

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GIZZELLE DELFINO ARAÚJO LADEIRA

**FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer**

Belo Horizonte

2019

GIZZELLE DELFINO ARAÚJO LADEIRA

**FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para o grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho, UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado, UFMG

Belo Horizonte

2019

Dedico o grau de Mestra

Ao meu marido, Marcos Augusto Lage Ladeira, às minhas filhas, Júlia Araújo Ladeira e Sofia Araújo Ladeira, aos meus pais, Hermes Luciano de Araújo e Maria do Carmo Delfino Araújo, aos meus irmãos, Luciana Araújo Lana, Bruno Delfino Araújo e Natália Araújo Watanabe, aos meus sogros, Marcos Ladeira e Eliete Lage Ladeira e a todos os cientistas brasileiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus que, por sua infinita graça e bondade, me proporcionou tão grande experiência e me sustentou nos dias e horas mais difíceis. Toda honra e toda glória a Ele!

Ao meu marido, Marcos Augusto Lage Ladeira, por seu amor, pelas palavras de vida, pela cumplicidade e pela dedicação à nossa família nos tempos de minha ausência. Às minhas filhas, Júlia e Sofia, pelo carinho, por compartilharem do meu sonho e se alegrarem comigo em cada conquista!

Aos meus pais, Hermes Luciano de Araújo e Maria do Carmo Delfino Araújo, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim. Vocês foram os primeiros a acreditarem neste sonho! Aos meus irmãos, Luciana Delfino Araújo Lana, Bruno Luciano de Araújo, Natália Delfino Araújo Watanabe, pela nossa união, nossa aliança!

Aos meus sogros, Marcos Ladeira e Eliete Lage Ladeira por cuidarem da minha família com tanto amor e carinho, semana após semana, por todo o período do mestrado.

À minha igreja, Videira, aos meus irmãos em Cristo, pelas orações e pelas palavras graciosas liberadas sobre minha vida. Aos demais familiares e amigos, pelo apoio!

Aos meus orientadores, Rachel Oliveira Castilho e Renes Resende Machado, exemplos de competência e dedicação, pelos ensinamentos, colaboração, paciência e amizade. Agradeço por confiarem e acreditarem que seria possível concluir esse trabalho. Rachel, seu otimismo, sua alegria e seu coração generoso e benigno sempre foram motivos de inspiração para nós! Renes, sua simplicidade e competência fazem de você um grande exemplo a seguir! Aprendi muito sobre o universo da ciência com vocês e, sobretudo, preciosos ensinamentos para a vida!

A todos os professores e colegas de pós-graduação, pela amizade, colaboração e auxílio. Aos alunos de iniciação científica, em especial à aluna Thaís Magalhães Acácio, que não poupou esforços no auxílio desta pesquisa. Aos técnicos, André Hilário e Olavo Mateus de Carvalho, pelo profissionalismo e empenho no bom funcionamento do Laboratório Gnosiah.

Aos amigos especiais conquistados ao longo desta jornada: Cristiane Aparecida e Silva, Felipe Fernandes Rodrigues, Ismin Natália Santos Teixeira, Ivo Souza Ferraz de Melo, Juliana Mendes Amorim, Laura Rolla De Leo, Letícia Barbosa Santos, Nívea Cristina Vieira Neves e Paula Mendonça Leite, pela cumplicidade e aliança. Pessoas que marcaram minha trajetória e que ficarão guardadas no meu coração. Cris, vou sentir falta dos nossos cafezinhos e agradáveis conversas de fim de tarde.

Ao colega, Felipe Fernandes Rodrigues, pela parceria e empenho nas análises farmacológicas, sempre pronto a ajudar e orientar os detalhes dos experimentos.

À professora Maria José Nunes de Paiva do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade Farmácia/UFMG, à professora Maria Auxiliadora Coelho Kapan do IPPN da UFRJ, à Juliana Mendes Amorim do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia/UFMG e ao Gustavo Pereira Cosenzo do Departamento de Alimentos da Faculdade Farmácia/UFMG pelas avaliações da composição química do óleo essencial de *Lippia lacunosa*. À professora Marina Scopel, pelas valiosas dicas no estágio em docência e na pesquisa.

À Maria Adelaide Fernandes e ao José Batista Viturino, pelo profissionalismo, cooperação e grande apoio.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Marton Victor Alves, pela paciência e pronta disposição em nos ajudar sempre que era preciso.

À FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPq/UFMG pelo apoio financeiro.

A todos o meu muito obrigada!

“Quanto mais me aprofundo na Ciência mais me aproximo de Deus”

Albert Einstein

RESUMO

Lippia lacunosa é uma planta endêmica da região da Serra do Espinhaço/MG, conhecida popularmente como chá de pedestre e rosmaninho. Esta espécie apresenta aroma de manga característico e tem amplo uso tradicional, mas é pouco estudada. Estudos biomonitorados já demonstraram as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de espécies de *Lippia*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a composição micromolecular e as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos hexânico e etanólico, óleo essencial e fração contendo substância(s) majoritária(s) das folhas de *L. lacunosa*. A composição química do óleo essencial foi investigada por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM) e os principais constituintes encontrados foram os monoterpenos mirceno (13,81%), linalol (6,84%) e mircenona (25,44%) e os sesquiterpenos elemol (7,30%), espatulenol (3,15%), entre outros. O óleo essencial foi fracionado por método cromatográfico (coluna e CCD) e a fração OEF33 foi selecionada para avaliação da atividade biológica. Nos modelos de edema de pata e alodínia mecânica induzidos por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*), a administração do extrato etanólico, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, *p.o*) não alterou significativamente o edema de pata dos camundongos Swiss. Em contrapartida, a administração do extrato hexânico, óleo essencial (50 ou 100 mg/Kg, *p.o.*) ou fração OEF33 (10 mg/Kg, *p.o.*) reduziram o edema de pata. O extrato etanólico (100 mg/Kg) reduziu a alodínia mecânica somente na 2ª hora de avaliação. Por outro lado, o extrato hexânico (50 ou 100 mg/Kg), óleo essencial (100 mg/Kg), assim como a fração OEF33 (10 mg/Kg) reduziram a alodínia mecânica durante todo o período de avaliação. O extrato hexânico, óleo essencial e fração OEF33 também reduziram a resposta nociceptiva induzida por calor. A atividade motora dos animais, avaliada pelo tempo de permanência na haste girante, não foi prejudicada pela administração dos derivados vegetais e OEF33. Os resultados demonstram a atividade marcante do extrato hexânico, óleo essencial e fração OEF33 em modelos de inflamação e dores nociceptiva e inflamatória. A elucidação da composição do óleo essencial e a demonstração da atividade de *L. lacunosa* em modelos experimentais de inflamação e dor podem auxiliar na validação da utilização etnofarmacológica, visando a avaliação da espécie como candidata a medicamento fitoterápico ou fitofármaco no tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas.

Palavras-chave: *Lippia lacunosa*. Extrato hexânico. Extrato etanólico. Óleo essencial. Etnofarmacologia. Nocicepção. Inflamação. CG-EM. CLUE.

ABSTRACT

Lippia lacunosa is an endemic plant in the Serra do Espinhaço/MG region, popularly known as “chá de pedereste” and rosmaninho. This species has a characteristic mango aroma and has wide traditional use, but it is little studied. Biomonitoring studies have already demonstrated the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia* species. Thus, the objective of the present work was to evaluate the micromolecular composition and the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the extracts hexane and ethanolic, essential oil and fraction containing major substance (s) obtained from the leaves of *L. lacunosa*. The chemical composition of the essential oil was investigated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the main constituents found were the monoterpenes myceno (13.81%), linalol (6.84%) and myrcenone (25.44%) and sesquiterpenes elemol (7.30%), espatulenol (3.15%), among others. The essential oil was fractionated by chromatographic method and the OEF33 fraction was selected for evaluation of the biological activity. In the models of paw edema and mechanical allodynia induced by carrageenan (600 µg, 30 µL, *i.pl.*), the administration of the ethanolic extract at the doses of 25, 50 and 100 mg / kg, *p.o.*) did not significantly altered the paw edema of the Swiss mice. In contrast, administration of the hexane extract, essential oil (50 or 100 mg / kg, *p.o.*) or OEF33 fraction (10 mg / kg, *p.o.*) reduced paw edema. Ethanolic extract (100 mg / kg) reduced mechanical allodynia only at the second hour of evaluation. On the other hand, the hexane extract (50 or 100 mg / kg), essential oil (100 mg / kg), as well as the OEF33 fraction (10 mg / kg) reduced mechanical allodynia throughout the evaluation period. The hexane extract, essential oil and OEF33 fraction also reduced the heat induced nociceptive response. The motor activity of the animals, evaluated by the residence time in the rotating rod, was not affected by the administration of the vegetal derivatives and OEF33. The results demonstrate the remarkable activity of the hexane extract, essential oil and OEF33 fraction in models of inflammation and nociceptive and inflammatory pain. The elucidation of the composition of the essential oil and the demonstration of the activity of *L. lacunosa* in experimental models of inflammation and pain can help in the validation of the ethnopharmacological use, aiming the evaluation of the species as a candidate for the phytotherapeutic drug or phytopharmaceutical in the treatment of patients with inflammatory and painful conditions.

Key words: *Lippia lacunosa*. Hexanic extract. Ethanolic extract. Essential oil. Ethnopharmacology. Nociception. Inflammation. GC-MS. UPLC.

LISTA DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS

Mirceno.....	36
Mircenona.....	36
Ácido oleanólico.....	36
Cirsimaritina.....	36
Eupatilina.....	36
Eupatorina.....	36
Salvigenina.....	36
3' -O-metil-eupatorina.....	36
3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi- flavona.....	36
7' -O-metil-apigenina.....	36
Isopreno.....	58
Linalol.....	88
Elemol.....	88
Espatulenol.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Lippia lacunosa</i>.....	32
Figura 2 - Núcleo fundamental de uma flavona e sua numeração.....	36
Figura 3 - Esquema do procedimento de extração por maceração da droga vegetal.....	43
Figura 4- Aparelho para extração de óleos voláteis pelo processo de hidrodestilação	44
Figura 5 – Camundongo Swiss.....	47
Figura 6 – Pletismômetro: aparato usado para a avaliação do edema de pata.....	50
Figura 7 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico e hexânico e óleo essencial sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	50
Figura 8 - Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica.....	52
Figura 9 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico e hexânico e óleo essencial sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	52
Figura 10 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.....	53
Figura 11 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico e hexânico e óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.....	53
Figura 12 - Aparato usado para a avaliação da atividade motora.....	54
Figura 13 - Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelos extratos etanólico, hexânico e óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.....	55
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtidos por CLUE- DAD para o extrato etanólico de <i>L. lacunosa</i>, λ 211 nm.....	60
Figura 15 - Espectros de absorção no ultravioleta de picos (tempo de retenção de 9,1 a 11,4 min.) representativos de flavonoides majoritários no extrato etanólico de <i>L. lacunosa</i>.....	61

Figura 16 - Perfil cromatográfico obtidos por CLUE-DAD para o extrato hexânico de <i>L. lacunosa</i>, λ 211 nm.....	62
Figura 17 - Perfil cromatográfico obtidos por CLUE- DAD para o óleo essencial de <i>L. lacunosa</i>, λ 211 nm.....	63
Figura 18 - Perfis cromatográficos da composição química do extrato hexânico (A) e do óleo essencial (B) das folhas de <i>L. lacunosa</i>, por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM).....	64
Figura 19 - Efeitos induzidos pelo extrato etanólico ou dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	66
Figura 20 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico ou dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	67
Figura 21 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial ou dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	68
Figura 22 - Efeitos induzidos pelo extrato etanólico ou dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	71
Figura 23 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	72
Figura 24 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	73
Figura 25 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico ou dipirona sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente.....	75
Figura 26 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial ou dipirona sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente.....	75
Figura 27 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico ou fenobarbital sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante.....	77
Figura 28 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial ou fenobarbital sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante.....	77

Figura 29 – Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para a avaliação da separação dos constituintes do óleo essencial (OE) de <i>L. lacunosa</i>.....	85
Figura 30 - Cromatograma do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> obtido por CG-EM.....	87
Figura 31 - Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para o β-mirceno presente no óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para o β-mirceno presente na biblioteca NIST (em vermelho).....	89
Figura 32 - Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para o β-linalol presente no óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para o β-linalol presente na biblioteca NIST (em vermelho).....	90
Figura 33 - Figura 33 – Espectro de massas obtido por CG-EM para a mircenona presente no óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> obtido por CG-EM.....	90
Figura 34 - Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para o elemol presente no óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para elemol presente na biblioteca NIST (em vermelho).....	91
Figura 35 - Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para o espatulenol presente no óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para espatulenol presente na biblioteca NIST (em vermelho).....	91
Figura 36 – Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para a avaliação da separação dos constituintes das frações do óleo essencial (OE) de <i>L. lacunosa</i>.....	97
Figura 37 - Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para a avaliação da separação da fração 33 (OEF33) do óleo essencial (OE) de <i>L. lacunosa</i>.....	98
Figura 38 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas da sobreposição do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> (preto) e da fração 33 (OEF33) (azul).....	98
Figura 39: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas da fração 20 do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i>.....	99
Figura 40: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas da fração 46 do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i>.....	

Figura 41: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas da fração 33 do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i>.....	100
Figura 42- Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> ou dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	102
Figura 43 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> ou dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....	104
Figura 44 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> ou dipirona sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente.....	105
Figura 45 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> ou fenobarbital sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química (% relativa da área do pico) do óleo essencial de flores e folhas de <i>L. lacunosa</i>.....	34
Tabela 2 - Porcentagem da composição química do óleo essencial extraído das folhas de <i>L. lacunosa</i>, determinado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	35
Tabela 3 - Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLUE-UV/DAD dos derivados de <i>L. lacunosa</i>.....	46
Tabela 4 - Rendimento das extrações obtidas a partir das folhas secas e pulverizadas de <i>L. lacunosa</i>.....	57
Tabela 5 - Gradiente de eluição empregado no processo de obtenção das frações em coluna cromatográfica do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i>.....	81
Tabela 6 - Comparação do perfil de fragmentação (<i>m/z</i>) dos principais componentes do óleo essencial de <i>L. lacunosa</i> na amostra, biblioteca NIST e biblioteca ADAMS.....	89
Tabela 7 - Porcentagem da composição química do óleo essencial (% relativa da área sob cada pico) extraído das folhas de <i>L. lacunosa</i>, determinado por cromatografia gasosa acoplada de espectroscopia de massas.....	92
Tabela 8 - Correlação entre a fase móvel e frações coletadas durante a cromatografia em coluna.....	95
Tabela 9 - Rendimento das frações isoladas do óleo de <i>L. lacunosa</i>, por cromatografia em coluna, expresso em massa (g) e porcentagem (%)......	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
ACN	Acetonitrila
AIE	Anti-inflamatório esteroide
AINE	Anti-inflamatório não-esteroide
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EtOH	Etanol
Ext. EtOH	Extrato etanólico
Ext. HEX	Extrato hexânico
<i>et al.</i>	et alia

EUA	Estados Unidos da América
HEX	Hexano
<i>i.p.</i>	Intraperitoneal
<i>i.pl.</i>	Intraplantar
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IR	Índice de retenção
Kg	Quilograma
Ltda	Limitada
MG	Minas Gerais
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidase
N	Número de animais experimentais
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento de nervos
NIST	National Institute of Standards and Technology
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OE	Óleo essencial
OEF33	Fração 33 do óleo essencial

P	Probabilidade de significância
<i>p.o.</i>	<i>Per os</i>
p/v	Concentração em peso por volume
PA	Para análise
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Tempo de retenção
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3 OBJETIVOS.....	39
PARTE 1 - Extração do material vegetal, avaliação fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de <i>Lippia lacunosa</i> Mart. & Schauer.....	40
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
PARTE 2 - Fracionamento, caracterização do óleo essencial e da fração 33 de <i>Lippia lacunosa</i> Mart. & Schauer e avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.....	79
1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4 PERSPECTIVAS.....	107
5 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações, constituindo, ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação. Os produtos naturais vêm ganhando destaque, pois podem ser fontes promissoras de substâncias biotivas (GOMES *et al.*, 2011; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013).

Muitas informações sobre a utilidade das plantas nativas foram registradas por naturalistas que viveram nos séculos XVIII e XIX no Brasil e a contribuição para o conhecimento da flora brasileira é incalculável: centenas de novas plantas foram descobertas e descritas. Destaque deve ser dado aos registros do botânico francês Auguste de Saint-Hilaire, que redigiu a obra específica *Plantas Usuais dos Brasileiros* (BRANDÃO *et al.*, 2009; BRANDÃO, 2010, BRANDÃO, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012). A espécie *L. pseudothea* (A.St.-Hil.) Schauer, conhecida popularmente como chá de pedestre, por exemplo, é uma planta brasileira, endêmica da Serra do Espinhaço, região de Diamantina/MG (BRANDÃO *et al.*, 2011; ECHTERNACHT *et al.*, 2011) e há muitos anos conhecida pela população brasileira e naturalistas. Essa espécie, muito confundida com *Lippia lacunosa*, foi citada na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (FBRAS, 1929; BRANDÃO *et al.*, 2009) e retirada por falta de estudos e interesse científico. Por ser uma região de alto endemismo, *L. lacunosa* é usada, pela população local, para os mesmos fins terapêuticos de *L. pseudothea* e *Lippia rotundifolia*. Estas espécies são confundidas pela população por serem muito parecidas e denominadas pelos mesmos nomes populares: chá de pedestre, rosmaninho e chá de frade (LEITÃO *et al.*, 2008; SALIMENA, 2010; SOUZA *et al.*, 2015; MEIRA *et al.*, 2017).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para o conhecimento das atividades terapêuticas das espécies vegetais, apesar de, na maioria das vezes, não se saber os seus constituintes químicos, as reais atividades biológicas e farmacológicas e a toxicidade das espécies. No Brasil, há grande diversidade em espécies vegetais, mas ainda é baixo o número de plantas cuja ação

terapêutica é cientificamente comprovada e cujo mecanismo de ação é conhecido. Assim, o estudo dos exemplares biológicos dos diversos ecossistemas brasileiros constitui uma interessante perspectiva de descoberta de produtos naturais com potencial farmacológico, alimentício e industrial (CASTILHO & BRAGA, 2011).

Extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia spp.* têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao uso na medicina popular e ao potencial dos princípios bioativos (GOMES *et al.*, 2011). Vários estudos em espécies de *Lippia* demonstraram sua potencial atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (MENDES *et al.*, 2010; GUIMARAES *et al.*, 2012B; RIELLA *et al.*, 2012; PÉREZ, *et al.*, 2005).

A espécie *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer é uma planta brasileira encontrada nos campos rupestres da Serra do Espinhaço, na região de Diamantina/MG, e há muitos anos conhecida pela população e pelos naturalistas (SALIMENA *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2010, MEIRA *et al.*, 2017). Essa planta é muito usada pela população em gripes, resfriados, sinusites, tosse, banhos relaxantes e como escalda-pés após longas caminhadas (PASCUAL *et al.* 2001; BRANDÃO *et al.* 2010; MEIRA *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o estudo fitoquímico e a avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das folhas de *L. lacunosa* podem auxiliar na viabilização da melhor utilização da espécie e contribuir com a pesquisa de fitofármacos ou medicamentos fitoterápicos úteis no tratamento da dor e inflamação, bem como aumentar o conhecimento científico a respeito de espécies vegetais brasileiras utilizadas medicinalmente pela população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dor e inflamação

A dor é o sintoma que mais leva indivíduos a procurarem assistência médica e o que causa maior sofrimento ao indivíduo (LOESER & MELZACK, 1999). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais, emocionais e cognitivos e que está associada a uma lesão real ou potencial. Assim, a manifestação nociceptiva não envolve apenas a transdução de sinais pelo sistema nervoso, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo. A dor aguda é uma manifestação clínica importante para o diagnóstico de várias doenças e para induzir um comportamento de precaução, evitando maiores danos ao indivíduo (WOOLF, 2000, JULIUS & BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004). Woolf (2004) propôs que a dor pode ser categorizada em quatro tipos principais, que consiste em dor nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática e dor disfuncional.

2.1.1 Dor nociceptiva

A dor nociceptiva é uma resposta aguda induzida por estímulos nocivos diversos (químicos, térmicos ou mecânicos) que ativam diretamente os nociceptores e tem um caráter fundamentalmente protetor, visando evitar ou reduzir uma lesão tecidual, acelerar a cicatrização do tecido e, conseqüentemente, a recuperação do paciente (SCHOLZ & WOOLF, 2002). A importância fisiológica desse tipo de dor fica evidente quando se constata que pacientes com insensibilidade congênita a estímulos nocivos (analgesia congênita) geralmente morrem durante a infância (NAGASAKO *et al.*, 2003; WOOLF, 2004).

Nesse tipo de dor, os estímulos ativam diretamente os neurônios de diâmetro médio e levemente mielinizados, denominados nociceptores A δ , e os neurônios de menor diâmetro e não mielinizados, denominados de nociceptores C (JULIUS & BASBAUM, 2001; WOOLF, 2004). Como todos os neurônios sensoriais primários, os nociceptores têm os seus corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal ou trigeminais e o axônio no sistema nervoso central (SNC) fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem (BROWER, 2000; WOOLF, 2004). O alívio da dor nociceptiva tradicionalmente ocorre em situações muito específicas, quando pacientes podem relatar dor muito intensa, como durante procedimentos cirúrgicos ou após traumas (SCHOLZ & WOOLF, 2002).

2.1.2 Dor inflamatória

A dor inflamatória resulta da ação de múltiplos mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores e, geralmente, está relacionada à inflamação decorrente de uma lesão ou infecção tecidual. Diversos estímulos podem causar lesão tecidual provocando a inflamação, que tem como objetivo final a eliminação tanto desses estímulos quanto das consequências da lesão, como células e tecidos necróticos. Logo, a inflamação é uma resposta adaptativa do organismo que visa restaurar a homeostasia (MEDZHITOV, 2008; WOOLF, 2004).

A reação inflamatória é caracterizada por eventos complexos no tecido afetado, levando a vasodilatação arteriolar, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, exsudação plasmática e migração leucocitária para o espaço extravascular. Grande parte dessas alterações são decorrentes da ação de mediadores inflamatórios. Os mediadores inflamatórios contribuem para o desenvolvimento da dor inflamatória. Entre esses, podem ser citados o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina (IL)-1 β , as prostaglandinas (PGs), o fator de crescimento de nervos (NGF), serotonina, histamina, substância P, óxido nítrico (NO) e adenosina, que ativam ou sensibilizam os nociceptores, levando a alterações funcionais de neurônios do SNC (COLLINS,

1999; KIM & DEUTSCHMAN, 2000; SCHOLZ & WOOLF, 2002). A sensibilização de neurônios sensoriais no SNP e no SNC, bem como a facilitação do processamento nociceptivo, contribuem para o aparecimento de uma manifestação comum aos processos inflamatórios: o aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar a estímulos não nocivos, ou seja, a hiperalgesia e a alodínia, respectivamente. Essa sensibilidade aumentada é resultado da ação de mediadores químicos de origem plasmática ou liberados por vários tipos celulares residentes ou que migraram para o local da lesão tecidual (LOESER & TREEDE, 2008; KOTAS & MEDZHITOV, 2015).

2.1.3 Dor neuropática

A dor neuropática é definida como uma dor causada ou iniciada por uma lesão primária ou por disfunções do SNP ou SNC (MERSKEY & BOGDUK, 1994). O impacto da dor neuropática sobre a qualidade de vida é marcante, uma vez que apresenta um caráter crônico, muitas vezes é intensa e está frequentemente associada a distúrbios do sono e do humor, como ansiedade e depressão (SMITH & TORRANCE, 2012). Os pacientes com dor neuropática geralmente apresentam resistência ao tratamento, principalmente porque os mecanismos subjacentes ainda são pouco conhecidos (HARDEN & COHEN, 2003; WOOLF, 2004).

Os mecanismos imunes e inflamatórios (atividade ectópica de neurônios, sensibilização periférica e central e neuroinflamação) desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor neuropática. A lesão periférica do nervo induz a ativação de células imunes residentes, que liberam vários mediadores, incluindo citocinas e eicosanoides, os quais contribuem para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos e para o aumento da expressão de genes para canais iônicos diversos. Esses eventos induzem alterações fenotípicas marcantes que resultam em sensibilização ou ativação dos nociceptores, com consequente alodínia, hiperalgesia ou dor espontânea (BARON *et al.*, 2010; HEHN *et al.*, 2012).

2.1.4 Dor disfuncional

A dor disfuncional é uma categoria de dor menos conhecida, de causas desconhecidas e de caráter crônico, associada a um funcionamento e/ou reatividade anormal do sistema nervoso, em que o ganho ou a sensibilidade aumentada do aparelho sensorial amplifica os sintomas. Na dor funcional, os pacientes não apresentam déficit neurológico ou anormalidade neuronal periférica. Como exemplos desse tipo de dor, podem ser citadas a fibromialgia, a síndrome do intestino irritável e cefaleia tensional (WOOLF, 2004).

2.2 Farmacoterapia da dor e da inflamação

Embora diversas terapias possam ser usadas visando promover o alívio da dor, a farmacoterapia é a mais comum. Várias classes de fármacos podem ser usadas e apresentam diferentes perfis de eficácia e segurança.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos amplamente usados na clínica médica e apresentam atividades analgésica, antipirética e anti-edematogênica, sendo particularmente úteis para o alívio de dores inflamatórias. Os AINEs são os fármacos de escolha para o tratamento de pacientes relatando dores leves a moderadas, tais como cefaleias e enxaquecas, dores pós-operatória, dental e menstrual (RANG *et al.*, 2007; FURST & ULRICH, 2007; GROSSER *et al.*, 2012;). O principal mecanismo de ação proposto para os AINEs foi descrito algumas décadas depois da inserção do ácido acetilsalicílico na medicina. Vane (1971) demonstrou que esse fármaco inibe a ciclooxigenase (COX). A COX-1, denominação dada à primeira enzima descoberta, participa de vários processos fisiológicos, sendo considerada constitutiva, enquanto que a COX-2 é especialmente importante no processo inflamatório, no qual a sua atividade está aumentada (FU *et al.*, 1990; XIE *et al.*, 1991). Assim, a ação anti-inflamatória dos AINEs se deve principalmente à inibição da COX-2 e as reações adversas estão relacionadas principalmente à inibição da COX-1, incluindo irritação gástrica, ulceração da

mucosa, redução do fluxo sanguíneo renal e inibição da agregação plaquetária (CROFFORD *et al.*, 2000).

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), como a dexametasona e a prednisolona, são fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores utilizados principalmente no tratamento de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tais como asma, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (BARNES & ADCOCK, 1993). O principal mecanismo de ação dos AIEs envolve diretamente o controle da transcrição gênica, seja estímulo ou inibição. Após se ligar aos receptores no citoplasma, o complexo é transportado para o núcleo onde, ao interagir com o DNA, pode ativar a transcrição de genes para proteínas anti-inflamatórias ou inibir a transcrição de genes para enzimas ou mediadores inflamatórios (VAN DER VELDEN, 1998). Embora as atividades anti-inflamatória e imunossupressora dos AIEs sejam bem estabelecidas, o uso desses fármacos é limitado pelas reações adversas que podem induzir quando ocorre a prescrição de doses elevadas e de forma contínua. As reações adversas incluem supressão da resposta imune, dificuldade da cicatrização de lesões, insuficiência adrenal, desequilíbrio hidroeletrolítico, elevação da pressão arterial e hiperglicemia (RANG *et al.*, 2007).

