et al. The role of polar phytocomplexes on anticonvulsant effects of leaf extracts of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown chemotypes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 933-939, 2009.
- NETO, R. M. et al. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 261-266, 2010.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NGAMO, T. J. S. et al. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera : Curculionidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 2, p. 164-167, 2007.

NOAMESI, B. K.; ADEBAYO, G. I.; BAMGBOSE, S. O. A. Muscle relaxant properties of aqueous extract of *Lippia multiflora*. **Planta Medica**, v. 51, p. 253-255, 1985.

NOGUEIRA, M. A. et al. Antibacterial activity of *Lippia Alba* (lemon herb). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 404-406, 2007.

NUNES, X. P. et al. Biological Oxidations and Antioxidant Activity of Natural Products. In: RAO, V. (ed). **Phytochemicals as nutraceuticals: global approaches to their role in nutrition and health**. Rijeka (Croácia): InTech, 2012, p. 2-20.

OBLEDO, E. N. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of Mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK) against pathogens of *Agave tequilana* Weber var. azul. **Phyton: International Journal of Experimental Botany**, p. 249-254, 2002.

OCAZIONEZ, R. E. et al. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 304-309, 2010.

OHNO, T. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, p. 207-215, 2003.

OLADIMEJI, F. A. et al. Pediculocidal and scabificidal properties of *Lippia multiflora* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 305-311, 2000.

OKPEKON, T. et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 91-97, 2004.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, F. P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 510-516, 2006.

OLIVEIRA, V. C. S. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, p. 1053-1059, 2009.

OLIVERO-VERBEL, J.; GÜETTE-FERNANDEZ, J.; STASHENKO, E. Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 8, p. 419-427, 2009.

OLIVIER, D. K. et al. Phenylethanoid glycosides from *Lippia javanica*. **South African Journal of Botany**, v. 76, p. 58-63, 2010.

- ONO, M. et al. DPPH radical-scavenging effect on some constituents from the aerial parts of *Lippia triphylla*. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 101-106, 2008.
- ONO, M. et al. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1175-1177, 2005.
- O'RIORDAN; LEE, J. C. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 218-234, 2004.
- ORMEÑO, E.; FERNANDEZ, C.; MÉVY, J-P. Plant coexistence alters terpene emission and content of Mediterranean species. **Phytochemistry**, v. 68, 840-852, 2007.
- OWOLABI, M. S. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Nigeria. **Records of Natural Products**, v. 3, p. 170-177, 2009.
- PALLARDY, S. Lipids, terpene, and related substances. In: _____. **Physiology of woody plants**. 3. ed. Waltham, Massachusetts: Academic Press, 2008. p. 217-232.
- PAREDES-AGUILAR, M. D. et al. Antimicrobial effect of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) and its essential oil against five *Vibrio* species. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 30, p. 261-267, 2007
- PASCUAL, M. E. et al. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Il Farmaco**, v. 56, p. 501-504, 2001a.
- PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214, 2001b.
- PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.
- PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 50-52, 2005.
- PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B. Natural products drug discovery: accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 220-227, 2010.
- PÉLISSIER, Y. et al. A chemical, bacteriological, toxicological and clinical study of the essential oil of *Lippia multiflora* Mold. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 6, p. 623-630, 1994.
- PELLETIER, S. et al. Prostaglandin E₂ increases cyclic AMP and inhibits endothelin-1 production/secretion by guinea-pig tracheal epithelial cells through EP₄ receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, p. 999-1008, 2001.
- PÉREZ, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 1-4, 2005.

PESSOA, O. D. L. et al. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia* aff. *Gracilis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 712-714, 2005.

PINTO, C. P. **Atividade antimicrobiana e perfil químico de espécies do gênero *Lippia* do semi-árido da Bahia**. 2008. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana.

PONCE-MONTER, H. et al. Chemical composition and antispasmodic effect of *Casimiroa pringlei* essential oil on rat uterus. **Fitoterapia**, v. 79, p. 446-450, 2008.

POZZATTI, P. et al. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 950-956, 2008.

PRIVIERO, F. B. M.; WEBB, R. C. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, p. 229-233, 2010.

