



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



DÉBORA MARIA MARCHESINE DE ALMEIDA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
bromelyana* MOLDENKE (VERBENACEAE) EM
CAMUNDONGOS**

Feira de Santana, BA

2017

DÉBORA MARIA MARCHESINE DE ALMEIDA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTINOCICEPTIVO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
bromelyana* MOLDENKE (VERBENACEAE) EM
CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Lucchese

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Lopes da Rocha

Feira de Santana, BA

2017

A todos que tornaram esse trabalho possível, dedico.

AGRADECIMENTOS

Todas as letras de todos os alfabetos de todos os idiomas não seriam suficientes para que eu possa exprimir o tamanho de minha gratidão.

Em primeiro lugar devo agradecer a causa primária da existência ou manifestação divina por me presentear com a vida...

Muitíssimo obrigada aos meus amados pais *Elvira* e *Wilson*, por me trazerem à vida, por se dedicarem a tornar meus estudos possíveis, pelo amor, educação e todos os esforços que tiveram comigo,

Às minhas irmãs *Raquel* e *Verônica*, que tanto amo, pelo apoio em todos os sentidos e amor fraterno que nos une e nos sustenta,

À *Samille*, minha prima-irmã do coração pelo companheirismo e palavras de incentivo nas horas complicadas,

Agradeço a *Prof.^a Angélica Lucchese* por ter aceitado ser minha orientadora, possibilitando a realização do sonho do mestrado,

À minha orientadora mãe, *Prof.^a Marilene Rocha*, que sempre me apoiou e incentivou, além de abrir as portas da ciência para mim,

Ao professor *Lenaldo Muniz* pela colaboração,

Aos funcionários do Biotério da UEFS, especialmente Júnior e Beth que se tornaram queridos amigos,

Aos demais funcionários da UEFS, *Helton* da secretaria do PPGBiotech,

Aos queridos estagiários e futuros biólogos *Alanna* e *John*, que muito ajudaram desempenhando um papel fundamental neste trabalho,

À querida estagiaria de Quimica, *Adriane*, por ter me ensinado a extrair os óleos essenciais,

À *Serly* do LAPRON, pela ajuda fundamental com a cromatografia,

Aos colegas do LAPRON e do LAFAR que de uma forma ou de outra contribuíram para que esse trabalho fosse feito, especialmente às colegas *Amanda*, *Valéria*, *Sammya*, *Cris* e *Polly*,

A todos os colegas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia por compartilharem momentos únicos entre risos e angústia, e pela troca de experiências,

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela contribuição com o conhecimento na formação para obtenção deste título,

Às minhas queridas bimbinhas, *Aline*, *Addla* e *Lary* pelo apoio e ombro amigo de sempre,

À UEFS, por ser um segundo lar, onde muitas experiências marcantes ficarão na memória e por fornecer toda a estrutura necessária para a execução dos estudos,

À CAPES pelo financiamento dos estudos,

E finalmente, a todas as pessoas que estiveram ao meu lado ou contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho nesses dois anos!!!

Deixo aqui o meu MUITO OBRIGADA!!!

Gracias a La Vida

Violeta Parra

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me dio dos luceros que cuando los abro
Perfecto distingo lo negro del blanco
Y en el alto cielo su fondo estrellado
Y en las multitudes el hombre que yo amo

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado el oído que en todo su ancho
Graba noche y día grillos y canarios
Martillos, turbinas, ladridos, chubascos
Y la voz tan tierna de mi bien amado

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado el sonido y el abecedario
Con él, las palabras que pienso y declaro
Madre, amigo, hermano
Y luz alumbrando la ruta del alma del que estoy
amando

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado la marcha de mis pies cansados
Con ellos anduve ciudades y charcos
Playas y desiertos, montañas y llanos
Y la casa tuya, tu calle y tu patio

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me dio el corazón que agita su marco
Cuando miro el fruto del cerebro humano
Cuando miro el bueno tan lejos del malo
Cuando miro el fondo de tus ojos claros

Gracias a la vida que me ha dado tanto
Me ha dado la risa y me ha dado el llanto
Así yo distingo dicha de quebranto
Los dos materiales que forman mi canto
Y el canto de ustedes que es el mismo canto
Y el canto de todos que es mi propio canto

Graças à Vida

Graças à vida que me deu tanto
Me deu dois olhos que quando os abro
Distinguo perfeitamente o preto do branco
E no alto céu seu fundo estrelado
E nas multidões o homem que eu amo

Graças à vida que me deu tanto
Me deu o ouvido que em todo seu comprimento
Grava noite e dia grilos e canários
Martírios, turbinas, latidos, aguaceiros
E a voz tão terna de meu bem amado

Graças à vida que me deu tanto
Me deu o som e o abecedário
Com ele, as palavras que penso e declaro
Mãe, amigo, irmão
E luz iluminando a rota da alma do que estou
amando

Graças à vida que me deu tanto
Me deu a marcha de meus pés cansados
Com eles andei cidades e charcos
Praias e desertos, montanhas e planícies
E a casa sua, sua rua e seu pátio

Graças à vida que me deu tanto
Me deu o coração que agita seu marco
Quando olho o fruto do cérebro humano
Quando olho o bom tão longe do mal
Quando olho o fundo de seus olhos claros

Graças à vida que me deu tanto
Me deu o riso e me deu o pranto
Assim eu distingo fortuna de quebranto
Os dois materiais que formam meu canto
E o canto de vocês que é o mesmo canto
E o canto de todos que é meu próprio canto

RESUMO

Plantas aromáticas do gênero *Lippia* (Verbenaceae) são muito utilizadas pela medicina tradicional no tratamento de distúrbios relacionados ao sistema respiratório e a problemas gastrointestinais. Algumas espécies de *Lippia* podem ser encontradas na caatinga, localizado na região Nordeste do Brasil. Dentre essas espécies *Lippia bromelyana* Moldenke, é endêmica do estado da Bahia. Este trabalho procurou investigar a composição química, o efeito tóxico agudo, antinociceptivo e anti-inflamatório do óleo essencial das folhas de *L. bromelyana* (OELB) em camundongos. A composição química do OELB avaliada por CG/EM e CG/DIC, detectou limoneno (29,90%) e óxido de piperitenona (26,91%) como compostos majoritários. A administração intraperitoneal do OELB na dose 300 mg/kg não causou efeitos tóxicos agudos nem mortes nos camundongos. Nas doses 75, 150 ou 300 mg/kg OELB não causou alterações na atividade motora dos camundongos no teste do *rota-rod*, mas promoveu significativo efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, em ambas as fases do teste da formalina, nos testes de nocicepção induzida por glutamato ou cinamaldeído e no teste de Randall-Selitto. No teste da placa quente, OELB (150 ou 300 mg/kg) provocou o aumento na latência aos 30, 60 e 120 min após sua administração; na dose 300 mg/kg a ação do OELB revertida pela naloxona, sugere a participação da via opióide. Além disso, OELB (75, 150 ou 300 mg/kg) reduziu significativamente o efeito inflamatório da carragenina no teste de edema de pata. Esses resultados sugerem, portanto, que OELB promove ação antinociceptiva e anti-inflamatória por ação central e periférica.

Palavras-chave: *Lippia bromelyana*. Efeito antinociceptivo. Efeito anti-inflamatório. Toxicidade aguda. Limoneno. Óxido de piperitenona.

ABSTRACT

Aromatic plants of the genus *Lippia* (Verbenaceae) are widely used in traditional medicine. A number of *Lippia* species can be found in the Caatinga biome in Northeastern Brazil, such as *Lippia bromelyana* Moldenke, endemic to the state of Bahia. This study investigated the chemical composition, acute toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory effect of the leaf essential oil of *L. bromelyana* (EOLB) in mice. The chemical composition of EOLB, assessed by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS), detected limonene (29.90%) and piperitenone oxide (26.91%) as major compounds. Intraperitoneal administration of 300 mg/kg of EOLB caused no acute toxic effects or deaths in the mice. At doses of 75, 150 and 300 mg/kg caused no changes in their motor activity in the rotarod test, but promoted a significant antinociceptive effect on abdominal contortions in the acetic acid-induced constriction test, in both phases of the formalin test, glutamate or cinnamaldehyde-induced nociception tests and the Randall-Selitto test. In the hot plate test, EOLB (150 or 300 mg/kg) increased latency at 30, 60 and 120 min after administration; at a dose of 300 mg/kg, the action reversed by naloxone suggests participation of the opioid pathway. Moreover, EOLB (75, 150 or 300 mg/kg) significantly reduced the inflammatory effect of carrageenan in the paw edema test. Thus, these results suggest that EOLB promotes antinociceptive and anti-inflammatory activity by central and peripheral action.

Keywords: *Lippia bromelyana*. Antinociceptive effect. Anti-inflammatory effect. Acute toxicity. Limonene. Piperitenone oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhe da inflorescência (A), folha (B) e ramo de <i>Lippia bromleyana</i> Moldenke (C) cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, UEFS, Feira de Santana, Bahia. (OLIVEIRA, 2014)	40
Figura 2 - Mapa de ocorrência geográfica de <i>Lippia bromelyana</i> Moldenke no estado da Bahia, Brasil	41
Figura 3 - Detalhes da espécie <i>Lippia bromleyana</i> Moldenke: Ramo, flor, folha, bráctea, estames. Prancha: Carla Teixeira (OLIVEIRA, 2014).....	42
Figura 4 - Exsicata de <i>Lippia bromelyana</i>	43
Figura 5 - Hidrodestilação em aparelho de Clevenger	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do OELB (300 mg/kg, i.p.) no teste de toxicidade aguda em camundongos.....	58
Gráfico 2 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do rota-rod.	60
Gráfico 3 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	62
Gráfico 4 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos.	64
Gráfico 5 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos.	65
Gráfico 6 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 30 min após os tratamentos.	66
Gráfico 7 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 60 min após os tratamentos.	67
Gráfico 8 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 120 min após os tratamentos.	69
Gráfico 9 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste Randall-Selitto. ...	70
Gráfico 10 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato.	72
Gráfico 11 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do cinamaldeído	73
Gráfico 12 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do edema de pata induzido por carragenina	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Drogas derivadas de fontes naturais amplamente utilizadas pela medicina moderna	22
Tabela 2 - Número catalogado de espécies da flora brasileira	23
Tabela 3 - Óleos essenciais de plantas com atividade antinociceptiva (continua)....	26
Tabela 4 - Atividade e composição química do OE de espécies de <i>Lippia</i> (continua)	32
Tabela 5 - Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas de <i>Lippia bromelyana</i> (continua)	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de Variância

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

CG – Cromatografia Gasosa

CG/DIC – Cromatografia Gasosa Acoplada ao Detector de Ionização de Chamas

CG/EM – Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora

COX – Ciclooxigenase

e.g. – *exempli gratia*

e.p.m. – Erro padrão da média

et al. – E colaboradores

g – Grama

IL - Interleucina

i.p. – Intraperitoneal

i.pl. – Intraplantar

Kg – Quilograma

LAFAR – Laboratório de Farmacologia

LAPRON – Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos

MCP-1- *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (Proteína Quimioatrativa de Monócito-1)

mg – Miligramas

min- Minutos

ms⁻¹ – Milisegundo

n – Número de animais

NaCl – Cloreto de Sódio

NAL - Naloxona

nm – Nanômetro

NMDA – N-Metil-D-aspartato

nmol – Nanomol

°C – Graus Celsius

OE – Óleo essencial

OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico)

OELB – Óleo Essencial de *Lippia bromelyana*

OMS – Organização Mundial de Saúde

r.p.m. – Rotação por minuto

s - Segundos

s.c.- Subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF- β – *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Transformação do Crescimento Beta)

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

TRPA1 - *Transient Receptor Potential Ankyrin 1* (Receptor Potencial Transiente Anquirina 1)

Tween – Polioxetileno Sorbitano Monoleato

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

v.o. – Via oral

v/v – volume/volume

w/v – peso/volume

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

μ L – Microlitro

μ mol - Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 IMPORTÂNCIA DA BIODIVERSIDADE E DOS PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS	20
2.1.1 Biodiversidade no semiárido brasileiro: a caatinga como fonte de plantas medicinais	22
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS	24
2.3 TÓPICOS RELEVANTES SOBRE O GÊNERO <i>LIPPIA</i> (VERBENACEAE).....	27
2.3.1 Importância socio-econômica	30
2.3.2 <i>Lippia bromelyana</i>	39
3 METODOLOGIA	43
3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	43
3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	44
3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	45
3.4 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS.....	46
3.4.1 Animais de experimentação	46
3.4.2 Avaliação da toxicidade aguda	47
3.4.3 Teste para investigação da atividade motora na barra giratória (<i>rota- rod</i>)	48
3.5 TESTES FARMACOLÓGICOS ESPECÍFICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	48
3.5.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	49
3.5.2 Teste da Formalina	49
3.5.3 Teste da Placa Quente	50

3.5.4 Teste de Randall e Selitto	51
3.5.5 Teste de nocicepção induzida por glutamato	52
3.5.6 Teste de nocicepção induzida por cinamaldeído	52
3.5.7 Teste do edema de pata induzido por carragenina	53
3.5.8 Tratamento estatístico dos dados	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	55
4.2 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS.....	57
4.2.1 Avaliação da toxicidade aguda	57
4.2.2 Teste para investigação da atividade motora na barra giratória (<i>rotarod</i>)	59
4.2.3 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	61
4.2.4 Teste da Formalina.....	63
4.2.5 Teste da Placa Quente	66
4.2.6 Teste Randall-Selitto.....	69
4.2.7 Teste de nocicepção induzida por glutamato.....	71
4.2.8 Teste de nocicepção induzida por cinamaldeído	72
4.2.9 Teste do edema de pata induzido por carragenina	74
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
6 REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICE A - Perfil cromatografico dos óleos essenciais de <i>L. bromelyana</i> obtido por CG/DIC.....	92

1 INTRODUÇÃO

A grande biodiversidade da natureza tem sido fonte de riquezas incalculáveis para a humanidade ao longo de sua história. Os produtos naturais extraídos dessa imensa fonte têm sido utilizados com a finalidade medicinal pelo ser humano. Há milênios, a humanidade utiliza as plantas por meio do conhecimento empírico de certas propriedades medicinais para prevenir, tratar e curar diversas doenças. A partir do conhecimento popular sobre as propriedades das plantas medicinais, a ciência tem desenvolvido diversos medicamentos oriundos dos produtos naturais.

Muitas drogas amplamente utilizadas para o tratamento de doenças graves, derivam desses produtos: metformina (derivada de *Galega officinalis*) – utilizada para o tratamento da diabetes; digitoxina (proveniente de *Digitalis purpurea*) – empregada para tratar doenças cardiovasculares; atropina (extraída de *Atropa belladonna*) – usada no tratamento de desordens neurológicas (SHARMA; GUPTA, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da população do planeta, nos países em desenvolvimento, dependem essencialmente das plantas como a sua principal fonte de assistência médica (WHO, 1999). No Brasil, o uso de plantas como recurso terapêutico é bastante difundido tanto nas zonas rurais quanto nas áreas urbanas e em grande parte foi influenciado pela tradição popular das culturas indígenas nativas, africana, asiática e europeia (MACIEL et al., 2002; MARTINS et al., 2000; RATES, 2001).

No Nordeste brasileiro, por exemplo, são conhecidas muitas espécies de plantas medicinais da caatinga (bioma exclusivo do Brasil de clima semiárido), que são utilizadas na medicina popular e na fabricação de produtos fitoterápicos comerciais (ALBUQUERQUE et al., 2005). Dentre essas espécies, podemos citar as do gênero *Lippia* (Verbenaceae), muitas das quais são empregadas tradicionalmente no tratamento de diversas doenças, principalmente as relacionadas ao sistema respiratório e a problemas gastrointestinais (PASCUAL et. al., 2001).

Nas últimas décadas, houve relativo aumento no número de estudos investigando a composição química dos óleos essenciais e algumas propriedades

farmacológicas de certas espécies de *Lippia*, como por exemplo, atividade antimicrobiana, analgésica, sedativa e anti-inflamatória (GOMES, et al., 2011; GUILHON et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2012; HALDAR et al., 2012; MENDES et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; RIELLA et al., 2012).

Porém, mesmo a caatinga possuindo rica biodiversidade com elevado potencial biotecnológico e econômico, há, ainda, muitas espécies de plantas endêmicas pouco ou nunca estudadas cientificamente, desconhecendo-se por completo o grande potencial biológico e farmacológico destas. Além disso, o tratamento da dor constitui atualmente, um grande desafio para a medicina moderna, o que estimula busca pelo desenvolvimento de novas substâncias capazes de cessá-la, ou mesmo a descoberta de fármacos com eficácia semelhante, ou maior que aqueles usados na terapêutica atual, mas com menor incidência de efeitos colaterais (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006), sendo as plantas grandes alvos nessa procura.

Mesmo com o aumento no número de estudos referentes à fitoquímica e à atividade biológica de plantas do gênero *Lippia*, inexistem dados publicados na literatura descrevendo as propriedades farmacológicas para a espécie *Lippia bromelyana* Moldenke. Esta planta, endêmica do Brasil, ocorre na região do semiárido baiano (Morro do Chapéu) (SALIMENA; MULGURA, 2015a) e, portanto, constitui uma espécie promissora a ser estudada do ponto de vista fitoquímico e farmacológico.

Diante disso, a realização deste trabalho se justifica na necessidade de investigar as propriedades farmacológicas do óleo essencial desta planta no que se refere à analgesia, à atividade anti-inflamatória e seu efeito tóxico, com a finalidade de compreender qual mecanismo de ação pode estar envolvido no processo antinociceptivo, além da necessidade de caracterização da composição química do óleo essencial extraído das folhas, fornecendo dados importantes como ponto de partida para o isolamento de um princípio ativo com potencial biotecnológico e de interesse econômico.

Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a composição química e o potencial biológico do óleo essencial de *Lippia bromelyana* em

camundongos. Para isso, foi necessário, então, além de obter o óleo essencial das folhas de *L. bromelyana*:

- Analisar sua composição química do óleo essencial obtido;
- Investigar preliminarmente seus aspectos toxicológicos;
- Observar sua ação farmacológica sobre o Sistema Nervoso Central em camundongos;
- Avaliar sua potencial atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção em camundongos;
- Diagnosticar o possível mecanismo de ação envolvido na ação antinoceptiva em modelo animal e
- Contribuir para o estudo fitoquímico e farmacológico desta espécie.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 IMPORTÂNCIA DA BIODIVERSIDADE E DOS PRODUTOS NATURAIS NA DESCOBERTA DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS

Os produtos naturais e seus derivados ainda representam importante papel no processo de descoberta e de desenvolvimento de novos fármacos, pois a natureza continua influenciando o desenho de pequenas moléculas (NEWMAN; CRAGG, 2016). Destacam-se as plantas que produzem muitas substâncias derivadas do seu metabolismo que podem, além de serem utilizadas como alimentos, causar efeitos nos seres vivos. Além dos metabolitos primários, provenientes das vias primárias de síntese e modificação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, alguns organismos, inclusive algumas plantas sintetizam, sob condições especiais, compostos conhecidos como metabólitos secundários. Tais metabólitos são as principais fontes de produtos naturais farmacologicamente ativos (DEWIK, 2009), ou seja, são considerados compostos bioativos, isto é, que provocam efeitos farmacológicos ou toxicológicos nos animais ou no ser humano (SHARMA; GUPTA, 2015). Alguns exemplos de compostos bioativos produzidos pelas plantas são vitaminas, macromoléculas, glicosídeos, alcalóides, taninos, óleos essenciais, flavonoides, saponinas, fenóis, dentre outros (LEJA; CZACZYK; 2016).