Os analgésicos opioides, como a morfina e a codeína, são fármacos de escolha para o tratamento de pacientes com dores moderadas a intensas, que geralmente não conseguem um alívio adequado por meio do uso de AINEs (LEMONICA, 2008). A interação dos analgésicos opioides com os receptores opioides pode resultar em várias alterações bioquímicas importantes que contribuem para a analgesia induzida por esses fármacos. Os analgésicos opioides não apresentam atividade anti-inflamatória ou antipirética, como os AINEs (SATOH & MINAMI, 1995; LEMONICA, 2008). Embora apresentem elevada eficácia, o uso dos analgésicos opioides é limitado pelas reações adversas graves que podem induzir, tais como náuseas, vômitos, constipação, sedação, depressão respiratória e risco de morte quando usados em altas doses. Em adição, os opioides podem causar dependência e tolerância, o que leva à necessidade de doses cada vez maiores para induzir o alívio da dor (LEMONICA, 2008; YAKSH & WALLACE, 2012).

Atualmente os medicamentos mais utilizados para o tratamento da dor crônica são os antidepressivos tricíclicos e os anticonvulsivantes. Diversos estudos têm demonstrado que os antidepressivos tricíclicos aliviam dores relacionadas à neuropatia diabética, neuralgia pós-herpética, fibromialgia, entre outras (KAKUYAMA *et al.*, 2000).

Ainda, podemos citar alguns medicamentos fitoterápicos em uso clínico, como por exemplo o Acheflan®, composto pelo óleo essencial da *Cordia verbenacea*, é um medicamento fitoterápico brasileiro, com comprovada atividade anti-inflamatória (MEDEIROS *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2007; ROGERIO *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2012), indicado no tratamento local de processos inflamatórios, tais como tendinites e dores musculares, e em quadros inflamatórios dolorosos associados a traumas de membros, entorses e contusões. Motore® também é um medicamento fitoterápico, contendo 250 mg de extrato seco de *Curcuma longa* em cada cápsula, que possui atividades anti-inflamatória e antioxidante comprovadas (KAWAMORI *et al.*, 1999; RAMSEWAK *et al.*, 2000; JURENKA, 2009; RAI *et al.*, 2018), com indicação no tratamento da osteoartrite e artrite reumatoide.

Em função do exposto, conclui-se que a farmacoterapia da dor e inflamação ainda apresenta grandes limitações. Apesar de existirem fármacos bastante eficazes para o tratamento de pacientes com dores agudas ou crônicas com características nociceptivas e/ou inflamatórias, as reações adversas causadas por esses fármacos restringem seu uso. Assim, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas torna-se necessária. Os fitoterápicos e os fitofármacos constituem formas de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos e, dentro desta perspectiva, o Brasil é um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial (YUNES *et al.*, 2001).

2.3 O gênero *Lippia*

2.3.1 Aspectos gerais

O gênero *Lippia*, o segundo maior da família Verbenaceae, possui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores que contêm estruturas químicas aromáticas. Os maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, regiões áridas do sudoeste dos EUA, como também em territórios da África tropical (GOMES *et al.*, 2011; SALIMENA *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2011, SINGULANI *et al.*, 2012).

O Brasil é o principal centro de diversidade do gênero *Lippia* e possui aproximadamente 70-75% das espécies conhecidas e a maioria delas estão concentradas na Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, nos campos rupestres, onde a ocorrência de rochas é comum (VICCINI *et al.*, 2005, LEITÃO *et al.*, 2008, SALIMENA, 2010). As espécies estão distribuídas nos campos rupestres e cerrado do Brasil, regiões de alto índice de endemismo, associado às montanhas mais altas e picos alpinos (RAPINI *et al.*, 2008; SALIMENA, 2010). Destas espécies, a *L. alba* (Mill.) N. E. Brown (erva cidreira ou falsa melissa) é a mais conhecida e utilizada devido as suas propriedades medicinais (GOMES *et al.*, 2011).

Existem algumas controvérsias taxonômicas no número de espécies de *Lippia*, pois espécies muito parecidas podem ser confundidas (LEITÃO *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Lippia*, ao longo dos anos, têm apresentado problemas de nomenclatura botânica devido à dificuldade em torno da correta identificação de certas espécies causando a utilização de diversas sinonímias para uma mesma espécie em artigos científicos, *Lippia pseudothea* pode ser encontrada como *Lippia pseudo-tha*, *Lippia pseudo-tea*, *Lantana pseudothea*, *Lantana pseudo-thea*. Com o propósito de contribuir para uma solução, a sistematização das informações referentes à denominação botânica de espécies do gênero *Lippia* foi realizada pela revisão do registro dessas espécies no INPI (The International Plant Names Index) (GOMES *et al.*, 2011; FUNARI *et al.*, 2012). Outra dificuldade ocorre na identificação de *Lippia rotundifolia* e *L. lacunosa*, muitas vezes consideradas como sinônimos em muitos herbários, apesar da diferença existente na composição, na descrição olfativa e visual do óleo essencial de cada espécie (LEITÃO *et al.*, 2008).

2.3.2 Composição química do gênero

As pesquisas referentes à composição química micromolecular das espécies de *Lippia* evidenciam, principalmente, os constituintes voláteis (GOMES *et al.*, 2011). Monoterpenos são os principais metabólitos secundários encontrados em muitas espécies do gênero *Lippia*, que possui a maior biodiversidade na Serra do Espinhaço, no estado de Minas Gerais, (SALIMENA & SILVA *et al.*, 1991; VICCINI *et al.*, 2005). Entretanto, outras substâncias como alcaloides, taninos, flavonoides, iridoides e naftoquinonas também são citados. Atualmente existe um grande número de estudos fitoquímicos e farmacológicos para um número restrito de espécies do gênero, tais como *L. alba* (Mill.) N.E. Brown e *L. multiflora* Moldenke. No entanto, para as outras espécies, principalmente as nativas, os estudos são escassos no que se refere aos aspectos químicos e farmacológicos (GOMES *et al.*, 2011).

A composição química do óleo essencial de muitas espécies de *Lippia* tem sido investigada através de cromatografia gasosa e, com base nos dados publicados, os constituintes que ocorrem com maior frequência são o limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno, timol (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2011). Várias espécies têm grande diversidade de quimiotipos, o que gera diferentes composições químicas (PASCUAL *et al.*, 2001). Além disso, as concentrações desses constituintes podem variar em função de diversos fatores (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013). No gênero *Lippia*, a secreção de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas e os constituintes são muito instáveis na presença de luz, calor e umidade, conseqüentemente o horário de colheita do material vegetal pode influenciar direta ou indiretamente nas variações quantitativas e qualitativas do óleo essencial (GOMES *et al.*, 2011). A análise estatística dos perfis químicos e a evolução mensal dos locais de plantio de *Lippia multiflora* ao longo de um ano permitiram avaliar as variações na composição e a posterior escolha do melhor tempo de colheita para aplicações etnofarmacológicas (SORO *et al.*, 2016).

Os monoterpenos β -mirceno, limoneno, γ -terpineno e linalol foram identificados na fração hexânica de *L. filippeii*, *L. lupulina*, *L. pseudothea*, sendo β -mirceno

uma das principais substâncias encontradas (DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2012).

Os monoterpenos oxigenados são os mais abundantes componentes observados em algumas espécies. O neral e geraniol estão presentes em *L. diamantinensis* com 9,38 e 14,53%, respectivamente. A cânfora (25,27%) foi a principal componente de *L. filifolia* e o epóxido cis-limoneno foi o componente principal em *L. rubella* enquanto o 1,8-cineol apareceu como um composto principal em *L. pseudothea* e em *L. rosella* (25,47 e 34,64%, respectivamente) (DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2012).

A constituição de *L. pseudothea* na fração hexânica é de 8,69 % sabineno, 8,24% β -mirceno, 1,44% p- cimeno, 0,68% limoneno, 0,56% trans β -ocimeno, 2,48% γ -terpineno, 0,23% terpinoleno, 25,47% 1,8 cineol, 2,57% linalol, 2,03% cânfora, 18,70% mircenona, 2,88% α -terpineol, 4,68% β -cariofileno, 0,29% α -cariofileno, 0,65% germacreno D, 0,69% óxido de cariofileno (DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2012).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, aparecendo com relativa frequência em espécies deste gênero (GOMES *et al.*, 2011). Em 2007, Lin e colaboradores identificaram nove novas flavanonas em extrato hidroalcoólico das folhas de *L. graveolens*. Em 2001, Pascual e colaboradores relataram a presença de duas flavanonas, a naringenina e a pinocembrina, na espécie *L. graveolens*. No total, são aproximadamente 56 ocorrências de flavonoides no gênero *Lippia*, sendo 45 derivados de flavonas e 11 derivados de flavanonas (GOMES *et al.*, 2011). Encontramos relatos dos flavonoides: salvigenina, eupatorina, eupafolina, luteolina, hispidulina, diosmetina, cismaritina, cirsiolol, pectolina-arigenina, 6-hidroxluteolina de *L. citriodora* (Ort.) H.B.K.; jaceosidina, nepetina, hispidulina, hidroxluteolina e nodifloretina de *L. nodiflora* (L.) Michx (PASCUAL *et al.*, 2001).

As naftoquinonas não são frequentes nas espécies do gênero *Lippia*. No entanto, no extrato metanólico das folhas e ramos de *L. sidoides* foi isolado o lapachenol, o isocatalponol e o 6-oxo-3,4,4a,5-tetrahydro-3-hidroxi-2,2-dimetilnafto-1,2-pirano (PASCUAL *et al.*, 2001).

Outro componente presente em espécies de *Lippia* são os iridoides glicosilados. Eles são produtos do metabolismo secundário de alguns grupos vegetais e desempenham um papel de proteção contra predadores, principalmente herbívoros, por serem venenosos ou amargos (PASCUAL *et al.*, 2001). Nas plantas, os iridoides apresentam uma pronunciada distribuição em angiospermas, notadamente nas Lamiaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae e Plantaginaceae sendo, muitas vezes, utilizados como marcadores taxonômicos (GOMES *et al.*, 2011). Foram isolados dez iridoides das folhas de *L. graveolens* da Guatemala e, sendo alguns deles secoiridoides glicosilados. Os majoritários foram o ácido carioptosídico e seus derivados 6'-O-p-coumaroil e 6'-O-caffeoil. Os iridoides teviridosídeo e tevesídeo foram isolados das espécies *Lippia alba*, *Lippia javanica*, *Lippia turbinata*, *Lippia angustifolia*, *Lippia arechavaletae*, *Lippia ramboi* e *Lippia thymoides* (GOMES *et al.*, 2011).

2.3.3 Uso tradicional e atividades biológicas de espécies de *Lippia*

Existem muitas espécies de *Lippia*, economicamente importantes, usadas na medicina tradicional, em diversas doenças, por suas atividades biológicas e terapêuticas (PASCUAL *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2011, SINGULANI *et al.*, 2012). As partes usadas, na maioria das vezes, são as flores e folhas, na forma de infusão ou decocto, administradas oralmente ou por meio de emplastos (GOMES *et al.*, 2011). Além das propriedades medicinais, também podem ser usadas como alimentos, exemplo das folhas de *L. dulcis*, cujo principal componente é cerca de mil vezes mais doce que a sacarose (GOMES *et al.*, 2011). As espécies de *Lippia* também vêm sendo exploradas na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu uso potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013).

Extratos e óleos essenciais obtidos de *Lippia* spp. têm sido investigados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos. Estudos em diversas áreas do conhecimento vêm confirmando tais atividades terapêuticas usadas na medicina popular, sendo as atividades antimicrobiana e antioxidante as mais investigadas (KUNLE, *et al.*, 2003; FABRI *et al.*, 2011; SINGULANI *et*

al., 2012; FUNARI *et al.*, 2012; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013; DE MORAIS *et al.*, 2016).

Foram demonstradas atividades antioxidante, gastroprotetora, anti-helmíntica e atividade antibacteriana em gengivite e placa dentária do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* (PASCUAL *et al.*, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2007; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; LOBO *et al.*, 2015; DE MORAIS *et al.*, 2016), bem como atividades antimicrobiana (AGUIAR *et al.*, 2008; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013) e antioxidante (ARA *et al.*, 2009; FABRI *et al.*, 2011) de *L. alba*.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. rotundifolia* e *L. origanoides* frente à enterobactérias isoladas de aves foi demonstrada por Souza *et al.* (2015) e a atividade antimicobacteriana de *L. rotundifolia* foi testada por Leitão *et al.* em 2006. O efeito citotóxico de cinco diferentes espécies de *Lippia* foi avaliado *in vitro* e os resultados para *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia* demonstraram redução de células tumorais (GOMIDE *et al.*, 2013). A atividade antioxidante das partes aéreas de dezesseis espécies de *Lippia* foi determinada, comprovando o potencial valor econômico do gênero para a indústria alimentícia e farmacêutica brasileira (SINGULANI *et al.*, 2012).

Vários estudos em espécies de *Lippia* demonstraram sua potencial atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Estudos realizados com a espécie *Lippia gracilis* Shauer demonstraram que a naringenina possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva e pode ser um promissor agente terapêutico em algumas doenças (GUIMARAES *et al.*, 2012). Foram estudadas as atividades anti-inflamatória e antipirética de *L. alba* (Mill.) N E. Brown e os efeitos anti-inflamatório e cicatrizante do extrato aquoso de *L. sidoides* Cha. (GOMES *et al.*, 2011). Extrato aquoso de folhas de *Lippia nodiflora* mostrou atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana (AHMED *et al.*, 2004; AL-SNAFI *et al.*, 2013). O uso tradicional de extrato aquoso das partes aéreas de *Lippia integrifolia* para a inflamação gástrica foi pesquisado e foi observado que, além de efeitos anti-inflamatórios em células do estômago, foi identificada atividade contra *Helicobacter pylori*, principal bactéria causadora de gastrite (MARCIAL *et al.*, 2014).

Extratos etanólico e hexânico das partes aéreas de *Lippia dulcis* foram testados para avaliação anti-inflamatória em vários modelos experimentais “*in vivo*”, mostrando significativa atividade do extrato etanólico na inibição do edema de pata induzido por carragenina e redução do granuloma (PÉREZ, *et al.*, 2005). Extrato metanólico das folhas de *L. nodiflora* foi testado e apresentou significativa atividade anti-inflamatória e atividade antinociceptiva, usando modelos experimentais de dor e inflamação (AHMED *et al.*, 2004).

Resultados de estudos com as folhas de *Lippia palmeri* e *Lippia graveolens* demonstraram o papel protetor dos terpenos e polifenóis na supressão da inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LEYVA-LÓPEZ *et al.*, 2016). Atividades analgésica e anti-inflamatória foram confirmadas, usando óleo essencial das folhas de *L. gracilis* e o componente majoritário, timol, apontado como potencial responsável pelas atividades farmacológicas demonstradas (RIELLA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2010). A administração via oral do óleo essencial (OE) de *L. sidoides*, nas doses de 50 e 100 mg/kg, em camundongos, reduziu a inflamação de lesões gástricas, induzidas por etanol, e mostrou um potencial agente gastroprotetor. No mesmo estudo, foi demonstrada a atividade anti-inflamatória tópica após a aplicação do OE de *L. sidoides* na orelha de camundongos, em modelo de inflamação tópica induzida por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) (MONTEIRO *et al.*, 2007). As atividades analgésica, antipirética e anti-inflamatória do óleo essencial de *L. multiflora* Moldenke foram analisadas e estudadas, nas doses de 2, 4 e 8 mL/kg (*p.o*) em camundongos e ratos. O estudo mostrou os monoterpenos como os principais constituintes do OE de *L. multiflora*, que possuem atividade analgésica e antipirética, mas não possuem atividade anti-inflamatória (ABENA *et al.*, 2003).

2.4 A espécie *Lippia lacunosa*

2.4.1 Aspectos gerais

Lippia lacunosa Mart. & Schauer (**Figura 1**) é um arbusto monóico, 0,70 - 2 m altura e possui ramos tetragonais, tricomas glandulares sésseis, folhas com lâmina coriácea e inflorescências com corola tubo rósea ou lilás (SALIMENA *et al.*, 2009; Jardim Botânico do Rio De Janeiro, 2018).



Figura 1: *Lippia lacunosa* (fotos de Maurício Mercadante)

L. lacunosa é uma espécie brasileira, pertencente à família Verbenaceae, e, junto de outras espécies do gênero, forma um complexo de difícil delimitação taxonômica. É uma planta endêmica encontrada em campos rupestres da Serra do Espinhaço, Minas Gerais, Brasil, formando população com numerosos indivíduos em solo arenoso de áreas de transição cerrado-campo sujo (SALIMENA *et al.*, 2009; LEITÃO *et al.*, 2008, MEIRA *et al.*, 2017). Muito parecida com *L. rotundifolia* da qual se difere pela morfologia das folhas e odor. As flores, folhas e o óleo essencial apresentam um forte, característico e agradável odor de manga, relacionado à presença de mirceno e mircenona em sua composição.

A pesquisa histórica representa uma rica contribuição sobre o uso da biodiversidade brasileira. Para a espécie em estudo, são muito importantes os dados recuperados, escritos pelo naturalista francês Auguste de Saint-Hilaire, no século XIX, durante sua expedição pelo Brasil. O nome popular chá de pedestre foi apresentado, pela primeira vez, por August Saint-Hilaire, quando descreveu *L. pseudothea*, espécie muito confundida com *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, como uma espécie típica da Província de Minas Gerais, onde

crece entre rochas de quartzito (BRANDÃO *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2012; MÜGGE *et al.*, 2016; MEIRA *et al.*, 2017). *L. lacunosa* é conhecida pela população da região dos campos rupestres da Serra do Espinhaço como chá de pedestre, rosmaninho ou chá de frade, os mesmos nomes vernaculares usados para *L. rotundifolia* e *L. pseudothea* (SOUZA *et al.*, 2015; MEIRA *et al.*, 2017). O endemismo é comum nestas regiões, podendo ocorrer hibridização entre as espécies, fato corroborado por Viccini *et al.* (2005), que ao estudar quatorze espécies do gênero *Lippia*, endêmicas da Serra do Espinhaço, observou o hibridismo nas espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*. (VICCINI *et al.*, 2005; RAPINI *et al.*, 2008; MEIRA *et al.*, 2017).

Embora, em muitos herbários, *L. lacunosa* seja considerada sinônimo de outras espécies muito parecidas, tais como *L. pseudothea* e *L. rotundifolia*, existem marcantes diferenças na composição e apresentação do seu óleo essencial (LEITÃO *et al.*, 2008).

2.4.2 Composição química da espécie

Estudo realizado por Leitão *et al.* (2008) demonstrou a composição química do óleo essencial das folhas de *L. lacunosa* (**Tabela 1**) utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-EM). Aproximadamente 0,7 mL do OE foi submetido a uma eluição utilizando mistura hexano: acetato de etila em coluna cromatográfica de gel de sílica e setenta e cinco frações foram obtidas. A **Tabela 1** apresenta a composição química do OE de flores e folhas frescas de *L. lacunosa*.

Em outro estudo, os principais componentes do óleo essencial das folhas frescas de *L. lacunosa* foram identificados por CG-EM e os resultados estão apresentados na **Tabela 2** (GOMIDE *et al.*, 2013).

Tabela 1: Composição química (% relativa da área do pico) do óleo essencial de flores e folhas de *L. lacunosa*.

Componentes	RI ^a	Flores	Folhas ^b	Folhas ^c
Sabineno	977	...	0,1	...
1-octen-3-ol	981	0,3
Mirceno	992	14,7	11,9	15,2
Limoneno	1032	1,8	0,8	1,3
Dihidrotagetona	1056	0,4	0,4	1,3
Ipsdienol	1147	1,0
Mircenona	1153	45,2	64,2	35,0
(Z)-tagetona	1157	0,5	0,5	...
α -terpineol	1192	0,5	0,4	0,6
(Z)-ocimenona	1234	5,7	5,2	6,1
(E)-ocimenona	1243	14,7	4,1	13,4
Timol	1293	0,5	0,2	0,1
neril acetato	1368	0,5
geranil acetato	1386	0,5	0,5	...
(E)-cariofileno	1421	...	0,7	2,7
α -humuleno	1456	0,4	0,1	0,4
germacreno D	1480	0,8
γ -muuroleno	1482	0,3	0,1	...
δ -cadineno	1525	...	0,8	...
óxido de cariofileno	1584	0,4	1,1	0,7
epi- α -cadinol ou epi- α -muurolol	1643	...	0,2	...
Total		85,9	91,3	79,01

^a Índice de Retenção. ^b Óleo essencial extraído em Agosto/2005. ^c Óleo essencial extraído em Maio/2007.

Fonte: LEITÃO *et al.* (2008)

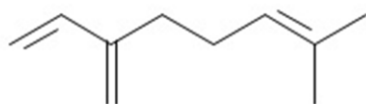
Tabela 2: Porcentagem da composição química (% relativa da área do pico) do óleo essencial extraído das folhas de *L. lacunosa*, determinado por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.

Componentes	RI ^a	Folhas
β-mirceno	991	19,47
Limoneno	1031	1,21
Linalol	1098	0,96
Mircenona	1148	58,57
α-terpineol	1189	0,53
(Z)-ocimenone	1231	3,60
(E)-ocimenone	1239	4,60
geranil acetato	1383	1,12
(E)-cariofileno	1418	3,89
α-humuleno	1454	0,57
germacreno D	1480	0,71
óxido de cariofileno	1581	1,73
(E,Z)-farnesol	1742	1,67
Total		98,63

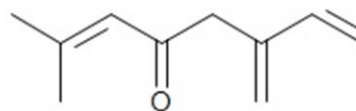
^a RI: Índice de Retenção

Fonte: GOMIDE *et al.* (2013)

Mirceno (53,53%) **(1)** e mircenona (25,41%) **(2)**, mais uma vez, foram os constituintes majoritários na composição do óleo essencial das folhas frescas de *L. lacunosa*, corroborando os resultados anteriores de Gomide *et al.* (2013; 2016).

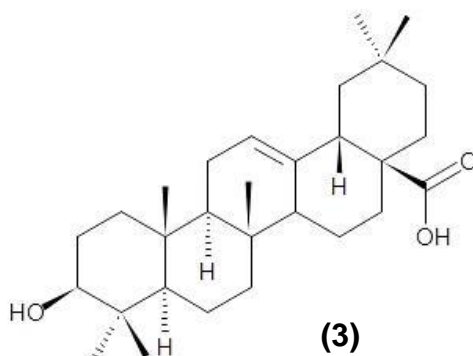


(1)



(2)

Do extrato, em diclorometano, de folhas de *L. lacunosa* foram identificados um triterpeno, o ácido oleanólico (3) e sete flavonoides (Figura 2): cirsimarina (4), eupatilina (5), eupatorina (6), salvigenina (7), 3'-O-metil-eupatorina (8), 3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxiflavona (9), 7'-O-metil-apigenina (10) (LEITÃO *et al.*, 2008; CASTELLAR, *et al.*, 2011).



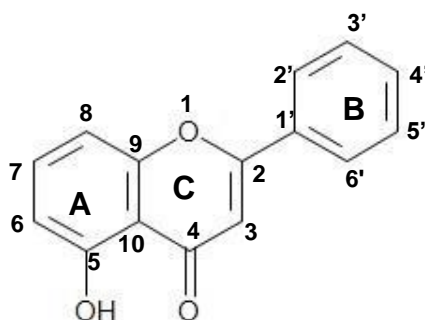


Figura 2: Núcleo fundamental de uma flavona e sua numeração.

Flavonoides	6	7	3'	4'
cirsimaritina (4)	OCH ₃	OCH ₃	*	OH
eupatilina (5)	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
eupatorina (6)	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
salvigenina (7)	OCH ₃	OCH ₃	*	OCH ₃
3' -O-metil-eupatorina (8)	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
3',7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona (9)	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
7 -O-metil-apigenina (10)	*	OCH ₃	*	OH

2.4.3 Atividades biológicas da espécie *Lippia lacunosa*

Embora muitos estudos farmacológicos tenham sido realizados para algumas espécies do gênero, poucos trabalhos foram desenvolvidos para as espécies do Brasil, tais como *L. lacunosa* (Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2018), para a qual as informações e estudos são escassos.

O efeito citotóxico do óleo essencial de cinco diferentes espécies de *Lippia* foi avaliado e os resultados mostraram o efeito citotóxico do óleo essencial de *L. sidoides*, *L. salviifolia* e *L. rotundifolia* em células tumorais do cólon CT26.WT e do óleo essencial de *L. alba* em células tumorais A549. Porém, o óleo essencial

das folhas de *L. lacunosa* não apresentou atividade citotóxica neste estudo (GOMIDE *et al.*, 2013; GOMIDE *et al.*, 2016).

Quarenta e oito extratos brutos etanólicos e frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol) de dez plantas brasileiras foram analisadas para verificação da atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*, utilizando folhas, flores, caules, raízes ou partes aéreas, em concentração fixa de 100 µg/mL. Dentre todos os extratos e frações estudados, sete apresentaram atividade, destacando-se as frações em hexano e diclorometano de folhas de *L. lacunosa* e de *L. rotundifolia*, ambas da família Verbenaceae (LEITÃO *et al.*, 2006).

Após prévia investigação de Leitão *et al.* (2006), foi realizado um estudo das folhas de *L. lacunosa* e isolados do extrato diclorometano, um triterpeno, o ácido oleanólico e sete flavonoides (flavonas): cirsimaritina, eupatilina, eupatorina, salvigenina, 3'-O-metil-eupatorina, 3,7-dimetoxi-5,6,4'-trihidroxi-flavona, 7'-O-metil-apigenina. A atividade contra cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* dos compostos isolados foi testada e o resultado demonstrou atividade antibacteriana, enfatizando a importância da investigação fitoquímica para a descoberta de novos fármacos contra a tuberculose (CASTELLAR *et al.*, 2011)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação fitoquímica e investigação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos derivados vegetais de *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar as folhas de *L. lacunosa* na Serra do Espinhaço – Diamantina/MG;
- Obter o óleo essencial e os extratos etanólico e hexânico das folhas secas de *L. lacunosa* Mart. & Schauer;
- Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos hexânico e etanólico, e do óleo essencial de *L. lacunosa*;
- Definir a matriz mais ativa para obtenção do perfil cromatográfico por CCD, CLUE-UV/DAD e CG-EM;
- Identificar os principais componentes da matriz escolhida;
- Fracionar a matriz de escolha, separando a fração contendo os componentes majoritários;
- Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da fração obtida contendo os componentes majoritários da matriz.

PARTE 1

Extração do material vegetal, avaliação fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Coleta e identificação botânica de *Lippia lacunosa*

A coleta de cerca de 2 kg partes aéreas de *L. lacunosa* Mart. & Schauer foi realizada em São Gonçalo do Rio das Pedras, Serro/MG (18° 25' 51" S; 43° 28' 55" W), nos campos ruprestres da Serra do Espinhaço, em setembro de 2017 e 2018, no mesmo mês e local. Os exemplares foram identificados pela, professora e bióloga, Dra. Fátima Regina Gonçalves Salimena, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sendo as exsiccatas depositadas no herbário do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número BHCB111231. As disposições do CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (CGEN) para acesso ao material biológico foram observadas.

1.2 Extração do material vegetal

1.2.1 Solventes e reagentes

- Acetato de etila grau PA, Neon.
- Acetonitrila grau CLAE, Tedia.
- Acetona grau PA, Synth.
- Ácido fórmico, Merck.
- Água ultrapura.
- Etanol comercial 92,8°
- Diclorometano grau PA, Neon.
- Hexano grau PA, Dinâmica.
- Metanol grau CLAE, Merck.
- Sulfato de sódio anidro PA, Alphatec.

1.2.2 Preparo do material vegetal

Após a coleta, o material vegetal foi separado em folhas, flores e caule e secos à sombra, sendo posteriormente pulverizados em moinho de facas (Moinho de facas Marconi, modelo TF 680) e armazenados em potes plásticos com tampas, guardados em local limpo, seco e escuro.