PUPO, M. T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

QUARTILHO, A. et al. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB₂ cannabinoid receptors. **Anesthesiology**, v. 99, p. 955-960, 2003.

RAHIMI, R. et al. A review of the herbal phosphodiesterase inhibitors; future perspective of new drug. **Cytokine**, v. 49, p. 123-129, 2010.

RAMOS, A. et al. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 241-246, 2003.

RAO, G. P. et al. Studies on chemical constituents and antifungal activity of leaf essential oil of *Lippia alba* (Mill). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 7. p. 332-335, 2000.

RASTRELLI, L. et al. Iridoids from *Lippia graveolens*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1829-1832, 1998.

RATES, S. M. K. Plants as source drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

REGNIER, T. et al. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 254-258, 2008.

RENISUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Departamento de Assistência Farmacêutica da Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde (DAF/SCTIE/MS). Fev. 2009. Disponível em <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em 11 abril 2012.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 1711-1723, 2005.

RIBEIRO, L. A. A. **Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-óico (labdano-302): um novo diterpeno ativador a via da ciclase de adenilil?** 2007. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa.

RIIHINEN, K. et al. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and ‘northblue’ blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). **Food Chemistry**, v. 110, p. 156-160, 2008.

RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101[suppl], p. 43D-49D, 2008.

RIVERO-CRUZ, I. et al. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. **Journal of Food Science**, v. 76, C309-C317, 2011.

RODRIGUES, I. S. C. et al. Antiplatelet and antigingivitis effect of *Lippia sidoides*. A double-blind clinical study in humans. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, p. 404-407, 2009.

ROJAS, L. B. et al. Chemical composition and bioactivity on bacteria and fungi of the essential oil from *Lippia micromera* Schauer. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 12, p. 69-75, 2009.

RUAN, Y. C.; ZHOU, W.; CHAN, H. C. Regulation of smooth muscle contraction by the epithelium: role of prostaglandins. **Physiology**, v. 26, p. 156-170, 2011.

SÁ, I. B.; RICHÉ, G. R.; FOTIUS, G. A. As paisagens e o processo de degradação do semi-árido nordestino. In: SILVA, J. M. C. et al. (Org.). **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. p. 17-36.

SABULAL, B. et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2469-2473, 2006.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SAKIHAMA, Y. et al. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177, p. 67-80, 2002.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* sect. *rhodolippia*

(Verbenaceae). *Darwiniana*, v. 40, p. 121-125, 2002.

_____. **Revisão Taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae).**

2000. Tese de Doutorado [Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica)] – Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo – São Paulo.

_____. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. *Acta Botanica Brasilica*, v. 24, p. 232-234, 2010.

SALIMENA, F. R. G. et al. **Verbenaceae in Lista de espécies da flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB021457>>. Acesso em 15 abril 2012

SALIMENA, F. R. G.; SILVA, T. R. S. F. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Verbenaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 27, p. 119-120, 2009.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 7, p. 283-294, 2010.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E. et al. Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *Gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 142-147, 2007.

SANTIAGO, G. M. P. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera : Culicidae) of essential oils of *Lippia* species from Brazil. *Natural Product Communications*, v. 1, p. 573-576, 2006.

SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* HBK. *Journal of Essential Oil Research*, v. 16, p. 504-506, 2004.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 240-244, 2000.

SANTOS, H. S. Cytotoxic naphthoquinones from roots of *Lippia microphylla*. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 58c, p. 517-520, 2003.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. *Food Chemistry*, DOI 10.1016/j.foodchem.2012.03.058, 2012.

SAYURI, V. A. et al. Chemical composition, seasonal variation, and biosynthetic considerations of essential oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chemistry and Biodiversity*, v. 7, p. 2771-2782, 2010.

SCHAIBLE, H-G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. *Arthritis Research and Therapy*, v. 13, 210, 2011.

SCHLEMPER, V. et al. Mechanisms underlying the relaxation response induced by bradykinin in the epithelium-intact guinea-pig trachea *in vitro*. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, p. 740-750, 2005.

SCHMIDT, C. et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 523-532, 2009.

SCHWARZ, K. et al. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4874-4882, 2000.

SENA FILHO, J. G. et al. Phytochemistry and acute toxicity from the roots of *Lippia alba*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, p. 142-145, 2009.