É fato que o impacto dos produtos naturais no tratamento de uma série de doenças vem sendo documentado há muitos anos (DECORTE, 2016; NEWMAN; CRAGG, 2016), pois o interesse por esses produtos é decorrente da grande demanda populacional do planeta. Visto que, tanto em países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos, um grande número pessoas conta com produtos de plantas medicinais para prevenir ou tratar doenças, por exemplo (CALIXTO, 2005; SMITH-HALL; LARSEN; POULIOT, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) os sistemas de medicina tradicional se tornaram um tema de importância global, pois uma grande parcela (cerca de 80%) da população dos países em desenvolvimento depende

quase exclusivamente de plantas e da medicina tradicional para suprir as demandas primárias de cuidado com a saúde, mesmo que a medicina moderna esteja disponível nesses países (WHO, 1999, 2011). Ao mesmo tempo em que o uso de fitoterápicos por essas populações é mantido por razões históricas e culturais, as terapias alternativas ou complementares, inclusive o uso de ervas medicinais ganhou espaço também nos países desenvolvidos (WHO, 1999).

Entre as décadas de 1981 e 2014, o número calculado de pequenas moléculas aprovadas como medicamentos derivados de alguma fonte natural (drogas derivadas de plantas, derivados de produtos naturais ou produto natural não alterado) foi de aproximadamente 33% das novas drogas disponíveis (NEWMAN; CRAGG, 2016). Nesse patamar, as ervas medicinais desempenham um papel fundamental, pois a maior parte da terapia tradicional envolve o uso de plantas (HAWKINS, 2008) o que conduz ao interesse na bioprospecção de pequenas moléculas derivadas de plantas com atividade farmacológica.

Contudo, embora a biodiversidade seja uma fonte primordial de substâncias terapêuticas, a exploração inapropriada dos recursos naturais tem levado ao desaparecimento de muitas espécies. Na América Latina, um dos mais importantes e ricos centros de biodiversidade do planeta, por exemplo, os países não utilizam de forma adequada seus recursos naturais em benefício de seu próprio desenvolvimento (CALIXTO, 2005). Além disso, muitas plantas medicinais estão entrando em extinção devido a uma taxa de destruição sem precedentes (HAWKINS, 2008).

Estima-se que apenas 15% das 300.000 espécies de plantas que existem no mundo foram estudadas do ponto de vista farmacológico, e, por esse motivo, o desenvolvimento de novos produtos a partir de fontes naturais deve ser estimulado (PALHARES et al., 2015). Além disso, plantas que não foram ainda descritas ou estudadas podem se revelar como a fonte de cura para muitas doenças (HAWKINS, 2008). A medicina moderna, por sua vez, tem muitos de seus medicamentos alopatícos derivados de plantas medicinais. Um dos mais importantes opióides utilizados no tratamento da dor, a morfina, bem como a codeína, são extraídas da papoula (*Papaver somniferum*) e a aspirina do ácido salicílico, da casca do salgueiro (*Salix* spp.) são exemplos clássicos de drogas derivadas de plantas (HAWKINS,

2008; RISHTON, 2008). Na Tabela 1 estão elencados mais exemplos de drogas derivadas de produtos naturais.

Tabela 1 - Drogas derivadas de fontes naturais amplamente utilizadas pela medicina moderna

Droga	Fonte	Utilização
Metformina	<i>Galega officinalis</i>	Diabetes
Vincristina	<i>Vinca rosea</i>	Câncer
Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	Câncer
Acetildigoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Doenças cardiovasculares
Digitoxina	<i>Digitalis purpurea</i>	Doenças cardiovasculares
Berberina	<i>Berberis vulgaris</i>	Disenteria bacilar
Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Desordens neurológicas

Fonte: Adaptado de Sharma e Gupta (2015)

2.1.1 Biodiversidade no semiárido brasileiro: a caatinga como fonte de plantas medicinais

O maior patrimônio da biodiversidade genética de plantas do mundo está contido no Brasil, que conta atualmente com uma flora de mais de 46 mil espécies catalogadas (Tabela 2), incluindo fungos (FLORA DO BRASIL, 2016; MMA, 2016).

A região Nordeste brasileira abriga uma vasta área vegetacional conhecida como caatinga, um bioma exclusivo deste país, de aproximadamente 734.478 km² (GIULIETTI et al., 2004). Representa 60% do território nordestino que se estende até uma pequena parte da região sudeste do estado de Minas Gerais e é caracterizada por deficiência hídrica originada por baixas chuvas, evapotranspiração de alto potencial e distribuição irregular da precipitação (ALBUQUERQUE; ANDRADE; SILVA, 2005; SAMPAIO et al, 2003).

A diversidade da vegetação desse bioma é muito vasta, sendo reconhecidos 12 tipos diferentes de caatingas, o que, de certa maneira, está relacionado à farta diversidade de espécies de plantas, inclusive abrigando muitas espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2004). Contudo, a maioria das informações coletadas em estudos sobre a vegetação de Caatinga só se aplica a um pequeno número de áreas devido a grande dificuldade em formular generalizações sobre a dinâmica da vegetação desta região por causa da falta de replicação, que é comum para outros tipos de vegetação em todo o mundo (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Tabela 2 - Número catalogado de espécies da flora brasileira

	<i>Grupo</i>	<i>Nº de espécies</i>
Flora	Algas	4.751
	Briófitas	1.544
	Samambaias e licófitas	1.314
	Gimnospermas	30
	Angiospermas	33.001
	Fungos	5.726
	Total	46.366

Fonte: Sistema Flora do Brasil 2020

Por ser um bioma muito rico em espécies vegetais, a caatinga tem atraído notável interesse relativo às plantas medicinais dessa região, pois as comunidades locais utilizam muitas ervas medicinais de forma tradicional e na produção comercial de produtos fitoterápicos não oficiais (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO;

SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010), inclusive *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Amburana cearenses* (Arr. Cam.) A.C. Smith., *Erythrina velutina* Willd., *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul, e *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn (ALBUQUERQUE et al., 2007). Além dessas espécies, levantamentos etnofarmacológicos realizados por Albuquerque et al. (2007) e Cartaxo et al. (2010) baseados em fontes secundárias, apontaram por exemplo, *Amburana cearensis*, *Cereus jamacaru*, *Bauhinia cheilantha*, *Caesalpinia ferrea*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Capparis jacobinae*, *Operculina spp.*, *Cnidioscolus phyllacanthus*, *Ziziphus joazeiro* e *Sideroxylon obtusifolium* como espécies nativas promissoras em estudos fitoquímicos e farmacológicos juntamente com outras exóticas, tais como *Lippia alba*, *Carica papaya*, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus barabatus* e *Cymbopogon citratus*.

Em vista desses fatos, torna-se crucial o investimento em estudos fitoquímicos e farmacológicos das espécies nativas da caatinga, a fim de fortalecer o desenvolvimento científico e tecnológico nessa região, que fomentem as políticas de preservação e proteção dessas espécies e do conhecimento etnobotânico das comunidades locais. Garantindo assim, não somente o uso seguro das ervas medicinais como também o desenvolvimento econômico sustentável do semiárido brasileiro.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

Os óleos essenciais são líquidos voláteis oleosos extraídos de plantas aromáticas, como metabólitos secundários biossintetizados em diferentes órgãos como flores, frutas, casca, semente, madeira, rizoma e raízes (ASBAHANI et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Apresentam complexa mistura de compostos de baixo peso molecular (frequentemente menores que 500 daltons), principalmente terpenos, além de outros compostos não-terpênicos como fenilpropanóides (ASBAHANI et al., 2015; EDRIS, 2007; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). A sua composição química também depende de muitos fatores como a diversidade

genética, ecótipo ou variedade da planta, o modo de cultivo, uso de fertilizantes, a localização geográfica, clima, solo, variações sazonais e tipo de estresse ambiental ao qual a planta é submetida durante seu crescimento, além de fatores pós-colheita como secagem e armazenagem (DO et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Na indústria, os óleos essenciais são amplamente utilizados em cosméticos, perfumes e produtos de limpeza doméstica, bem como para aromatizar alimentos e bebidas (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; DO et al., 2015; EDRIS, 2007; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Entretanto, também apresentam propriedades medicinais diversas e são tradicionalmente utilizados no tratamento de infecções, como anti-inflamatórios, estimulantes ou relaxantes (FIRENZUOLI et al., 2014). Nos últimos anos, esses produtos naturais ganharam interesse em diferentes áreas, pois além de apresentarem características físico-químicas interessantes, com altos valores agregados respeitando o meio ambiente, têm demonstrado relevantes atividades biológicas como ação antimicrobiana (bactericidas, virucidas e fungicidas) (ASBAHANI et al., 2015), anticâncer, antidiabetes, antioxidantes, antiviral, anti-inflamatória, antiprotozoários e antinociceptiva (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; EDRIS, 2007; FIRENZUOLI et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SARMENTO-NETO et al., 2016).

O conceito de dor em si diz respeito a uma experiência sensorial complexa que envolve não apenas a transdução de estímulos ambientais nocivos, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro, enquanto o componente fisiológico que permite um indivíduo detectar e evitar estímulos potencialmente nocivos através de mecanismos de transdução de sinais é conhecido como nocicepção (JULIUS; BASBAUM, 2001). Um nociceptor é um receptor sensorial especializado presente nas terminações livres das fibras nervosas aferentes que irá responder a tais estímulos enviando os sinais nervosos para a medula espinhal e cérebro (BURGESS et al., 1967; FURST, 1999; MILLAN, 1999). Dessa forma, um efeito antinociceptivo está relacionado com a redução da sensibilidade algésica no interior dos neurônios quando a endorfina ou uma substância similar opióide se combina com um receptor (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Com relação à atividade antinociceptiva de produtos naturais, diversos estudos vêm salientando a eficácia dos óleos essenciais de diferentes plantas no tratamento da dor (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010; ANAYA-EUGÊNIO et al., 2016; DONALD; FERNANDES; BOYLAN, 2016; QUITANS et al., 2017; SARMENTO-NETO et al., 2016; SUN et al., 2016). A busca por novos compostos com propriedades analgésicas, mas com efeitos colaterais menos danosos do que os do mercado atual têm impulsionado muitas pesquisas, pois a medicina moderna enfrenta grandes desafios no que se refere ao tratamento da dor, principalmente a do tipo crônica (BORSOOK; KALSO, 2013). Nesse sentido, os óleos essenciais desempenham papel promissor como agentes antinociceptivos em modelos animais, sendo muitas vezes seu mecanismo de ação evidenciado, como pode ser verificado em alguns exemplos na tabela abaixo (Tabela 3). Esses estudos possibilitam melhor compreensão sobre os efeitos desses produtos naturais no organismo, direcionando as pesquisas para o desenvolvimento de candidatos a novos fitoterápicos.

Tabela 3 - Óleos essenciais de plantas com atividade antinociceptiva (continua)

<i>Espécie</i>	<i>Modelo Animal</i>	<i>Mecanismo de Ação</i>	<i>Referência</i>
<i>Citrus limon</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ teste da formalina/ placa quente	Central	Campêlo et al. (2011)
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ retirada da calda	Não informado	Gbenou et al. (2012)
<i>Hyptis fruticosa</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ formalina	Periférico/ central	Franco et al. (2011)

(continuação)

Espécie	Modelo Animal	Mecanismo de Ação	Referência
<i>Lippia gracilis</i>	Contorções induzidas por ácido acético	Periférico	Mendes et al. (2010)
<i>Ocimum basilicum</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ teste da formalina/ placa quente	Periférico/central (opióide)	Venâncio et al. (2010)
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	Contorções induzidas por ácido acético	Periférico	De Paula et al. (2012)
<i>Senecio rufinervis</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ placa quente	Periférico/ central	Mishra et al. (2010)
<i>Valeriana wallichii</i>	Contorções induzidas por ácido acético/ retirada da cauda	Periférico	Sah; Mathela; Chopra (2010)
<i>Zingiber officinale</i>	Contorções induzidas por ácido acético	Periférico	Jeena; Liju; Kuttan (2013)

Fonte: Adaptado de Sarmiento-Neto (2016)

2.3 TÓPICOS RELEVANTES SOBRE O GÊNERO *LIPPIA* (VERBENACEAE)

Verbenaceae J. St-Hil consiste numa família relativamente grande e de plantas economicamente importantes, pois muitas espécies são ornamentais, além de fornecer madeira, são muito utilizadas como especiarias (MARX et al., 2010). A família pode ser reconhecida por apresentar plantas de hábito arbustivo e herbáceo,

mas também podem ser árvores ou lianas com menos frequência (SALIMENA et al., 2013), e, em sua maioria são aromáticas (SALIMENA; FRANÇA; SILVA; 2009). As folhas e flores são opostas com simetria ligeiramente bilateral (zigomorfa) da corola; os frutos são carnosos ou secos, geralmente com 2 ou 4 sementes, muitas vezes dividindo-se em 2 ou 4 segmentos e os óvulos se encaixam diretamente nas margens dos falsos septos dos carpelos (O'LEARY et al., 2012).

Cerca de 36 gêneros e 1.000 espécies são conhecidas em Verbenaceae com distribuição nos trópicos, principalmente a região neotropical (ATKINS, 2004¹ *apud* SALIMENA; MULGURA, 2015b; SALIMENA et al., 2013; SOUZA; LORENZI, 2012), constituindo importante elemento da flora na América do Norte e do Sul (MARX et al., 2010). O Brasil é considerado o centro de maior diversidade da família, abrigando cerca de 16 gêneros e 286 espécies, sendo 187 endêmicas (SALIMENA et al., 2015) e 55 consideradas raras (SALIMENA; FRANÇA; SILVA; 2009).

Os principais gêneros de Verbenaceae que ocorrem no território brasileiro são *Lippia* L., *Stachytarphita* Vahl., *Verbena* L., *Lantana* L., *Citharexylum* L. e *Glandularia* J. F. Gmel, sendo os dois primeiros os que apresentam maior diversidade na flora do Brasil (SALIMENA et al., 2015) (*Lippia* contendo por volta de 82 espécies, destas 61 endêmicas; e *Stachytarphita* incluindo cerca de 79 espécies, com 73 endêmicas e 13 subespécies endêmicas) (SALIMENA; MULGURA, 2015c; SALIMENA, 2015). Outros gêneros que ocorrem no Brasil incluem *Aloysia* Juss., *Bailonia* Bocq., *Bouchea* Cham., *Cassaleia* Nees & Mat., *Petrea* L., *Phyla* Lour., *Pitraea* Tucz., *Priva* Adans, *Recordia* Moldenke e *Tamonea* Abl. (SALIMENA; MULGURA, 2015c).

O gênero *Lippia* está incluído na tribo *Lantanæ* Endl. e junto com *Lantana* representa aproximadamente 80% das espécies (MARX et al., 2010). Embora haja problemas taxonômicos entre *Lippia*, o gênero apresenta por volta de 150-200 espécies principalmente distribuídas geograficamente entre as regiões das Américas Central e do Sul, territórios tropicais da África, América do Norte e Austrália (ATKINS, 2004 *apud* SALIMENA; MULGURA, 2015a; GOMES et al., 2011; MUNIR,

² ATKINS, S. Verbenaceae. In J. W. Kadereit (ed.). The families and genera of flowering plants, vol. 7. Springer. Berlin, p. 449 – 468, 2004.

1993; PASCUAL et al., 2001; SOUZA; LORENZI, 2012; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996).

O Brasil é um dos maiores centros de diversidade de *Lippia*, estando as espécies distribuídas em todo território do país, ocorrendo principalmente nas áreas de vegetação campo-rupestre e cerrados, regiões de elevado endemismo (SALIMENA et al., 2013), inclusive a caatinga (SALIMENA et al., 2015c). O maior centro de diversidade do gênero no Brasil é a Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia) onde ocorre mais da metade das espécies, embora a urbanização e aumento da atividade agrícola tenham colocado muitas espécies sob ameaças de extinção (SALIMENA et al., 2013).

As espécies de *Lippia* podem aparecer como arbustos eretos ou subarbustos, com caule ramificado, arborizado, muitas vezes hirsuto ou tomentoso. As folhas são simples, opostas decussadas ou cruzadas, raramente alternas, decíduas, inteiras a dentadas ou lobadas, estipuladas, pecioladas ou sésseis, membranáceas a coriáceas, na maior parte penínérveas. A inflorescência é espiciforme ou capituliforme, solitária ou fasciculada nas axilas das folhas ou agregada em corimbo terminal ou panícula; picos pedunculados, na maioria contraídos em cabeças ou cilíndricos, às vezes alongados em frutos, densamente floridos. As brácteas são visíveis, não decíduas, decussadas ou muito classificadas como herbáceas, geralmente dobradas, por vezes côncavas ou planas, imbricadas, principalmente ovadas ou lanceolada. Com relação às flores, estas são pequenas, sésseis, suportadas individualmente nas axilas de brácteas, muitas vezes classificadas como tetrâmeras, com cálice persistente, membranáceo, gamossépalo, ovoide-campanulado ou comprimido, alado, induplicado, inconspícuo. A corola é gamopétala, hipcrateriforme ou infundibular, tetralobada, zigomorfa; tubo cilíndrico, reto ou curvo, ligeiramente exserido do cálice; lóbulos oblíquos, se espalhando, com 2 lábios, sendo o anterior mais largo que o posterior. Os estames são 4, didínamos, inseridos em torno do meio do tubo da corola, incluídos ou ligeiramente exseridos; as anteras são ovadas, não apontadas, as células paralelas. Os ovários são biloculares, cada lóculo com 1 óvulo; estilete frequentemente curto com estigma oblíquo ou sublateral. Os frutos são secos, ovoides, rodeados pelo cálice de

frutificação, algumas vezes agregados a ele, em 2 mericarpos ou “nutlets” na maturidade; pericarpo papiráceo ou duro. As sementes não apresentam endosperma (MUNIR, 1993).

2.3.1 Importância socio-econômica

Muitas espécies de *Lippia* são frequentemente utilizadas na medicina popular e na culinária (GOMES et al., 2011; JUDD et al., 2009; PASCUAL et al., 2001), além disso, algumas espécies têm sido utilizadas no reflorestamento de áreas degradadas pela mineração (GOMES et al., 2011). Por serem plantas aromáticas que produzem óleos essenciais, muitas espécies do gênero são de relevante interesse biotecnológico, visto que diversos compostos podem ser precursores de novos medicamentos fitoterápicos, que consistem em uma alternativa às drogas alopáticas convencionais, com a vantagem de produzirem menos efeitos colaterais.