1.2.3 Extração

1.2.3.1 Extrato etanólico e extrato hexânico

Porções do material vegetal seco e pulverizado das folhas de *L. lacunosa* foram submetidas à maceração com dois solventes com auxílio de banho ultrassônico (Ultrassom Ultronique Eco-Sonics Ultronique). Os seguintes solventes extratores foram utilizados: etanol (EtOH) comercial 92,8° e Hexano (Hex) 100%. Para cada um dos solventes listados realizou-se o procedimento descrito na **Figura 3**.

Porção de 5 g do material vegetal seco (folhas) e pulverizado foi submetida à maceração com etanol comercial 92,8° e hexano, em erlenmayer de 250 mL, separadamente. Realizou-se a extração com o auxílio do banho de ultrassom (5 g/100 mL do solvente) por 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada (Centrífuga, Edutec, modelo 9004/B), 2000 rpm, utilizando-se tubos cônicos tipo Falcon, por 10 minutos. Após a decantação, filtrou-se o sobrenadante em funil simples de vidro com algodão, para balão de fundo redondo com capacidade de 500 mL e o material residual (torta) foi reservado. Foram utilizados os solventes hexano (HEX) para extrato apolar, e etanol (EtOH) para extrato polar. Esse processo foi repetido por mais duas vezes e o solvente residual dos extratos resultantes foi evaporado a 40 °C, em evaporador rotatório (Evaporador rotatório Buchi, modelo R-114 e waterbath B-480), sob pressão reduzida, até a eliminação total dos solventes orgânicos (**Figura 3**). Os extratos (hexânico e etanólico), obtidos separadamente, foram transferidos para frascos previamente pesados sendo

calculado o rendimento e então armazenados em freezer (Brastemp flex frostfree), -22 °C.

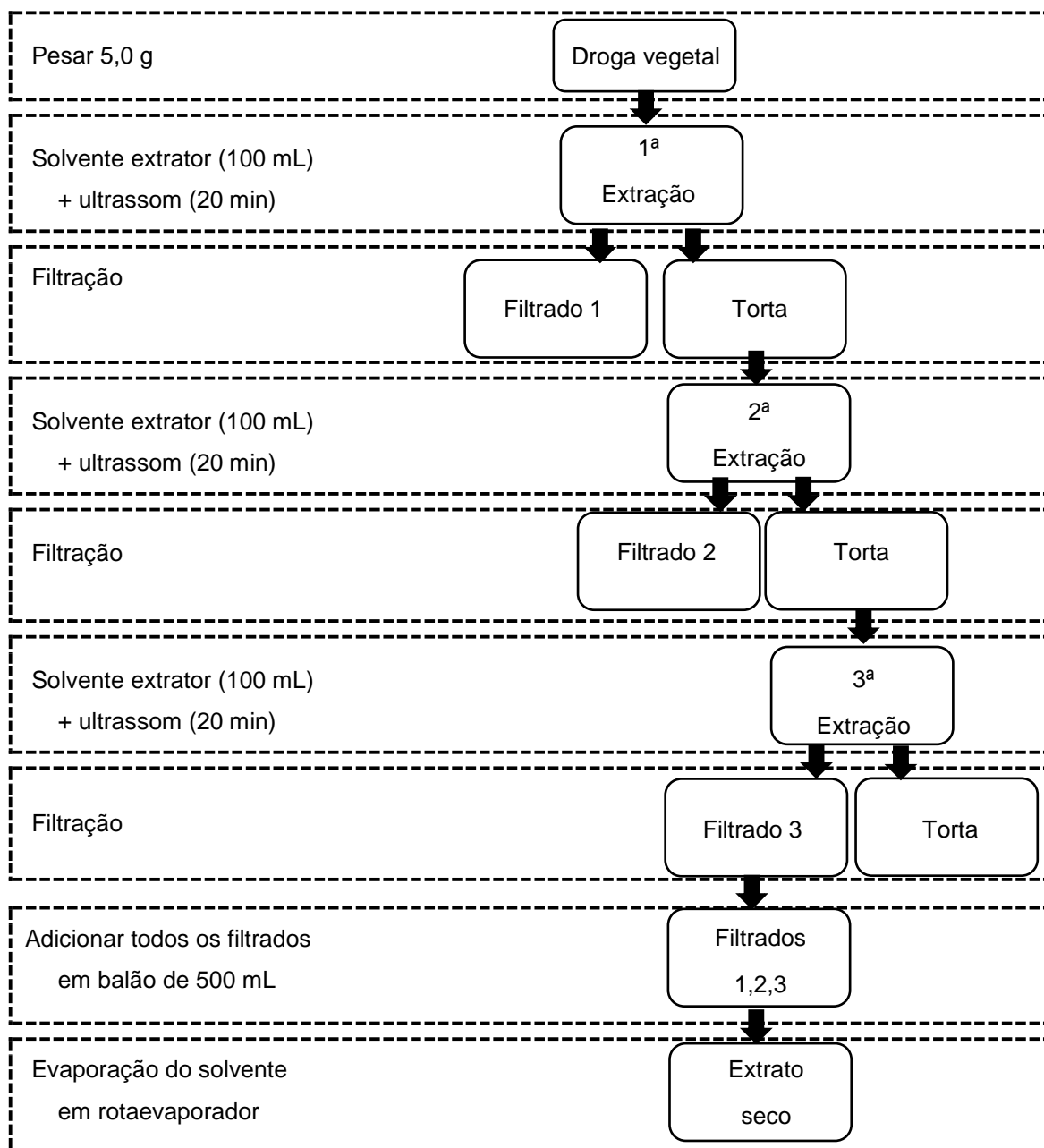
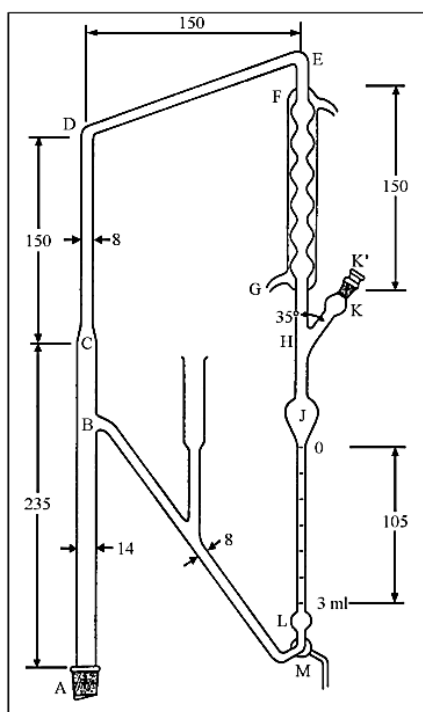


Figura 3 – Esquema do procedimento de extração por maceração da droga vegetal.

1.2.3.2 Óleo essencial (OE)

O óleo essencial de *L. lacunosa* foi obtido por meio da hidrodestilação, por 2h, em aparelho de Clevenger (**Figura 4**), modelo descrito pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FBRAS, 2010), utilizando 50 g das folhas secas e grosseiramente fragmentadas e 500 ml de água ultrapura (Purificador de água Millipore Direct-Q.) em balão de fundo redondo de 1000 mL. O tempo de extração utilizado foi de 120 min a partir da ebulição da água. O óleo foi retirado do aparelho de Clevenger para um béquer de vidro contendo sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), para a eliminação de qualquer resíduo de água. Posteriormente, o óleo essencial foi retirado do béquer, com o auxílio de uma pipeta do tipo Pasteur, e conservado em frasco de vidro protegido da luz. Este material foi armazenado em freezer (Brastemp flex frostfree), $-22\text{ }^\circ\text{C}$, até a realização da análise da composição química e dos ensaios das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.



- 1) tubo vertical (AC);
- 2) tubo dobrado, com segmentos (CD) e (DE);
- 3) condensador de bolas, tipo Allihn (FG);
- 4) rolha (K') contendo orifício que obtura uma saída lateral (K)
- 5) tubo (GH) formando as partes (HK) ângulo (GHK);
- 6) alargamento em forma de pêra (J) de 3 mL de capacidade;
- 7) tubo (JL) de 3 mL de capacidade
- 8) alargamento em forma de bola (L) de aproximadamente 2 mL de capacidade;
- 9) torneira de 3 vias;
- 10) tubo de conexão (BM) provido de tubo de segurança. O ponto de inserção (B) encontra-se a 20-25 mm acima da parte mais alta da escala graduada.

Figura 4: Aparelho para extração de óleos voláteis pelo processo de hidrodestilação

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 5ª edição.

1.3 Perfil químico dos extratos etanólico, hexânico e do óleo essencial (OE) de *Lippia lacunosa*, por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-UV/DAD)

Foi realizado um perfil químico exploratório dos extratos etanólico, hexânico e do óleo essencial de *L. lacunosa*, por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência UPLC[®] Acquity Waters), em coluna de fase reversa, acoplado a detector por arranjos de diodo (UV/DAD) (Waters) e programa Empower para processamento de dados (Waters). Foram preparadas soluções, em microtubo do tipo Eppendorf, utilizando 5 mg de extrato etanólico seco de *L. lacunosa* em 1 mL de metanol grau CLAE, 5 mg de extrato hexânico seco em 1 mL de acetonitrila grau CLAE e 5 mg de OE em 1 mL de acetonitrila grau CLAE. A dissolução foi realizada com o auxílio de um banho de ultrassom (Ultrassom Ultronique Eco-Sonics Ultronique) por 15 minutos. Após esse tempo, as soluções obtidas foram centrifugadas (Centrífuga, Cientec, modelo 15000) a 1400 g por 10 minutos. Os sobrenadantes, filtrados em filtros de 0,22 µm, foram transferidos, separadamente, para *vials* de vidro de 2 mL. Os perfis foram obtidos utilizando coluna de fase reversa (Acquity UPLC[®] BEH C18, 100 x 2,1 mm d.i., tamanho de partícula 1,7 µm), pré-coluna VanGuard[™] C18 (2,1 x 5 mm, 1,7 µm) e temperatura do forno de 40 ± 5°C. Foram injetados 2 µL de cada solução em fluxo de 0,3 mL/min. A leitura foi realizada em λ 211 e 350 nm. Empregou-se gradiente linear utilizando como fase móvel uma mistura de água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (ACN) grau CLAE acidificado com 0,1% de ácido fórmico por 28 min (perfil exploratório) (**Tabela 3**).

A substância de referência utilizada foi o nerolidol (Sigma-Aldrich, USA). Pesou-se 1,0 mg de padrão diretamente para tubos do tipo Eppendorf, seguido de solubilização em 1,0 mL de acetonitrila grau cromatográfico. Para a completa solubilização, utilizou-se o banho de ultrassom durante 15 minutos. Em sequência, a amostra foi centrifugada a 1400 g por 10 minutos, o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm e empregado nas análises em CLUE-UV/DAD como descrito para as amostras. A escolha do padrão foi realizada de acordo

com a disponibilidade de padrões no laboratório e com base no levantamento bibliográfico da química micromolecular da espécie estudada. A análise para a substância de referência foi realizada nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para os extratos e óleo essencial.

Tabela 3 – Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis por CLUE-UV/DAD dos derivados de *L. lacunosa*.

Tempo (min)	Fase móvel		Temp. (°C)	Fluxo (mL/min)
	ACN (%)	H ₂ O (%)		
0	5	95	40	0,3
24	95	5		
26	95	5		
28	5	95		

1.4 Perfil cromatográfico e análise do extrato hexânico e do óleo essencial (OE) de *Lippia lacunosa*, por cromatografia gasosa (CG-EM)

A análise do extrato hexânico e do óleo essencial de *L. lacunosa* foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS). Utilizou-se o CG System 6890N SII acoplado ao espectrômetro de massas 5973 Network, ambos da Agilent Technologies, com coluna capilar Agilent 122-5532 DB-5MS (30 m x 250µm x 0,25 µm), hélio como gás carreador em um fluxo constante de 1 mL/min, com programação de temperatura de 60-290° C (10° C/min), e 70V e temperatura do transferline de 280° C, fonte de íons 230° C.

1.5 Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa*

1.5.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (**Figura 5**), com massas entre 25 e 30 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos em sala com temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ$ C, a qual corresponde à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, água e ração foram fornecidas *ad libitum*. A administração dos extratos e do óleo essencial de *L. lacunosa* foi feita pela via *per os* (*p.o.*), sendo a ração retirada 10 h antes do tratamento. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos dois dias antes da realização dos experimentos. Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia (deslocamento cervical após sedação/anestesia). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (ZIMMERMANN, 1983). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número de protocolo 277/2017. Os ensaios de atividade biológica foram realizados com a orientação do Prof. Renes de Resende Machado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.



Figura 5 – Camundongo Swiss
(Fonte: UFSJ – Linhagens de Animais)

1.5.2 Fármacos, reagentes e veículos

- Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich, EUA) – Veículo.
- Carragenina λ tipo IV (Sigma, EUA) – Estímulo nocivo/inflamatório.
- Cloridrato de cetamina (União Química, Brasil) – Anestésico.
- Cloridrato de xilazina (União Química, Brasil) – Coadjuvante de anestesia.
- Dexametasona 21-fosfato dissódico (Sigma, EUA) – Anti-inflamatório esteroide.
- Dipirona sódica (Sanofi Aventis, Brasil) – Analgésico.
- Fenobarbital (Gardenal[®], Sanofi Aventis, Brasil) – Fármaco depressor do SNC.
- Solução de cloreto de sódio 0,9% p/v (Sanobiol, Brasil) – Veículo.

1.5.3 Preparo das soluções e suspensões, doses e vias de administração

1.5.3.1 Solução de CMC

A solução de CMC 0,5% (p/v) foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% no dia anterior ao experimento.

1.5.3.2 Extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa*

As amostras de extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial foram preparadas em solução de CMC 0,5% e administradas imediatamente por via *p.o.* em volume de 10 mL/kg. As doses do extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial utilizadas nos protocolos experimentais foram de 25, 50 e 100 mg/kg.

1.5.3.3 Estímulo inflamatório: carragenina

A suspensão de carragenina 2% foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, no dia anterior ao experimento e armazenada sob refrigeração. Foram injetados 30 µL (600 µg de carragenina) dessa suspensão por via *i.pl.* na pata posterior direita dos camundongos.

1.5.3.4 Dexametasona, dipirona e fenobarbital

As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de dipirona, dexametasona e fenobarbital foram 500 mg/kg, 5 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. As soluções de dipirona e fenobarbital foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg e 8 mL/kg, respectivamente. A dexametasona foi administrada por via *i.p.* em volume de 8 mL/kg.

1.6 Avaliação do edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação do edema de pata foi usado um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (**Figura 6**). Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa o valor do volume observado.



Figura 6 – Pletismômetro: aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.

O volume de pata basal de cada animal foi medido no dia anterior ao experimento e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os volumes de pata basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados seis animais. O extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial foram administrados *p.o.*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. O extrato etanólico, extrato hexânico, óleo essencial ou o controle positivo dexametasona foram administrados 30 min antes da administração por via *i.pl.* de 600 μ g de carragenina (30 μ L da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 7**).

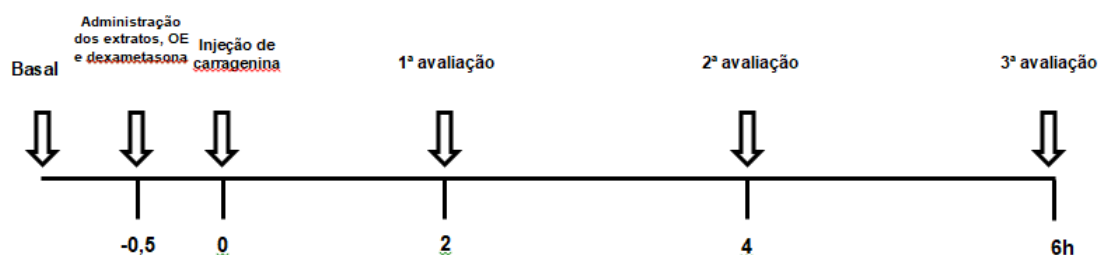


Figura 7 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico, hexânico e óleo essencial sobre o edema de pata induzido por carragenina.

1.7 Avaliação da alodínia mecânica induzida por carragenina

Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato em uma sessão diária de 60 min cada, durante dois dias antes da realização do experimento e em uma sessão de 10 min, imediatamente antes do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), o qual permite determinar o limiar para a retirada da pata, que é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada sobre o centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal (**Figura 8**) e um aumento gradual de pressão foi feito até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão a qual fez com que o animal removesse a pata foi registrado automaticamente. Para cada animal, foram feitas cinco avaliações em intervalos de 20 s, descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média das três medidas restantes.

O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia anterior ao teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados seis animais. O extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial foram administrados *p.o.*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. O extrato etanólico, extrato hexânico, óleo essencial ou o controle positivo dexametasona foram administrados 30 min antes da administração por via *i.pl.* de 600 µg de carragenina (30 µL da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 9**).



Figura 8 – Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica. PP - ponteira de polietileno; TF - transdutor de força. O sítio de estimulação é o centro delimitado pelos pontos pretos.

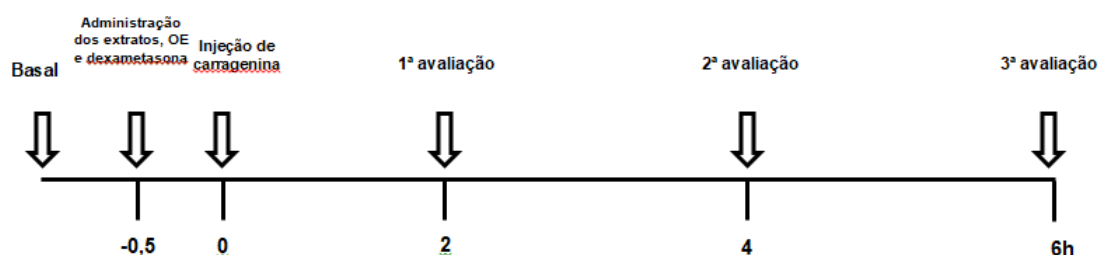


Figura 9 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico, hexânico e óleo essencial sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.

1.8 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor

A avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor foi realizada com auxílio da placa quente (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil – **Figura 10**). Este modelo foi originalmente descrito por Woolfe & MacDonald (1944). Os animais foram colocados sob a superfície não aquecida da placa durante 2 min para ambientação nos três dias anteriores ao experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes.

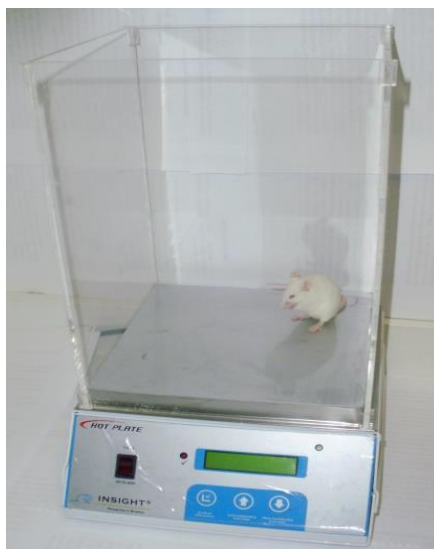


Figura 10 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.

Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida na temperatura estabelecida e o tempo para que os animais exibissem comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos) foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. A temperatura utilizada foi de 50° C e o tempo de corte foi de 50 s, a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual (**Figura 11**). O extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial foram administrados *p.o.*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. O extrato etanólico, extrato hexânico, óleo essencial ou o controle positivo dipirona foram administrados 30 min antes da realização dos experimentos.

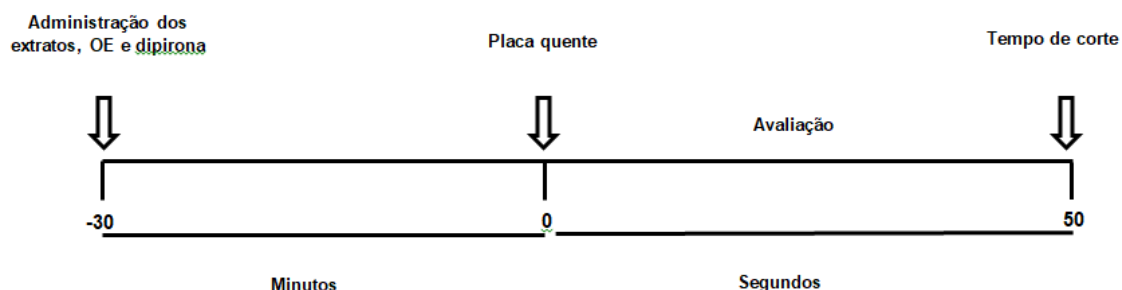


Figura 11- Escala temporal de avaliação do efeito induzido pelos extratos etanólico e hexânico e óleo essencial de *L. lacunosa* sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.

1.9 Avaliação da atividade motora

A coordenação motora dos camundongos foi avaliada na haste girante (2,3 cm de diâmetro, 14 rpm; **Figura 12**), de acordo com o procedimento proposto por Vaz *et al.* (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham e Miya (1957). Nos três dias que antecederam os experimentos, os animais foram treinados no aparato durante 120 s. No dia do experimento, os animais foram colocados sobre a haste e o tempo basal de permanência foi determinado. O tempo de corte foi de 120 s.

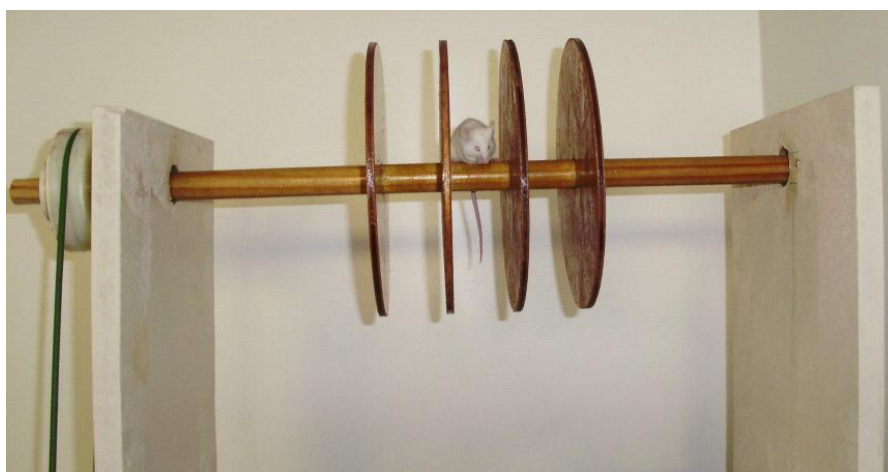


Figura 12 - Aparato usado para a avaliação da atividade motora.

A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os tempos basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais. O extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial foram administrados *p.o.*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. O extrato etanólico, extrato hexânico, óleo essencial ou o controle positivo fenobarbital foram administrados 30 min antes da avaliação na haste girante. As avaliações ocorreram 0,5; 2, 4 e 6 h após administração dos extratos etanólico, extrato hexânico, óleo essencial, fenobarbital ou veículo (**Figura 13**).

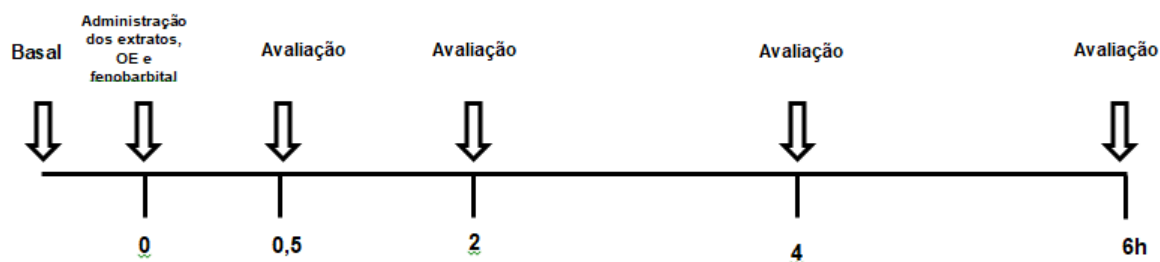


Figura 13 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pelos extratos etanólico, hexânico e óleo essencial de *L. lacunosa* ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.

1.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA). Os resultados referentes aos modelos de placa quente, haste girante e área sob a curva foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados referentes aos modelos de alodínia mecânica e edema de pata foram analisados por meio de análise de variância de duas vias, seguida de teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Extração

Os materiais vegetais são comumente extraídos empregando-se solventes líquidos, devido à sua ampla aplicabilidade, eficiência, seletividade e facilidade de utilização (SHARMA & GUPTA, 2015). A técnica, denominada extração sólido-líquido, em geral, envolve a secagem e moagem do material vegetal e a escolha de um solvente e de um procedimento adequado para a extração das substâncias de interesse (SHARMA & GUPTA, 2015).

No presente trabalho, buscou-se desenvolver um método adequado para a extração de compostos mais polares e menos polares. O solvente deve ser escolhido de acordo com a polaridade desejada. Substâncias menos polares, são extraídas utilizando-se solventes de baixa polaridade, como o hexano. Já as substâncias mais polares, por sua vez, são extraídas com álcoois, solventes de alta polaridade.

Folhas, flores e caules de *L. lacunosa* foram separados e secos. Optou-se, no presente estudo, trabalhar com as folhas de *L. lacunosa* em função do uso etnofarmacológico e de estudos com o gênero *Lippia* encontradas na literatura científica (PASCUAL *et al.*, 2001; AHMED *et al.*, 2003; CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2011; LOBO *et al.*, 2015; DE MORAIS *et al.*, 2016). As folhas foram trituradas e extraídas por maceração com o auxílio de ultrassom com hexano e etanol. Além disso, o óleo essencial (OE) das folhas foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Para as folhas secas e trituradas de *L. lacunosa*, o rendimento do extrato etanólico foi de 15,7 % (m/m), do extrato hexânico foi de 2,5 % (relação m/m) e do óleo essencial foi de 1,1% (relação m/m) (**Tabela 4**).

Em estudos anteriores com a espécie, podemos observar uma grande variação nos tipos de solventes usados para a extração, que apresentam diferentes polaridades, além da utilização de distintos órgãos vegetais. Estas diferenças na extração levam a resultados diferentes. Por exemplo, o extrato etanólico das

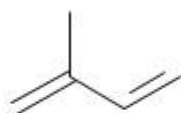
folhas secas e pulverizadas de *L. lacunosa* foi obtido por maceração e fracionado com solventes orgânicos de diferentes polaridades, obtendo as frações: n-hexano (12,2g), diclorometano (6,1g), acetato de etila (15,4g), n-butanol (46,5 g). Do extrato diclorometano, com média polaridade, sete flavonas foram isoladas (CASTELLAR *et al.*, 2011). O extrato etanólico obtido a partir de 600 g de folhas secas e pulverizadas de *L. alba*, em extração por soxhlet, obteve 9,72% de rendimento (HALDAR *et al.*, 2012). O extrato hidroetanólico, com 95% de etanol, preparado a partir de 160g de partes aéreas de *Lippia organoides* teve como resultado 15,35g, cerca de 10% de rendimento (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Em outro trabalho, flores, folhas e caules de *Lippia balansaes*, folhas e caules de *Lippia lasiocalycina*, folhas, caules e raízes de *L. sidoides*, flores de *Lippia lupulina*, folhas e caules de *Lippia velutina* e *Lippia salviaefolia* foram usados como material vegetal na produção de extratos etanólicos (FUNARI *et al.*, 2012).

Tabela 4 – Rendimento das extrações obtidas a partir das folhas secas e pulverizadas de *L. lacunosa*

Extrações	Massa de folhas secas (g)	Massa obtida após a extração (g)	Rendimento (%)
Extrato etanólico	15	2,3523	15,7
Extrato hexânico	15	0,3768	2,5
Óleo essencial	350	3,6771	1,1

Pérez *et al.* (2005) usou 100 g e 60 g de partes aéreas de *L. dulcis* para obter extrato hexânico e extrato etanólico, respectivamente. O extrato hexânico obteve rendimento de 2,5% e o extrato etanólico 9,2%. Comparando os resultados, observamos que, no presente estudo, o rendimento para o extrato hexânico das folhas de *L. lacunosa* (2,5%) foi equivalente ao estudo já apresentado para as partes aéreas. Já para o extrato etanólico obtivemos melhor rendimento (15,7%), quando comparado com o rendimento da extração de partes aéreas de *L. dulcis*. Em ambos os trabalhos, o rendimento do extrato etanólico foi maior que o hexânico.