SENA FILHO, J. G. et al. Distribution of iridoid glycosides in plants from the genus *Lippia* (Verbenaceae): an investigation of *Lippia alba* (Mill.) NE brown. **Natural Product Communications**, v.2, p. 715-716, 2007.

SENA FILHO, J. G. et al. Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p. 506-509, 2006.

SENATORE, F.; RIGANO, D. Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 169-171, 2001.

SHAH, A. J.; GILANI, A. H. Bronchodilatory effect of *Acorus calamus* (Linn.) is mediated through multiple pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 471-477, 2010.

SHUKLA, R. et al. Efficacy of essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown and *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet and their major constituents on mortality, oviposition and feeding behaviour of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, p. 2277-2283, 2011.

SHUKLA, R. et al. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B₁ production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 165-170, 2009.

SILVA, A. J. R. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lippia substrigosa* Turcz. growing wild in Guatemala. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 107-108, 2010.

SILVA, N. A. et al. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1281-1286, 2009.

SILVA-FILHO, J. C. et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 110, p. 171-177, 2011.

SKOGVALL, S.; ARNER, A.; GRAMPP, W. Capsaicin can abolish spontaneous tone in guinea-pig trachealis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 163, p. 73-81, 1998.

- SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977
- SOUSA, A. A. S. et al. Antispasmodic effect of *Metha piperita* essential oil on tracheal smooth muscle of rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 433-436, 2010.
- SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. **Molecules**, v. 16, p. 2233-2252, 2011.
- SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 771-777, 2008.
- SOUTO-BACHILLER, F. A. et al. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1077-1086, 1997.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.
- SPINA, D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.158, p. S141-S145, 1998.
- SPINA, D. et al. A comparison of sensory nerve function in human, guinea-pig, rabbit and marmoset airways. **Life Sciences**, v. 63, p. 1629-1642, 1998.
- STANKOVIC, M. S. et al. Antioxidant activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of different parts of *Teucrium polium* L. subsp. *polium*. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 81, p. 117-122, 2012.
- STASHENKO, E. E. et al. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. grown in Colombia. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 563-566, 2008.
- STASHENKO, E. E. et al. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93-103, 2010.
- STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, E.; MARTÍNEZ, R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.
- STRETTON, D.; BELVISI, M. G.; BARNES, P. J. The effect of sensory nerve depletion on cholinergic neurotransmission in guinea pig airways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 260, p. 1073-1080, 1992.
- SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 11613-11617, 2007.

SÜLSEN, V. et al. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitology Research**, v. 98, p. 370-374, 2006.

SZAREK, J. L. et al. Substance P and capsaicin release prostaglandin E₂ from rat intrapulmonary bronchi. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 275, p. L1006-1012, 1998.

TADEG, H. et al. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TAMAOKI, J. et al. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channel in epithelium-dependent relaxation of human bronchial smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 794-798, 1997.

TAMBE, Y. et al. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β-caryophyllene. **Planta Medica**, v. 62, p. 469-470, 1996.

TASADJIEU, N. L. et al. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. **Food Control**, v. 20, p. 161-166, 2009.

TAWAHA, K. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1372-1378, 2007.

TERPINC, P. et al. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 210-217, 2012.

THOLL, D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 297-304, 2006.

TIMOTEO, P. et al. HPLC/DAD/ESI-MS Analysis of Non-volatile Constituents of Three Brazilian Chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Natural Product Communications**, v. 3, p. 2017-2020, 2008.

TIWARI, M.; KAKKAR, P. Plant derived antioxidants – geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 23, v. 295-301, 2009.

TOMAZETTI, J. et al. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 147, p. 29-35, 2005.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, p. 606-625, 2008.

TROMBETTA, D. et al. Mechanism of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 2474-2478, 2005.