A respeito disso, o uso medicinal de espécies de *Lippia* vem sendo investigado nas últimas décadas e corroborando as propriedades terapêuticas já difundidas pela medicina popular. Pascual et al. (2001) em uma revisão sobre o uso tradicional, farmacologia e composição química do gênero *Lippia*, constatou que a composição dos óleos essenciais têm sido minuciosamente estudada, sendo o perfil químico do gênero, bem como atividades farmacológicas e uso tradicional consistentes. Esses autores apontaram também o uso comum dessas espécies para o tratamento de doenças respiratórias (preparadas como decoto) e distúrbios gastrintestinais, dores de estômago e uso como carminativo (nestes casos são preparadas na forma de infusões e decocções), sendo utilizadas as partes aéreas, folhas ou flores e administradas oralmente.

Nas últimas décadas, o número de estudos realizados com os óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Lippia*, relacionados à composição química e suas atividades biológicas, tem crescido em diversas áreas do conhecimento, embora no que diz respeito à atividade analgésica/antinociceptiva e

anti-inflamatória, ainda existam poucos trabalhos. Além disso, a maioria dos estudos estão concentrados em poucas espécies (e.g. *L. alba*, *L. multiflora* e *L. sidoides*), o que denota a necessidade de maior investigação do potencial desse gênero, principalmente das espécies que ocorrem no Brasil (SILVA, 2012).

No prisma das espécies do gênero mais estudadas, *L. alba*, popularmente conhecida como “cidreira” no Brasil é, sem dúvidas, a que ocupa o primeiro lugar. Estudos etnofarmacológicos com essa espécie apontam o uso tradicional no tratamento de desordens diversas, desde resfriados a dores de estômago, bem como sedativa, anti-hipertensiva, analgésica, anti-inflamatória, digestiva e cicatrizante (FRANCO; BARROS, 2006; GAZZEANO; LUCENA; ALBUQUERQUE; 2005; HANNEBELLE et al., 2008; PASCUAL et al., 2001). Diante disso, pesquisas realizadas com o óleo essencial de *L. alba* têm comprovado o uso tradicional dessa espécie, como o efeito ansiolítico (HATANO et al., 2012), vasorrelaxante (MAYNARD et al., 2011), amebicida (SANTOS et al., 2015), antiespasmódica et al. (BLANCO et al., 2013), além de atividade antimicrobiana (JUIZ et al., 2015) e antifúngica (TOMAZONI et al., 2016), dentre outras como pode ser verificado na Tabela 4, que relaciona algumas espécies de *Lippia*, suas propriedades biológicas e a composição dos óleos essenciais.

L. sidoides ou “alecrim pimenta”, nativa da região semiárida do Nordeste brasileiro, é utilizada popularmente para tratar infecções na pele e nas mucosas (SOARES et al.; 2016; VERAS et al., 2013). Algumas dessas propriedades têm sido comprovadas cientificamente em estudos sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial desta espécie (FONTENELLE et al., 2007; FREIRES et al. 2015). Além disso, o óleo essencial dessa espécie apresenta atividade antiparasitária (BORGES et al., 2012; SANTOS et al., 2015; SOARES et al., 2017), antimalária (MOTA et al.; 2012), inseticida contra *Aedes aegypty* (DE LIMA, 2013), anti-inflamatória (MONTEIRO et al.; 2007; VERAS et al.; 2012) e gastroprotetora (MONTEIRO et al., 2007).

Outra espécie amplamente estudada, *L. gracilis*, comumente conhecida na região do semiárido nordestino como “alecrim-da-chapada”, “alecrim-da-serra”, é tradicionalmente utilizada na medicina popular para tratar não somente desordens

do trato respiratório tais como gripes, resfriados, tosse, congestão nasal, bronquites e sinusite, mas também dores de cabeça, icterícia e inclusive paralisia (ALBUQUERQUE et al., 2007, RIELLA et al., 2012). Além disso, essa espécie também é aplicada topicamente para tratar doenças cutâneas, feridas, úlceras e queimaduras (PASCUAL et al., 2001). O estudo realizado por Riella et al. (2012) comprovou que tais propriedades cicatrizantes de *L. gracilis*, podem estar relacionadas ao componente majoritário do óleo essencial, timol, que foi eficaz no processo de regeneração da pele lesionada em ratos. Estudos investigando a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante (GUILHON et al., 2011; MENDES et al., 2010) e antimicrobiana (BITU et al., 2014) do OE de *L. gracilis* corroboram a eficácia no uso medicinal dessa planta. Além disso, o OE dessa espécie possui propriedades amebicida (SANTOS et al., 2015), acaricida (COSTA-JUNIOR et al., 2016), antileishmania (MELO et al., 2013) e inseticida, contra larvas de *Aedes aegypty* (DIAS et al., 2015).

Tabela 4 - Atividade e composição química do OE de espécies de *Lippia* (continua)

<i>Espécie</i>	<i>Atividade</i>	<i>Principais compostos do OE</i>	<i>Referência</i>
<i>L. alba</i> (Mill.)N.E.Br.	Acaricida (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	carvona, limoneno e citral (geranial e neral)	Peixoto et al. (2017)
	Amebicida (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>)	limoneno e carvona	Santos et al. (2015)
	Anestésica	citral	Sousa et al. (2015)
	Ansiolítica	carvona, limoneno	Hatano et al. (2012)
	Antiespasmódica	quimiotipos citral e linalol	Blanco et al. (2013)

(continuação)

Espécie	Atividade	Principais compostos do OE	Referência
<i>L. alba</i> (Mill.)N.E.Br	Antimicrobiana (<i>P. gingivalis</i> / <i>B. fragilis</i> / <i>F. nucleatum</i> .)	citral, carvona, limoneno	Juiz et al. (2015)
	Tripanocida (<i>Leishmania chagasi</i> / <i>Trypanosoma cruzi</i>)	geranial, neral, geraniol, trans- β -caryophyllene 6-methyl-5-hepten-2-one, geranial, neral	Escobar et al. (2010)
	Vasorrelaxante	geranial, citral	Maynard et al. (2011)
<i>L. chevalieri</i> Moldenke.	Antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Enterococcus hirae</i> / <i>Candida albicans</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Folhas: β -cariofileno, elemol, oxido de cariofileno, germacreno D Flores: β -cariofileno, germacreno D, elemol, 1-8-cineol	Mevy et al. (2007)
<i>L. citriodora</i> Kunth.	Antibacteriana (MRSA <i>Staphylococcus aureus</i>)	Não informado	Ansari et al. (2012)
	Antimicrobiana (<i>Helicobacter pylori</i>)	Neral, limoneno, geranial, β -cariofileno, farneseno, germacreno D, trans- β -ocimeno, sabineno, 1,8-cineol	Ohno et al. (2003)
	Tripanocida (<i>Leishmania chagasi</i> / <i>Trypanosoma cruzi</i>)	geranial, neral, limoneno, nerol, 1,8-cineol e espatulenol	Escobar et al. (2010)

(continuação)

<i>Espécie</i>	<i>Atividade</i>	<i>Principais compostos do OE</i>	<i>Referência</i>
<i>L. dulcis</i> Trev.	Antiespasmódica	Cânfora, hernandulcina	Görnemann et al. (2008)
	Tripanocida (<i>Leishmania chagasi</i> / <i>Trypanosoma cruzi</i>)	trans- β -cariofileno, δ -cadineno, α -copaeno, α -bisabolol, biciclogermacreno	Escobar et al. (2010)
<i>L. gracilis</i> Schauer.	Acaricida (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	timol, carvacrol	Costa-Júnior et al. (2016)
	Amebicida (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>)	p-cimeno, γ -terpineno, carvacrol	Santos et al. (2015)
	Antifúngica (<i>Trichophyton rubrum</i>)/ Antileishmania (<i>Leishmania chagasi</i>)	Carvacrol, Timol, metil timol, β -cariofileno, p-cimeno, γ -terpineno	Melo et al. (2013)
	Antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Timol, carvacrol, p-cimeno, α -pineno	Bitu et al. (2014)
	Antinociceptiva/ anti-inflamatória	o-cimeno, γ -terpineno, 2-isopropil-5-metilansole, timol, carvacrol, β -cariofileno	Guilhon et al. (2011)
	Antinociceptiva/ anti-inflamatória/ antioxidante	Timol, p-cimeno, metil timol, γ -terpineno, β -cariofileno, carvacrol, 1,8-cineol, mirceno	Mendes et al. (2010)
	Inseticida/larvicida (<i>Aedes aegypti</i>)	1,8-cieneol, α -terpineol, β -pineno, terpinen-4-ol, γ -terpineno, <i>trans</i> -pinocarveol	Dias et al. (2015)

(continuação)

Espécie	Atividade	Principais compostos do OE	Referência
<i>L. grata</i> Schauer. (+ β -ciclodextrina)	Antinociceptiva	canfeno, cânfora, borneol, (E)-cariofileno, biciclogermacreno	Siqueira-Lima et al. (2014)
<i>L. graveolens</i> H. B. K	Acaricida (<i>Rhipicephalus microplus</i>)	timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno	Matinez-Velazquez et al. (2011)
	Antimicrobiana (<i>Bacillus subtilis</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Escherichia coli</i> / <i>Salmonella typhi</i>)/ espasmolítica	caracrol, óxido de cariofileno, β -cariofileno, p-cimeno, m-cimeno	Rivero-Cruz et al. (2011)
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron	Antifúngica (<i>Microsporum gypseum</i> / <i>Trichophyton mentagrophytes</i> / <i>T. rubrum</i> / repelente (<i>Triatoma infestans</i>))	borneol, lippifoli-1(6)-en-5-nona, α -pineno, terpinen-4-ol, canfeno, Δ^8 -Africaneno, limoneno, α -terpinil acetato	Lima et al. (2011)
	Antioxidante	β -Cariofileno, terpineno-4-ol, espatulenol, oxido de cariofileno, cis-sabineno hidrato, trans-davonona, β -bisaboleno, biciclogermacreno, p-cimeno	Barbieri et al. (2015)
<i>L. microphylla</i> Cham.	Antitumor	timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno	Xavier et al. (2015)
<i>L. multiflora</i> Moldenke.	Anti-inflamatória/ Antioxidante/ antiproliferativa	p-cimeno, β -cariofileno, timol, γ -terpineno, acetato de timila	Bayala et al. (2014)

(continuação)

Espécie	Atividade	Principais compostos do OE	Referência
<i>L. multiflora</i> Moldenke.	Anti-inflamatória	α -pineno, geraniol, eranial, timol, neral, α -terpineol, δ -terpineol, linalol, 1-8-cineol, (E)- β -farneseno, germacreno D, β -cariofileno, oxido de cariofileno	Soro et al. (2016)
<i>L. origanoides</i> Kunth.	Antimicrobiana (<i>Candida albicans</i> / <i>Candida parapsilosis</i> / <i>Candida guilliermondii</i> / <i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>Trichophyton rubrum</i> / <i>Fonsecaea pedrosoi</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> / <i>Lactobacillus casei</i> / <i>Streptococcus mutans</i>)	carvacrol, timol, p-cimeno, γ -terpineno	Oliveira et al. (2006)
	Antioxidante	carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno, linalol, β -cariofileno, Bicyclogermacreno	Teles et al. (2014)
	Tripanocida (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	timol, carvacrol, γ -terpineno, (E)-cariofileno, mirceno	Borges et al. (2012)
<i>L. pedunculosa</i> Hayek.	Amebicida (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>)	limoneno, rotundifolona	Santos et al. (2015)
	Larvicida/ repelente	óxido de piperitenona, limoneno	Nascimento et al. (2016)

(continuação)

Espécie	Atividade	Principais compostos do OE	Referência
<i>L. pedunculosa</i> Hayek.	Larvicida/ repelente (<i>Aedes aegypti</i> L.)	óxido de piperitenona, limoneno	Nascimento et al. (2016)
	Tripanocida (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	limoneno, rotundifolona	Menezes et al. (2014)
<i>L. sidoides</i> Cham.	Amebicida (<i>Acanthamoeba polyphaga</i>)	Carvacrol, p-cimeno, γ-terpineno	Santos et al. (2015)
	Antifúngica (<i>Candida albicans</i> / <i>Candida tropicalis</i> / <i>Microsporum canis</i>)	Timol, E-cariofileno, p-cimeno	Fontenelle et al. (2007)
	Anti-inflamatória	Timol, p-cimeno, etilmetil carvacrol	Veras et al. (2012)
	Anti-inflamatória/gastroprotetora	Timol, E-cariofileno, p-cimeno, γ-terpineno	Monteiro et al. (2007)
	Antimalária (<i>Plasmodium falciparum</i> / <i>Plasmodium berghei</i>)	Timol, p-cimeno, timilmetil-eter	Mota et al. (2012)
	Antimicrobiana (<i>Streptococcus mutans</i> / <i>Candida albicans</i>)	Timol	Freires et al. (2015)
	Antiparasitária (<i>Anacanthorus spathulatu</i> / <i>Notozothecium janauachensis</i> / <i>Mymarothecium boegeri</i>)	Timol, p-cimeno, (E)-β-cariofileno, carvona, γ-terpineno	Soares et al. (2017)
	Inseticida (<i>Aedes aegypti</i> L.)	Timol, tans-cariofileno, p-cimeno, oxido de cariofileno	De Lima et al. (2013)
	Tripanocida (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Timol, (E)-cariofileno	Borges et al. (2012)

(continuação)

<i>Espécie</i>	<i>Atividade</i>	<i>Principais compostos do OE</i>	<i>Referência</i>
<i>L. thymoides</i> Mart. & Schauer.	Antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus/ Micrococcus luteus/ Candida albicans</i>)/ vasorrelaxante/ tocolítica	β -cariofileno, borneol, canfora, canfeno, germacreno D	Silva et al. (2015)
<i>L. turbinata</i> Griseb.	Antioxidante	Limoneno, óxido de piperitenona, oxido de cariofileno, β -cariofileno	Barbieri et al. (2015)

Fonte: Levantamento da pesquisa (2017)

Levando em consideração os estudos relativos à fitoquímica das espécies de *Lippia*, a maioria está concentrada na química dos constituintes voláteis, limitando em parte as informações sobre os compostos não voláteis (CATALAN; DE LAMPASONA², 2012 *apud* OMBITO et al., 2014). A composição química dos óleos essenciais de espécies do gênero tem sido diagnosticada pelo método de cromatografia gasosa (CG) e identificado principalmente limoneno, β -cariofileno, p-cimeno, cânfora, linalol, α -pineno e timol (PASCUAL et al., 2001; TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996). Outras substâncias como os terpenos γ -terpineno e carvacrol também têm sido encontradas no óleo essencial de algumas espécies de *Lippia* (BAYALA et al., 2014; BITU et al., 2014; BORGES et al., 2012; COSTA-JÚNIOR et al. 2016; DIAS et al., 2015; GUILHON et al., 2011; MATINEZ-VELAZQUEZ et al., 2011; MELO et al., 2013; MENDES et al., 2010; MONTEIRO et al., 2007; OLIVEIRA

² CATALAN, C.A.N., DE LAMPASONA, M.E.P. The chemistry of the genus *Lippia* (Verbenaceae). In: Kintzios, S.E. (ed.) *Oregano: The genera *Origanum* and *Lippia**. 1st ed. London: Taylor & Francis.2002.

et al., 2006; RIVERO-CRUZ et al., 2011; SANTOS et al., 2015; SOARES et al., 2017 TELES et al., 2014; XAVIER et al., 2014), como pode ser observado na Tabela 1.

De forma geral, o teor e a composição química do óleo essencial de diferentes espécies de *Lippia* variam em relação aos componentes majoritários, no entanto, de forma geral, estão presentes monoterpenos e sesquiterpenos (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013). Algumas espécies apresentam variedade intraespecífica na composição do óleo essencial, o que frequentemente as difere em diversos quimiotipos (PASCUAL et. al, 2001), como é o caso de *L. alba*, que apresenta vários quimiotipos como citral (geranial e neral), cânfora e linalol, por exemplo. Tal diversidade de substâncias presentes nos óleos essenciais de uma mesma espécie está diretamente relacionada a fatores ambientais, como origem geográfica, tipo de solo, temperatura, irrigação, etc. (LARIBI et al., 2013; MARCIAL et al., 2015).

2.3.2 *Lippia bromelyana*

Lippia bromelyana Moldenke (Figura 1) é uma planta endêmica do Brasil, ocorrendo na região do cerrado e da caatinga no estado da Bahia (Figura 2) (SALIMENA; MULGURA, 2015a). As principais características morfológicas (Figura 3) dessa espécie são: hábito arbustivo, com ramos eretos; folhas ovadas, opostas, craspedródomas, com limbo cartáceo, glabro, com base decorrente, ápice atenuado e margem crenada; as brácteas são verde-claras e elípticas; a inflorescência é do tipo racemosa e axilar; as flores apresentam pétalas lilases-claro, o perianto labiado com tricomas incano na face abaxial e glabro na face adaxial (OLIVEIRA, 2014).

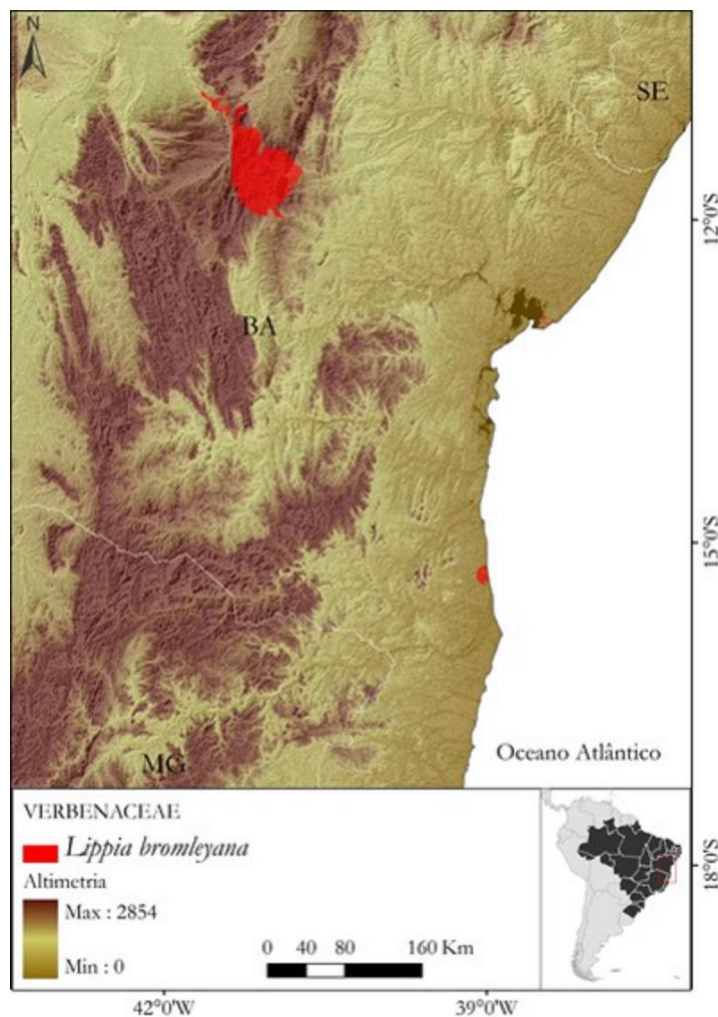
Figura 1 - Detalhe da inflorescência (A), folha (B) e ramo de *Lippia bromleyana* Moldenke (C) cultivada na Unidade Experimental Horto Florestal, UEFS, Feira de Santana, Bahia. (OLIVEIRA, 2014)



Fonte: Oliveira (2014)

De acordo com a Portaria do Ministério do Meio Ambiente Nº 433 de 17 de dezembro de 2014, *L. bromleyana* está incluída na "Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção" e classificada como uma espécie em perigo (BRASIL, 2014). Muito provavelmente esse fato decorre do desmatamento e da atividade mineradora na região, que conseqüentemente causam processos erosivos que conduzem à fragmentação do habitat dessa espécie (CNCFlora, 2012). Além disso, essa espécie apresenta raríssimos relatos na literatura (SALIMENA; MULGURA, 2015a; OLIVEIRA, 2014) além de ainda não ter sido estudada do ponto de vista farmacológico.