Os óleos essenciais podem ser definidos como material volátil presente em plantas e, geralmente, de odor e fragrância característica. São misturas complexas e, quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de terpenos (SIMÕES & SPITZER, 2000). Os terpenos são formados por unidades do isopreno (11), composto por 05 carbonos.



(11)

Os monoterpenos são compostos por duas unidades do isopreno (10 carbonos) e os sesquiterpenos, por sua vez, são compostos por três unidades do isopreno (15 carbonos), os diterpenos por 20 unidades de carbonos, os triterpenos por 30 unidades de carbono e os tetraterpenos por 40 unidades de carbono (BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al.*, 1999).

Observa-se, com muita frequência, o estudo do óleo essencial de muitas espécies de *Lippia*, uma vez que o gênero é muito rico em monoterpenos e sesquiterpenos (PASCUAL *et al.*, 2000; SOARES & TAVARES-DIAS, 2013; GOMES *et al.*, 2011; DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2012). *L. lacunosa*, *L. rotundifolia*, *L. origanoides*, *Lippia gracillis*, *L. sidoides*, *L. multiflora* e *L. alba* são alguns exemplos de espécies, cujo óleo essencial foi estudado (LEITÃO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015; GOMIDE *et al.*, 2013; GOMIDE *et al.*, 2016; MENDES *et al.*, 2010; GUILHON *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2007; ABENA *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 1998). A composição química e teor do óleo essencial dependem de vários fatores, como condições ambientais, hora e período de colheita, formas de cultivo, método de extração, entre outras (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013). Em espécies do gênero *Lippia*, a secreção de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas e os constituintes são muito instáveis na presença de luz, calor e umidade, conseqüentemente o horário de colheita do material vegetal pode influenciar direta ou indiretamente nas variações quantitativas e qualitativas do óleo essencial (GOMES *et al.*, 2011). Folhas secas e pulverizadas de *L. gracillis*

foram utilizadas para a obtenção do óleo essencial, por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, obtendo 2,8% (p/v) de rendimento (GUILHON *et al.*, 2011).

Leitao *et al.* (2008) descrevem que o teor de óleo de *L. lacunosa* foi de 0,38% para flores e 0,44% para folhas frescas, em coletas realizadas no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora, local adaptado para o cultivo de indivíduos originados de Diamantina, MG, Brasil. O óleo essencial obtido apresentou cor amarelo fluorescente, com forte e agradável aroma de manga, características específicas da espécie (Leitao *et al.*, 2008).

O óleo extraído das folhas secas de *L. lacunosa*, no presente estudo, obteve melhor rendimento (1,1%), quando comparado ao rendimento da extração de folhas frescas (0,44%) do trabalho já apresentado para a mesma espécie. Esta diferença no rendimento pode estar associada ao local de cultivo, uma vez que a planta estudada por Leitão *et al.*, 2008 foi cultivada em local adaptado e a mesma planta no presente estudo foi cultivada em seu habitat natural, os campos rupestres da Serra do Espinhaço. As características organolépticas, cor amarelo fluorescente e intenso aroma de manga, apresentaram-se equivalentes às características também descritas em estudo de Leitão *et al.* (2008), o que contribui para a confirmação da espécie e equivalência na composição química do óleo extraído.

2.2 Perfil cromatográfico dos extratos etanólico, hexânico e do óleo essencial (OE) de *Lippia lacunosa*, por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE-UV/DAD)

Para obtenção do perfil exploratório, o sistema eluente iniciou com ACN:Água (5:95) até chegar em ACN:Água (95:5) em 28 minutos, visando a máxima separação de substâncias, baseada nas diferentes polaridades e interações do sistema eluente-analito-fase estacionária. O solvente acetonitrila, que é menos polar que a água, é o modificador orgânico deste sistema e alterou a força do eluente. Força do eluente é a capacidade da fase móvel de arrastar o analito pela coluna cromatográfica.

Análise por CLUE permitiu uma investigação exploratória qualitativa da composição química de derivados vegetais das folhas de *L. lacunosa* (**Figuras 14 a 17**). A análise do perfil cromatográfico do extrato etanólico de *L. lacunosa* (**Figura 14**), em λ 211 nm, revelou que a maior parte dos picos têm tempo de retenção (TR) entre 8 e 15 minutos, indicando que o mesmo é constituído principalmente por substâncias de média polaridade.

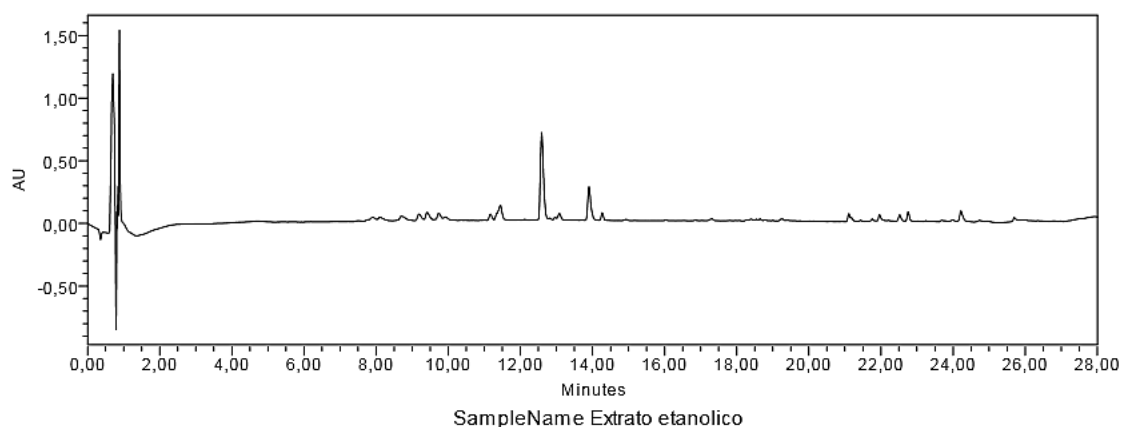


Figura 14: Perfil cromatográfico obtido por CLUE- DAD para o extrato etanólico de *L. lacunosa*, λ 211 nm. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.3.

Alguns picos em tempo de retenção entre 21 e 24 minutos apareceram, revelando também a presença de substâncias menos polares, porém com menores áreas de absorção no ultravioleta (**Figura 14**).

Pela CLUE-UV/DAD, podemos identificar a presença de flavonoides através de alguns picos com tempo de retenção próximos de 12 minutos e de 20 minutos, que apresentam característicos espectros de absorção no UV e dois grandes cromóforos, um em comprimento de onda em torno de 250 nm e outro em 350 nm, denominados banda II e I, respectivamente, podem ser vistos (MABRY, 1970; SIMÕES *et al.*, 2017). O pico com maior área de absorção no ultravioleta possui tempo de retenção igual a 12,6 minutos, porém não apresenta característica de flavonoide (**Figura 15**).

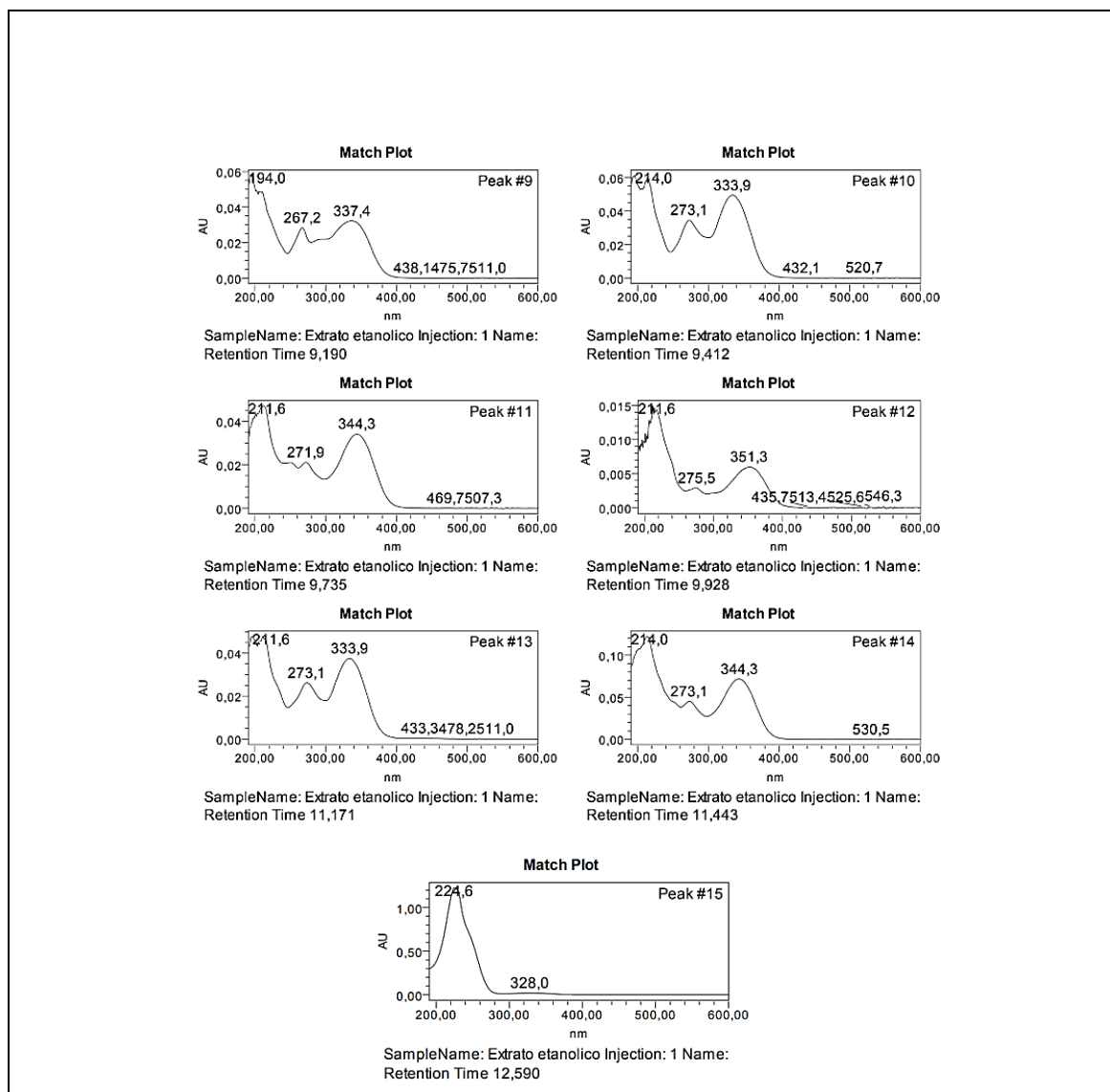


Figura 15: Espectros de absorção no ultravioleta de picos (tempo de retenção de 9,1 a 11,4 min.) representativos de flavonoides majoritários no extrato etanólico de *L. lacunosa*.

Já os picos com tempo de retenção entre 9,0 e 11,4 min possuem espectros de absorção no UV característicos dessa classe, apresentando dois grandes cromóforos, um em comprimento de onda em torno de 270 nm e outro em 340 nm (**Figura 15**).

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os metabólitos secundários e já foram isolados em várias espécies de *Lippia*: *L. citriodora*, *L. graveolens*, *L. sidoides*, *L. dulcis*, *L. nodiflora* e *L. triphylla* (GOMES *et al.*, 2011). Estudos realizados na espécie *L. gracilis*

Shauer demonstraram que a naringenina possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (GUIMARAES *et al.*, 2012). O fracionamento do extrato diclorometano das folhas de *L. lacunosa* resultou no isolamento de sete flavonoides e um triterpeno, que foram testados na atividade antimicrobacteriana (Leitão *et al.*, 2006). Embora estejam presentes em várias espécies de *Lippia*, esta classe de metabólitos secundários não é a majoritária. Os terpenos são os componentes majoritários no gênero *Lippia* (SALIMENA & PIRES *et al.*, 1991; VICCINI *et al.*, 2005, LEITÃO *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2011)

O cromatograma do extrato hexânico (**Figura 16**) mostra que os picos majoritários apresentaram maior tempo de retenção entre 10 e 27min, evidenciando sua menor polaridade, como é esperado para um extrato hexânico. Alguns picos são comuns no cromatograma do extrato etanólico e do extrato hexânico, podemos citar os picos com tempo de retenção de 11,5 e 12,6 min.

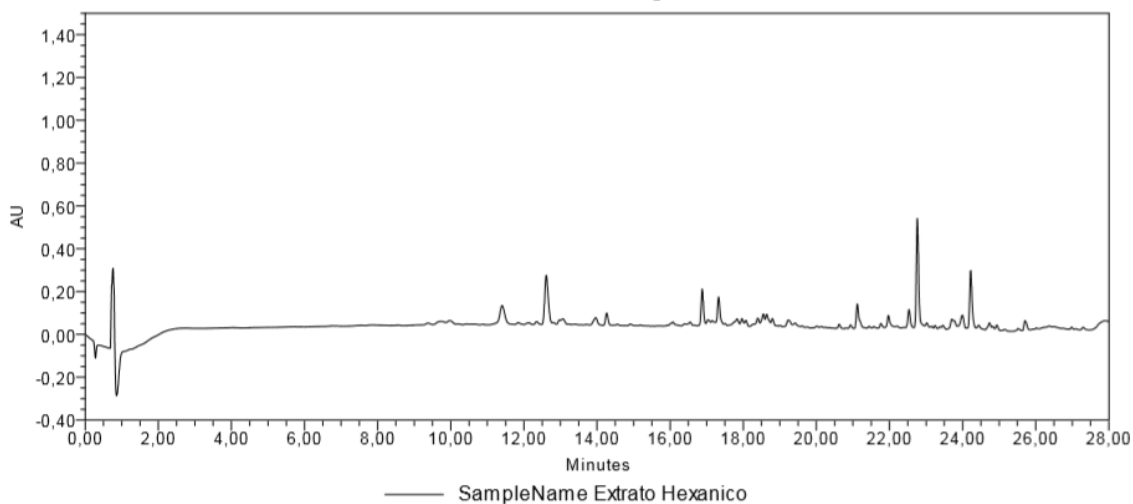


Figura 16: Perfil cromatográfico obtidos por CLUE- DAD para o extrato hexânico de *L. lacunosa*, em λ 211 nm. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.3.

Para o óleo essencial de *L. lacunosa* (**Figuras 17**), podemos observar dois picos proeminentes, com tempo de retenção de aproximadamente 12,6 e 14 minutos, com grande absorção no ultravioleta, indicando alta concentração das respectivas substâncias. Cabe destacar, que esses picos também são

encontrados nos extratos hexânico e etanólico. Como esperado o cromatograma do óleo essencial de *L. lacunosa* apresenta picos de substâncias de baixa polaridade, com sinais em tempo de retenção entre 17 e 23 minutos (**Figuras 17**).

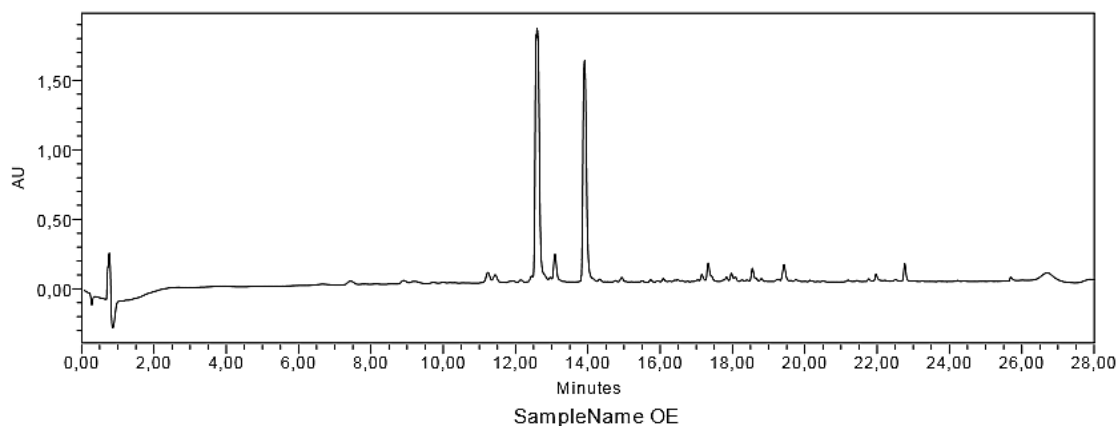


Figura 17: Perfil cromatográfico obtidos por CLUE- DAD para o óleo essencial de *L. lacunosa*, λ 211 nm. Condições cromatográficas: vide Materiais e Métodos item 1.3.

A identificação dos compostos nos extratos pode ocorrer por meio da comparação com um padrão de referência, seguindo as mesmas condições cromatográficas. O padrão de nerolidol foi a substância de referência escolhida, a fim de o identificar nos extratos e no óleo essencial, o que não ocorreu.

A partir da análise dos perfis cromatográficos, podemos perceber a diferença na composição entre os derivados vegetais de *L. lacunosa* do ponto de vista químico. No extrato etanólico, observamos a presença de flavonoides, o que não ocorre no extrato hexânico e no óleo essencial. O extrato hexânico e o óleo essencial, por sua vez, apresentaram substâncias de menor polaridade.

2.3 Perfil cromatográfico do extrato hexânico e do óleo essencial (OE) de *Lippia lacunosa*, por cromatografia gasosa (CG-EM)

O extrato hexânico e o óleo essencial são derivados vegetais compostos essencialmente por substâncias menos polares, como exemplo os terpenos. Os monoterpenos (10C) e os sesquiterpenos (15C) são os principais

componentes de óleos voláteis encontrados nas espécies de *Lippia*, inclusive em *L. lacunosa* (SALIMENA & PIRES *et al.*, 1991; VICCINI *et al.*, 2005, LEITÃO *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2011), que, por possuírem baixo peso molecular, são facilmente obtidos por hidrodestilação. Enquanto diterpenos (20C), triterpenos (30) e os tetraterpenos ou carotenoides (C40) são extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES *et al.*, 2017).

A **Figura 18** demonstra o perfil químico do extrato hexânico e do óleo essencial (OE) obtido por CG-EM. Como pode ser observado, o perfil cromatográfico do extrato hexânico é mais complexo que o perfil demonstrado para o OE. Isso ocorre pelo fato da hidrodestilação extrair substâncias com baixo peso molecular e o solvente hexânico extrair diferentes tipos de substância menos polares, tais como terpenos, óleos fixos, gorduras e até ceras (SIMÕES *et al.*, 2017).

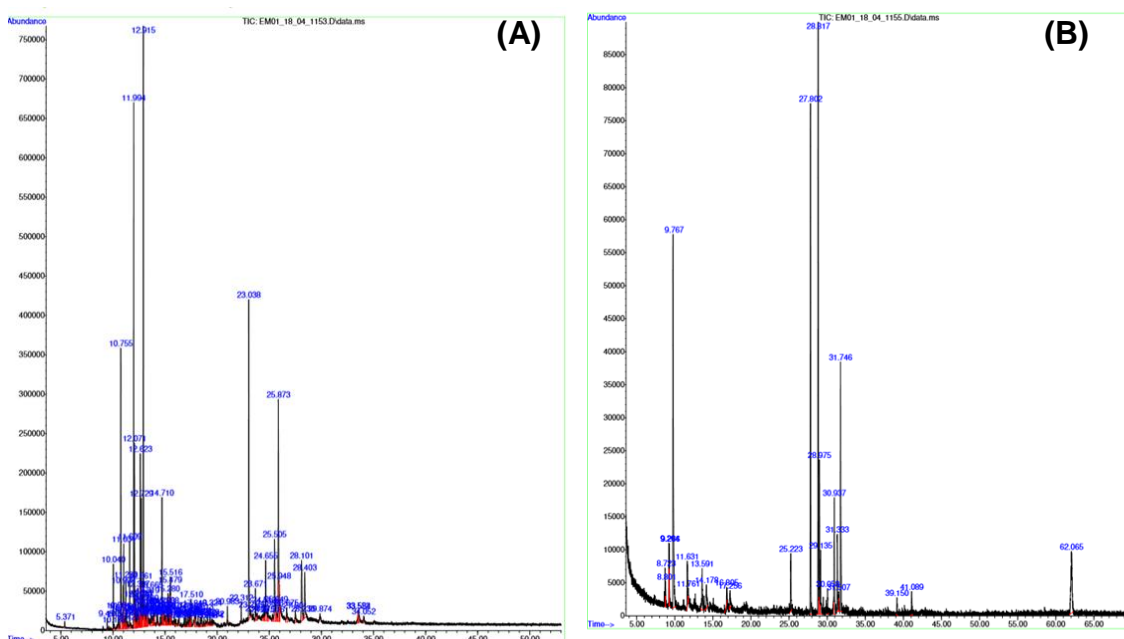


Figura 18: Perfis cromatográficos do extrato hexânico (A) e do óleo essencial (B) das folhas de *L. lacunosa*, por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massas . Condições cromatográficas: item 1.4 (Materiais e Métodos /Parte1).

2.4 Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa*

Após a obtenção dos extratos hexânico e etanólico e do OE de *L. lacunosa*, foram realizados testes biológicos para a escolha da matriz com maior atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.

2.4.1 Efeitos induzidos pelo extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre o edema de pata induzido por carragenina

Avaliamos inicialmente as atividades dos extratos etanólico e hexânico ou do óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* em um modelo experimental de inflamação aguda, o edema de pata induzido por carragenina. O edema induzido pela carragenina, uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas da família da *Rhodophyceae* e composta por D-galactose sulfatada, é um modelo amplamente usado para a investigação de candidatos a fármacos anti-inflamatórios (MORRIS, 2003).

No presente estudo, o grupo controle que recebeu carragenina apresentou acentuado edema de pata, que se manteve durante todo o período de avaliação (2, 4 e 6 h). O pré-tratamento dos animais com o extrato etanólico de *L. lacunosa*, nas doses avaliadas (25, 50 e 100 mg/kg), não reduziu significativamente o edema de pata nos intervalos avaliados nesse protocolo (2, 4 e 6 h após injeção *i.pl.* de carragenina) (**Figura 19A**). Apesar dos valores médios do volume da pata para as doses de 50 e 100 mg/kg não diferirem estatisticamente dos valores do grupo que recebeu carragenina quando comparados em cada momento de avaliação, ao realizarmos uma avaliação global (área sob a curva) verificamos uma redução significativa (**Figura 19B**).

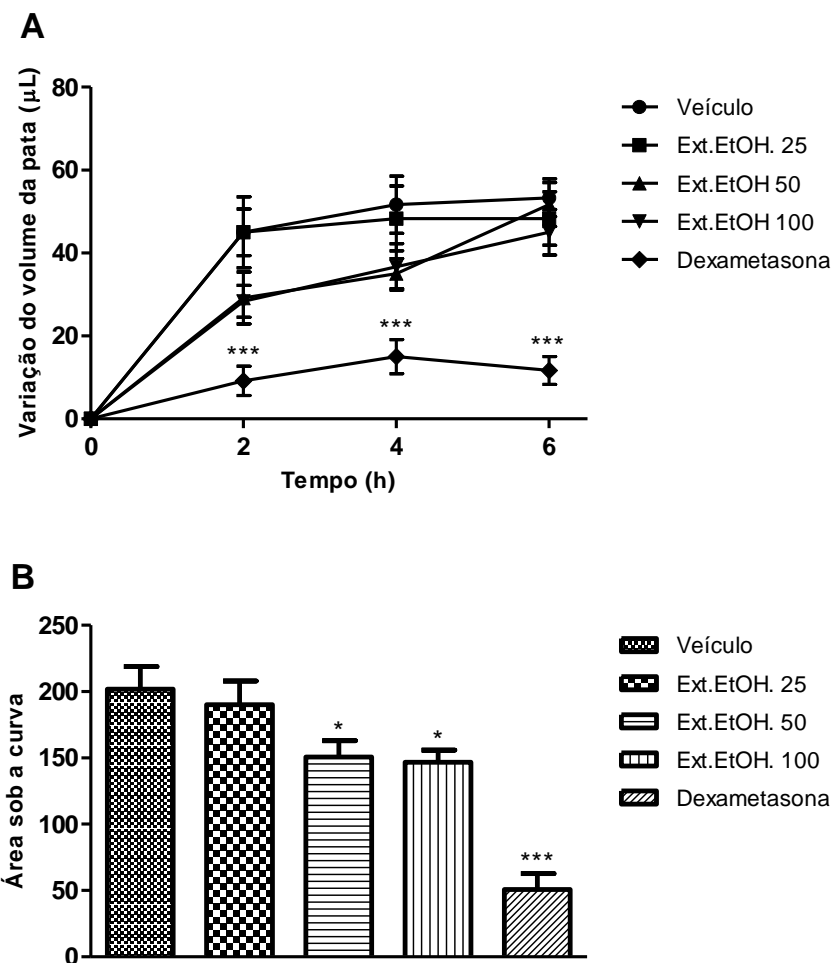


Figura 19 - Efeitos induzidos pelo extrato etanólico de folhas de *L. lacunosa* (Ext. EtOH; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

A redução do edema de pata pelo pré-tratamento dos animais com o extrato hexânico foi observada na 4^a e 6^a h (dose de 50 mg/kg) e na 2^a, 4^a e 6^a h (dose de 100 mg/kg) (**Figura 20**). Para o óleo essencial, a redução do edema de pata foi observada na 4^a h (dose de 50 mg/kg) e também na 2^a, 4^a e 6^a h (dose de 100 mg/kg) (**Figura 21**). A dexametasona, utilizada como controle positivo no experimento, reduziu a formação do edema de pata nesse modelo nos períodos avaliados (**Figuras 19, 20, 21**).