- TRONCOSO, N. S. Los generos de Verbenaceas de Sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Sur de Brasil). **Darwiniana**, v. 18, n. 3-4, p. 295-412, 1974.
- TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.
- TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.
- ULRICH-MERZENICH, G. et al. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 58, p. 208-219, 2010.
- VALE, T. G. et al. Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 127-133, 1999.
- VALENTÃO, P. et al. Studies on the antioxidant activity of *Lippia citriodora* infusion: scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1324-1327, 2002.
- VALENTIN, A. et al. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippia multiflora*. **Phytochemistry**, v. 5, p. 1439-1442, 1995.
- VANHOUTTE, P. M.; BOULANGER, C. M. Endothelium-dependent responses in hypertension. **Hypertension Research**, v. 18, p. 87-98, 1995.
- VELASCO, J. et al. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. **Natural Product Communications**, v. 2, p. 85-88, 2007.
- VERAS, H. N. H. et al. Enhancement of the antibiotic activity of erythromycin by volatile compounds of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown against *Staphylococcus aureus*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, p. 334-337, 2011.
- VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508-512, 2012.
- VIANA, G. S. B. et al. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, v. 36, p. 347-351, 1998.
- VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia oreganoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, v. 81, p. 343-349, 2010.
- VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- VILA, R. et al. Composition of the essential oil from leaves of *Lippia myriocephala* from Costa Rica. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 177-179, 2004.

- VILJOEN, A. M. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 271-277, 2005.
- VILJOEN, A. M. et al. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 271-277, 2005.
- VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. i69-i85, 2010.
- WANG, P.; KONG, C. H.; ZHANG, C. X. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ambrosia trifida* L. **Molecules**, v. 11, p. 549-555, 2006.
- WANG, R. et al. Cloning, expression and wounding induction of β -caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* H.B.K. and allelopathic potential of β -caryophyllene. **Allelopathy Journal**, v. 24, p. 35-44, 2009.
- WANG, R-L. et al. Responses of *Mikania micrantha*, an invasive weed to elevated CO₂: induction of β -caryophyllene synthase, changes in emission capability and allelopathic potential of β -caryophyllene. **Journal of Chemical Biology**, v. 36, p. 1076-1082, 2010.
- WATANABE, N. Immunohistochemical localization of vanilloid receptor subtype 1 (TRPV1) in the guinea pig respiratory system. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 18, p. 187-197, 2005.
- WATKINS, F. et al. Anglo-Saxon pharmacopoeia revisited: a potential treasure in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 16, p. 1069-1075, 2011.
- WAYMAN, G. A. et al. Analysis of CaM-kinase signaling in cells. **Cell Calcium**, v. 50, p. 1-8, 2011.
- WRAY, S.; BURDYGA, T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 113-178, 2010.
- YANG, D. et al. A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR. **Hypertension**, v. 41, p. 143-148, 2003.
- YANG, W-M. et al. Albaconol from the mushroom *Albatrellus confluens* induces contraction and desensitization in guinea pig trachea. **Planta Medica**, v. 69, p. 715-719, 2003.
- YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1101, p. 71-84, 2007.
- YU, F. H.; CATTERALL, W. A. The VGL-chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. **Science Signaling – Signal Transduction Knowledge Environment**, v15, p. 1-17, 2004.

ZÉTOLA, M. et al. CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba* – Verbenaceae (Brazilian *false melissa*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 207-215, 2002.

ZHONG, Y; SHAHIDI, F. Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4-6, 2012.

ZOGHBI, M. D. B. et al. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 29-31, 2002.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da UEFS

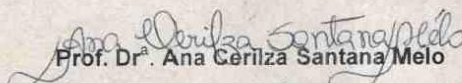


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -
Fone: (75) 3224-8398 Fax: 8398

Feira de Santana, 06 de Março de 2009.

PARECER

Após avaliação do projeto de pesquisa intitulado “**Estudo Fitoquímico e Farmacológico de Espécies do Gênero *Lippia* do Semi-árido Brasileiro**”, de autoria do Sr. Fabrício Souza Silva, que tem como pesquisadora responsável pelo projeto a Prof^ª. Dr^ª. Angélica Maria Lucchese, do Departamento de Ciências Exatas, desta Universidade, sou de parecer **FAVORÁVEL** à realização do mesmo.


Prof. Dr^ª. Ana Cêrilza Santana Melo

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Feira de Santana

Prof.ª Dr.ª Ana Cêrilza Santana Melo
Coordenadora do CEUA
Comitê de Ética no Uso de Animais
CEUA/UEFS
Prot. 497/2008