Figura 2 - Mapa de ocorrência geográfica de *Lippia bromleyana* Moldenke no estado da Bahia, Brasil



Fonte: CNCFlora (2012)

Esses fatos atestam a necessidade de estudos que conduzam à preservação e conservação da espécie em seu habitat bem como o desenvolvimento de estratégias de cultivo que possibilitem estudos fitoquímicos e farmacológicos com a finalidade de ressaltar ainda mais sua importância não apenas ecológica/biológica, mas também sócio-econômica, visto que a produção de metabólitos secundários por essa planta é um fator para a bioprospecção de novas substâncias de interesse biotecnológico.

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Exemplares de *L. bromelyana* foram coletados no campo experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana (12° 14' 21" S latitude e 38° 58' 46" W longitude) em junho de 2015, seguindo o método de herborização descrito por Mori et al. (1989). O espécime foi identificado pela Dra. Tânia Regina dos Santos Silva e a exsicata (Figura 4) depositada no herbário da UEFS, sob voucher nº 216826.

Figura 4 - Exsicata de *Lippia bromelyana* Moldenke



Fonte: Arquivo pessoal

3.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial das folhas de *L. bromelyana* (OELB) foi obtido por meio de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger (Figura 5) em triplicata. O material vegetal, após a coleta, foi secado à temperatura ambiente (24° C). Em seguida foi pesado e dividido em três partes iguais (com massa = 70 g cada). Cada parte foi submetida à trituração e em seguida, colocada em um balão contendo 1000 mL de água destilada no aparelho de Clevenger, durante 180 minutos contados a partir do início da destilação. Após a extração do óleo essencial, foi adicionado ao mesmo sulfato de sódio anidro para retirada da água residual e evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Em seguida, o óleo foi recolhido e acondicionado em recipientes de vidro escuro e pesados em balança de precisão. O cálculo do teor de óleo foi realizado utilizando-se a relação entre o volume de óleo coletado e a massa de material vegetal seco utilizada na extração (TELES et al., 2014).

Figura 5 - Hidrodestilação em aparelho de Clevenger



Fonte: Adaptado de Oliveira (2014).

Para a obtenção do teor de umidade residual presente nas folhas, aproximadamente 1 g do material vegetal foi analisado em triplicata em um

Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte® e o cálculo foi obtido de acordo com a seguinte fórmula (GOUVEA; FOLLETTO; BERRETA-HURTADO, 2013):

$$\% \text{ umidade} = \left[\frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \right] \times 100$$

3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

OELB foi analisado por cromatografia a gás com detecção por ionização de chama (CG/DIC) e por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), para determinar os constituintes, o número e a concentração destes. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com o banco de dados (NIST 21 e NIST107) do CG/EM, com padrões autênticos e através do cálculo do Índice de Kovat's (calculado pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos C8-C24) (ADAMS, 2007).

Nas análises por CG/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Varian® CP-3380, com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar DB -5 (30 m x 0,5 mm X 0,25 µm), temperatura do injetor de 220°C e do detector de 240°C, split 1:50, hélio como gás de arraste na vazão de 1 mL/min, com programa de temperatura do forno de: 60°C a 240°C (3°C/min), mantendo por 240°C durante 20 minutos.

As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar BPX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), temperatura do injetor 220°C, gás de arraste hélio na vazão de 1 mL/min, split 1:100, temperatura da interface de 240°C, temperatura da fonte de ionização de 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), mantendo a 240°C por 20 minutos.

Antes da injeção, 20 mg de cada amostra de óleo essencial foi dissolvida em 1 mL de diclorometano e 0,2 µL desta solução foi injetado. Após análises, um pool dos óleos essenciais foi compilado para testes subsequentes.

3.4 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS

3.4.1 Animais de experimentação

Para a realização dos testes farmacológicos *in vivo*, foram utilizados camundongos *Mus musculus* (LINNAEUS, 1758), machos e fêmeas, adultos, pesando entre 25 e 35 g, obtidos da colônia do Biotério Central da UEFS.

No biotério, os animais foram alojados em caixas de polipropileno completas com grade aramada em aço inoxidável, comedouro e encaixe para o bebedouro, nas dimensões 32 x 20 x 13 cm para camundongos, providas de cama de serragem selecionada. Os camundongos foram mantidos no sistema *Open Cage* – no qual as gaiolas ficam alocadas em estantes metálicas abertas, sendo o controle de temperatura, umidade e filtragem do ar feito em toda a sala (climatizada: temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) do ar em $50 \pm 10\%$) de manutenção do Biotério da UEFS. Nesta sala, foram armazenadas quatro gaiolas por prateleira, totalizando doze por estante. Cada gaiola foi trocada duas vezes por semana.

Os animais foram mantidos em fotoperíodo de 12h claro/12h escuro controlado por temporizador digital, sendo a fase clara iniciando às 06h e a escura às 18h, de acordo com os padrões recomendados para roedores (GHIRALDINI, 1995; MERUSSE; LAPICHICK, 1996). Até o momento da realização dos experimentos, os camundongos tiveram acesso a água e comida *ad libitum*.

As gaiolas com os animais foram, então, transferidas para a sala de experimentação, onde foram realizados os experimentos, com pelo menos uma hora de antecedência à execução dos mesmos, com a finalidade de reduzir o estresse e consequentes alterações comportamentais decorrentes da mudança de ambiente, bem como permitir uma adaptação à sala de experimentação, onde os experimentos foram realizados entre 08h e 12h ou 13h e 17h (período correspondente à fase clara). Antes de cada experimento, a bancada foi higienizada com etanol 70%. Os animais foram utilizados uma única vez e, em seguida, eutanasiados seguindo as normas do Biotério. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e

previamente aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA-UEFS, protocolo nº 02/2015).

3.4.2 Avaliação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda foi baseado no protocolo estabelecido pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD 420, 2001) e de acordo com Da Silva et al. (2015), com algumas adaptações. Os animais (camundongos fêmeas, n=5 por grupo) foram distribuídos em dois grupos e receberam OELB na dose fixa 300 mg/kg (em solução aquosa + 80 0,2% v/v) , via intraperitoneal (i.p.) ou veículo (salina + Tween 80 0,2% v/v, 0,1 mL/10 g, i.p. - grupo controle negativo). Os camundongos permaneceram em jejum durante a noite antecedente ao teste e 3h após as administrações.

Ao receberem os respectivos tratamentos, os animais foram observados durante um período de 24h (principalmente as quatro primeiras) para monitoramento de sinais comportamentais gerais (alterações nos pêlos, olhos, membranas mucosas, sistema respiratório, circulatório e digestivo; comportamento anormal, atividade anormal, atividade motora, tremores, convulsão, salivação, diarreia, letargia ou sonolência, dentre outros). Além disso, os animais permaneceram em observação durante quatorze dias consecutivos para verificar a possível ocorrência de mortes e a massa corporal foi monitorada no 1º (após a administração das substâncias), 7º e 14º dias. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e os órgãos (coração, pulmões, fígado, baço intestino, estômago e rins) foram excisados, pesados e analisados macroscopicamente a olho nu, a fim de observar algum sinal de patologia grosseiramente visível nos mesmos. Tal análise seguiu como parâmetro de comparação os órgãos dos camundongos do grupo controle.

3.4.3 Teste para investigação da atividade motora na barra giratória (*rota-rod*)

A fim de verificar o efeito do relaxamento muscular ou de alterações na coordenação motora produzidas pelo OELB, os animais foram submetidos ao teste proposto por Dunham e Miya (1957) no aparelho *rota-rod* (Insight Ltda., Brasil), Durante a execução deste teste, os animais foram colocados em um cilindro que gira a uma velocidade constante (*rota-rod*), a fim de verificar se são capazes de se equilibrarem sobre o mesmo (MATTEI; FRANCA, 2006).

Para evitar uma interpretação equivocada dos resultados devido a uma incapacidade natural dos animais em manter o equilíbrio e a movimentação na barra giratória, 24h antes da realização do teste foi feita uma pré-seleção dos animais (sem administração de substâncias), na qual foram considerados aptos a participarem aqueles animais que permaneceram na barra giratória (com velocidade de 7 r.p.m.) durante 180 segundos (s), em até três tentativas (BONJARDIN *et al.* 2011; CARLINI; BURGOS, 1979; DE SOUSA *et al.*, 2007; MENDES; MATTEI; CARLINI, 2002; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

No dia seguinte, os camundongos pré-selecionados foram divididos em cinco grupos (n=6-8 cada): controle negativo (salina + Tween 80 0,2% v/v 0,1 mL/10 g, i.p.), padrão (Diazepam - DZP, 5 mg/kg, i.p.) e experimentais (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) e, antes da realização do tratamento, foi realizada uma leitura basal, medindo-se o tempo de permanência no aparelho conforme descrito anteriormente. Após a administração dos respectivos tratamentos, os animais foram submetidos ao teste com registro do tempo (segundos) de permanência na barra giratória nos intervalos 0, 30, 60 e 120 minutos para o registro do tempo de permanência já mencionado.

3.5 TESTES FARMACOLÓGICOS ESPECÍFICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Os testes de avaliação da atividade antinociceptiva do óleo essencial de *L. bromelyana* seguiram o mesmo padrão de agrupamento, com os camundongos

(n=6-8 por grupo), distribuídos em: grupo controle negativo (veículo), grupo padrão (morfina ou indometacina, 10 mg/kg, i.p.) e grupos experimentais (OELB 75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.). Após trinta minutos da administração, os animais receberam os indutores químicos de nocicepção, dando início à observação para registro dos parâmetros específicos de cada metodologia.

3.5.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético consiste na indução de nocicepção pela injeção de um agente químico irritante na cavidade peritoneal levando a característicos movimentos de estiramento da região abdominal (contorções), seguidas de extensão dos membros posteriores (WHITTLE, 1964).

Neste teste, adaptado da metodologia descrita por Koster, Anderson e Debeer (1959), os animais foram randomicamente distribuídos nos grupos (n=8 cada) tratados com OELB, veículo ou indometacina (10 mg/kg, i.p.). Aos trinta minutos posteriormente a administração dos respectivos tratamentos, cada camundongo recebeu uma injeção de solução de ácido acético a 0,85% (0,1 mL/10 g, i.p.). Em seguida, logo após intervalo de cinco minutos, foram colocados em uma caixa de polipropileno sem maravalha e observados durante quinze minutos para registro (contagem) do número de contorções abdominais exibidas por cada indivíduo.

3.5.2 Teste da Formalina

O experimento foi adaptado da metodologia descrita por Hunskaar e Hole (1987), que consiste num modelo bifásico de avaliação para diversas classes de drogas analgésicas. Após os animais serem randomicamente distribuídos nos grupos (n=8 cada), receberam os respectivos tratamentos (OELB, veículo ou indometacina (10 mg/kg, i.p.)) e, depois de trinta minutos, foram administrados com uma injeção de 20 µL de formalina 2,5% (v/v) na região intraplantar (i.pl.) da pata traseira direita. Em seguida, os camundongos foram individualmente colocados numa caixa de observação triangular espelhada (25 x 25 x 25 cm) para registro do tempo (segundos) de lambida da pata durante cinco minutos (1ª fase, aguda), e

após um intervalo de dez minutos, esse mesmo parâmetro foi registrado durante quinze minutos (2ª fase, inflamatória) com o auxílio de um cronômetro digital.

3.5.3 Teste da Placa Quente

O teste da placa quente consiste no emprego de um estímulo térmico agudo constante e de alta intensidade sobre a pele capaz de sensibilizar as fibras sensoriais de elevado limiar, consistindo numa ferramenta útil para medir a resposta nociceptiva de ação central em camundongos (WOOLFE; MacDONALD, 1944; EDDY; LEIMBACH, 1953).

O procedimento foi realizado de acordo com o método adotado por Jacob e Ramabadrán (1978) com algumas alterações. Os animais foram colocados numa placa quente (Insight Ltda., Brasil) mantida a uma temperatura constante de 50 ± 1 °C (PIETROVSKI et al., 2006). A placa quente apresenta dispositivos que controlam automaticamente a temperatura e possui uma caixa de acrílico transparente, que mantém o animal sobre a placa durante o período de observação, sendo o registro do tempo de reação do animal ao estímulo térmico feito através de um cronômetro acoplado ao aparelho, que é acionado por meio de um pedal externo.

Para evitar possíveis erros de leitura decorrentes da inadaptação do animal à placa, os mesmos foram submetidos a uma triagem 24h antes da realização do experimento (sem administração de substância), onde a latência basal foi registrada usando o tempo de corte de dez segundos, e avaliada a sensibilidade ao estímulo térmico. Os camundongos que apresentaram um tempo de reação (definido como latência para levantar ou lambear as patas) maior que dez segundos foram excluídos.

No dia seguinte, os animais foram distribuídos nos grupos (n=6 cada) tratados com OELB, veículo ou morfina (10 mg/kg, i.p.) e, após 30, 60 e 120 minutos do tratamento inicial com as substâncias, foram colocados na placa (50 ± 1 °C) e expostos ao estímulo térmico e observados individualmente para o registro da latência obtida pelo tempo (segundos) decorrido entre a colocação dos mesmos na placa e a ocorrência de lambida das patas ou comportamento de pular, sendo o

tempo máximo de permanência na placa de trinta segundos, para evitar danos aos indivíduos (SILVA et al., 2005).

Além disso, para avaliar o possível envolvimento do sistema opióide na ação antinociceptiva produzida pelo OELB, outros grupos receberam naloxona (NAL) (1,5 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração de OELB 300 mg/kg, i.p ou de morfina (10 mg/kg, i.p.), e, após 30, 60 e 120 minutos, foram colocados na placa quente para registro dos mesmos parâmetros conforme descrito no parágrafo anterior.

3.5.4 Teste de Randall e Selitto

Seguindo uma adaptação do método de hipernocicepção descrito por Randall e Selitto (1957), os camundongos foram submetidos à hiperalgesia aplicando-se uma pressão (no máximo 500 g) crescente na pata direita traseira por meio de um aparelho analgesímetro (Insight Ltda, Brasil). Neste modelo de hiperalgesia, um agente flogístico é injetado na região intraplantar da pata traseira do animal, que causará um edema de pata. Após a formação do edema, o limiar de latência do reflexo de retirada da pata edemada, é, então, registrado a partir da pressão exercida sobre esta no analgesímetro.

Três dias antes da realização do experimento, os animais foram colocados uma única vez no analgesímetro, sem qualquer administração de substâncias, para adaptarem-se a este equipamento e evitar resultados falsos, em decorrência de naturalmente retirarem a pata antes mesmo de a pressão ser aplicada efetivamente. Após esse momento de adaptação, os camundongos foram randomicamente distribuídos nos diferentes grupos (n=8 cada) de tratamento: OELB, veículo e morfina (10 mg/kg, i.p.) e mantidos na sala de experimentos até a realização do teste.

No dia em que o experimento foi executado, os grupos receberam a administração das respectivas substâncias. Após trinta minutos, foi injetado o volume de 50 µL de λ-carragenina lambda (1% w/v, i.pl.) na pata traseira direita de cada animal para induzir a inflamação (edema). A dor induzida pela inflamação foi aferida pelo analgesímetro, pelo limiar nociceptivo (em gramas), que consiste na

força necessária a ser aplicada pelo aparelho na superfície dorsal da pata até que o animal vocalize ou retire.

3.5.5 Teste de nociceção induzida por glutamato

O teste realizado foi adaptado do método proposto por Beirith, Santos e Calixto (2002), no qual a injeção de glutamato na pata traseira do camundongo produz comportamento do tipo nociceptivo de início rápido e de curta duração. Este ensaio possibilita avaliar drogas capazes de agirem sobre o sistema glutamatérgico, o qual desempenha um papel significativo no processamento nociceptivo (FUNDYTUS, 2001).

Para a realização desse experimento, os camundongos distribuídos randomicamente nos grupos (n=8 cada) tratados com OELB, veículo ou morfina (10 mg/kg, i.p.) receberam, após trinta minutos da administração dos tratamentos, injeção no volume de 20 μ L (i.pl.) de glutamato (20 μ mol/pata, em solução salina) na pata direita traseira. Logo em seguida, os animais foram colocados numa caixa de observação triangular espelhada (25 x 25 x 25 cm) para a contagem do tempo (segundos) em que passaram lambendo a pata (indicativo de nociceção) durante quinze minutos.

3.5.6 Teste de nociceção induzida por cinamaldeído

Este teste permite verificar a ação de uma substância nos canais iônicos receptores de potencial transitório relacionados à proteína anquirina do tipo 1 (TRPA1), relacionados à nociceção provocada pelo frio nocivo, pois o cinamaldeído é a principal ativador desses canais (CORDOVA et al., 2011).

O procedimento foi realizado seguindo Cordova et al. (2011), com algumas adaptações. Os camundongos, trinta minutos após serem distribuídos aleatoriamente nos grupos (n=6-8 cada) e receberem a administração das respectivas substâncias, foram submetidos a uma injeção de cinamaldeído (10 nmol/pata, i.pl.) na pata direita traseira. Em seguida, os animais foram colocados

numa caixa de observação triangular espelhada (25 x 25 x 25 cm) para serem individualmente observados durante 5 minutos, nos quais foi contabilizado o tempo (segundos) em que passaram lambendo a pata, considerado como parâmetro de nocicepção.

3.5.7 Teste do edema de pata induzido por carragenina

O teste edema de pata induzido por carragenina é considerado importante meio de avaliação da atividade anti-inflamatória aguda de substâncias promissoras, pois permite verificar o quanto essa substância pode inibir os mediadores da inflamação aguda e da imunidade nata (HUSSAIN et al., 2015; LAAVOLA et al. 2016). O agente flogístico utilizado neste experimento é um polissacarídeo extraído das algas vermelhas e que pode ser fracionado em κ -Carragenina e λ -Carragenina, sendo esta última mais ativa e irritante para a indução de inflamação aguda e crônica (Di ROSA, 1972). Além disso, a carragenina é amplamente utilizada nos testes de atividade anti-inflamatória devido não ser muito antigênica, o que garante a ausência de efeitos secundários sistêmicos que poderiam resultar em falsos positivos (HUSSAIN et al., 2015).