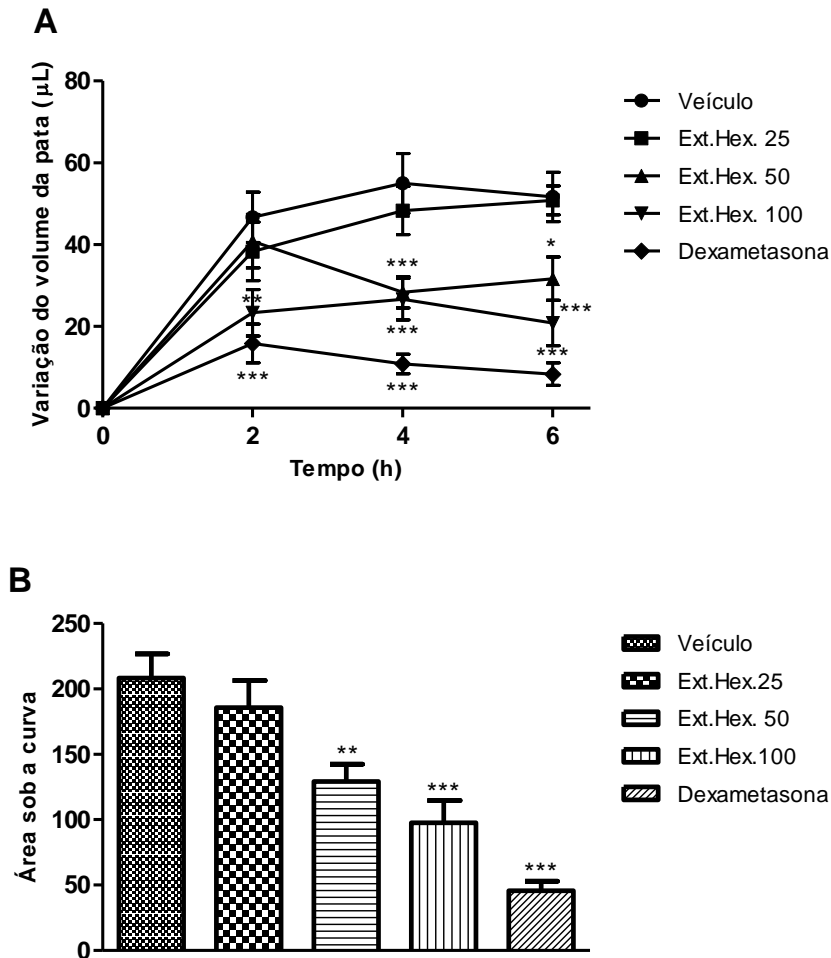


Figura 20 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico de folhas de *L. lacunosa* (Ext. Hex; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 μg , 30 μL , *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

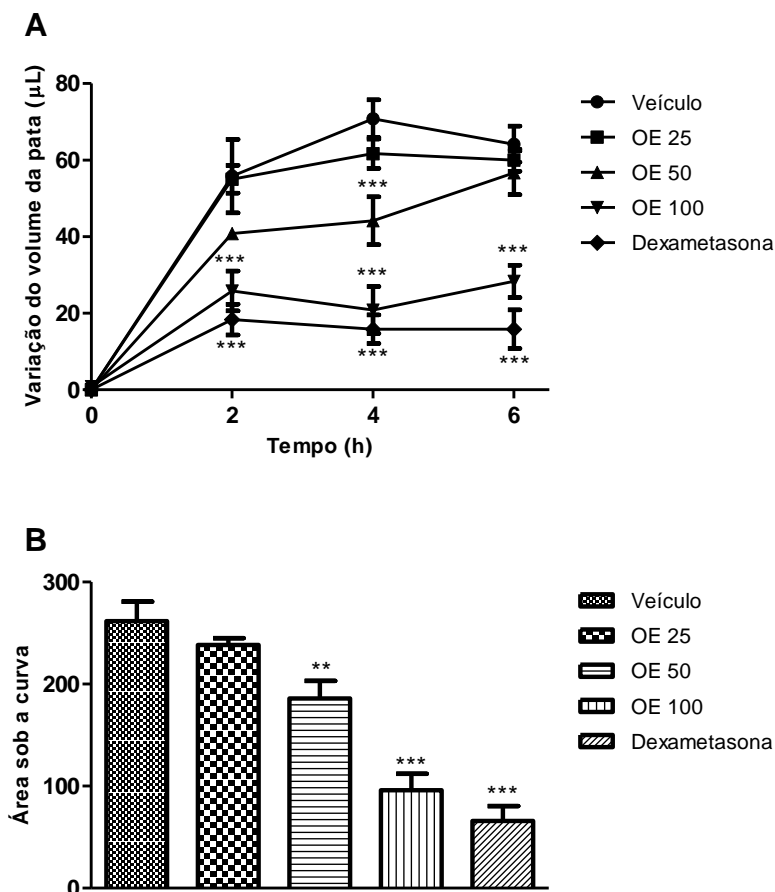


Figura 21 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* (OE; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

A injeção *i.pl.* de carragenina induz inflamação local, resultante da ação de vários mediadores como, bradicinina, serotonina, histamina, citocinas, quimiocinas, eicosanoides e espécies reativas de oxigênio. O edema induzido pela carragenina é resultado da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, que culminam com o extravasamento de líquido para o interstício. Ocorre a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório com consequente produção de diversos mediadores inflamatórios mencionados (SALVEMINI *et al.*, 1996). Nossos resultados demonstraram que o extrato hexânico e o óleo essencial de *L. lacunosa* reduziram de forma marcante o edema de pata dos animais, nas doses de 50 e 100 mg/kg. Outros grupos de pesquisa avaliaram a

atividade anti-inflamatória de outras espécies de *Lippia*, sendo este, um estudo inédito para a espécie *L. lacunosa*. Estudos realizados com o óleo essencial das folhas de *L. gracilis* Shauer (MENDES *et al.*, 2010; GUIMARAES *et al.*, 2012), demonstraram atividade anti-inflamatória. A aplicação tópica do óleo essencial (OE) extraído das folhas de *L. sidoides*, nas doses de 1 e 10 mg/orelha em aplicação única, diminuiu significativamente o edema (MONTEIRO *et al.*, 2007). Doses de 1, 5, 10, 50 e 100 mg/kg (*p.o.*), do OE das folhas de *L. sidoides*, foram testadas em camundongos, em modelo de lesão gástrica induzida por etanol, e observou-se inibição das lesões gástricas para as doses 10, 50 e 100 mg/kg (MONTEIRO *et al.*, 2007). Ainda, o extrato etanólico das partes aéreas de *L. dulcis*, nas doses 50, 100, 200 e 400 mg/kg, apresentou significativa atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema de pata induzido por carragenina em ratos (PÉREZ, *et al.*, 2005). Outros estudos demonstraram que a administração do extrato metanólico das folhas de *L. nodiflora*, nas doses de 200 e 400 mg/kg (*p.o.*), em ratos, reduziu a atividade anti-inflamatória em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina (AHMED *et al.*, 2004). Utilizando doses de 100 e 200 mg/kg (*p.o.*) de extrato aquoso das folhas de *L. nodiflora*, a atividade anti-inflamatória em camundongos foi confirmada em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina (AL-SNAFI *et al.*, 2013).

Considerando que o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina depende da ação de vários mediadores inflamatórios, podemos sugerir que a atividade anti-inflamatória do extrato hexânico e do óleo essencial de *L. lacunosa* pode estar relacionada à redução da produção de mediadores inflamatórios e do acúmulo de células inflamatórias, principalmente neutrófilos. Em estudo de outra espécie de *Lippia*, em camundongos, foi demonstrado que o óleo essencial das folhas de *L. gracilis* inibiu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (17,4, 29,6 e 38,4% nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, *p.o.*, respectivamente), em modelo experimental de peritonite induzida pela carragenina (MENDES *et al.*, 2010).

2.4.2 Efeitos induzidos pelo extrato etanólico, extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

As atividades dos extratos etanólico e hexânico ou do óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* também foram demonstradas em modelo experimental de dor inflamatória, a alodínia mecânica induzida por carragenina. A injeção *i.pl.* de carragenina induz a formação de edema de pata e o desenvolvimento de alodínia mecânica, uma sensibilização marcante dos nociceptores (POSADAS *et al.*, 2004; GREGORY *et al.*, 2013).

No presente estudo, o grupo controle que recebeu carragenina apresentou diminuição acentuada do limiar nociceptivo, o qual se manteve durante todo o período de avaliação (2, 4 e 6 h). O extrato etanólico de *L. lacunosa* reduziu a alodínia mecânica, na dose de 100 mg/kg, somente na primeira avaliação, correspondente a 2 h (**Figura 22**). O extrato hexânico, nas doses 50 e 100 mg/kg, reduziu a alodínia mecânica nas avaliações realizadas na 2^a, na 4^a e na 6^a h após injeção de carragenina (**Figura 23**). O óleo essencial, na dose de 50 mg/kg, reduziu a alodínia mecânica na 4^a h avaliada e, na dose de 100 mg/kg, observamos redução da alodínia mecânica na 2^a, 4^a e 6^a h após injeção de carragenina (**Figura 24**). A dexametasona, utilizada como controle positivo no experimento, reduziu a alodínia mecânica induzida pela injeção *i.pl.* de carragenina nos períodos avaliados (**Figuras 22, 23, 24**).

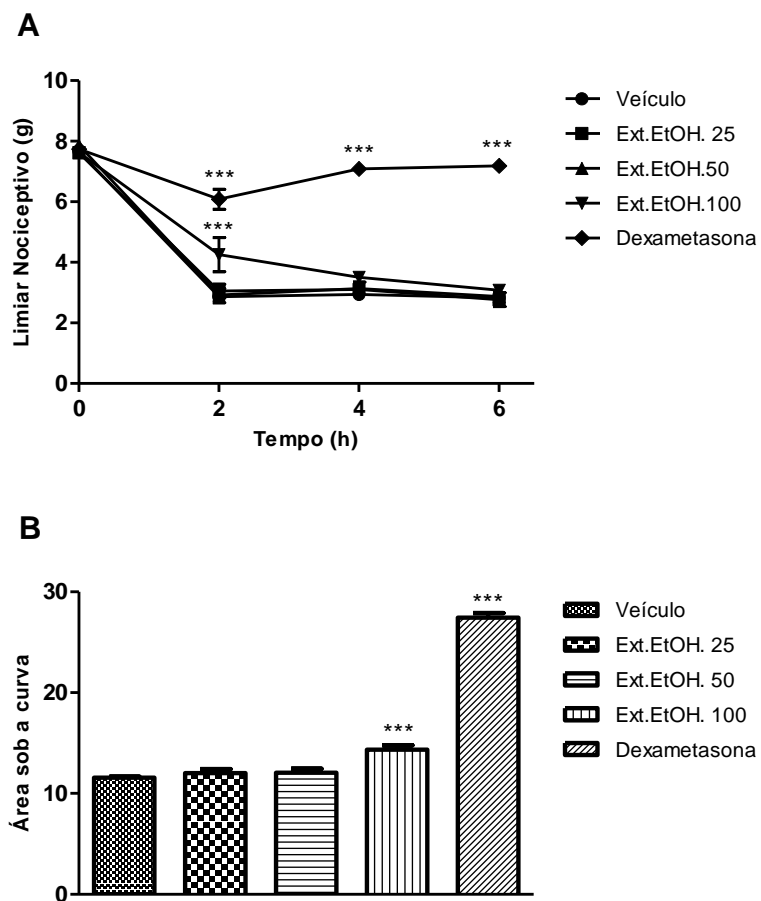


Figura 22 - Efeitos induzidos pelo extrato etanólico das folhas de *L. lacunosa* (Ext EtOH; 25, 50 e 100 mg/Kg, p.o., - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, i.p., - 30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n=6$.

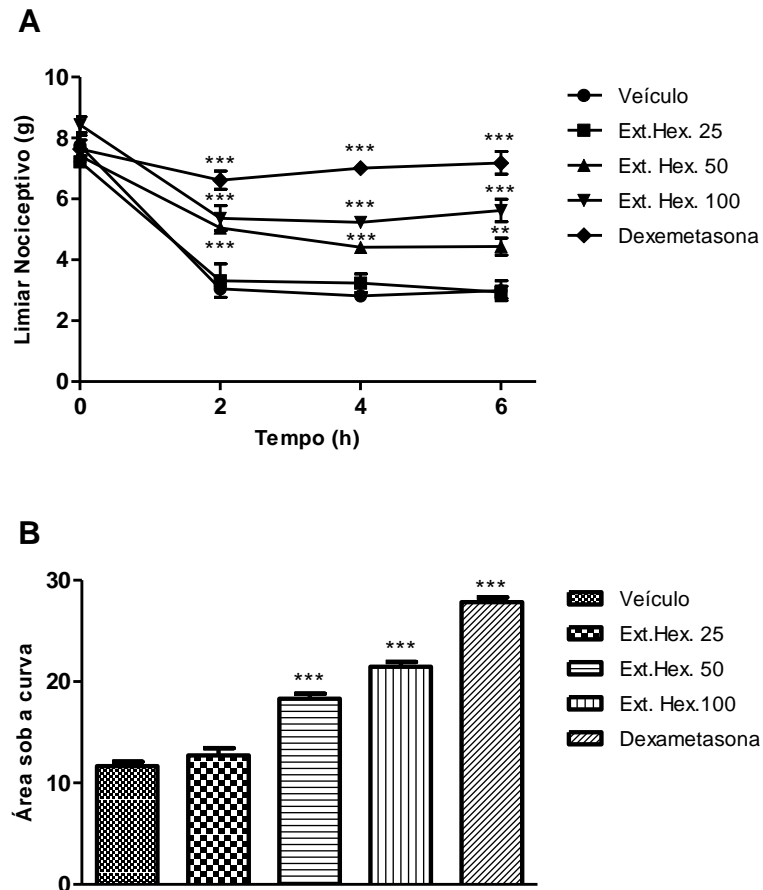


Figura 23 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico de folhas de *L. lacunosa* (Ext. Hex; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

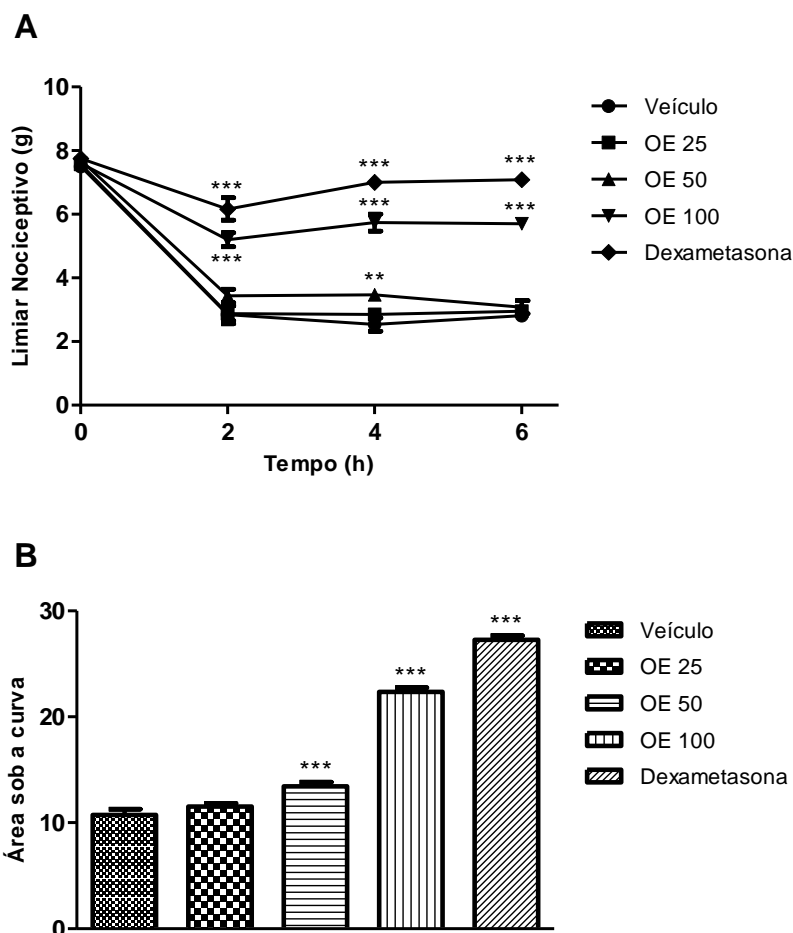


Figura 24 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* (OE; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

As atividades de outras espécies de *Lippia* em modelos experimentais de dor também foram demonstradas. O óleo essencial (OE) das folhas de *L. gracilis* foi testado em camundongos, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (*p.o.*) e os resultados mostraram significativa redução do número de contorções abdominais no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético e da duração do comportamento de lambida da pata injetada com formalina (GUILHON, *et al.*, 2011). Novamente, após o tratamento oral de camundongos com OE das folhas de *L. gracilis*, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (*p.o.*), em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, houve expressiva

diminuição do número de contorções abdominais (MENDES, *et al.*, 2010). Outro estudo investigou a atividade antinociceptiva do extrato metanólico das partes aéreas de *L. nodiflora*, em camundongos, nas doses de 250 e 500 mg/kg (p.o), em modelo experimental de contorção abdominal induzida por ácido acético, apresentando resultados expressivos de 61% e 78% na inibição das contorções (AHMED *et al.*, 2004).

2.4.3 Efeitos induzidos pelo extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

Tendo em vista os resultados anteriores indicando a marcante atividade, principalmente, do extrato hexânico e óleo essencial de *L. lacunosa* em modelo experimental de dor inflamatória, investigamos o efeito dessas substâncias em um modelo experimental de dor provocada por estímulo térmico. No modelo da placa quente, o estímulo térmico provoca um comportamento nociceptivo nos camundongos pela ativação direta dos nociceptores (Le BARS *et al.*, 2001). À temperatura de 50 °C, utilizada no experimento, ocorre ativação de receptores TRP (*Transient receptor potential cation channel*), essenciais para o processamento inicial da resposta nociceptiva (TOMINAGA, 2007). Alguns fármacos, tais como analgésicos opioides e antidepressivos tricíclicos, são capazes de aumentar a latência para o comportamento nociceptivo (LOH *et al.*, 1976; ROSLAND *et al.*, 1988).

Nossos resultados demonstraram que o grupo controle (veículo) apresentou uma latência média de aproximadamente 15 s. O grupo tratado com o extrato hexânico de *L. lacunosa*, nas doses de 50 e 100 mg/Kg, elevou a latência para o comportamento nociceptivo no modelo avaliado (**Figura 25**). A administração do óleo essencial de *L. lacunosa*, na dose de 100 mg/Kg, mas não para a dose de 50 mg/kg, também elevou a latência do comportamento nociceptivo no modelo da placa quente (**Figura 26**). O grupo tratado com dipirona, controle positivo do experimento, elevou de forma marcante a latência do comportamento nociceptivo. Assim, as atividades do extrato hexânico e óleo essencial das folhas de *L. lacunosa* sugerem ações no processamento

nociceptivo no SNC ou nos mecanismos de ativação direta dos nociceptores sensíveis a estímulos térmicos.

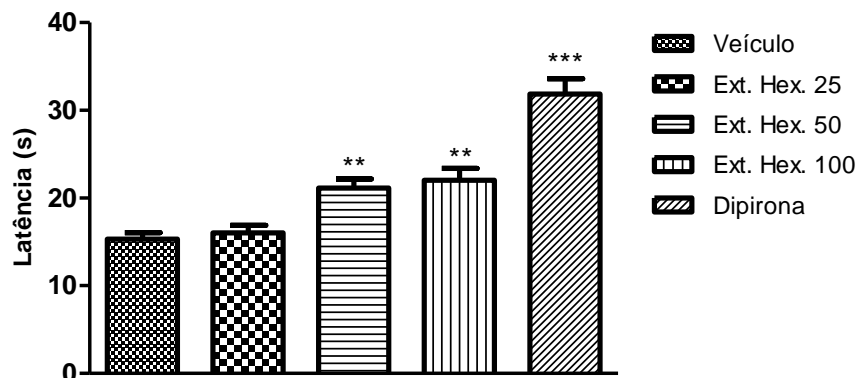


Figura 25 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico de folhas de *L. lacunosa* (Ext. Hex; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dipirona (500 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50°C). ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

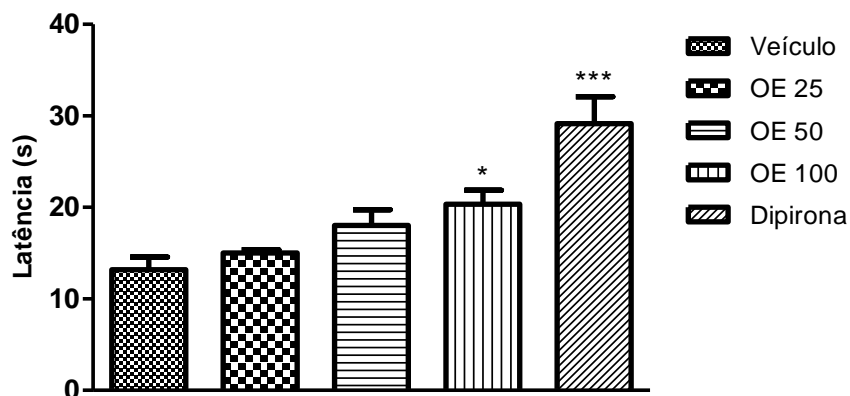


Figura 26 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* (OE; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dipirona (500 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50°C). * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

Em estudos anteriores a atividade antinociceptiva de outras espécies de *Lippia* também foi apresentada. Camundongos foram submetidos ao modelo de placa quente, após administração oral de óleo essencial das folhas de *L. gracilis*, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, apresentando significativa atividade antinociceptiva em todas as doses testadas (GUILHON *et al.*, 2011). A atividade analgésica do extrato metanólico de *L. gracilis*, em camundongos, foi investigada em modelo de placa quente. A administração oral de doses de 100, 200 e 400 mg/kg, elevou a latência para o comportamento nociceptivo (GUIMARÃES *et al.*, 2012). A atividade antinociceptiva do extrato etanólico das partes aéreas de *L. origanoides* foi testada em modelo de placa quente em camundongos, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (*p.o.*). Neste estudo os autores demonstram que a administração do extrato etanólico de *L. origanoides* elevou a latência para o comportamento nociceptivo (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Assim, os resultados demonstrados com outras espécies de *Lippia*, no modelo de placa quente, corroboram os resultados do presente estudo, uma vez que o extrato hexânico ou óleo essencial das folhas de *L. lacunosa* também elevam a latência do comportamento nociceptivo no referido modelo experimental.

2.4.4 Efeitos induzidos pelo extrato hexânico e óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a atividade motora

Com o objetivo de validar os resultados obtidos nos protocolos de nocicepção, foram avaliados os efeitos induzidos pelo extrato hexânico e óleo essencial sobre a atividade motora dos animais. Vale ressaltar que, com o objetivo de reduzir o número de animais utilizados, a presente validação não foi realizada para o extrato etanólico, pois o mesmo não apresentou resultados promissores nos ensaios realizados. O extrato hexânico e o óleo essencial de *L. lacunosa*, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, não alteraram o tempo de permanência dos animais na haste girante (**Figuras 27 e 28**). Entretanto, esse tempo foi reduzido

pelo fenobarbital (50 mg/kg), usado como controle positivo nesse protocolo (Figuras 27 e 28).

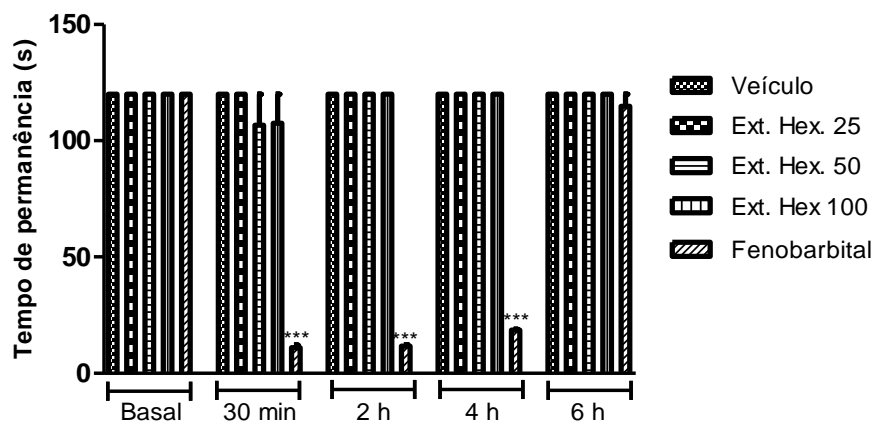


Figura 27 - Efeitos induzidos pelo extrato hexânico de folhas de *L. lacunosa* (Ext. Hex; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pelo fenobarbital (50 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n=6$.

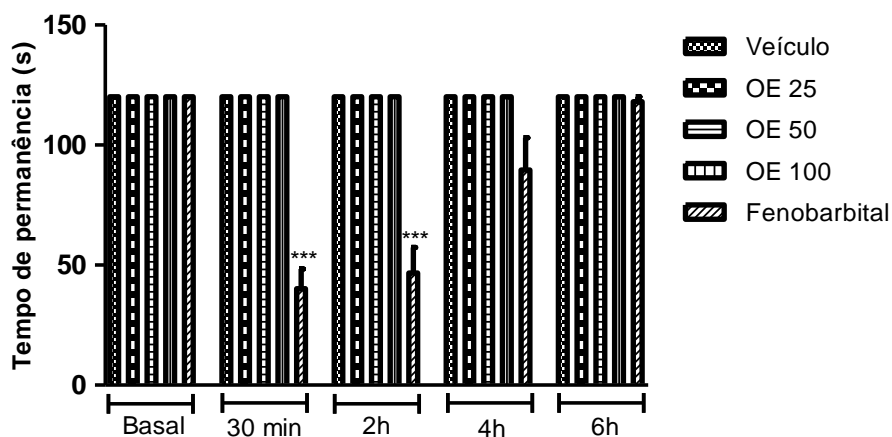


Figura 28 - Efeitos induzidos pelo óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* (OE; 25, 50 e 100 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pelo fenobarbital (50 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n=6$.

Uma vez que o extrato hexânico e o óleo essencial não alteraram o tempo de permanência dos camundongos na haste girante, é muito pouco provável que a atenuação do comportamento nociceptivo nos modelos avaliados seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular. Assim, esses resultados indicam que a redução do comportamento nociceptivo resulta de uma atividade antinociceptiva genuína do extrato hexânico e óleo essencial.

Como demonstrado nesta primeira parte do trabalho o óleo essencial demonstrou bom rendimento e menor complexidade na constituição química de sua matriz, quando comparado ao extrato hexânico. O óleo essencial também obteve expressiva atividade anti-inflamatória, em modelo experimental de edema de pata, e atividade antinociceptiva, nos modelos de dor inflamatória induzida por carragenina e dor nociceptiva induzida por calor. Sendo assim, o OE foi selecionado, dentre as matrizes testadas, para o fracionamento e avaliação do perfil fitoquímico, bem como a avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da fração contendo os componentes majoritários.

PARTE 2

Fracionamento, caracterização do óleo essencial e da fração 33 de *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer e avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 Solventes e reagentes

- Ácido acético glacial, CRQ.
- Ácido sulfúrico concentrado, MTedia.
- Acetato de etila (AcOEt) grau PA, Neon.
- Acetona grau PA, Synth.
- Anisaldeído, Vetec.
- Hexano (HEX) grau PA, Dinâmica.
- Metanol grau PA, Synth.
- Gel de sílica 60 NP/TLC Macherey-Nagel.
- Gel de sílica 60 Merck (0.063 – 0.200 mm).

1.2 Fracionamento do óleo essencial de *Lippia lacunosa*

Para o fracionamento foi utilizado uma coluna cromatográfica de vidro, com 42 cm de altura e 1,2 cm de largura, preenchida com gel de sílica 60 Merck (0.063 – 0.200 mm) e uma sequência de misturas de solventes, de diferentes proporções dos solventes hexano:acetato de etila (**Tabela 5**), com fluxo contínuo de 20 gotas/min.

Foram eluidos 1,2 g de óleo essencial de *L. lacunosa* pela coluna cromatográfica e suas frações foram coletadas em frascos de vidro e levadas para evaporação completa em capela com exaustor. Todas as frações foram pesadas e monitoradas por CCD, e por fim congeladas em freezer (-22 °C).

Tabela 5 – Gradiente de eluição empregado no processo de obtenção das frações em coluna cromatográfica do óleo essencial de *L. lacunosa*.

Volume (mL)	Fase móvel	
	HEX (%)	AcOEt (%)
25	100	0
25	98	2
25	95	5
25	90	10
25	88	12
25	86	14
25	84	16
25	80	20
25	0	100

1.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) do óleo essencial (OE) e da fração 33 (OEF33) de *Lippia lacunosa*

Foi obtido o perfil químico do óleo essencial de *L. lacunosa* por cromatografia em camada delgada (CCD) de gel de sílica. A placa de vidro foi revestida com uma camada fina de material adsorvente, gel de sílica, chamada de fase estacionária. O volume de 5 μ L de óleo essencial e da fração 33 foram diluídos em 2,0 mL de acetona PA, e aplicados sobre a placa e uma mistura de solventes hexano:acetato de etila (80:20), a fase móvel, permeou a placa por capilaridade. Os diferentes componentes do OE percorreram a placa de CCD de maneiras diferentes, de acordo com a polaridade de cada um, sendo então possível a separação dos mesmos ao longo da placa. Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD para a avaliação da separação dos terpenos presentes no OE e frações, incluindo a OEF33. Um sistema eluente e um revelador inespecífico foram usados, conforme descrito abaixo.

- Fase móvel: hexano : acetato de etila (80:20).
- Revelador: Solução de anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 100 °C (pistola de calor D26411, DeWalt) até o aparecimento das manchas.