Dessa forma, a atividade anti-inflamatória do OELB foi estudada seguindo o procedimento adotado por Winter, Risley e Nuss (1962) com poucas modificações. Posterior a formação aleatória dos grupos (n=8 cada), os camundongos foram tratados com OELB, indometacina (20 mg/kg, i.p.) ou veículo (i.p.). Após trinta minutos da administração dos respectivos tratamentos, foi injetado o volume 50 μ L de solução de λ -carragenina (2% w/v em salina, i.pl.) na pata direita traseira e 50 μ L de solução salina (NaCl 0,9%, i.pl.) na pata esquerda traseira dos camundongos. Em seguida, o edema foi medido em volume utilizando-se um pletismômetro de pata (Insight Ltda., Brasil) nos intervalos entre 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração da carragenina. O efeito anti-inflamatório do OELB foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Percentual de Inibição (\%)} = (C-D/C) \times 100,$$

onde D = diferença entre o volume das patas direita e esquerda após a administração de carragenina no grupo tratado com OELB; e C = diferença entre o volume das patas direita e esquerda após a administração de carragenina no grupo tratado com veículo.

3.5.8 Tratamento estatístico dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, e expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas pela aplicação de análise de variância (ANOVA - *one* ou *two –way*) seguido do teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$ (WINER et al., 1991).

O percentual de inibição por um agente antinociceptivo foi determinado pela seguinte fórmula, de acordo com Bonjardin et al. (2011):

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{\text{controle} - \text{experimental}}{\text{controle}} \right] \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O rendimento médio do OELB foi de $2,5 \pm 1,65\%$ (V/m) e o teor de umidade residual presente nas folhas foi de $15,05 \pm 0,28\%$. Foram identificados vinte e nove compostos (aproximadamente 90,19% da composição total dos óleos), sendo limoneno (29,89%), óxido de piperitenona (rotundifolona) (26,90%), β -bisaboleno (8,02%) γ -terpineno (3,52%), biciclogermacreno (2,9%) e p-cimeno (2,29%) os compostos principais (Tabela 5). A presença majoritária dos monoterpenos limoneno e óxido de piperitenona foi observada nos óleos essenciais de outras espécies de *Lippia*, como *L. turbinata* (BARBIERI et al., 2015). Em *L. alba* (SANTOS et al., 2016) e *L. pedunculosa* (MENEZES et al., 2014) limoneno também foi um dos compostos majoritários identificados.

Além disso, este monoterpeno foi identificado ainda em *L. thymoides* (SILVA et al., 2015) e *L. sidoides* (MORAIS et al., 2016). A análise do óleo essencial de *L. pedunculosa* (MENEZES et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016; SANTOS et al., 2016) revelou óxido de piperitenona (rotundifolona) como um dos compostos majoritários desta espécie apresentando importante similaridade com os resultados aqui apresentados. Adicionalmente, a composição química do OELB está de acordo com dados da literatura que reportam espécies de *Lippia* exibindo em suas composições alguns terpenos identificados na referida espécie, como p-cimeno e γ -terpineno em *L. organoides* (OLIVEIRA et al.; 2007; TELES et al.; 2014), *L. sidoides* (FONTENELLE et al., 2007; LIMA et al., 2013; VERAS et al., 2013), *L. microphylla* (XAVIER et al., 2015), *L. multiflora* (SORO et al., 2016) e *L. gracilis* (COSTA-JUNIOR et al., 2016); β -bisaboleno e biciclogermacreno em *L. organoides* (TELES et al.; 2014) e *L. integrifolia* (MARCIAL et al., 2015).

Conforme observado, os constituintes do OELB podem ser encontrados nos óleos essenciais de outras espécies de *Lippia*, variando apenas nas proporções. Tal fato revela perfis químicos ligeiramente parecidos entre as espécies, estando às diferenças na composição desses óleos condicionadas aos fatores ambientais,

geográficos, edáficos, climáticos, genéticos, sazonalidade etc., de cada planta (DO et al., 2015; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Tabela 5 - Análise da composição química dos óleos essenciais obtidos das folhas de *Lippia bromelyana* (continua)

Composto	<i>IK_{lit}</i>	<i>IK_{calc}</i>	<i>Média±DP</i>
α-tujeno	930	928	0.40±0.08
α-pineno	939	936	0.11±0.01
sabineno	975	974	0.11±0.01
octen-3-ol + β-pineno	977	979	traços
β-mirceno	990	989	0.32±0.04
p-cimeno	1026	1025	2.29±0.27
limoneno	1029	1031	29.89±3.14
γ-terpineno	1059	1060	3.52±0.33
linalol	1096	1097	1.79±0.09
trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	1122	1119	0.61±0.14
cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	1137	1134	0.44±0.04
mircenona	1149	1147	0.13±0.01
trans-carveol	1216	1218	0.39±0.03
timol	1290	1285	0.81±1.15
carvacrol	1298	1298	1.98±2.57
acetato de trans-carvila	1342	1336	0.61±0.09

(continuação)

Composto	<i>IK_{lit}</i>	<i>IK_{calc}</i>	<i>Média±DP</i>
piperitenona	1343	1339	1.52±0.10
α-cubebeno	1348	1351	0.18±0.02
óxido de piperitenona	1368	1367	26.90±3.09
E-cariofileno	1419	1421	1.48±0.86
E-β-farneseno	1456	1457	0.77±0.09
biciclogermacreno	1500	1497	2.90±0.23
β-bisaboleno	1505	1508	8.02±0.68
δ-cadineno	1523	1524	1.27±0.07
espatulenol	1578	1578	1.32±0.14
óxido de cariofileno	1583	1584	0.43±0.04
benzoato de benzila	1760	1762	0.56±0.07
Total de compostos identificados			90.19±0.18

¹Índice de Kovats descrito na literatura. ²Índice de Kovats determinado na coluna.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

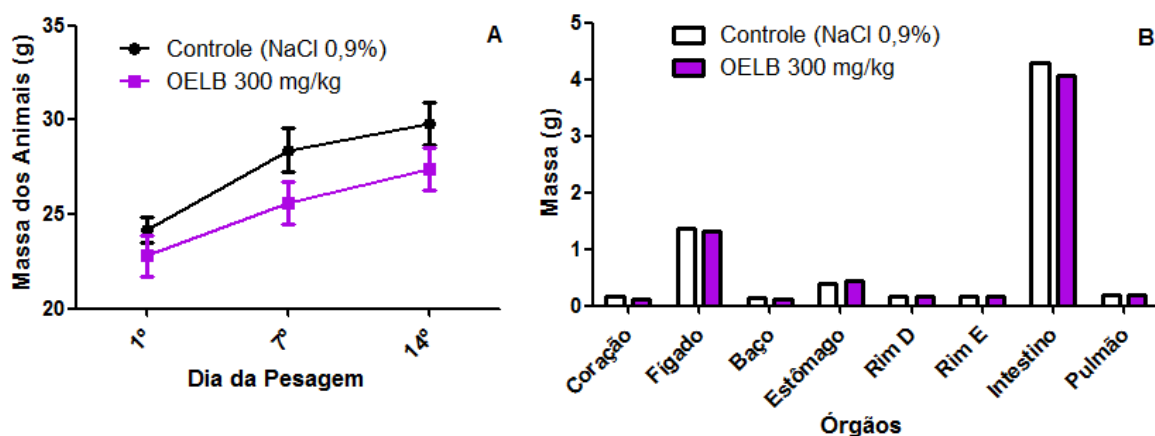
4. 2 TESTES FARMACOLÓGICOS GERAIS

4.2.1 Avaliação da toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda possibilitou avaliar, de forma geral, o potencial tóxico agudo do OELB na dose fixa 300 mg/kg (i.p.) em camundongos. Após a administração do OELB e o monitoramento diário durante os 14 dias subsequentes

de duração do experimento, constatou-se que o óleo em questão não foi capaz de causar mortes na dose testada, tampouco efeitos tóxicos relevantes na alteração do comportamento dos roedores. A massa corpórea dos animais tratados com OELB 300 mg/kg (i.p.) não sofreu alterações significativas ($p > 0,05$) em comparação aos animais do grupo controle após o 7º e 14º dias desde o início do experimento (Gráfico 1A). Também não foram observadas alterações no crescimento ou anormalidades nos órgãos dos camundongos durante a análise macroscópica (Gráfico 1B). OELB, na dose testada, não causou, portanto, sinais patológicos visíveis nos órgãos observados comparados aos dos animais do grupo controle.

Gráfico 1 - Efeito do OELB (300 mg/kg i.p.) no teste de toxicidade aguda em camundongos.



(A) Diferença entre ganho de massa (g) dos animais do grupo controle e OELB 300 mg/kg (i.p.) após o 7º e 14º dias do experimento. (B) Diferença entre a massa dos órgãos dos animais do grupo controle e OELB 300 mg/kg no final do experimento. Os dados foram expressos em média \pm e.p.m. ($n=5$). $P>0,05$ foram considerados não significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA duas vias seguido do teste de Tukey). Rim D – Rim direito. Rim E – Rim esquerdo.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Estudos realizados com o óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham demonstraram ausência de toxicidade aguda em camundongos quando

administrado por via oral ou intraperitoneal até a dose 3000 mg/kg (FONTENELLE et al. 2007). Esses resultados podem estar relacionados aos compostos de cada óleo, que devido a sua complexidade pode ou não apresentar efeitos tóxicos a depender da presença ou ausência de um composto chave.

A ausência de efeito tóxico agudo apresentado pela administração do OELB, na dose 300 mg/kg todavia, não é suficiente para garantir o uso contínuo seguro desse óleo, sendo necessário, dessa forma, estudos mais amplos acerca da sua toxicidade, o qual não constituiu objetivo deste trabalho. No entanto, a partir do teste realizado, foi possível estabelecer uma dose limite segura para os testes farmacológicos subsequentes.

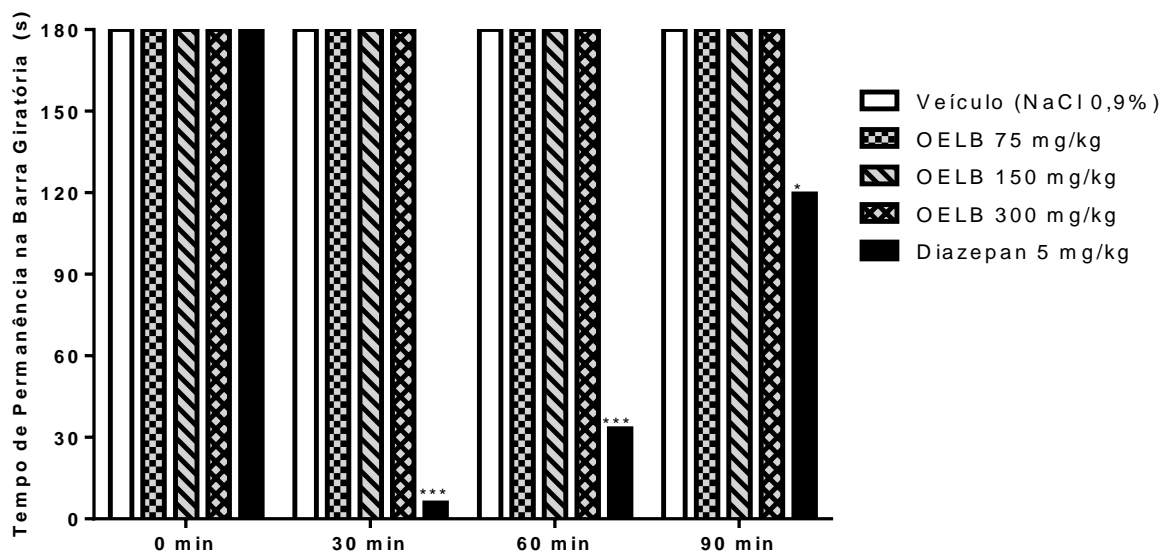
4.2.2 Teste para investigação da atividade motora na barra giratória (rota-rod)

O teste do *rota-rod* foi utilizado para investigar o efeito do OELB sobre a coordenação motora dos camundongos. Os animais tratados com OELB permaneceram na barra giratória pelo tempo de corte máximo (180 segundos) em até três tentativas em todas as doses testadas (75, 150 ou 300 mg/kg) 30, 60 e 120 min após as administrações, isto é, OELB não reduziu de forma significativa ($p > 0,05$) o tempo de permanência na barra giratória quando comparado ao grupo controle negativo, como pode ser visto no Gráfico 2. Entretanto, diazepam, droga padrão, de efeito depressor do sistema nervoso central (SNC), reduziu significativamente ($p < 0,05$) o tempo de permanência na barra giratória conforme o esperado.

O teste do *rota-rod* é um importante método de avaliação da integridade do sistema motor, visto que a diminuição da ambulação é um parâmetro para verificar possível ação depressora de alguma substância sob o SNC. Devido a essas prováveis ações, com o teste do *rota-rod* torna-se possível verificar a presença de efeitos característicos de neurotoxicidade (enfraquecimento neurológico, ataxia e relaxamento muscular) provocados pelas drogas depressoras do SNC que poderiam afetar os testes farmacológicos comportamentais devido a consequente diminuição

da coordenação motora (De SOUSA et al, 2007; PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

Gráfico 2 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do rota-rod.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). *p<0,05 foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Assim, a ausência de efeito relaxante na musculatura e coordenação motora dos animais na atividade do OELB pode indicar ausência de efeito depressor sobre o SNC. Em conformidade parcial com esses dados, o estudo realizado por Do Vale et al. (2002), revelou que limoneno um dos compostos isolados de um quimiotipo do OE de *L. alba* em dose baixa (50 mg/kg, i.p.) não alterou a atividade motora em camundongos, em contrapartida, em doses maiores (100 ou 200 mg/kg, i.p.) essa substância apresentou efeito contrário, indicando que doses elevadas desse monoterpeno na composição do óleo essencial podem causar relaxamento muscular. No entanto, essa diferença entre os dados aqui apresentados pode ser explicada pelo fato de o estudo supracitado ter sido realizado com a substância

isolada, enquanto o OELB consiste numa complexa mistura de substâncias terpênicas, não apresentando apenas limoneno em sua composição.

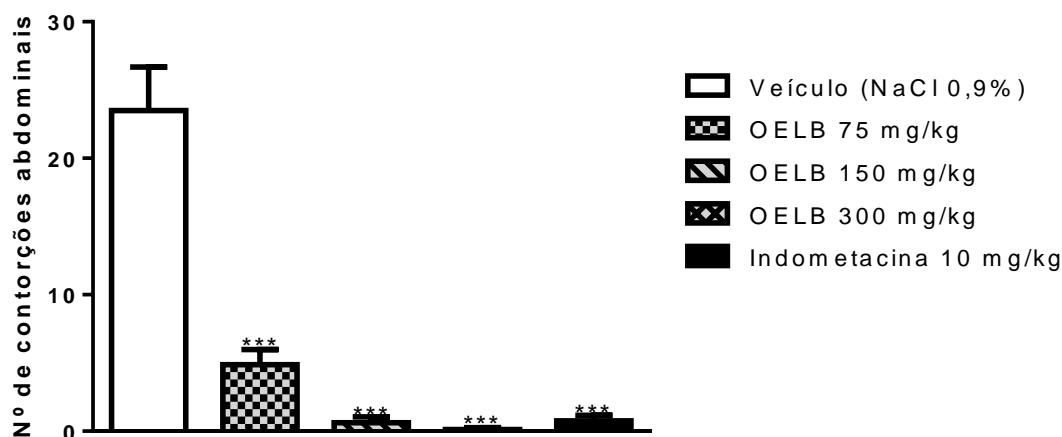
4.2.3 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético foi realizado para avaliar a ação antinociceptiva do OELB. Os resultados obtidos indicam que este composto foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos em todas as doses testadas (Gráfico 3), quando comparados aos animais pertencentes ao grupo controle (tratados com veículo). Os animais tratados com OELB nas doses 75, 150 ou 300 mg/kg tiveram valores médios de contorções $4,87 \pm 1,11$; $0,63 \pm 0,42$ ou $0,13 \pm 0,13$ contorções; respectivamente, enquanto o número de contorções apresentadas pelos animais do grupo controle foi $23,5 \pm 3,20$. A indometacina, droga padrão utilizada, reduziu de forma significativa as contorções abdominais, como previsto. O percentual de inibição médio do OELB foi de 90% (75 mg/kg: 79,27%; 150 mg/kg: 97,31%; 300 mg/kg: 99,44%).

Modelo de dor padrão simples, o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é bastante sensível e útil para identificar atividade analgésica central e periférica de novas substâncias uma vez que as contorções podem ser inibidas tanto por opióides quanto por analgésicos de ação periférica, como alguns anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (COLLIER et al., 1968, LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), embora também possa ser empregado como um modelo de dor inflamatória visceral (BARBER; GOTTSCHLICH, 1992; GUIMARÃES et al., 2012)

A sensação dolorosa causada pelo ácido acético está relacionada com a liberação de algumas substâncias endógenas, tais como serotonina, bradicinina, prostaglandinas e substância P. Tais substâncias são responsáveis por estimular as terminações nervosas e os receptores peritoneais, causando, como resposta, contorções abdominais (HUSSAIN et al., 2015).

Gráfico 3 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.



Os dados foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

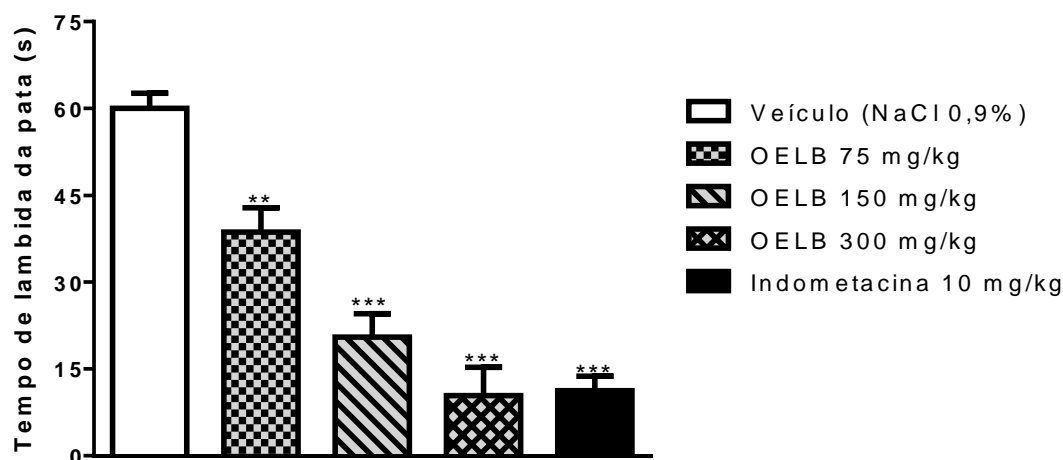
O efeito antinociceptivo do OELB observado neste experimento foi semelhante à ação da indometacina, visto que OELB inibiu em média 90% das contorções e a indometacina reduziu 96,80%. Estudos realizados com *Lippia gracilis* Schauer em roedores (GUILHON et al., 2011; MENDES et al., 2010) revelaram que a administração (via oral) do óleo essencial desta planta foi capaz de inibir as contorções abdominais induzidas por ácido acético. O óleo essencial de *Citrus limon*, rico em limoneno (52,77%), também demonstrou significativo efeito analgésico no teste do ácido acético, indicando que a presença majoritária desse composto pode atuar na inibição da dor periférica (CAMPÊLO et al., 2011). Com base nestes dados, supõe-se, então, que a ação analgésica do OELB deve resultar da inibição da síntese e/ou da liberação de mediadores inflamatórios derivados do processamento de metabólitos do ácido araquidônico pela via da COX e biossíntese de prostaglandinas (DUARTE; NAKAMURA; FERREIRA, 1988), resultando numa ação periférica.