1.3.1 Preparo da solução reveladora

A solução de anisaldeído sulfúrico é composta por 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico, adicionados nesta ordem. A associação anisaldeído/ácido sulfúrico pode ser usada para visualizar antioxidantes, esteróides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, componentes de óleos essenciais ou terpenos (JORK *et al.*, 1990).

1.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) e composição química do óleo essencial e da fração 33 (OEF33) de *Lippia lacunosa*

O óleo essencial e a fração 33 (OEF33), obtidos no presente estudo, foram analisados por CG-EM. O ensaio foi realizado em Cromatógrafo a gás (Agilent 7890B) equipado com sistema de detecção por espectrometria de massas (Agilent 5977A -MSD), com analisador de massas do tipo quadrupolo. A coluna utilizada foi do tipo capilar CP – WAX 52 CB (Polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de diâmetro interno). A programação de temperatura do forno iniciou-se com 60°C por 5 minutos e, a seguir, foram acrescentados 25° C por minuto até que fosse atingida a temperatura de 160° C, permanecendo por mais 5 minutos. Em sequência, foram acrescentados 10° C por minuto até que fosse atingida temperatura final de 240° C, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos e totalizando uma corrida analítica de 27 minutos. O gás de arraste utilizado foi o gás hélio a um fluxo constante de 1 mL por minuto. O modo de injeção utilizado foi com divisão de fluxo (*split*) de 1:10 e volume de injeção de 1 µL. A aquisição dos dados ocorreu no modo SCAM, utilizando razão massa carga (*m/z*) de 14 a 500. A interface do cromatógrafo com o detector foi mantida a 240° C e foi utilizada a ionização por impacto de elétrons operada a 240 °C. O analisador de massas foi do tipo quadrupolo simples

operado a 150° C. O volume de 10 µL de óleo essencial foi dissolvido em 1,0 mL de hexano, antes da injeção da amostra no equipamento. A massa e perfil de fragmentação dos picos encontrados foram comparados com o banco dos espectros da biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST), dados da literatura científica e biblioteca ADAMS (2007).

1.5 Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da fração 33 do óleo essencial (OEF33) de *Lippia lacunosa*

Os materiais e métodos necessários para estes experimentos estão descritos nos itens 1.5.1 a 1.10, exceto o item 1.5.3.2. A amostra contendo a fração 33 (OEF33) foi preparada em solução de CMC 0,5% em cloreto de sódio 0,9% no dia anterior à experiência e administrada imediatamente por via *p.o.* em volume de 10 mL/kg (-30 min). As doses da fração 33 foram de 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Caracterização do óleo essencial (OE) e da fração 33 (OEF33)

2.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) do óleo essencial de *Lippia lacunosa*

A cromatografia em camada delgada permite obter o perfil químico dos constituintes voláteis com várias informações em curto espaço de tempo, com pouca amostra e com baixo custo. O perfil cromatográfico em CCD é característico para cada óleo e permite, em muitos casos, uma confirmação da identidade de um óleo (SIMÕES *et al.*, 2017). Geralmente, são usadas placas de gel de sílica, como fase estacionária, e, como fase móvel, existe uma grande variedade de sistemas eluentes. As cores e seus valores de fator de retenção (R_f) fornecem informações sobre cada composto. A intensidade da cor das manchas também pode ser usada como parâmetro semiquantitativo, podendo ser comparada com padrões (SIMÕES *et al.*, 2017).

Foi avaliada a separação dos componentes do óleo essencial de *L. lacunosa* por cromatografia em camada delgada (CCD) gel de sílica. Os diferentes constituintes do OE percorreram a placa de CCD de maneiras diferentes, de acordo com a polaridade de cada um, sendo então possível a separação dos mesmos ao longo da placa. A **Figura 29** mostra o perfil cromatográfico, por CCD, do OE de *L. lacunosa*.

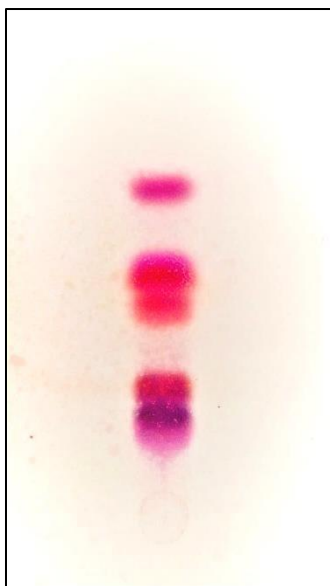


Figura 29: Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para a avaliação da separação dos constituintes do óleo essencial (OE) de *L. lacunosa*. Eluente: hexano: acetato de etila (80:20 v/v). Revelação: solução de anisaldeído sulfúrico

2.1.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM) e a composição química do óleo essencial de *Lippia lacunosa*

A cromatografia gasosa (CG) é utilizada como prova de identidade e para a determinação do teor dos componentes do óleo essencial e substâncias, cujos constituintes tenham pontos de ebulição de até 300°C e que sejam termicamente estáveis. A CG é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de óleos essenciais, também chamados óleos voláteis, que são dissolvidos em solventes como hexano, antes de serem injetados no cromatógrafo (HARRIS, 2001; SIMÕES *et al.*, 2017). Para quantificar a composição de um óleo volátil, é usado o método dos 100%: o valor total das áreas dos picos do cromatograma é considerado 100%. A CG consiste numa fase móvel e uma fase estacionária, onde a fase móvel é um gás e a fase estacionária é geralmente um líquido não-volátil, podendo ser também um sólido. Na cromatografia gasosa, o constituinte gasoso (ou líquido volátil) é transportado pela coluna por uma fase móvel gasosa, chamada gás de arraste. A amostra líquida volátil ou gasosa é injetada por um septo dentro

de uma câmara aquecida, na qual ela se evapora rapidamente. O vapor é arrastado na coluna pelo gás de arraste e os constituintes separados fluem pelo detector, cuja resposta é mostrada num computador ou registrador. A coluna deve estar aquecida o bastante para proporcionar uma pressão de vapor suficiente para que os constituintes sejam eluídos num tempo razoável (HARRIS, 2001; SIMÕES *et al.*, 2017). A escolha da fase líquida para um dado problema está baseada na regra “semelhante dissolve semelhante”. As colunas apolares são melhores para as substâncias apolares, assim como, as colunas de polaridade intermediária são melhores para substâncias de polaridade intermediária e as colunas fortemente polares são melhores para substâncias fortemente polares (HARRIS, 2001). O tempo de retenção – tempo decorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico cromatográfico – é relativo às substâncias polares e apolares com a mudança na polaridade da fase estacionária, quanto mais fortemente polar for à fase estacionária, mais fortemente a coluna irá reter as substâncias polares. O determinante principal da retenção da coluna é a volatilidade das substâncias, (HARRIS, 2001). A temperatura de uma coluna é elevada durante a separação para aumentar a pressão de vapor do soluto e assim diminuir os tempos de retenção dos últimos componentes a serem eluídos. Com a elevação da temperatura é possível uma melhor resolução dos picos, pois estes se tornam mais finos. Mas, é importante salientar que, elevando-se muito a temperatura poderá ocorrer decomposição térmica dos constituintes da análise ou da fase estacionária (HARRIS, 2001).

O espectrômetro de massas (EM) é um detector potente para as análises qualitativa e quantitativa de constituintes em cromatografia gasosa ou líquida. Esse método fornece um espectro de massas para cada pico, indicando a massa molecular e o padrão de fragmentação, que pode ser comparado ao banco de dados presente na espectroteca instalada no computador (HARRIS, 2001; SIMÕES *et al.*, 2017). Na espectroscopia de massas, as substâncias gasosas são ionizadas, geralmente para formar cátions, aceleradas por um campo elétrico e separadas de acordo com a sua massa. Em um espectro de massas, o eixo horizontal é a razão massa/carga (m/z), onde m é massa do íon (em unidades de massa atômica) e z é o número de carga que ele transporta.

O eixo vertical indica a abundância do íon (%). Uma substância ionizada que não se fragmenta é chamada de íon molecular, sendo representada por M+.

O óleo essencial (OE) de *L. lacunosa* foi submetido à análise por CG-EM nas condições estabelecidas (item 1.4). Esta análise permitiu avaliar qualitativamente e quantitativamente a composição química do óleo essencial e (Figuras 30 a 35), através do tempo de retenção de seus picos e respectivos espectros de massas.

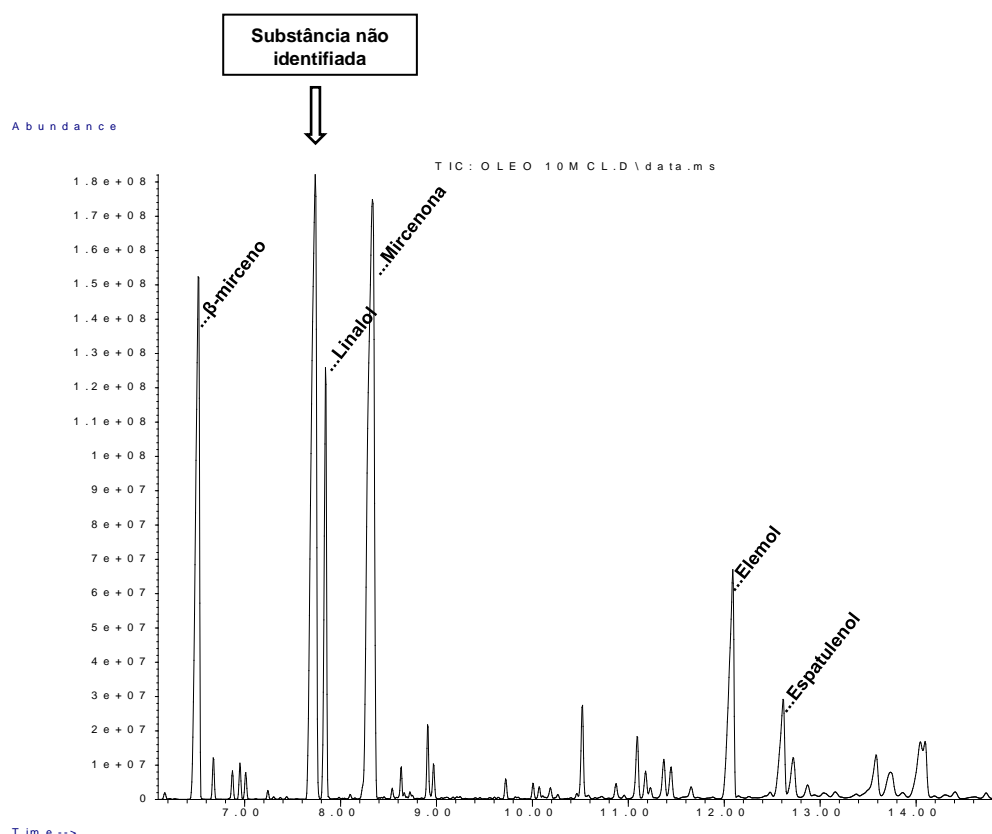
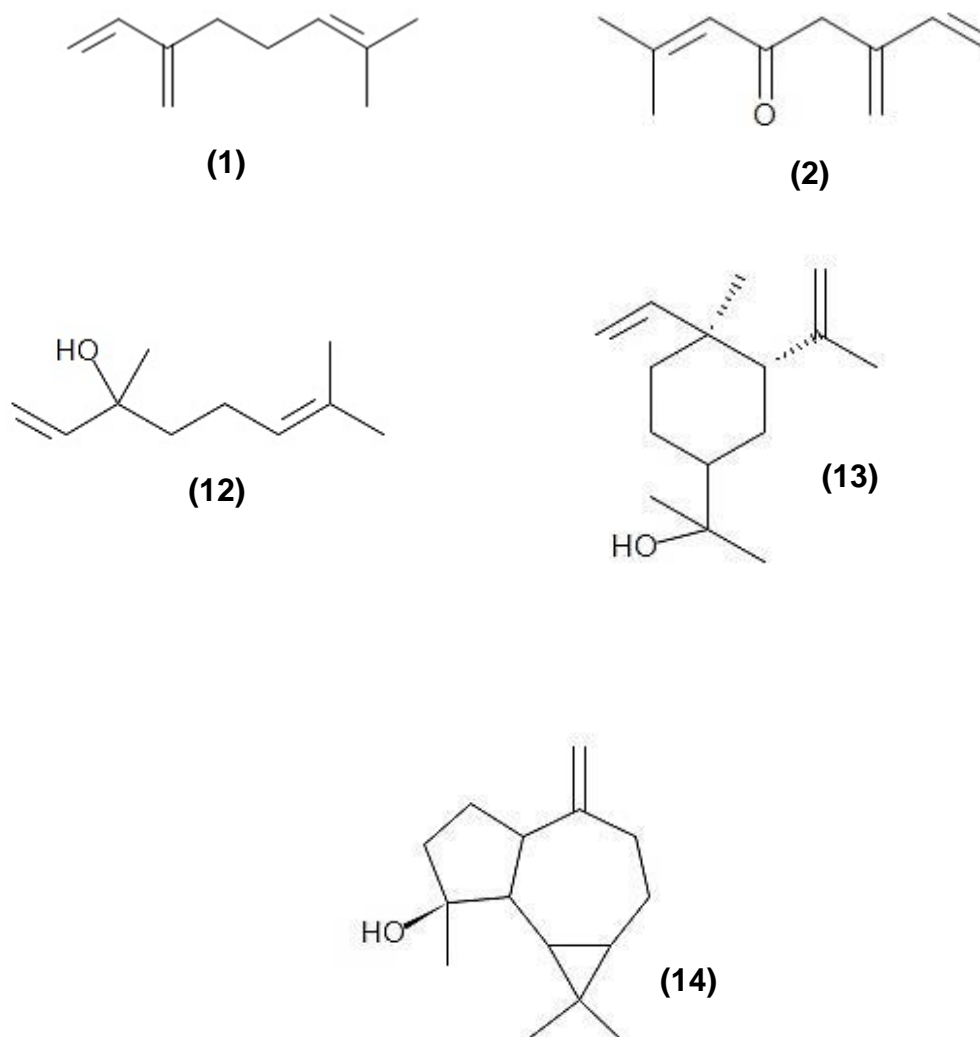


Figura 30: Cromatograma (CG) do óleo essencial de *L. lacunosa* obtido por CG-EM. Condições cromatográficas: item 1.4 Materiais e Métodos (Parte 2).

Foram identificados aproximadamente 23 constituintes no óleo essencial (91,86% do total), sendo estes terpenos de baixo peso molecular: monoterpenos (71,08%) e sesquiterpenos (19,44%). Os principais monoterpenos identificados foram β -mirceno (1), mircenona (2) e linalol (12) e os sesquiterpenos, elemol (13) e espatulenol (14) (Figura 30).



A identificação das substâncias do OE de *L. lacunosa* ocorreu por meio da comparação dos perfis de fragmentação (**Tabela 6**) dos espectros de massas das substâncias com os espectros apresentados pelas bibliotecas NIST e ADAMS. Os espectros de massas obtidos por CG-EM para substâncias majoritárias do OE estão apresentados nas **Figuras 31 a 35**.

Tabela 6: Comparação do perfil de fragmentação (m/z) dos principais componentes do óleo essencial de *L. lacunosa* na amostra, biblioteca NIST e biblioteca ADAMS.

Componentes	Principais fragmentos (m/z)*		
	Amostra	Biblioteca NIST	Biblioteca ADAMS
β -mirceno	41, 93, 69	41, 93, 69	41, 93, 69
Linalol	71, 93, 55, 43	71, 93, 55, 43	71, 43, 93, 55
Mircenona	83, 55	**83, 55	83, 55
Elemol	59, 43, 93, 161, 107	59, 93, 43, 161, 107	59, 93, 43, 161, 107
Espatulenol	43, 91, 205, 119	43, 91, 205, 119, 105	43, 205, 91, 119, 105

* m/z em ordem decrescente de abundância

**Leitão *et al.*, 2008.

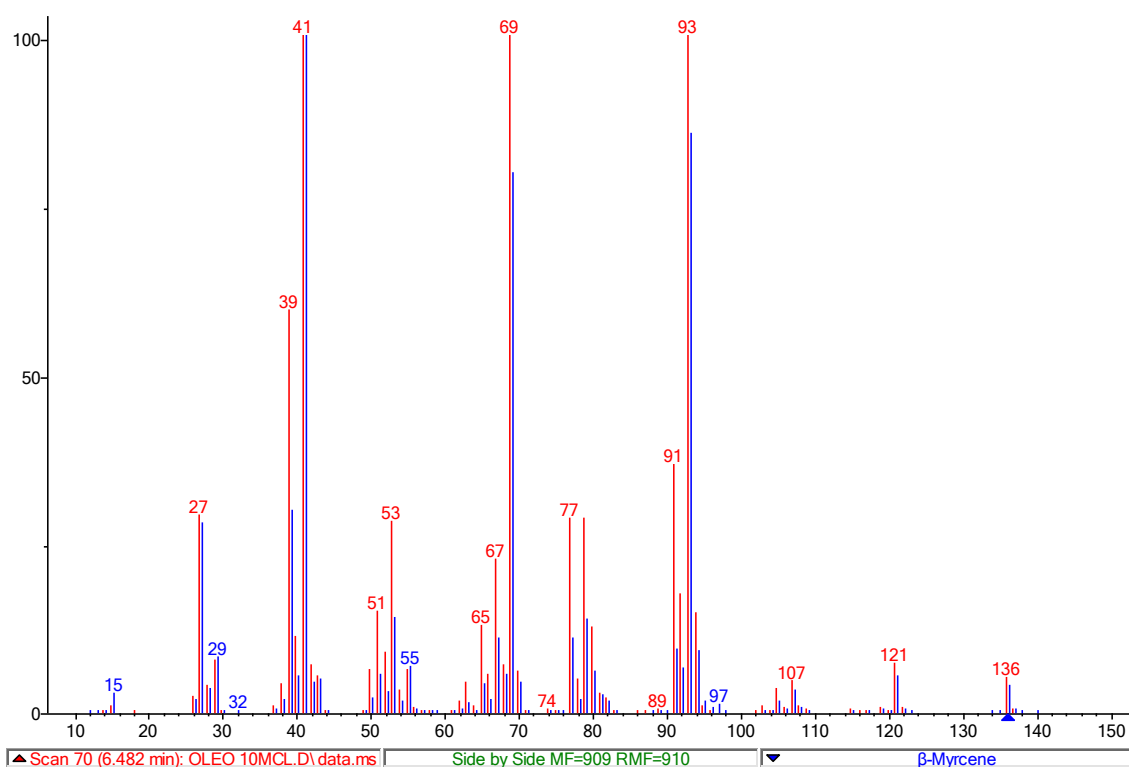


Figura 31 – Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para β -mirceno presente no óleo essencial de *L. lacunosa* (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para β -mirceno presente na biblioteca NIST (em vermelho).

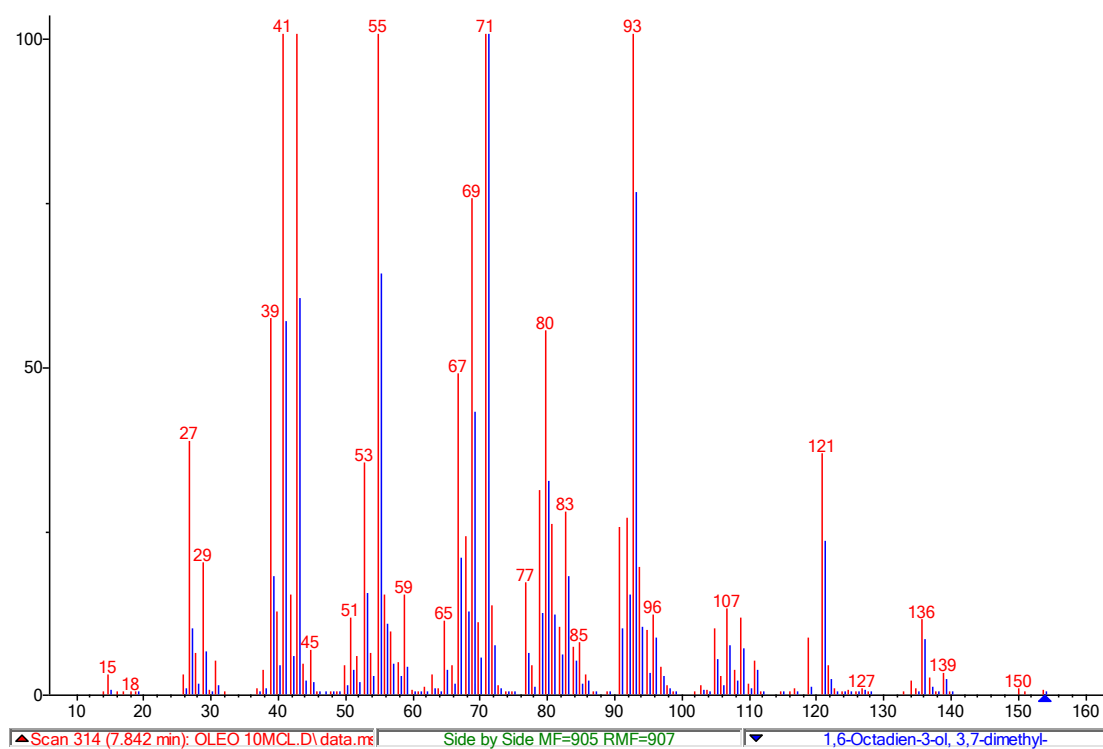


Figura 32 – Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para β -linalol presente no óleo essencial de *L. lacunosa* (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para β -linalol presente na biblioteca NIST (em vermelho).

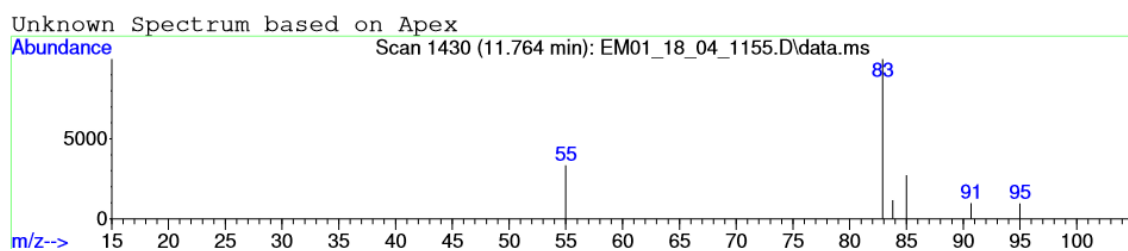


Figura 33 – Espectro de massas obtido por CG-EM para mircenona presente no óleo essencial de *L. lacunosa* obtido por CG-EM.

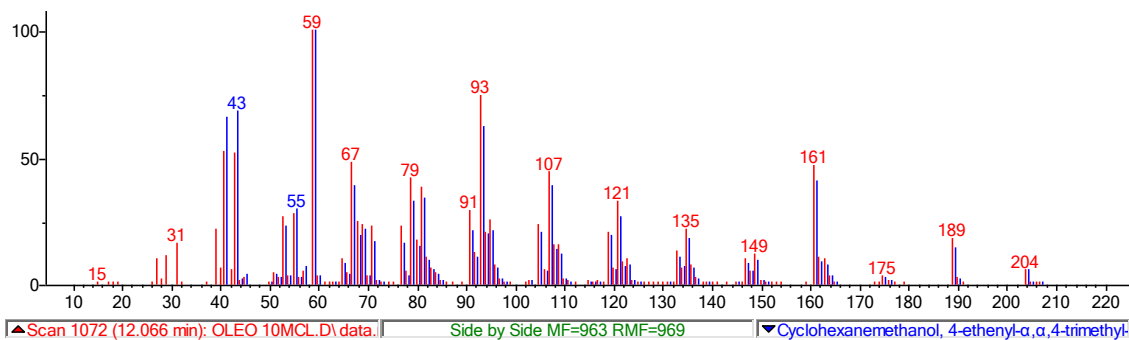


Figura 34 – Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para elemol presente no óleo essencial de *L. lacunosa* (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para elemol presente na biblioteca NIST (em vermelho).

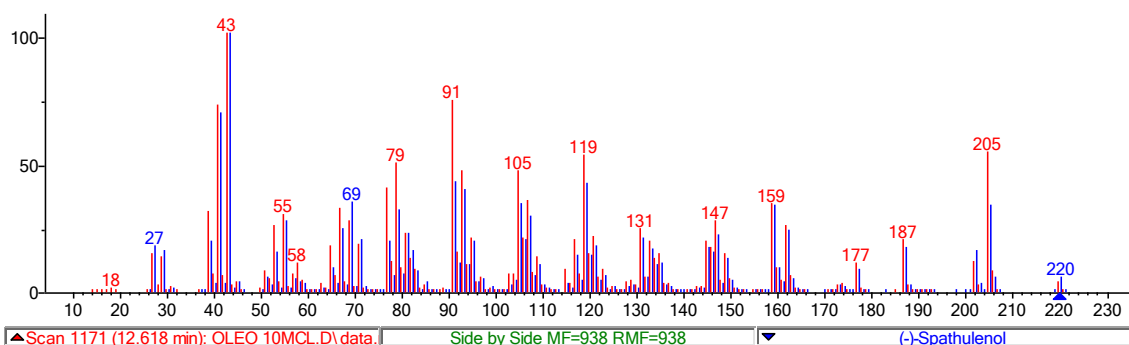


Figura 35 - Sobreposição do espectro de massas obtido por CG-EM para espatulenol presente no óleo essencial de *L. lacunosa* (em azul) e espectro de massas obtido por CG-EM para espatulenol presente na biblioteca NIST (em vermelho).

A **Tabela 7** mostra as principais substâncias identificadas do OE de *L. lacunosa*. Muitos dos componentes identificados neste trabalho no OE de *L. lacunosa* (**Tabela 7**), já foram citados em trabalhos anteriores, para espécies do mesmo gênero (PASCUAL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2011; CHAVAN *et al.*, 2010; DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2012; GOMIDE *et al.*, 2013, GOMIDE *et al.*, 2016).

Tabela 7: Porcentagem da composição química do óleo essencial (% relativa da área sob cada pico) extraído das folhas de *L. lacunosa*, determinado por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas (CG-EM).

Componentes	TR (min)	(%)
MONOTERPENOS		
1 β -mirceno	6,48	13,81
2 α -felandreno	6,68	1,12
3 o-cimeno	6,95	0,44
4 β -felandreno	7,01	0,35
5 Ocimeno	7,24	0,11
6 γ -terpineno	7,30	0,03
7 Substância não identificada	7,74	21,2
8 β -linalol	7,85	6,84
9 Mircenona	8,33	25,44
10 4-terpineol	8,54	0,14
11 α -terpineol	8,63	0,42
12 Ocimenona	8,91	0,96
13 geraniol acetato	10,01	0,22
SESQUITERPENOS		
14 β -cariofileno	10,52	1,54
15 α -cariofileno	10,87	0,29
16 α -curcumeno	11,09	1,16
17 γ -elemeno	11,37	0,82
18 Elemol	12,09	7,30
19 Espatuleno	12,62	3,11
20 óxido de cariofileno	12,72	1,20
21 γ -eudesmol	13,59	1,79
22 β -eudesmol	14,05	2,23
23 α -eudesmol	14,09	1,34
Total		91,86

Leitao *et al.* (2008) elucidou a composição química de *L. lacunosa*, apresentando os componentes mircenona e mirceno como majoritários no óleo essencial extraído de folhas frescas. Estes dois monoterpenos são os componentes responsáveis pela cor amarela e odor característico de manga,

que o OE de *L. lacunosa* apresenta (LEITÃO *et al.*, 2008). O óleo essencial das partes aéreas de *L. javanica*, analisado por CG-EM, contém mirceno, linalol e mircenona, dentre outros componentes, nos 16 diferentes quimiotipos estudados, apresentando mircenona (36,3%) e mirceno (28,8%) como substâncias majoritárias em um dos quimiotipos (VILJOEN *et al.*, 2005). Em estudo apresentado por Silva *et al.* (2014) em outra espécie de *Lippia*, foram encontrados 83,0% de sesquiterpenos do óleo essencial das flores de *Lippia stachyoides* e 94,9% de sesquiterpenos do óleo essencial das folhas, identificando o espatulenol, 8,1% e 16,4%, para flores e folhas, respectivamente.