4.2.4 Teste da Formalina

Uma vez que o teste das contorções abdominais apresenta inespecificidade respondendo tanto aos analgésicos centrais como aos AINEs, foi necessário realizar um teste mais específico para melhor delineamento da atividade antinociceptiva do OELB. Dessa forma, o teste da formalina foi empregado por ser considerado um importante método para a avaliação clínica da dor, pois consiste em um modelo bifásico, isto é, há uma fase neurogênica (1ª fase), caracterizada pela dor aguda, na qual os nociceptores são ativados diretamente pelo Receptor Potencial Transiente Anquirina 1 (TRPA1), localizados nas fibras C sensoriais, refletindo assim uma dor mediada centralmente e uma fase crônica ou inflamatória (2ª fase), em que a liberação de mediadores inflamatórios participam da sensibilização dos nociceptores (HUNSKAAR; HOLE, 1987; ; McNAMARA et al., 2007; TJØLSEN et al., 1991). As respostas da 1ª fase são mediadas pela liberação de substância P e bradicinina, enquanto na 2ª ocorre a mediação provocada pela histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina (PARADA et al., 2001; TJØLSEN et al., 1992). Fármacos analgésicos de ação central inibem tanto a 1ª quanto a 2ª fase, enquanto os anti-inflamatórios tendem a diminuir a resposta nociceptiva na 2ª fase (BARROT, 2012).

Os dados obtidos neste teste corroboram a ação antinociceptiva do OELB observada no teste do ácido acético. OELB foi capaz de reduzir de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de lambida da pata nos camundongos tratados, em todas as doses testadas, em relação aos animais do grupo controle em ambas as fases. Na primeira fase (Gráfico 4), OELB reduziu o tempo de lambida de forma dose dependente, apresentando valores de $38,63 \pm 4,21$; $20,50 \pm 4,07$ e $10,38 \pm 4,91$ s, respectivamente nas doses 75, 150 e 300 mg/kg, comparados aos animais do grupo tratado com veículo ($60,00 \pm 2,62$ s). OELB inibiu em média 61,38% da resposta nociceptiva (75 mg/kg: 35,61%; 150 mg/kg: 65,83%; 300 mg/kg: 82,70%).

Gráfico 4 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) na primeira fase do teste da formalina em camundongos.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

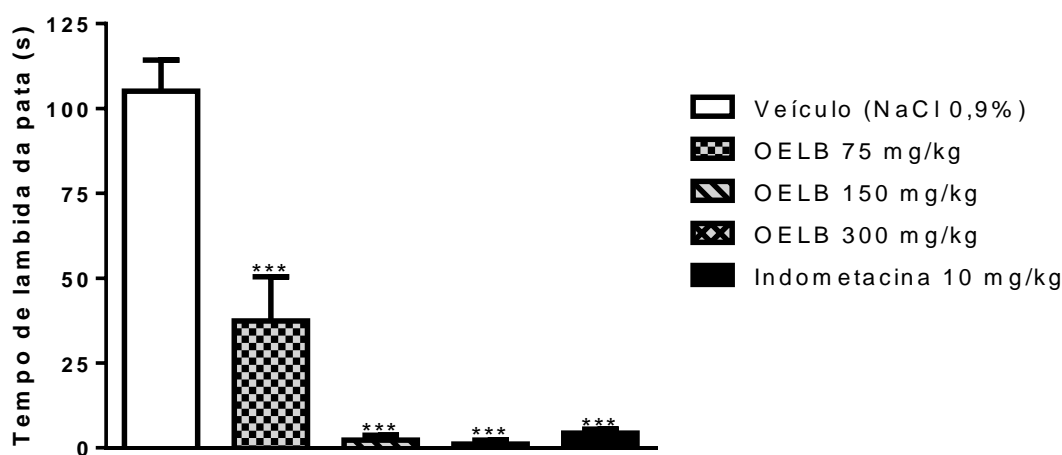
Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Conforme pode ser observado no Gráfico 5, na segunda fase do teste, OELB reduziu significativamente ($p < 0,001$) o tempo de lambida da pata em todas as doses testadas (75 mg/kg: $37,43 \pm 12,97$ s; 150 mg/kg: $2,25 \pm 1,48$ s; 300 mg/kg: $1,12 \pm 1,12$ s) quando comparadas ao grupo controle negativo ($105,10 \pm 9,12$ s). Nesta fase, OELB inibiu em média 87,05% da resposta nociceptiva (75 mg/kg: 64,38%; 150 mg/kg: 97,85%; 300 mg/kg: 98,93%). A indometacina, como esperado, também reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) o tempo de lambida da pata em ambas as fases.

Estes resultados demonstraram que o OELB foi capaz de diminuir significativamente a algia em ambas as fases, sendo o efeito analgésico mais pronunciado na segunda fase, não havendo diferença entre as doses 150 e 300 mg/kg. OELB em ambas as fases se mostrou tão eficaz quanto a indometacina, anti-inflamatório inibidor não seletivo da COX, o que indica o provável efeito anti-inflamatório desse óleo, bem como atividade antinociceptiva de efeito central e periférico, sendo que, sua ação foi mais evidente na redução do processo inflamatório agudo. Além disso, OELB pode atuar na dor neurogênica (1ª fase) pela

ativação direta dos receptores TRPA1, mas principalmente pela inibição de mediadores inflamatórios diretos e indiretos, afetando também as vias de neurotransmissão no SNC.

Gráfico 5 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) na segunda fase do teste da formalina em camundongos.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

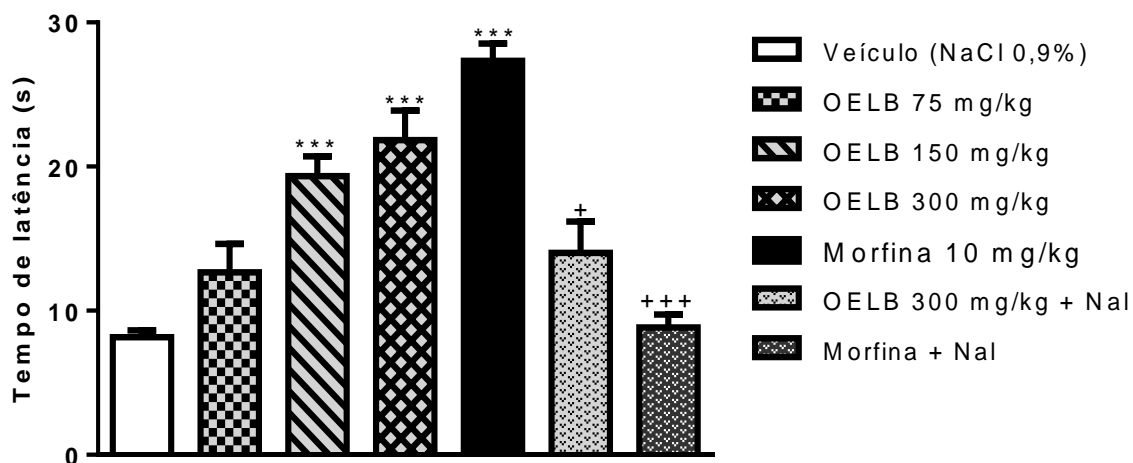
Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Em conformidade com esses dados, Passos et al. (2015) encontraram idênticos resultados para γ -terpineno. Outros estudos realizados com óleos essenciais de outras espécies de *Lippia*, como *Lippia gracilis* (GUILHON et al, 2011; GUIMARAES et al, 2012; MENDES et al, 2010), *Lippia nodiflora* (AHMED et al., 2004), bem como com os monoterpenos R-(+)-limoneno (AMARAL et al., 2007) e α,β -Epoxy-carvona (ROCHA et al, 2013), obtiveram resultados similares evidenciando as propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas de plantas deste gênero e dos terpenos encontrados em diversos óleos essenciais de plantas aromáticas.

4.2.5 Teste da Placa Quente

Como OELB apresentou efeito antinociceptivo na 1ª fase do teste da formalina, sugerindo efeito central no processo antinociceptivo, foi realizado o teste da placa quente, a fim de melhor elucidar a ação central desse óleo. O OELB apresentou efeito antinociceptivo no teste da placa quente, visto que após trinta minutos da administração dos tratamentos, foi observado aumento significativo ($p < 0,001$) no tempo de latência para o comportamento de pular ou lamber a pata traseira, nos grupos tratados com OELB nas doses 150 ou 300 mg/kg (i.p.), com valores $19,33 \pm 1,38$ segundos e $21,83 \pm 2,06$ segundos, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo ($8,17 \pm 0,48$) tratado com veículo (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 30 min após os tratamentos.

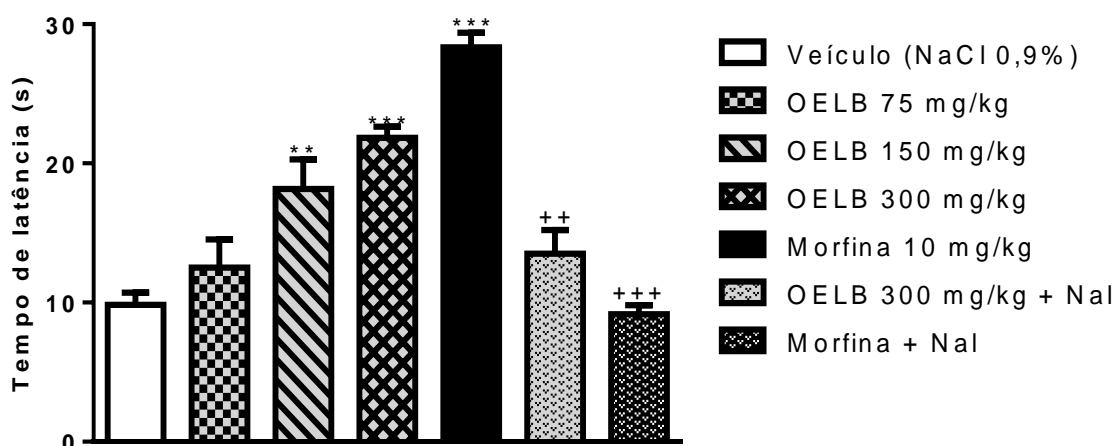


Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. ($n=6$). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey). O símbolo + representa os níveis de significância em comparação com morfina ou OELB (300 mg/kg) versus os grupos tratados com morfina mais naloxona ou OELB mais naloxona (1,5 mg/kg). + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

O aumento do tempo de latência na placa quente permaneceu significativo ($p < 0,01$) após sessenta e cento e vinte minutos da administração (Gráficos 7 e 8) do OELB nas doses 150 ou 300 mg/kg, com respectivos valores aos sessenta minutos: $18,17 \pm 2,12$ segundos e $21,83 \pm 0,79$ segundos; e aos cento e vinte minutos: $20,50 \pm 2,06$ segundos e $24,33 \pm 1,56$ segundos, quando comparados ao grupo tratados com veículo (aos 60 minutos: $9,83 \pm 0,87$ segundos; 120 minutos: $10,17 \pm 0,54$ segundos). A morfina, droga padrão utilizada teve sua ação conforme esperado.

Gráfico 7 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 60 min após os tratamentos.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. ($n=6$). $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey). O símbolo + representa os níveis de significância em comparação com morfina ou OELB (300 mg/kg) vs os grupos tratados com morfina mais naloxona ou OELB mais naloxona (1,5 mg/kg). $++p < 0,01$, $+++p < 0,001$.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Inversamente, a associação do OELB (300 mg/kg, i.p.) com naloxona, um antagonista não seletivo do receptor opióide, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) o tempo de latência na placa quente (aos 30 minutos: $14,00 \pm 2,191$ s; 60 minutos: $13,5 \pm 1,70$ s; 120 minutos: $16,67 \pm 1,40$ s), o que indica a possibilidade de

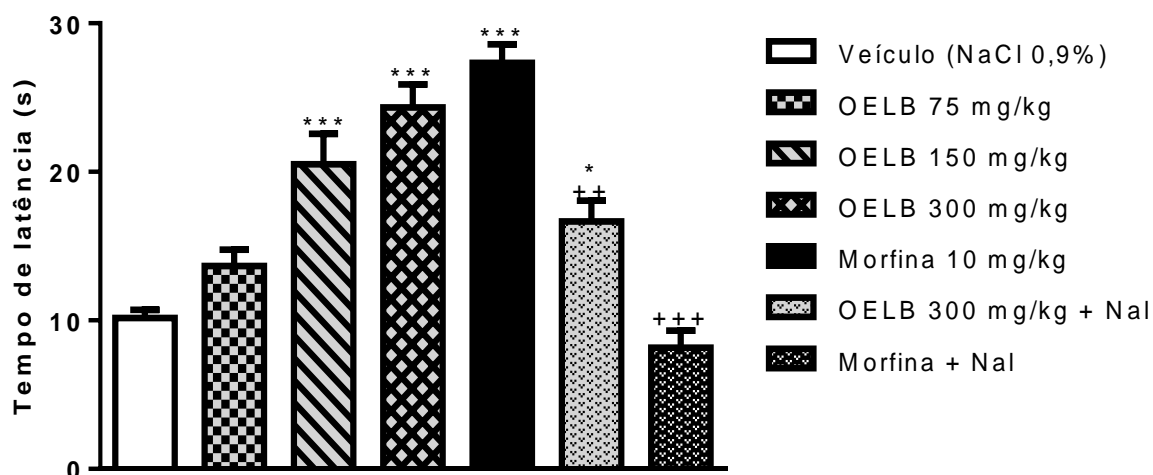
envolvimento do sistema opióide no mecanismo de ação do OELB (Gráficos 6, 7 e 8). A naloxona também reverteu a ação da morfina, conforme esperado aos 30 minutos ($8,83 \pm 0,91$ s), 60 minutos ($9,17 \pm 0,66$ s) e 120 minutos ($8,17 \pm 1,14$ s) (Gráficos 6, 7 e 8).

O emprego de um estímulo térmico agudo de alta intensidade sobre a pele, no teste da placa quente, desencadeia a ativação das fibras sensoriais de elevado limiar que enervam esse tecido (ALLEN; YAKSH, 2004). Este estímulo é responsável pelo comportamento de lambida das patas traseiras ou pulo, respostas essas consideradas espinal ou supraespinalmente integradas (LE BARS et al., 2001).

Neste trabalho, foi possível verificar, por meio deste teste, que OELB alterou a latência da resposta nociceptiva ao calor significativamente nas doses 150 e 300 mg/kg, comparado ao grupo controle negativo, corroborando o efeito analgésico central. O efeito sobre o aumento da latência observado pela administração do OELB nas doses 150 e 300 mg/kg permaneceu inclusive após 60 e 120 min, entretanto OELB 75 mg/kg não foi capaz de alterar a latência neste teste. Efeitos similares foram encontrados por Quintans-Jr et al. (2011), em estudo realizado com o monoterpeno α -terpineol (TPN). *R-(+)*-limoneno, entretanto, não apresentou eficácia na supressão da nocicepção supraespinal, pois não demonstrou qualquer influência significativa na latência da reação ao calor da placa (DO AMARAL et al., 2007).

Os resultados positivos do OELB nesse teste indicam a eficácia desse óleo na promoção de analgesia central espinal e supraespinal integrada, indicando a complexidade de mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva dos compostos presentes no OELB. Dessa forma, o possível envolvimento do sistema opióide durante o efeito analgésico do OELB foi avaliado por meio da administração associada com naloxona, fármaco antagonista opióide. Os resultados encontrados indicam que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1,5 mg/kg) foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do OELB na dose 300 mg/kg, o que provavelmente está relacionado à participação do sistema opióide na ação antinociceptiva deste óleo.

Gráfico 8 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente 120 min após os tratamentos.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey). Os símbolos + representam os níveis de significância em comparação com morfina ou OELB (300 mg/kg) vs os grupos tratados com morfina mais naloxona ou OELB mais naloxona (1,5 mg/kg). ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Ao contrário dos resultados aqui apresentados, no estudo realizado por Guilhon et al. (2011) o óleo essencial de *Lippia gracilis* aumentou a latência da resposta nociceptiva, porém seu efeito não foi revertido pela naloxona. Essa diferença pode estar relacionada, mais uma vez, aos componentes majoritários e a proporção dos constituintes químicos dos óleos essenciais que diferem nas espécies e que, por sua vez, podem estar envolvidos em mecanismos de ação divergentes.

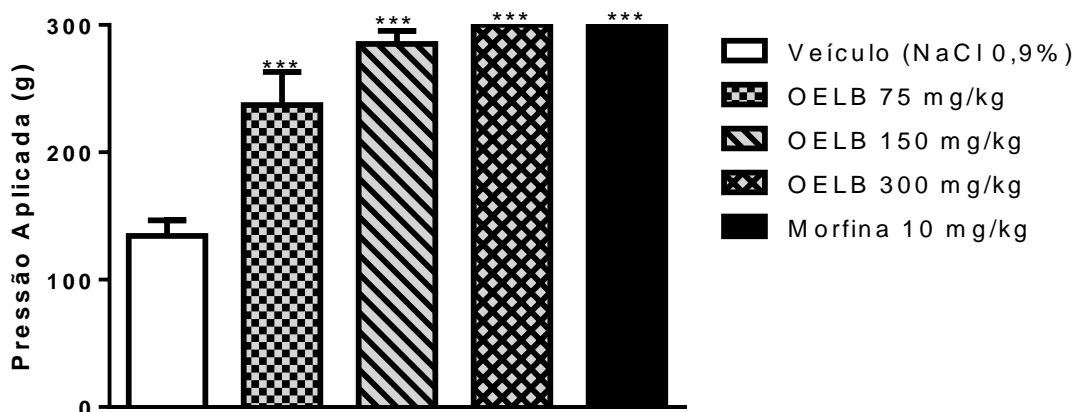
4.2.6 Teste Randall-Selitto

O teste Randall-Selitto (1956) permitiu verificar a ação do OELB sobre a hiperalgesia em camundongos, que consiste na redução do limiar da dor e o aumento desta por estímulos supraliminares (TREEDE et al., 1992). Assim, foi

possível avaliar o limiar de retirada da pata inflamada por carragenina, baseado no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilização ao estímulo doloroso e que essa sensibilização está sujeita a ação de drogas de efeito analgésico (RANDAL; SELITTO, 1957).