Alguns dos constituintes do óleo essencial de *L. lacunosa* (**Tabela 7**) já foram identificados em estudos de espécies de outros grupos taxonômicos. Em análise feita por Souza *et al.* (2003), foram encontrados 16% de β -mirceno, no óleo essencial de *Porophyllum ruderale*, Asteraceae. Já o linalol apresentou rendimento de 76,13% no óleo essencial das folhas de *Ocimum basilicum* (VENÂNCIO *et al.*, 2011).

Os monoterpenos são os principais óleos voláteis encontrados na maioria das espécies de *Lippia*, inclusive na espécie *L. lacunosa* (SALIMENA & PIRES *et al.*, 1991; VICCINI *et al.*, 2005, LEITÃO *et al.*, 2008, GOMES *et al.*, 2011). Resultados, já apresentados anteriormente para *L. lacunosa* (LEITÃO *et al.*, 2008; CASTELLAR *et al.*, 2011; GOMIDE *et al.*, 2013; GOMIDE *et al.*, 2016) e até mesmo de outras espécies do gênero (PASCUAL *et al.*, 2001; ABENA *et al.*, 2003; MENDES *et al.*, 2010; RIELLA *et al.*, 2012), corroboram o resultado predominante de monoterpenos (71,08%) demonstrado no presente trabalho.

No presente estudo foram observadas diferenças nas concentrações dos monoterpenos, mirceno (13,81%) e mircenona (25,44%), quando comparados aos resultados relatados na literatura. Leitão *et al.* (2008) relatou para as mesmas substâncias um rendimento de 11,9% e 25,41%, respectivamente. Em 2013, Gomide e colaboradores encontraram o teor de 15,20% para o mirceno e 35% para a mircenona. O mesmo grupo, mais tarde, encontrou 19,47% de mirceno e 58,57% de mircenona (GOMIDE *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que o óleo essencial de *L. lacunosa* utilizado por Leitão e Gomide *et al.* foi extraído de folhas frescas. Por outro lado, estas diferenças nas concentrações dos

constituintes do óleo essencial de *L. lacunosa* podem estar associadas aos fatores ecográficos, que já começaram a ser investigados, porém requerem mais estudos (LEITÃO, *et al.*, 2008; GOMIDE *et al.*, 2013; GOMIDE *et al.*, 2016; MEIRA *et al.*, 2017). As concentrações dos constituintes do OE podem variar em função de diversos fatores: tipo de solo, clima, altitude, horário da coleta da planta e fatores pluviométricos (SOARES & TAVARES-DIAS, 2013; MEIRA *et al.*, 2017). A hibridização é outro fator importante a ser considerado na diversificação da flora dos campos rupestres, pois a maioria das espécies da Cadeia do Espinhaço apresenta distribuição restrita e marcada pela alta taxa de endemismo, talvez a maior dentre as formações vegetais brasileiras (RAPINI *et al.*, 2008; SALIMENA, 2010). No gênero *Lippia*, a secreção de óleos essenciais tem sido associada à presença de tricomas e os constituintes são muito instáveis na presença de luz, calor e umidade, conseqüentemente o horário de colheita do material vegetal pode influenciar direta ou indiretamente nas variações quantitativas e qualitativas do óleo essencial (GOMES *et al.*, 2011). O endemismo é comum na região da Serra do Espinhaço, o que promove hibridização entres espécies da família Verbenaceae, fato corroborado por Viccini *et al.*(2005), que ao estudar quatorze espécies do gênero *Lippia*, endêmicas da Serra do Espinhaço, observou o hibridismo nas espécies *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*. (VICCINI *et al.*, 2005; MEIRA *et al.*, 2017). Possivelmente, *L. lacunosa* tenha sido também descrita por Saint-Hilaire como chá de pedestre, uma vez que ambas se encontram no mesmo ambiente natural e endêmico, os campos rupestres da Serra do Espinhaço.

2.1.3 Fracionamento do óleo essencial de *Lippia lacunosa*

Por ser uma matriz menos complexa que o extrato hexânico e por demonstrar importante atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, o óleo essencial de *L. lacunosa* foi o material selecionado para o fracionamento e investigação fitoquímica mais aprofundada, com o objetivo de identificar as substâncias ativas e selecionar marcadores químicos.

Um ponto a destacar é que, apesar do rendimento do óleo essencial ser menor (1,1%) que o do extrato hexânico (2,5%), podemos considerá-lo expressivo,

uma vez que o extrato hexânico é uma matriz mais complexa (**Figura18**), podendo conter uma série de substâncias que talvez não sejam de interesse, tais como óleos fixos, graxas, ceras, mucilagens e clorofila.

No fracionamento cromatográfico do OE de *L. lacunosa* foram obtidas 74 frações, que foram eluídas em diferentes polaridades, iniciando com 100% de hexano, baixa polaridade, e finalizando com 100% de acetato de etila, maior polaridade (**Tabela 8**). As frações foram coletadas em função do perfil de separação da amostra. Cada fração obtida, após total evaporação do solvente, foi pesada, calculado o seu rendimento (**Tabela 9**) e armazenada em freezer (-22° C).

Tabela 8: Correlação entre a fase móvel e frações coletadas durante a cromatografia em coluna.

Fase móvel		Frações
HEX (%)	AcOEt (%)	Coletadas
100	0	1 a 2
98	2	3 a 8
95	5	9 a 11
90	10	12 a 43
88	12	44 a 52
86	14	53 a 57
84	16	58 a 63
80	20	64 a 68
0	100	69 a 74

Após o fracionamento, obteve-se 0,9025g, rendimento total de 75,21%, em relação à quantidade inicialmente inserida na coluna, 1,2 g de óleo essencial.

Tabela 9: Rendimento das frações isoladas do óleo de *L. lacunosa*, por cromatografia em coluna, expresso em massa (g) e porcentagem (%).

Fração	Peso (g)	Rendimento (%)	Fração	Peso (g)	Rendimento (%)
1	0,0002	0,0167	38	0,0229	1,9083
2	0,0001	0,0083	39	0,0189	1,5750
3	0,0010	0,0833	40	0,0253	2,1083
4	0,0002	0,0167	41	0,0156	1,3000
5	0,0023	0,1917	42	0,0255	2,1250
6	0,0050	0,4167	43	0,0386	3,2167
7	0,0241	2,0083	44	0,0175	1,4583
8	0,0170	1,4167	45	0,0151	1,2583
9	0,0270	2,2500	46	0,0096	0,8000
10	0,0075	0,6250	47	0,0398	3,3167
11	0,0002	0,0167	48	0,0021	0,1750
12	0,0006	0,0500	49	0,0001	0,0083
13	0,0004	0,0333	50	0,0136	1,1333
14	0,0003	0,0250	51	0,0124	1,0333
15	0,0013	0,1083	52	0,0171	1,4250
16	0,0003	0,0250	53	0,0287	2,3917
17	0,0012	0,1000	54	0,0089	0,7417
18	0,0001	0,0083	55	0,0224	1,8667
19	0,0006	0,0500	56	0,0323	2,6917
20	0,0053	0,4417	57	0,0248	2,0667
21	0,0050	0,4167	58	0,0062	0,5167
22	0,0034	0,2833	59	0,0086	0,7167
23	0,0104	0,8667	60	0,0064	0,5333
24	0,0135	1,1250	61	0,0040	0,3333
25	0,0162	1,3500	62	0,0007	0,0583
26	0,0141	1,1750	63	0,0048	0,4000
27	0,0109	0,9083	64	0,0005	0,0417
28	0,0110	0,9167	65	0,0310	2,5833
29	0,0086	0,7167	66	0,0001	0,0083
30	0,0140	1,1667	67	0,0002	0,0167
31	0,0159	1,3250	68	0,0001	0,0083
32	0,0157	1,3083	69	0,0003	0,0250
33	0,0558	4,6500	70	0,0009	0,0750
34	0,0210	1,7500	71	0,0018	0,1500
35	0,0503	4,1917	72	0,0164	1,3667
36	0,0309	2,5750	73	0,0036	0,3000
37	0,0322	2,6833	74	0,0021	0,1750
Subtotal	0,4236	35,3000	Subtotal	0,4789	39,9083
Rendimento total do fracionamento: 0,9025g (75,21%)					

Leitão *et al.* (2008) eluiu aproximadamente 0,7 mL de óleo essencial de *L. lacunosa* com uma mistura de hexano: acetato de etila (98:2) em coluna cromatográfica, obtendo 75 frações de 1 mL, sendo que as frações de 11 a 21 renderam 2 mg de mirceno puro e as frações de 59 a 61, 30 mg de mircenona pura.

No presente estudo, no fracionamento do OE, foi utilizado gradiente de eluição com a mesma mistura de solventes orgânicos do trabalho de Leitão *et al.* (2008), pois um melhor perfil de separação foi observado previamente na cromatografia em camada delgada (**Figura 29**).

A **Figura 36** mostra o perfil cromatográfico do fracionamento do OE de *L. lacunosa*. Pode-se visualizar que o perfil de separação obtido na coluna cromatográfica é semelhante ao obtido, por CCD de gel de sílica, para o OE (**Figura 29**).

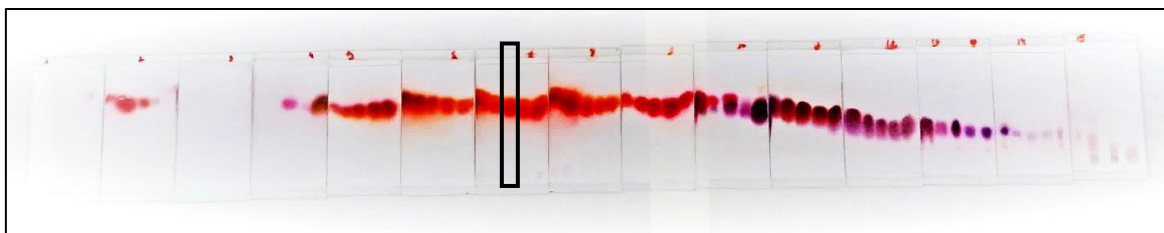


Figura 36: Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para a avaliação da separação dos constituintes das frações do óleo essencial (OE) de *L. lacunosa*. Eluente: hexano: acetato de etila (80:20 v/v). Revelação: solução de anisaldeído sulfúrico. A fração 33 está destacada na figura.

Como observado na **Tabela 9**, a fração 33 obteve o melhor rendimento; 0,0558g (4,65%). Após a análise por CCD e CG-EM dessa fração, pode-se observar que a mesma é composta por duas substâncias (**Figuras 37, 38 e 41**) referentes aos dois constituintes majoritários do óleo essencial. Uma destas substâncias ainda não foi identificada e a outra foi identificada como mircenona por CG-EM, utilizando a base de dados NIST e dados da literatura (Figura 33). A caracterização desta substância não identificada será confirmada por análises com ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H , ^{13}C .

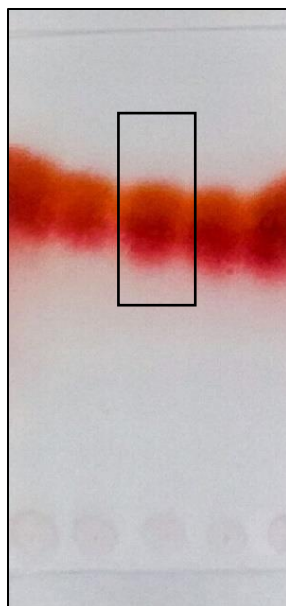


Figura 37: Cromatograma obtido por CCD de gel sílica para a avaliação da separação da fração 33 (OEF33) do óleo essencial (OE) de *L. lacunosa*. Eluente: hexano: acetato de etila (80:20 v/v). Revelação: solução de anisaldeído sulfúrico. A fração 33 está destacada na figura.

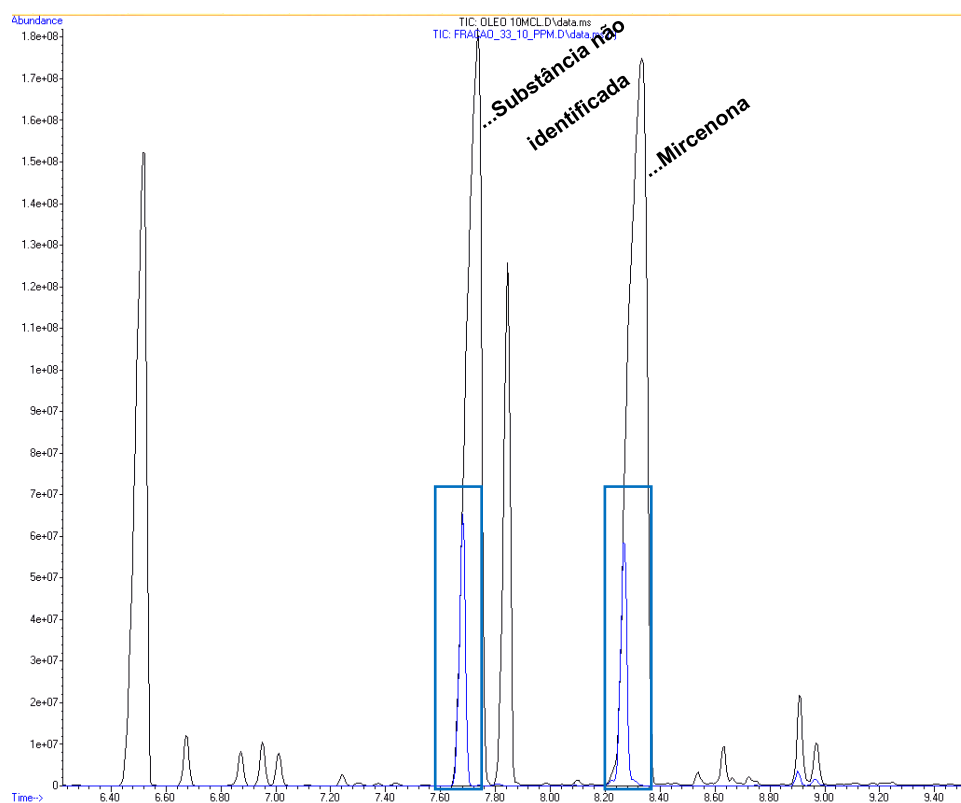


Figura 38: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas da sobreposição do óleo essencial de *L. lacunosa* (preto) e da fração 33 (OEF33) (azul). Condições cromatográficas: item1.4 - Materiais e Métodos (Parte 2).

A fração 20 com rendimento de 0,44% (**Tabela 9**) foi caracterizada, por CG-EM, como sendo a substância não identificada da OEF33 (**Figura 39**). Já a fração 46, com rendimento 0,80% foi identificada como mircenona (**Figura 40**)

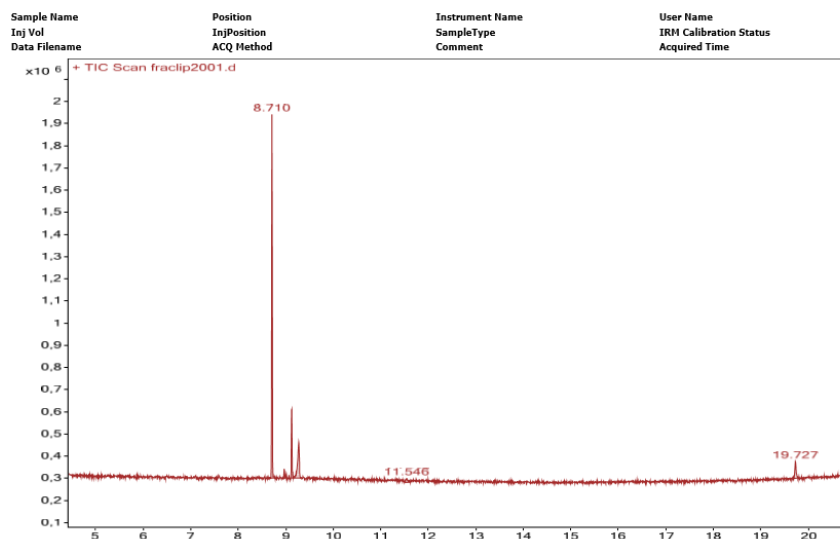


Figura 39: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas da fração 20 do óleo essencial de *L. lacunosa*. Condições cromatográficas: item1.4 - Materiais e Métodos (Parte 2).

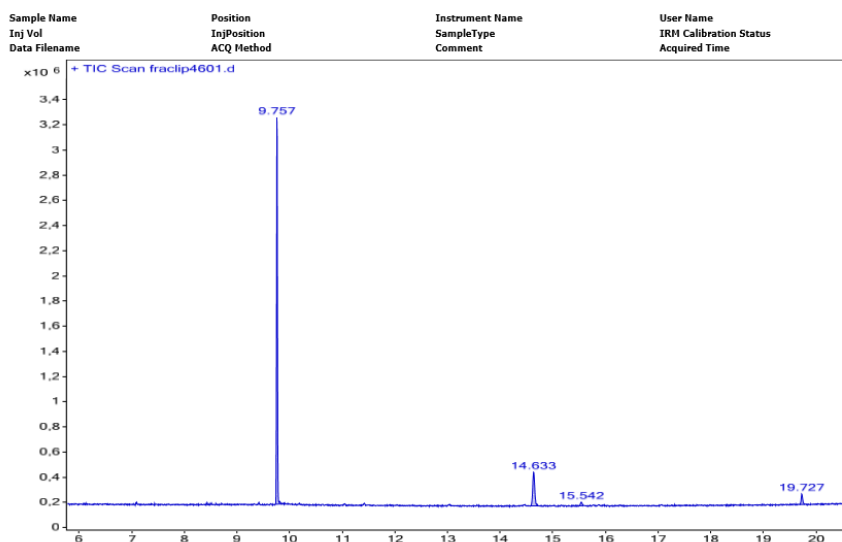


Figura 40: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas da fração 46 do óleo essencial de *L. lacunosa*. Condições cromatográficas: item1.4 Materiais e Métodos (Parte2)

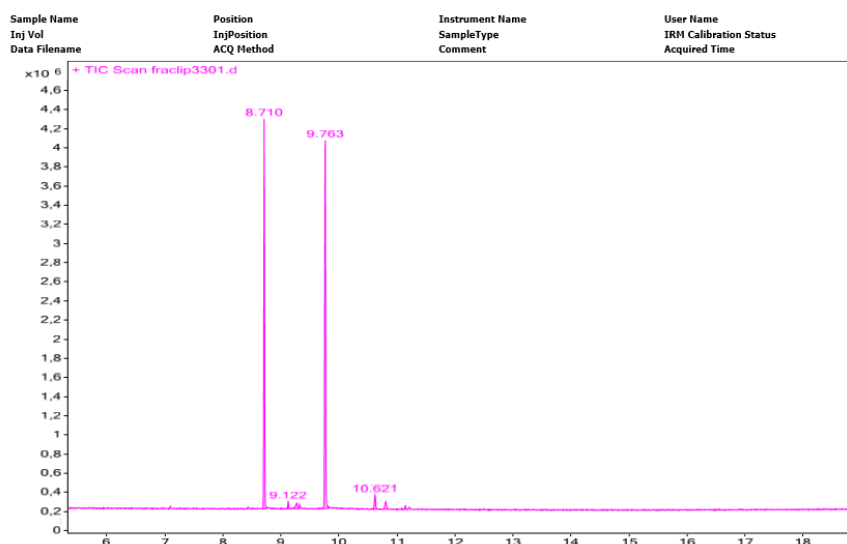


Figura 41: Cromatograma obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas da fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa*. Condições cromatográficas: item1.4 - Materiais e Métodos (Parte 2).

A fração OEF33 foi escolhida para a avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva baseada na presença dos componentes majoritários (46,64%) do óleo essencial de *L. lacunosa* (Figura 38 e 41) e no bom rendimento obtido, 0,0558g (Tabela 9), o qual seria suficiente para todos os ensaios biológicos.

2.2 Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da fração 33 (OEF33) do óleo essencial de *Lippia lacunosa*

Na sequência, após o estudo da composição química do óleo essencial, uma segunda etapa de testes foi realizada, agora utilizando a fração 33, contendo mircenona, o constituinte majoritário do óleo essencial de *L. lacunosa*. Com relação às atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, não existem estudos, até o presente momento, sobre o monoteperno mircenona isolado. Mircenona é uma substância encontrada na literatura científica em investigação do óleo essencial ou extrato de plantas que a contém, como ocorre nas espécies *L. javanica* (VILJOEN *et al.*, 2005), *L. lacunosa* e *L. rotundifolia* (CASTELLAR *et al.*, 2011; GOMIDE *et al.*, 2013; GOMIDE *et al.*, 2016, LEITÃO *et al.*, 2006) ou

em estudos de composição química do óleo essencial de folhas de *L. lacunosa* e *L. rotundifolia*, (LEITÃO *et al.*, 2008) e da fração hexânica de *L. pseudothea* (SINGULANI *et al.*, 2012).

2.2.1 Efeito induzido pela fração 33 do óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre o edema de pata induzido por carragenina

Nossos resultados demonstraram que a fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa* reduziu significativamente o edema de pata dos animais na 2^a, 4^a e 6^a h (dose de 10 mg/kg) e, de forma similar à resposta apresentada pela dexametasona, utilizada como controle positivo do experimento. Para a dose de 5 mg/kg observamos redução do edema somente na 4^a h na análise do curso temporal (**Figura 42**).

Riella *et al.* (2012) testou a atividade anti-inflamatória utilizando doses de 10, 30 e 100 mg/kg de timol, componente majoritário de uma fração do óleo essencial de *L. gracilis*, em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados demonstraram que o timol reduz significativamente o edema, na dose de 100 mg/kg. Nove compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) e 22 terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) de *L. graveolens* e *L. palmeri* foram detectados e as frações foram estudadas, comprovando, em ensaios *in vitro* utilizando células RAW 264.7 de macrófagos, a atividade anti-inflamatória mediada por polifenóis e terpenos (LEYVA-LÓPEZ, *et al.*, 2016). Mirceno, um dos principais constituintes do óleo essencial das folhas de *L. lacunosa*, foi testado em duas espécies Asteraceae, no modelo de pleurisia induzido por lipopolissacarídeo (LPS), nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg, em camundongos. Os resultados mostraram inibição da migração de leucócitos (33% e 22%), neutrófilos (36% e 18%), macrófagos mononucleares (25% e 18%) e eosinófilos (64% e 51%), em dose de 50 mg/kg e 400 mg/kg, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2003).

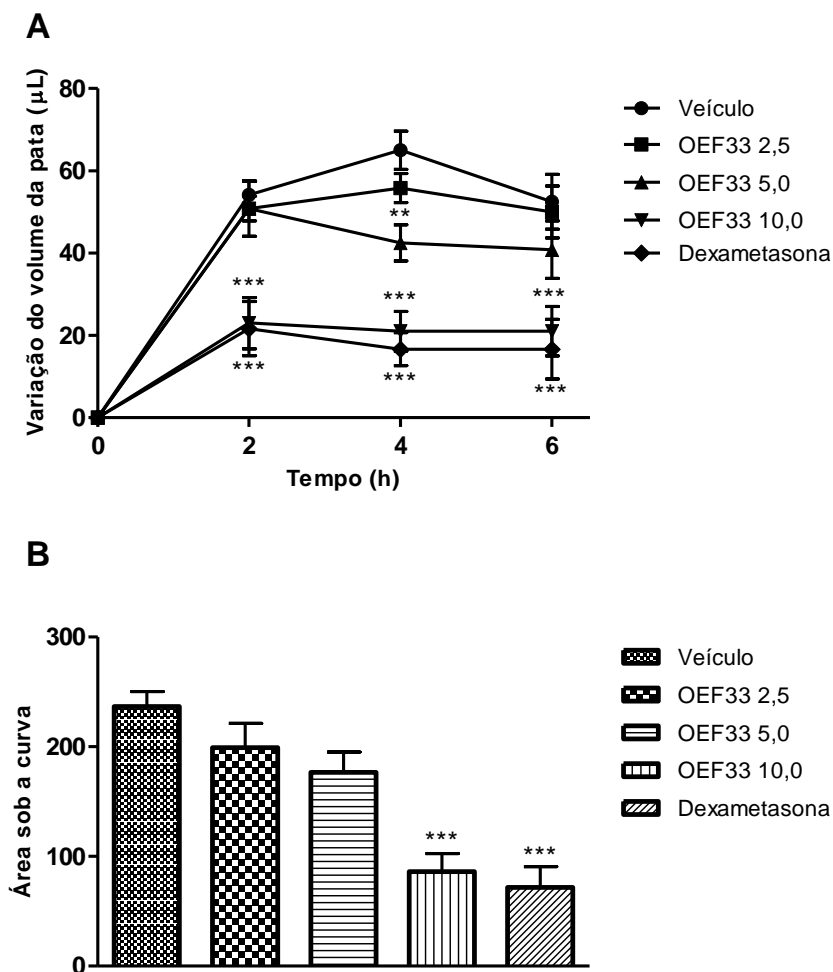


Figura 42 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de *L. lacunosa* (OEF33; 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 μg , 30 μL , *i.p.l.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

Considerando que o edema induzido por carragenina envolve a produção de vários mediadores inflamatórios, podemos sugerir que a atividade anti-inflamatória da fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa* pode estar relacionada à redução da produção de mediadores inflamatórios e do acúmulo de células inflamatórias. Em outro estudo, foi demonstrado que o tratamento de ratos com timol, monoterpene do OE de *L. gracillia*, nas doses 10, 30 e 100 mg/kg, (*i.p.*), reduziu significativamente tanto o edema da pata quanto a atividade da MPO (usada como indicador de neutrófilos) induzida pela carragenina (RIELLIA *et al.*, 2012).

2.2.2 Efeito induzido pela fração 33 do óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

No presente estudo, o grupo controle que recebeu carragenina apresentou diminuição acentuada do limiar nociceptivo, o qual se manteve durante todo o período de avaliação (2, 4 e 6 h). Observamos que a fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa*, somente na dose de 10 mg/kg, reduziu a alodínia mecânica na 2^a, 4^a e 6^a h após injeção de carragenina (**Figura 43**). A dexametasona, utilizada como controle positivo, reduziu a alodínia mecânica induzida pela injeção *i.pl.* de carragenina nos períodos avaliados (**Figura 43**).

Estudos de alguns componentes presentes no óleo essencial de *L. lacunosa*, tais como mirceno e linalol já foram demonstrados.

A atividade do mirceno, um monoterpene isolado de óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), foi investigada em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Neste estudo, os autores observaram inibição significativa da nocicepção nas doses de 20 e 40 mg/kg (s.c.) (RAO, *et al.*, 1990).

Linalol, em doses de 25 a 75 mg/kg, também apresentou atividade antinociceptiva no modelo de dor visceral induzida por ácido acético em camundongos (PEANA *et al.*, 2003). Os efeitos antinociceptivos do óleo essencial da folha de *Ocimum basilicum* L. e de seu principal componente, linalol, foram testados em modelos de nocicepção orofacial induzida por formalina, glutamato e capsaicina em camundongos, nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, (*i.p.*), apresentando resultados significativos (VENÂNCIO *et al.*, 2011).