Após a formação do edema de pata, induzido pela administração de carragenina, OELB foi capaz de aumentar o limiar de hiperalgesia quando a pressão (g) foi aplicada pelo analgesímetro. Todas as doses testadas apresentaram significativa ($p < 0,001$) ação sobre a redução da resposta hiperalgésica, quando comparadas ao grupo tratado com veículo (Gráfico 9). OELB 75 mg/kg aumentou o limiar para $237,10 \pm 25,91$ g; a dose 150 mg/kg aumentou para $285,10 \pm 10,26$ g e 300 mg/kg para 300 ± 0 g. O grupo controle, por sua vez, apresentou limiar no valor $134,40 \pm 12,27$ g, enquanto a morfina aumentou o limiar para 300 ± 0 g conforme esperado. Os resultados evidenciam a eficácia do OELB na redução da resposta hiperalgésica induzida pela pressão aplicada no tecido inflamado. A ação do OELB foi idêntica ao efeito da morfina quando administrado na dose 300 mg/kg.

Gráfico 9 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste Randall-Selitto.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. ($n=8$). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

No estudo conduzido por Macedo et al. (2016), o monoterpeno terpinoleno (TPL) foi capaz de aumentar o limiar da dor no teste Randall Selitto, além disso, TPL em associação com diclofenaco, potencializou o efeito anti-inflamatório desse fármaco, evidenciando o efeito sinérgico desse monoterpeno e este AINE. Nesse sentido, a ação conjunta dos compostos do OELB podem proporcionar também tais efeitos sinérgicos em relação a redução da hiperalgesia provocada pela pressão na pata inflamada, agindo, possivelmente, sobre os mediadores inflamatórios e consequentemente aumentando o limiar de retirada da pata, conforme foi verificado no teste.

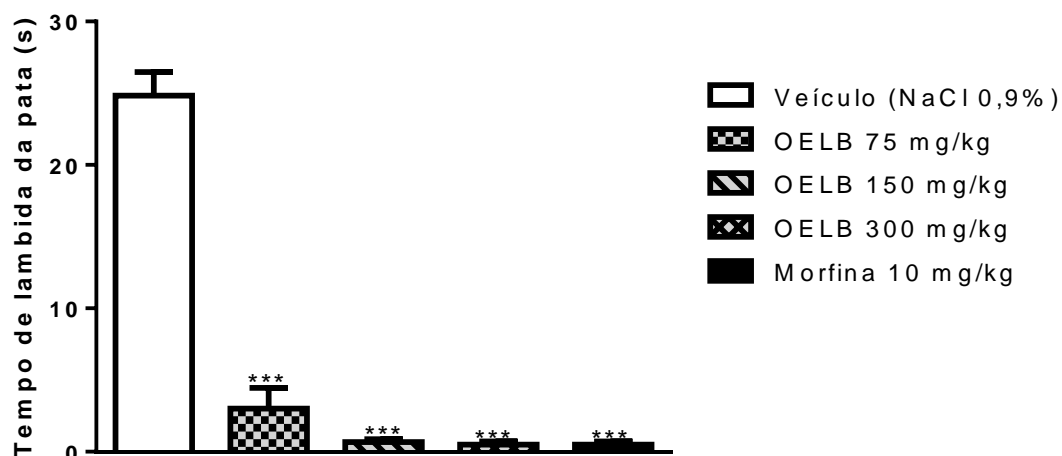
4.2.7 Teste de nocicepção induzida por glutamato

O Gráfico 10 mostra os resultados obtidos sobre a ação do OELB no teste do glutamato. Todas as doses do OELB testadas foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,001$) o tempo de lambida da pata dos camundongos em comparação ao grupo tratado com veículo ($24,83 \pm 1,64$ s). A morfina teve sua ação conforme esperado para uma droga padrão. OELB 75 mg/kg foi capaz de inibir a resposta nociceptiva provocada pelo glutamato cerca de 88,00% ($3 \pm 1,46$ s), enquanto OELB 150 e 300 mg/kg inibiram em 97,34% ($0,66 \pm 0,21$ s) e 98% ($0,5 \pm 0,22$ s), respectivamente. Pode-se observar, então, que a atividade antinociceptiva do OELB foi semelhante ou igual (na dose 300 mg/kg) a da morfina neste experimento, isto é, não houveram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre as doses testadas ou quando comparadas a morfina.

O glutamato é um importantíssimo aminoácido excitatório que atua como neurotransmissor nos processos de transmissão sináptica referentes à dor e como coadjuvante na inflamação (FUNDYTUS, 2001; BEIRITH et al, 2002; MILLER et al, 2011). O efeito nociceptivo causado pela injeção de glutamato na pata traseira do camundongo envolve sítios de ação periférica, espinal e supraespinal, sendo fortemente mediada pela liberação de óxido nítrico, mas também tanto pela ativação de receptores NMDA como não-NMDA e sítio modulador de glicina (BEIRITH et al, 2002, MILLER et al, 2011). Os resultados aqui apresentados apontam para a

eficácia do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) na diminuição da resposta nociceptiva induzida pela injeção de glutamato na pata traseira dos camundongos.

Gráfico 10 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do glutamato.



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=6). ***p < 0,001 foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

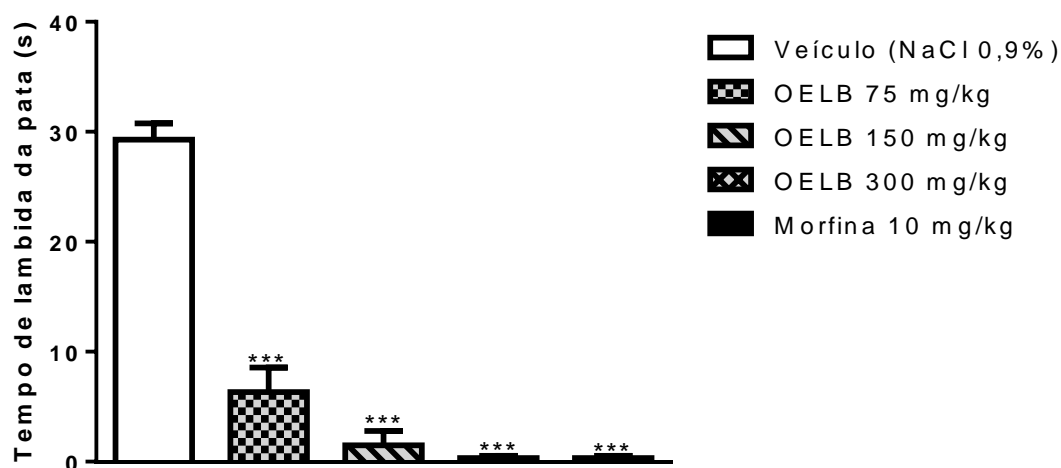
Monoterpenos como geraniol (LA ROCCA et al, 2016), orto-eugeniol (FONSECA, 2016) e mirtenol (SILVA, et al., 2014) encontrados no óleo essencial de plantas aromáticas mostraram resposta semelhante no teste do glutamato. Esses resultados sugerem que a presença de monoterpenos encontrados no OELB pode estar diretamente relacionada ao efeito antinociceptivo avaliado no teste do glutamato, possivelmente pela inibição da síntese de óxido nítrico ou pela inativação dos canais NMDA (N-metil D-Aspartato).

4.2.8 Teste de nocicepção induzida por cinamaldeído

Os dados mostrados no Gráfico 11 indicam que administração do OELB 75, 150 ou 300 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,001$) o tempo de lambida da pata nos camundongos em relação ao grupo tratado com veículo ($29,29 \pm 1,47$ s). O percentual de inibição da resposta nociceptiva foi de 78,40% ($6,33 \pm 2,25$) para OELB 75 mg/kg; 95,00% ($1,5 \pm 1,31$ s) para OELB 150 mg/kg e 99,00% ($0,33 \pm 0,21$ s) para OELB 300 e morfina ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle. É possível inferir, a partir da análise desses dados, que OELB é tão eficaz quanto morfina para a redução da resposta nociceptiva provocada pela administração de cinamaldeído.

O cinalmadeído é o principal agente químico ativador de um tipo de canal iônico conhecido como receptor de potencial transitório relacionado à proteína anquirina do tipo 1 (TRPA1), provocando a excitação de subconjuntos de neurônios termossensíveis envolvidos na percepção do frio nocivo, além de causar nocicepção em camundongos (BANDELL et al., 2004; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009; KOIVISTO et al, 2014).

Gráfico 11 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do cinamaldeído



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. ($n=6-8$). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Os canais TRPA1 fornecem transdução de estímulos nocivos por meio de sinais elétricos nos terminais periféricos de fibras nociceptivas aferentes, enquanto amplifica a transmissão para interneurônios espinhais e neurônios de projeção nas terminações centrais no corno dorsal da medula (KOIVISTO et al, 2014). Em publicação recente, a aplicação sistêmica do monoterpene limoneno em camundongos exerceu efeitos inibidores sobre a nocicepção causada pela ativação dos canais TRPA1 induzida por estresse oxidativo (KAIMOTO et al., 2016). Dessa forma, é possível que o limoneno, composto majoritário do OELB, possa atuar como antagonista do canal TRPA1, e, conseqüentemente, inibindo a ação nociceptiva provocada pela ativação desse canal.

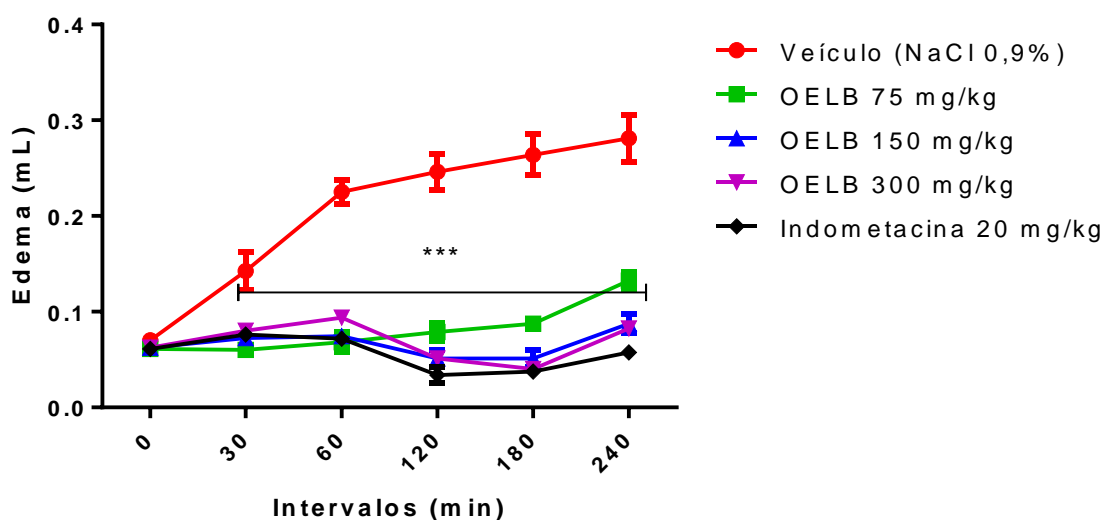
4.2.9 Teste do edema de pata induzido por carragenina

O teste de edema de pata induzido por carragenina foi utilizado para melhor elucidar o efeito anti-inflamatório do OELB observado na segunda fase do teste da formalina. Os resultados obtidos em relação à atividade do OELB sobre o edema de pata podem ser vistos no Gráfico 12. Aos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração da carragenina, houve diferença significativa ($p < 0,001$) entre o tamanho do edema observado nos grupos tratados com OELB (75, 150 ou 300 mg/kg) quando comparados ao grupo tratado com veículo. A droga referência utilizada neste teste, indometacina, também reduziu o edema de forma significativa ($p < 0,001$) conforme esperado.

Nos animais tratados com OELB (75, 150 ou 300 mg/kg), observou-se redução do edema mais pronunciada após 120 e 180 minutos da administração da carragenina, sendo o percentual de inibição do OELB 150 e 300 mg/kg de 80,55% e 84,83%, respectivamente, aos 180 min. Indometacina, nesse mesmo intervalo, inibiu em 85,78% o edema de pata, valor este bem próximo aos obtidos pelo OELB (150 ou 300 mg/kg) já mencionados. A Tabela 6 contém os percentuais de inibição de todas as doses do OELB testadas e indometacina.

A resposta inflamatória observada na pata traseira dos camundongos neste experimento, por sua vez, envolve uma série de mediadores pro-inflamatórios liberados em sequência e é dividida em três fases após a injeção de carragenina: na primeira (1,5 h), ocorre a liberação de histamina e serotonina, enquanto na segunda fase (1,5-2,5 h) bradicinina é liberada; a terceira fase (2,5-6 h) está relacionada à produção local de óxido nítrico e prostaglandinas, bem como com o aumento da expressão de COX-2 e dos níveis de IL-6, IL-1 β , TNF- α , e MCP-1 (DI ROSA, 1972; GANGWAR et al., 2015; VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969). Por outro lado, é possível, também, que OELB possa induzir a síntese de interleucinas anti-inflamatórias, como TGF- β , IL4, IL10 e IL13, as quais atuam no sistema imunológico inibindo a produção de quimiocinas, bem como inibindo a ação das células T auxiliares (T-helper) (Th)1 (RANG; DALE, 2011).

Gráfico 12 - Efeito do OELB (75, 150 ou 300 mg/kg, i.p.) no teste do edema de pata induzido por carragenina



Os valores foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8). *** $p < 0,001$ foram considerados significativos quando comparados com o grupo controle. (ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey).

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

Por esse motivo, conforme dados apresentados neste estudo, a ação do OELB (75-300 mg/kg) na redução do edema de pata induzido pela carragenina pode estar relacionada à inibição da enzima COX-2 e, conseqüentemente, a síntese de prostaglandinas, visto que OELB reduziu a inflamação na primeira e segunda fase do teste. Propriedades similares foram relatadas para *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (HALDAR et al. 2012) e para o monoterpene timol presente no óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer (RIELLA et al, 2012). Esses dados sugerem, ainda, que a ação anti-inflamatória do OELB pode estar relacionada ao bloqueio dos canais TRPA1 (como demonstrado no teste de nocicepção induzida por cinamaldeído), os quais foram recentemente relacionados à mediação do processo inflamatório induzido por carragenina (MOILANEN et al. 2012).

Tabela 6 - Percentual de inibição do edema de pata pelo OELB (75, 150 ou 300 mg/kg)

Tempo	OELB 75mg/kg	OELB 150mg/kg	OELB 300mg/kg	Indometacina
0'	12,43%	10,71%	10,71%	12,43%
30'	57,89%	49,12%	43,86%	46,46%
60'	69,73%	66,93%	58,31%	68,04%
120'	68,04%	79,17%	79,21%	86,32%
180'	66,83%	80,55%	84,84%	85,78%
240'	52,89%	68,89%	70,67%	79,56%

Os valores foram calculados a partir dos dados expressos no Gráfico 12 conforme fórmula apresentada na página 55.

Fonte: Dados da pesquisa (2017)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial de *Lippia bromelyana* mostrou efeito antinociceptivo tanto por ação central, quanto pela inibição de vias periféricas (pela inibição da síntese de mediadores químicos pró-inflamatórios ou síntese de agentes anti-inflamatórios) em diversos modelos de dor em camundongos. Também há evidências de que OELB apresenta ação anti-inflamatória conforme resultados apresentados. Essas propriedades estão relacionadas à composição do óleo essencial, provavelmente a presença majoritária de limoneno, o qual apresenta grande atividade antinociceptiva, e também óxido de piperitenona. Além disso, OELB pode ser considerado não tóxico em doses iguais ou menores a 300 mg/kg por via intraperitoneal.

Embora os mecanismos envolvidos nos processos antinociceptivo e anti-inflamatório do OELB necessitem de maior aprofundamento, este trabalho foi importante no sentido de fornecer dados preliminares e diretivos para futuros estudos farmacológicos mais específicos com esta espécie. Esses dados sugerem, assim, o grande potencial biotecnológico do OELB como um produto promissor para o tratamento da dor e inflamação.

6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. B. **Identification of essential oil components by gas chromatograph/mass spectrometry**. Carol Stream: Allured. p.804, 2007.
- ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: An updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 2010.
- AHMED, F. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia nodiflora* Linn. **Pharmazie**, v. 59, n. 4, p. 329–330, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. D. H. C.; SILVA, A. C. O. DE. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta Botânica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 27–38, 2005.
- ALBUQUERQUE, U.P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p.325–354, 2007.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Caatinga Revisited: Ecology and Conservation of an Important Seasonal Dry Forest. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–18, 2012.
- ALLEN, J. W.; YAKSH, T. L. Assessment of Acute Thermal Nociception in Laboratory Animals. In: Pain Research: Methods and Protocols, Edited by: Z. D. Luo. **Methods in Molecular Medicine**, v. 99, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004. chap. 2, p. 11-23.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 17, p. 179-188.
- ANAYA-EUGENIO, G. D. et al. Antinociceptive activity of the essential oil from *Artemisia ludoviciana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 403–411, 2016.
- ANSARI, M. et al. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* herb essence against MRSA *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 1, p. 16–19, 2012.
- ASBAHANI, A. EL et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.
- BANDELL, M., et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, p. 849–857, 2004.
- BARBER, A.; GOTTSCHLICH, R. Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. **Medicinal Research Reviews**, v. 12, p. 525–562, 1992.

BARBIERI, N. et al. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 168–173, 2016.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.

BAYALA, B. et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 224, p. 219-228, 2002.

BITU, VCN. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Product Research**, v. 28, n. February 2016, p. 399–402, 2014.

BLANCO, M. A. et al. Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 3, p. 803–809, 2013.

BONJARDIM, L. R. *et al.* *Sida cordifolia* Leaf Extract Reduces the Orofacial Nociceptive Response in Mice. **Phytorappy Research**, 2011.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123–128, 2012.

BORSOOK, D.; KALSO, E. Transforming pain medicine: Adapting to science and society. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 17, n. 8, p. 1109–1125, 2013.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa no 06, de 23 de setembro de 2008. Brasília, DF, 2008. Disponível em:
<http://servicos.ibama.gov.br/phocadownload/legislacao/in_06_lista_flora_ameacada_extincao.pdf> Acesso em: 02 dez. 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria n. 433, de 17 de dezembro de 2014. Brasília, DF, 2014. Disponível em:
<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/static/pdf/portaria_mma_443_2014.pdf> Acesso em: 07 jan. 2017

BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, v.190, n.3, p.541-562, Jun. 1967.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 131-134, 2005.