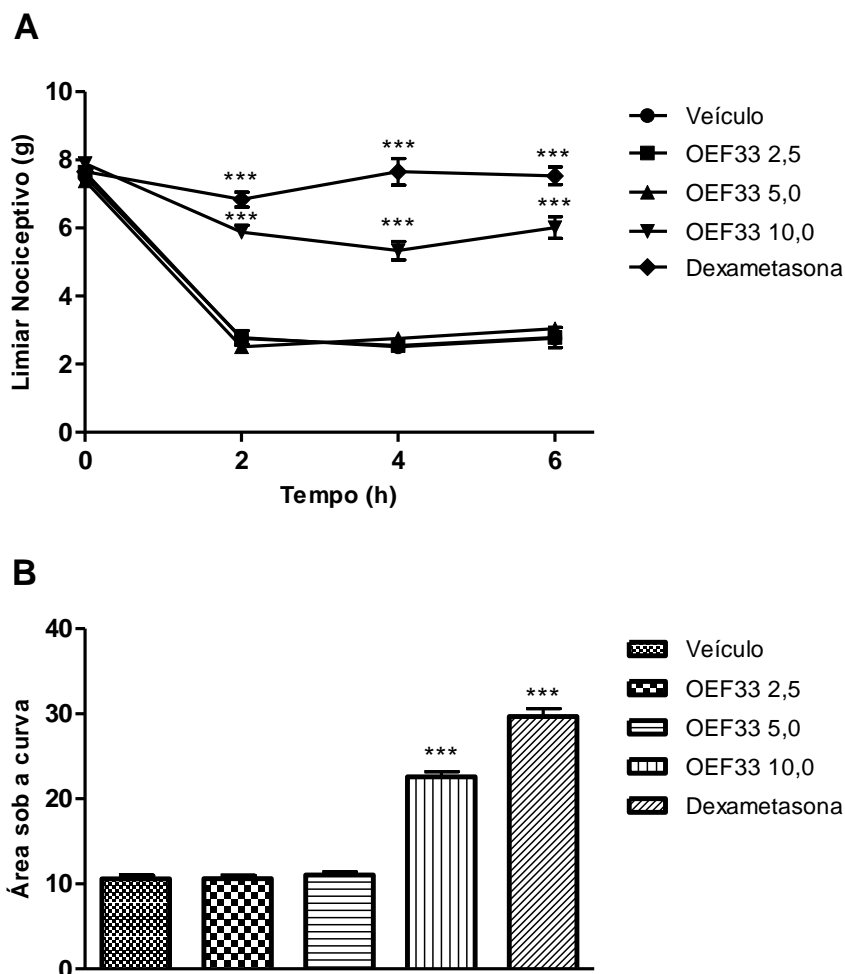


Figura 43 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de *L. lacunosa* (OEF33; 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dexametasona (5 mg/kg, *i.p.*, - 30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, *i.pl.*). (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n = 6$.

2.2.3 Efeito induzido pela fração 33 do óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

Em seguida, investigamos o efeito da fração no modelo experimental de dor provocada por estímulo térmico. A administração da fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa*, contendo o principal componente, a mircenona, nas doses de 5 e 10 mg/Kg, elevou a latência do comportamento nociceptivo no modelo da placa quente (**Figura 44**). O grupo tratado com dipirona, controle

positivo do experimento, elevou de forma marcante a latência do comportamento nociceptivo (**Figura 44**). A redução da resposta nociceptiva induzida pelo calor permite também sugerir que a fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa* pode inibir o processamento nociceptivo no SNC ou os mecanismos de ativação direta dos nociceptores por estímulos térmicos.

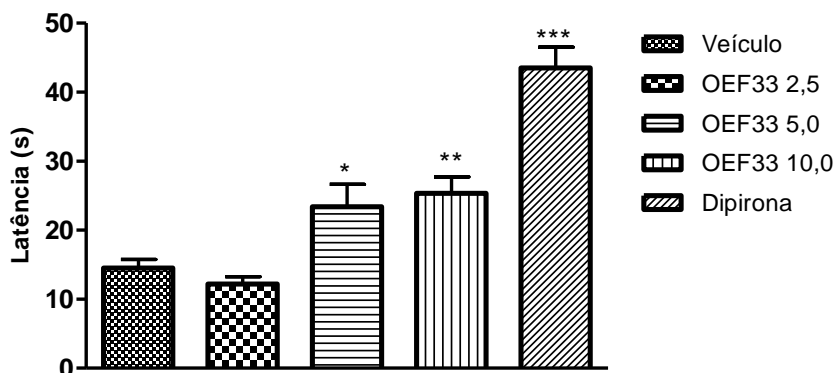


Figura 44 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de *L. lacunosa* (OEF33; 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pela dipirona (500 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50°C). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). $n = 6$.

A atividade do mirceno, isolado de óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), também foi investigada em modelo de placa quente em camundongos. Neste estudo, os autores observaram inibição significativa da nocicepção nas doses de 10 e 20 mg/kg (*i.p.*). Ainda, o efeito antinociceptivo do mirceno foi atenuado pelo antagonista opioide naloxona (RAO, *et al.*, 1990).

O óxido de cariofileno, substância também presente no óleo essencial de *L. lacunosa*, foi isolado da casca de *Annona squamosa* e investigada a atividade antinociceptiva em camundongos, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg. Neste estudo, utilizando o teste de placa quente, o óxido de cariofileno apresentou significativa atividade antinociceptiva (CHAVAN *et al.*, 2010).

2.2.4 Efeito induzido pela fração 33 do óleo essencial de *Lippia lacunosa* sobre a atividade motora

A atividade motora dos camundongos foi também avaliada na haste girante com o objetivo de validar os resultados obtidos nos protocolos de nocicepção. A fração 33 do óleo essencial de *L. lacunosa*, nas doses de 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg, não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante (**Figura 45**). Entretanto, esse tempo foi reduzido pela administração do fenobarbital, na dose de 50 mg/kg, usado como controle positivo nesse protocolo (**Figura 45**). Uma vez que a OEF33 não alterou o tempo de permanência dos camundongos na haste girante, é muito pouco provável que a atenuação do comportamento nociceptivo nos modelos avaliados seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular. Desse modo, esse resultado indica que a redução do comportamento nociceptivo, nos diferentes modelos experimentais de dor, resulta de uma atividade antinociceptiva genuína da fração 33 do óleo essencial das folhas de *L. lacunosa*.

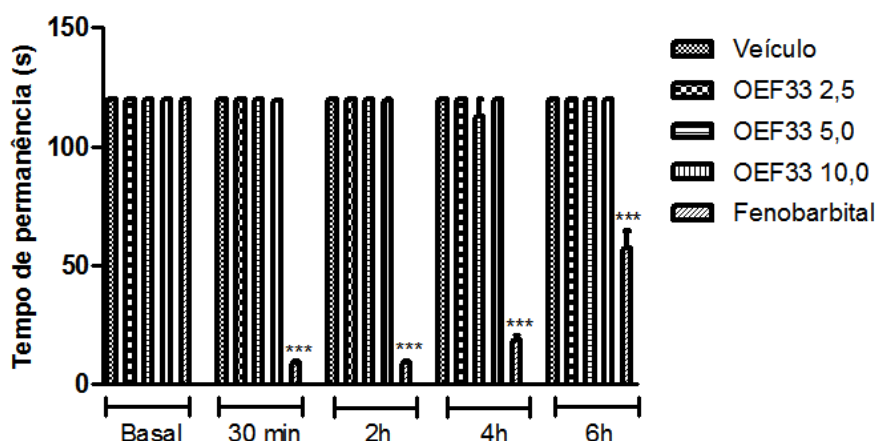


Figura 45 - Efeitos induzidos pela fração 33 isolada do óleo essencial de *L. lacunosa* (OEF33; 2,5, 5,0 e 10,0 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) ou pelo fenobarbital (50 mg/kg, *p.o.*, - 30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). $n = 6$.

4 PERSPECTIVAS

Este trabalho mostra, pela primeira vez, que o extrato hexânico, o óleo essencial e a fração OEF33 de *L. lacunosa* apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva nos diferentes modelos experimentais avaliados em camundongos. Novos estudos devem ser conduzidos na investigação fitoquímica para a elucidação estrutural da substância majoritária não identificada de OEF33, seleção de marcadores químicos e desenvolvimento de método analítico para a quantificação de suas substâncias ativas. Portanto, os resultados do presente estudo são promissores quando se tem em perspectiva a investigação do óleo essencial ou fração OEF33 de *L. lacunosa* como candidatos a fitoterápico ou fitofármaco com atividades analgésica e anti-inflamatória. Desse modo, estudos adicionais devem ser conduzidos com o intuito de investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nessas atividades, assim como, avaliar os perfis farmacocinético e toxicológico do óleo essencial e fração de *L. lacunosa*. Adicionalmente, vislumbra-se investigar a atividade de *L. lacunosa* em modelos experimentais crônicos, como de dor neuropática e artrite reumatoide, com o objetivo de caracterizar de forma mais ampla sua atividade.

5. CONCLUSÃO

No presente estudo, obtiveram-se diferentes derivados vegetais das folhas de *L. lacunosa*, que demonstraram rendimento de 15,7% para o extrato etanólico, 2,5% para o extrato hexânico, 1,1% para o óleo essencial e 4,65% para a fração OEF33. A partir da análise do óleo essencial identificou-se 91,86% da sua composição química. Os monoterpenos são os componentes majoritários (71,08%), seguido dos sesquiterpenos (19,44%). Os componentes majoritários identificados por CG-EM do óleo essencial foram os monoterpenos mirceno (13,81%), linalol (6,84%) e mircenona (25,44%) e os sesquiterpenos elemol (7,30%) e espatulenol (3,11%), dentre outros. O óleo essencial foi fracionado, obtendo-se a fração OEF33, constituída por uma substância majoritária, ainda não identificada, e por mircenona, além de duas frações purificadas constituídas pelas substâncias de OEF33 separadamente.

Demonstramos ainda, que o extrato hexânico, óleo essencial e a fração OEF33, contendo as substâncias majoritárias do OE, apresentam atividades em modelos de dores nociceptiva e inflamatória e também em modelo de edema inflamatório. Este estudo é inédito e contribuiu com a investigação da espécie *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer como promissor fitoterápico ou fitofármaco para doenças da inflamação e dor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABENA, A. A.; DIATEWA, M.; GAKOSSO, G.; GBEASSOR, M.; HONDI-ASSAH, T.; & OUAMBA, J. M. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 3, p. 231-236, 2003.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. **4^a. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation**, 2007.

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C.; NASCIMENTO, S. C.; & SENA, K. X. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.

AHMED, F.; SELIM, M. S. T.; DAS, A. K.; CHOUDHURI, M. S. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia nodiflora* Linn. Die Pharmazie-An International **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 4, p. 329-330, 2004.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.

AL-SNAFI, A. E. & FARIS, A. N. Anti-inflammatory and antibacterial activities of *Lippia nodiflora* and its effect on blood clotting time. **J Thi Qar Sci**, Vol.4, n.1, pag. 25-30, 2013.

ARA, N.; NUR, H. In vitro antioxidant activity of methanolic leaves and flowers extracts of *Lippia alba*. **Research journal of medicine and medical sciences**, v. 4, n. 1, p. 107-110, 2009.

BARNES, P.J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 12, p. 436-41, 1993.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms and treatment. **Neurology**, v. 9, n. 8, p. 807-819, 2010.

BRANDÃO, Maria das Graças Lins. Plantas úteis nativas do Brasil na obra dos naturalistas. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 0-0, 2010.

BRANDÃO, M. G.; COSENZA, G. P.; GRAEL, C. F.; NETTO JUNIOR, N. L.; MONTE-MÓR, R. L. Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 478-487, 2009.

BRANDÃO, M. G.; PIGNAL, M.; ROMANIUC, S.; GRAEL, C. F.; FAGG, C. W. Useful Brazilian plants listed in the field books of the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire (1779–1853). **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 488-500, 2012.

BRANDÃO, M. G.; GRAEL, C. F.; FAGG, C. W. European naturalists and medicinal plants of Brazil. **Biological diversity and sustainable resources use**, v. 101, p. 120, 2011.

BROWER, V. New paths to pain relief. **Nat Biotech**, v. 18, p. 387-391, 2000.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1991.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MAVIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, A. T. F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, 148, 288–294, 2007.

CASTELLAR, A.; COELHO T. S.; SILVA, P. E. A.; RAMOS, D. F.; LOURENÇO M. C. S.; LAGE, C. L. S.; JULIÃO, L. S.; BARBOSA, Y. G.; LEITÃO, S. G.. The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.21, n.5, 2011.

CASTILHO, R. O.; BRAGA, F. C. **Farmacognosia: coletânea científica**. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. Ouro Preto: Editora UFOP, p.295-318, 2011.

CHAVAN M.J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa*. **Phitomedicine**, v.17, n.2, p.149-151, 2010.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). **Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia**: Saunders, 1999. Cap. 3, p. 50-88.

CROFFORD, L.J.; LIPSKY, P.E.; BROOKS, P.; ABRAMSON, S.B.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. **Arthritis Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 4-13, 2000.

DE LACORTE SINGULANI, J.; RAPOSO, N. R. B.; DE SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; & VICCINI, L. F. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 27, p. 4416-4422, 2012.

DE MORAIS, S. R.; OLIVEIRA, T. L. S.; DE OLIVEIRA, L. P.; TRESVENZOL, L. M. F.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; REZENDE, M. H.; & DE PAULA, J. R. Essential oil composition, antimicrobial and pharmacological activities of *Lippia sidoides* Cham (Verbenaceae) from São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 262, 2016.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacology Association**. v. 46, n. 3, p. 208-9, 1957.

ECHTERNACHT, L.; TROVÓ, M.; OLIVEIRA, C. T.; PIRANI, J. R. Areas of endemism in the Espinhaço range in Minas Gerais, Brazil. Flora-Morphology, Distribution, **Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 9, p. 782-791, 2011.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; MOREIRA, J. D. R.; BOUZADA, M. L. M.; & SCIO, E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 7-8, p. 840-846, 2011.

FARMACOPEIA Brasileira 1^a Ed., São Paulo: Nacional; 1929.

FARMACOPEIA Brasileira 5^a Ed. São Paulo: Atheneu; 2010.

FERNANDES, E. S. ; PASSOS, G. F. ; MEDEIROS, R.; da CUNHA, F. M. ; FERREIRA, J. ; CAMPOS, M. M. ; PIANOWSKI, L. F. ; CALIXTO, J. B.. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)- trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*, **European Journal of Pharmacology**, Vol.569(3), pp.228-236, 2007.

FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 28, p. 16737-16740, 1990.

FUNARI, C. S.; GULLO, F. P.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R. L.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; & SILVA, D. H. S. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 2086-2094, 2012.

FURST, D.E.; ULRICH, R.W. Fármacos anti-inflamatórios não esteroides, fármacos anti-reumáticos modificadores da doença, analgésicos não-opioides e fármacos usados no tratamento da gota. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. Cap. 36, p. 515-538

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOMIDE, M.S.; LEMOS, F.O.; LOPES, M.T.P.; ALVES, T.M.A.; VICCINI, L.F.; COELHO, C.M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Revista Brasileira Farmacognosia** . v. 23, n. 6, p. 895-902, 2013.

GOMIDE, M.; LEMOS, F.; REIS, D.; JOSÉ, G.; LOPES, M.; MACHADO, M.A.; ALVES, T.; COELHO, C.M. Identification of dysregulated microRNA expression and their potential role in the antiproliferative effect of the essential oils from four different *Lippia* species against the CT26.WT colon tumor cell line. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v. 26, n. 5, p. 627-633, 2016.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & behavior**. V.47, n.5, p.963-991, 1990.

GREGORY, N.; HARRIS, A. L.; ROBINSON, C. R.; DOUGHERTY, P. M.; FUCHS, P. N. SLUKA, K. A. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain**. v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

GROSSER, T.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G.A. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios; farmacoterapia da gota. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLMANN, B.C. (Eds.). Goodman & Gilman - **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. Cap. 34, p. 959-1003.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; & FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

GUIMARÃES, A. G.; XAVIER, M. A.; DE SANTANA, M. T.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, C. A.; BRITO, F. A.; & QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 385, n. 3, p. 253-263, 2012. A

GUIMARAES, A. G.; GOMES, S. V.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F.; & JÚNIOR, L. J. Q. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of natural medicines**, v. 66, n. 3, p. 428-434, 2012. B

HALDAR, S.; KAR, B., DOLAI, N.; KUMAR, R. S.; BEHERA, B.; & HALDAR, P. K. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S667-S670, 2012.

HARDEN, N.; COHEN, M. Unmet needs in the management of neuropathic pain. **Journal Pain Symptom Manage**, v.25, n. 5, p.S12-S17, 2003.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., p. 586-587, 2001.

HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**. v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. Thin-Layer Chromatography, **Reagents and Detection Methods**. Vol.1a, VCH-Verlag, Weinheim, 1990.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JURENKA, J.S.; Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review**, v.14, n. 2, 2009.

KAKUYAMA, M. & FUKUDA, K. The role of antidepressants in the treatment of chronic pain. **Pain Reviews**, v. 7, p. 119-129, 2000.

KAWAMORI T., LUBET R., STEELE V.E., Chemopreventative effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. **Cancer Research**, 59: 597-601, 1999

KIM, P.K.; DEUTSCHMAN, C.S. Inflammatory responses and mediators. **Surgical Clinics of North America**, v. 80, n. 3, p. 885-894, 2000.

KOTAS, M.E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KUNLE, O.; OKOGUN, J.; EGAMANA, E.; EMOJEVWE, E.; & SHOK, M.. Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. **Phytomedicine**, v. 10, n. 1, p. 59-61, 2003.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN S.W., Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews** 53: 597–652, 2001.

LEITÃO, S. G.; CASTRO, O.; FONSECA, E. N.; JULIÃO, L. S.; TAVARES, E. S.; LEO, R. R. T.; VIEIRA, R. C.; OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; MARTINO

V.; SULSEN, V.; BARBOSA, Y. A. G.; PINHEIRO, D. P.G.; DA SILVA, P. E. A.; TEIXEIRA, D. F.; JUNIO, I. N.; LOURENÇO, M. C. S. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.16, n.1, 2006.

LEITÃO, S. G., OLIVEIRA, D.R., SÜLSEN, V., MARTINO, V., BARBOSA, Y, BIZZO, H. R.; LOPES, D.; VICCINI, L. F.; SALIMENA, F.R.G.; PEIXOTO, P.H.P.; LEITÃO, G. G.. Analysis of the Chemical Composition of the Essential Oils Extracted from *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer and *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) by Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.19, n.7, p.1388-1393, 2008.

LEMONICA, Lino. Bases farmacológicas para uso clínico de opioides. **Prática Hospitalar**, n. 56, p. 129-135, 2008.

LEYVA-LÓPEZ, N.; NAIR, V.; BANG, W. Y.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; & HEREDIA, J. B. Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 187, p. 302-312, 2016.

LIN, L.; MUKHOPADHYAY, S.; HARNLY, R. J. M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 20, n. 5, pag. 361-369, 2007.

LOBO, P. L. D.; MARQUES, L. A. R. V.; GURGEL, M. F.; SOARES, J. L.; DA CRUZ FONSECA, S. G.; & DE MORAES, M. E. A. Atividade Farmacológica do Óleo Essencial de *Lippia sidoides* em Odontologia: Uma Revisão de Literatura. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 373-378, 2015.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOESER J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p.473-477, 2008.

LOH, H. H.; TSENG, L. F.; WEI, E.; LI, C. H. β -Endorphin is a potent analgesic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 73, n. 8, p. 2895-2898, 1976.

MABRY, T. J.; MARKHAM K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 354p., 1970.

MARCIAL, G.; SENDKER, J.; BRANDT, S.; DE LAMPASONA, M. P.; CATALÁN, C. A.; DE VALDEZ, G. F.; & HENSEL, A. Gastroprotection as an example: Antiadhesion against *Helicobacter pylori*, anti-inflammatory and antioxidant activities of aqueous extracts from the aerial parts of *Lippia integrifolia* Hieron. **Journal of ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1125-1133, 2014.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M ; CALIXTO, J. B.. 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**, Vol.151(5), pp.618-627, July 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MEIRA, M. R.; MARTINS, E. R.; RESENDE, L. V.. Ecogeografia de *Lippia rotundifolia* Cham. (Verbenaceae) em Minas Gerais, Brasil. **Ciencia Rural**, vol.47, n.8, e20160921. Epub June 22, 2017. ISSN 1678-4596, 2017.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; & THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MERSKEY H.; BOGDUK N. Classification of chronic pain: Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. In: MERSKEY, H.; BOGDUK, N (Eds.). **Classification of Chronic Pain**. Seattle, WA: IASP Press, p.180-181,1994.

MONTEIRO, M. V. B.; DE MELO LEITE, A. K. R.; BERTINI, L. M.; DE MORAIS, S. M.; & NUNES-PINHEIRO, D. C. S. (2007). Topical anti-inflammatory,

gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378-382, 2007.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MÜGGE, F. L.; DE PAULA-SOUZA, J.; MELO, J. C.; BRANDÃO, M. D. G. L. Native plant species with economic value from Minas Gerais and Goiás: a discussion on the currentness of the data recovered by the French naturalist Auguste de Saint-Hilaire. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 455-462, 2016.

NAGASAKO, E.M.; OAKLANDER, A. L.; DWORKIN, R. H. Congenital insensitivity to pain: an update. **Pain**, v. 101, n. 3, p. 213-219, 2003.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Estudos etnofarmacológicos de *Lippia organoides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.24, n.2, 2014.

PASCUAL, E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; & VILLAR, Á. Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **II Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 501-504, 2001.

PASCUAL, M. E., SLOWING, K., CARRETERO, E., SÁNCHEZ, D. M., & VILLAR, A.. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology. A review. **Journal of Ethnopharmacology**, 76, 201–214, 2001.

PASSOS, G.; FERNANDES, E. S.; Da CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B.. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.110(2), pp.323-333, 2007.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P.S.; CHESSA, M.L ; MORETTI, M.D.L.; SERRA G.; PIPPIA, P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **Revista Europeia de Farmacologia** v. 460, ed. 1, p. 37-41, 2003.

PÉREZ, S.; MECKES, M.; PÉREZ, C.; SUSUNAGA, A.; & ZAVALA, M. A. Anti-inflammatory activity of *Lippia dulcis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 1-4, 2005.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

RAI, M.; INGLE, A.; PANDIT R.; PARALIKAR, P. REHMAN. F.; ANASANE, N.; INGLE, P.; BUXY, S. Curcuma longa L.: From Ethnomedicinal to Novel Biomedical Applications. **Ethnobotany of Medicinal Plants**, cap 8, 2018.

RAMSEWAK, R. S.; DEWITT, D. L.; NAIR, M. G. Cytotoxicity, antioxidant and anti inflammatory activities of curcumins I–III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, v.7, ed.4, p. 303-308, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. Fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. 6ª Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 14, p. 226-247, 2007.

RAO, V.S.N.; MENEZES, A.M.S.; VIANA, G.S.B. Effect of myrcene on nociception in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42 , ed. 12, p.877-878,1990.

RAPINI, A.; RIBEIRO, P.L.; LAMBERT, S.; PIRANI, J.R. A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. **Megadiversidade**, v.4: n. 1-2, p.15-23, 2008.

RIBEIRO, F.V.; BARRELLA, G.E.; CASARIN, R.C.V.; CIRANO, F.R.; FOGGIO, M. A.; PIMENTEL, S.P. Effect of crude extract and essential oil of *Cordia verbenacea* in experimental periodontitis in rats **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 11, n.01, 2012.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; & THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

ROGERIO, A.P.; ANDRADE, E.L.; LEITE, D.F.P.; FIGUEIREDO, C. P.; CALIXTO, J. B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. **British journal of Pharmacology**, vol 158, n. 4, 2009.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Modification of the antinociceptive effect of morphine by acute and chronic administration of clomipramine in mice. **Pain**. v. 33, n. 3, p. 349-355, 1988.

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. *Lippia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15171>>. Acesso em: 25 Fev. 2018.

SALIMENA, F. R. & SILVA, T. R. S.. Verbenaceae da Serra do Cipo', Minas Gerais, Brasil. M.Sc. Thesis. Universidade de Sao Paulo. 1991.

SALIMENA, F.R.G. & SILVA, T.R.S. Flora de GrãoMogol, Minas Gerais: Verbenaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 27: p.119-126, 2009.

SALIMENA, R. G. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**. 24(1): 232-234. 2010.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SATOH, M.; MINAMI, M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 68, n. 3, p. 343-364, 1995.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, *suppl.*, p. 1062-1067, 2002.

SHARMA, S. S.; GUPTA, Y. K. Drug development from natural resource: a systematic approach. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 52–57, 2015.

SILVA, R. F.; REZENDE, C. M., SANTANA, H. C. D., VIEIRA, R. F.; ALVES R. B. N.; ALVIANO, C. S.; SANTOS, M. C. S. BIZZO, H. R. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Leaves and Flowers of *Lippia stachyoides* var. *martiana* (Verbenaceae). **The Natural Products Journal**, v. 4, n. 4, p. 241-247, 2014.

SILVA, P. S., VICCINI, L. F.; SINGULANI, J. L.; DE SIQUEIRA, E. P.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 20, no. 6, pp. 312–319, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora: Artmed, 2017.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Editora UFRS/UFSC, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia**. Porto Alegre: UFRGS, p. 387-415, 2000.

SINGULANI, JL, SILVA, PS, RAPOSO, NRB, SIQUEIRA, EP, ZANI, CL, ALVES, TMA, VICCINI, LF. Chemical composition and antioxidant activity of *Lippia* species. **Journal Medicinal Plants Research**. V.6, n.27, p.4416-4422, 2012.

SMITH, B.H.; TORRANCE, M. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. **Curr Pain Headache Rep**, v. 16, n. 3, p. 191-198, 2012.

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

SORO, L. C.; MUNIER, S.; PELISSIER, Y.; GROSMIRE, L.; YADA, R.; KITTS, D.; & ROBINSON, J. C. Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 587-594, 2016.

SOUZA, D. S.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; MARCELO, N. A.; AZEVEDO, I. L.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S.. Antimicrobial activity of *Lippia origanoides* and *Lippia rotundifolia* oils against enterobacteria isolated from poultry. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.3, p.940-944, 2015.

SOUZA, M.C.; SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-DE-LIMA, O.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**, v. 58, n. 8, p. 582-586, 2003.

TOMINAGA, M. The Role of TRP Channels in Thermosensation. In: LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. **TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades**. Boca Raton: Taylor & Francis, Cap. 20, 2007.

VAN DER VELDEN, V.H. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. 4, p. 229-237, 1998.

J. R. VANE Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. **Nature New Biology**. Vol. 231, pag. 232–235, 1971.

VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 278, n. 1, p. 304-312, 1996.

VENÂNCIO, A. M.; MARCHIORO, M.; ESTAVAM, C. S.; MELO, M. S.; SANTANA, M. T.; ONOFRE, A. S. C.; GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, M. G. B.; ALVES, P. B.; PIMENTEL, H. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. *Ocimum basilicum* leaf essential oil and (-)-linalool reduce orofacial nociception in rodents: a behavioral and electrophysiological approach. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.21, n.6, 2011.

VIANA, G. S.B.; VALE, T. G.; RAO, V.S.N.; MATOS, F.J.A. Analgesic and antiinflammatory effects of two chemotypes of *Lippia alba*: a comparative study. **Pharmaceutical Biology**, 36:5, 347-351, 1998.

VICCINI, L. F.; PIERRE, P. M. O.; PRAÇA, M. M.; DA COSTA, D. S.; DA COSTA ROMANEL, E.; DE SOUSA, S. M.; & SALIMENA, F. G. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, n. 1-4, p. 171-178, 2005.

VILJOEN, A. M.; SUBRAMONEY, S.; van VUUREN, S. F.; BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.271–277, 2005.

WOOLF, C.J. Neurobiological Disease. **Pain**, v.7, n.5, p.504-510, 2000.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic treatment. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

XIE, W.L.; CHIPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L.; ERIKSON, R.L.; SIMMONS, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 7, p. 2692-2696, 1991.

YAKSH, T.L.; WALLACE, M.S. Opioides, analgesia e tratamento da dor. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLMANN, B.C. (Eds.). Goodman & Gilman - **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12a ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, Cap. 18, p. 481-525, 2012.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.