- CAMPÊLO, L. M. L. et al. Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, 2011.
- CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de Ansiolíticos: Metodologia Laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.
- CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.
- CNCFlora. *Lippia bromleyana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia bromleyana](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia_bromleyana)>. Acesso em 13 jan. 2017.
- COLLIER, H. O. J. et al. the Abdominal Constriction Response and its Suppression by Analgesic Drugs in the Mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, 1968.
- CORDOVA, M. M. et al. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, v. 495, n. 3, p. 173–177, 2011.
- COSTA-JÚNIOR, L. M. et al. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 60–64, 2016.
- DE LIMA, G. P. G., et al. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. **Parasitology Research**, v. 112, p. 1953-1958, 2013.
- DE PAULA, J. A. M. et al. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.
- DE SOUSA, O. V. et al. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2007.
- DeCORTE, B. L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.59, p. 9295-9304, 2016.
- DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed Chichester, U.K.: Wiley, 2009.
- Di ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89–102, 1972.

- DIAS, C. N. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal AMAZOn plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- DO AMARAL, J. F. et al. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(+)-limonene in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 30, n. 7, p. 1217–1220, 2007.
- DO VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9, n. 8, p. 709–714, 2002.
- DO, T. K. T. et al. Authenticity of essential oils. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 146–157, 2015.
- DONALD, G. R.; FERNANDES, P. D.; BOYLAN, F. Antinociceptive Activity of *Zanthoxylum piperitum* DC. Essential Oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- DUARTE, I. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA S. H. Participation of the sympatic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p.208-209, 1957.
- EDDY N. B., LEIMBACH D. J. Synthetic analgesics: II. Dithienylbutenyl- and dithienyl-butylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.
- ESCOBAR, P. et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184–190, 2010.
- FIRENZUOLI, F. et al. Essential oils: New perspectives in human health and wellness. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 Nov. 2016
- FONSECA, D. V. et al. Ortho-eugenol exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory activities. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 402–408, 2016.

- FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934-940, 2007.
- FRANCO, C. R. P. et al. Bioassay-guided evaluation of antinociceptive properties and chemical variability of the essential oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 11, p. 1693–1699, 2011.
- FREIRES, I. A. et al. The effect of essential oils and bioactive fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms: A confocal analysis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.
- FUNCH, L. S. et al. **Plantas úteis: Chapada Diamantina**. São Carlos: Rima, 2004.
- FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs**, v. 15, n. 1, p. 29-58, 2001.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v.48, n.2, p.129-141, Jan. 1999.
- GANGWAR, M. Pharmacological evaluation of *Mallotus philippinensis*(Lam.) Muell.-Arg. fruit hair extract for anti-inflammatory, analgesic and hypnotic activity. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, p. 14-21, 2015.
- GAZZANEO, L.R.S.; LUCENA, R.F.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.32, n.1, p.1-11, 2005.
- GBENOU, J. D. et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1127–1134, 2013.
- GIULIETTI, A.M. et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T. (Orgs.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2004.
- GOMES, S. V. F. et al., Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, São Paulo, 2011.
- GÖRNEMANN, T. et al. Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 166–169, 2008.
- GOUVEA, C. A. K.; FOLLETO, M. A., BERRETTA-HURTADO, A. L. Determinação do teor de umidade em folhas de tabaco através da técnica de micro-ondas. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 4., 2013. São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: Brasil, 2013. Disponível em:

<http://www.advancesincleanerproduction.net/fourth/files/sessoes/6B/7/gouvea_et_al_work_02.pdf>. Acesso em: 19 maio 2016.

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

GUIMARÃES, A. G.; *et al.* Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, p. 428-434, 2012.

HALDAR, S.; *et al.* In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Lippia alba*. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. S667-S670, 2012.

HATANO, V. Y. *et al.* Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238–243, 2012.

HAWKINS, B. **Plants for life: Medicinal plant conservation and botanic gardens**. s. Botanic Gardens Conservation International, Richmond, U.K. 2008

HENNEBELLE, T. *et al.* Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

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

HUSSAIN, L. *et al.* The Analgesic, Anti-Inflammatory and Anti-Pyretic Activities of *Tinospora cordifolia*. **Advances Clinical & Experimental Medicine**, v. 24, n. 6, p. 957–964, 2015.

JACOB, J.J.C., RAMABADRAN, K. Enhancement of a nociceptive reaction by opiate antagonists in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 64, p. 91-98, 1978.

JEENA, K.; LIJU, V.B.; KUTTAN, R. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activities of Essential Oil from Ginger. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 51–62, 2013.

JUDD, W. S. *et al.* **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2009.

JUIZ, P. J. L. *et al.* Essential oils and isolated compounds from *Lippia alba* leaves and flowers: Antimicrobial activity and osteoclast apoptosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 1, p. 211–217, 2015.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 13, p. 203–210, Sep. 2001.

KAIMOTO, T. *et al.* Involvement of transient receptor potential A1 channel in algescic and analgesic actions of the organic compound limonene. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, v. 20, n. 7, p. 1155–1165, 2016.

KOIVISTO, A., et al. TRPA1: A transducer and amplifier of pain and inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 14, p. 50–55, 2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBBER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-414, 1959.

LA ROCCA, V. et al. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, n. June, 2016.

LA AVOLA, M. et al. Anti-inflammatory Effects of Nortrachelogenin in Murine J774 Macrophages and in Carrageenan-Induced Paw Edema Model in the Mouse. **Planta Medica**, eFirst, oct. 13th, 2016.

LARIBI, B. et al. Essential oils and fatty acids composition of Tunisian, German and Egyptian caraway (*Carum carvi* L.) seed ecotypes: a comparative study. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 312–318, 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M. M.; CADDEN, S. W. Animals models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEJA, K. B.; CZACZYK, K. The industrial potential of herbs and spices - a mini review. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 15, n. 4, p. 353–368, 2016.

LIMA, B. et al. Essential oils of medicinal plants from the central Andes of Argentina: Chemical composition, and antifungal, antibacterial, and insect-repellent activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 5, p. 924–936, 2011.

MACEDO, E. M. A. et al. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 7, p. 1–10, 2016.

MACEDO, E. M. A. et al. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 7, p. 1–10, 2016.

MACIEL, M. A. M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCIAL, G. et al. Intraspecific variation in essential oil composition of the medicinal plant *Lippia integrifolia* (Verbenaceae). Evidence for five chemotypes. **Phytochemistry**, v. 122, p. 203–212, 2015.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. et al. Acaricidal Effect of Essential Oils From *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 822–827, 2011.

- MARTINS, E. R.; *et al.* **Plantas Mediciniais**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 220 p.
- MARX, H. E. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American journal of botany**, v. 97, n. 10, p. 1647–63, 2010.
- MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 12, p. 138-142.
- MAYNARD, L. G. *et al.* Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. **Indian journal of pharmacology**, v. 43, n. 6, p. 694–8, 2011.
- MCNAMARA, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 30, 2007.
- MELLO, R. D.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anesthesia**, v. 101, p 8-16, 2008.
- MELO, J. O. de. *et al.* Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 110–115, 2013.
- MENDES, S. S., *et al.* Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.
- MENEZES, L. R. A. *et al.* A new source of (R)-limonene and rotundifolone from leaves of *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) and their trypanocidal properties. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 6, p. 737–739, 2014.
- MENEZES, L. R. A. *et al.* A new source of (R)-limonene and rotundifolone from leaves of *Lippia pedunculosa* (Verbenaceae) and their trypanocidal properties. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 6, p. 737–739, 2014.
- MEVY, J. P. *et al.* Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 682–685, 2007.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, n.1, p.1-164, Jan. 1999.
- MILLER, *et al.* Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 130, p. 283–309, 2011.
- MISHRA, D. *et al.* Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 11, p. 1297–301, 2010.

MOILANEN, L.J. et al. TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. **Science Reports**, v.2, p. 380 2012; 2: 380

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 378–382, 2007.

MORI, S.A. *et al.* **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. Ilhéus: CEPEC/CEPLAC, 1989.

MOTA, M. L. et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. **Planta Medica**, v. 78, n. 7, p. 658–664, 2012.

MUNIR, A. A. A taxonomic revision of the genus *Lippia* [Houst. Ex] Linn. (Verbenaceae) in Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Garden**, v. 14, n. 2, p. 133–168, 1982.

NASCIMENTO, A. M. D. et al. Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopi*a *laevigata*, *Xylopi*a *frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Neotropical Entomology**, 2016.

NASCIMENTO, A. M. D. et al. Repellency and Larvicidal Activity of Essential oils from *Xylopi*a *laevigata*, *Xylopi*a *frutescens*, *Lippia pedunculosa*, and Their Individual Compounds against *Aedes aegypti* Linnaeus. **Neotropical Entomology**, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

O'LEARY, N. et al. Evolution of morphological traits in Verbenaceae. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 11, p. 1778–1792, 2012.

OECD. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure. v. 420, n. December, p. 1–14, 2001.

OHNO, T. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v. 8, n. 3, p. 207–215, 2003.

OLIVEIRA, Ariana Reis Messias Fernandes de. Morfoanatomia, composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécies nativas de *Lippia*. 2014. 114 f. Tese (Doutorado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236–240, 2006.

OMBITO, J. O. et al. A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 460–466, 2014.

PALHARES, R. M. et al. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–29, 2015.

PARADA, C.A. et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n.4, p.937–944, 2001.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 1, p. 55-69, 2009.

PEIXOTO, M. G. et al. Acaricidal activity of essential oils from *Lippia alba* genotypes and its major components carvone, limonene, and citral against *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 118–122, 2015.

PEREIRA, S. L. S. et al. Clinical effect of a gel containing *Lippia sidoides* on plaque and gingivitis control. **European Journal of Dentistry**, v. 7, 2013.

PIETROVSKI, E. F.; et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

PROBST, I. A., Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico. Botucatu, 2012. (Dissertação de Mestrado).

PULTRINI, A.M.; GALINDO, L.A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Science**, v. 78, p. 1720-1725, 2006.

QUINTANS, J. DE S. S. et al. Antinociceptive effect of *Aristolochia trilobata* stem essential oil and 6-methyl-5-hepten-2yl acetate, its main compound, in rodents. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 0, n. 0, 2017.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. **Pharmaceutical biology**, v. 49, n. 6, p. 583–586, 2011.

RANDALL, L. O., & SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, v. CXI, p. 409–419, 1957.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

RANG, H. P; DALE, M. M. **Rang & Dalle Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2011.

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

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.

RIELLA, K. R. *et al.* Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology** 143 656-663, 2012.

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 10A, p. 43D-49D, 22 May 2008.

RIVERO-CRUZ, I. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial and Spasmolytic Properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* Essential Oils. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. 309–317, 2011.

ROCCA, V. L. *et al.* Geraniol Induces Anti-nociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 2016.

SAH, S. P.; MATHELA, C. S.; CHOPRA, K. Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichii* DC chemotype (patchouli alcohol) in experimental animal models. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 289–293, 2010.

SALIMENA, F.; FRANÇA, F. & SILVA, T.R.S. Verbenaceae. In:Giulietti, A.M.; Rapini, A.; Andrade, M.J.G.; Queiroz, L.P. & Silva, J.M.C. (orgs.). Plantas Raras do Brasil. Conservação Internacional. Belo Horizonte, Minas Gerais. Pp. 399-405, 2009.

SALIMENA, F.R.G. *et al.* Verbenaceae. In: G. Martinelli & M.A. Moraes (orgs.). Livro Vermelho da Flora do Brasil. CNCFLOA. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, p. 1010-1016, 2013.

SALIMENA, F.R.G. *et al.* Verbenaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015 Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. Acesso em: 04 Jan. 2017.

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. *Lippia*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21433>>. Acesso em 10 mar. 2016.

SALIMENA, F. R. G.; MÚLGURA, M. E. M. A. Notas sobre o gênero *Lippia* (verbenaceae) no Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 45-49, 2015b.

SALIMENA, F.R.G.; MULGURA, M. *Lippia*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015c. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15170>> Acesso em: 04 jan 2017.

SALIMENA, F.R.G. *Stachytarpheta*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15189>>. Acesso em: 04 jan 2017.

SAMPAIO, E.V.S.B. Caracterização da caatinga e fatores ambientais que afetam a ecologia das plantas lenhosas. In: SALES, V.C. (Ed.). **Ecosistemas brasileiros: manejo e conservação**. Fortaleza, Expressão Gráfica e Editora, 2003.

SANTOS, I. G. de A. et al. Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 535–540, 2015.

SARMENTO-NETO, J. F. et al. Analgesic potential of essential oils. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1–29, 2016.

SHARMA, S. B.; GUPTA, R. Drug Development from Natural Resource: A Systematic Approach. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 52–57, 2015.

SIANI, A. C. et al. Óleos Essenciais. Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 2000.

SILVA, F. S. 2012. Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae). Tese de Doutorado (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana Bahia. 143 fl.

SILVA, F. S. et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, p. 25–34, 2016.

SILVA, M. G. et al. Investigação do efeito analgésico central e antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 533-537, 2005.

SILVA, R.O. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of myrtenol, a plant derived monoterpene alcohol, in mice. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, p. 184–92, 2014.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. et al. β -Cyclodextrin Complex Containing *Lippia grata* Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice - Evidence of Possible

Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, n. 2, p. 188–196, 2014.

SMITH-HALL, C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, p. 43, 2012.

SOARES, B. V. et al. Antiparasitic activity, histopathology and physiology of *Colossoma macropomum* (tambaqui) exposed to the essential oil of *Lippia sidoides* (Verbenaceae). **Veterinary Parasitology**, v. 234, p. 49–56, 2017.

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

SORO, L. C. et al. 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.

SOUSA, D.G. et al. Essential oil of *Lippia alba* and its main constituent citral block the excitability of rat sciatic nerves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n.8, p. 697-702, 30 Jun. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2012.

SUN, L. et al. The essential oil from the twigs of *Cinnamomum cassia* Presl alleviates pain and inflammation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. October, p. 904–912, 2016.

TELES, S et al. *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products** n. 60, p. 217–225, 2014.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential Oil Constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae) - A Literature Review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471–485, 1996.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TJØLSEN, A. et al. The increasing-temperature hot-plate test: An improved test of nociception in mice and rats. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 25, n. 3, p. 241–250, 1991.

TOMAZONI, E. Z. et al. In vitro antifungal activity of four chemotypes of *Lippia alba* (Verbenaceae) essential oils against *Alternaria solani* (Pleosporaceae) isolates. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 2, p. 999–1010, 2016.

TOMIĆ, M. et al. Antihyperalgesic and antiedematous activities of bisabolol-oxides-rich matricaria oil in a rat model of inflammation. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 5, p. 759–766, 2014.

TREEDE, R.D. et al. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Progress Neurobiology**, v. 38, p. 397–421, 1992.

VENANCIO, A. M. et al. Chemical composition, acute toxicity, and antinociceptive activity of the essential oil of a plant breeding cultivar of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Planta Medica**, v. 77, n. 8, p. 825–829, 2011.

VERAS, H. N. H. et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* cham: Possible mechanism of action. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 2, p. 179–185, 2012.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969.

VINERGAR, R.; SCHREIBER W, HUGO R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96–103, 1969.

WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Journal of Neuropharmacology**, v. 3, p. 369 –378, 1964.

WHO (World Health Organization). Monographs on selected medicinal plants . Geneva, v. 1, 1999, 295p.

WHO (World Health Organization). The World Traditional Medicines Situation. In: **Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges**. Geneva, v. 3, p. 1–14, 2011.

WINER, B.J., BROWN, D.R, MICHELIS, K.,M. **Statistical principles in experimental design**. 3rd.ed. New York: McGraw Hill; p.100-65, 1991.

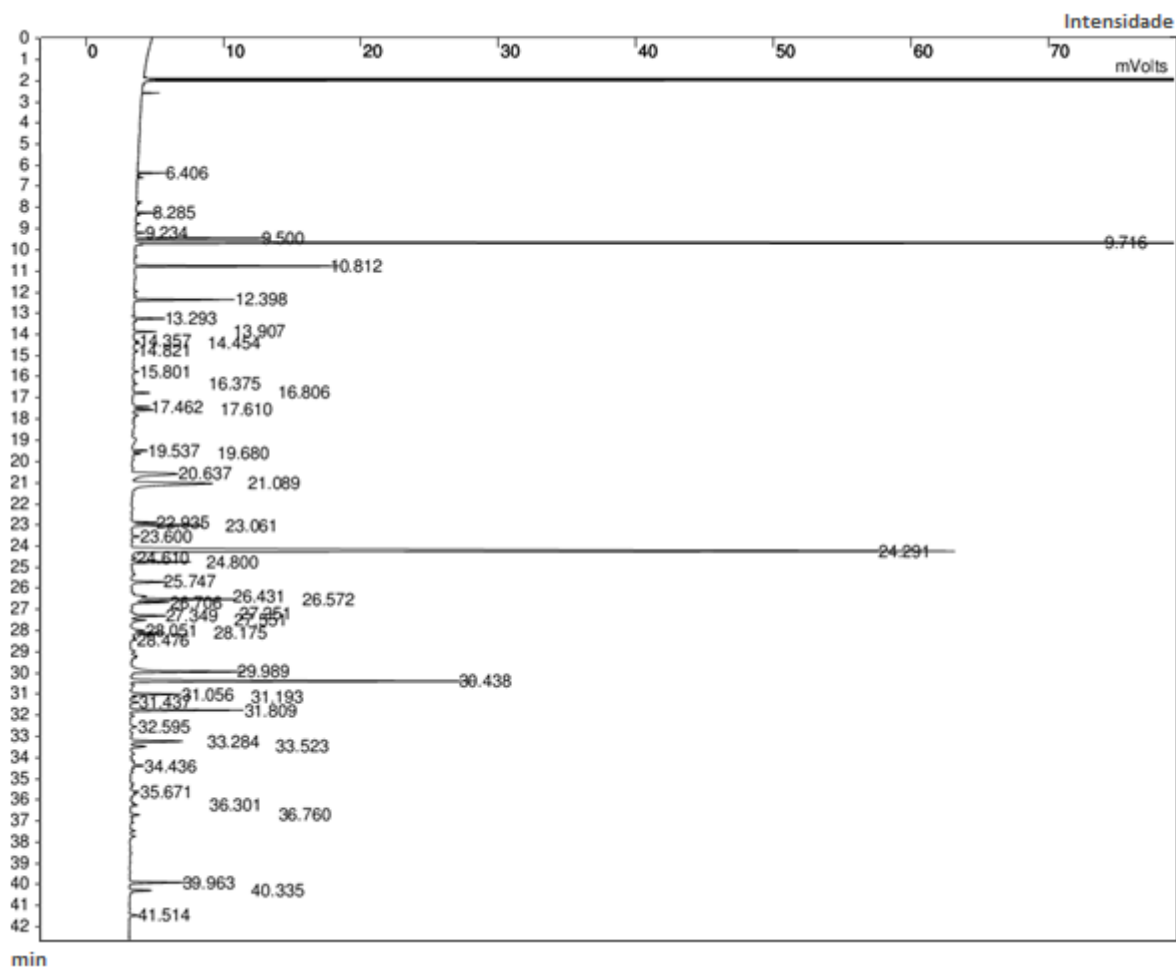
WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544- 547, 1962.

WOOLFE, G.;MacDONALD, A.L. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300–307, 1944.

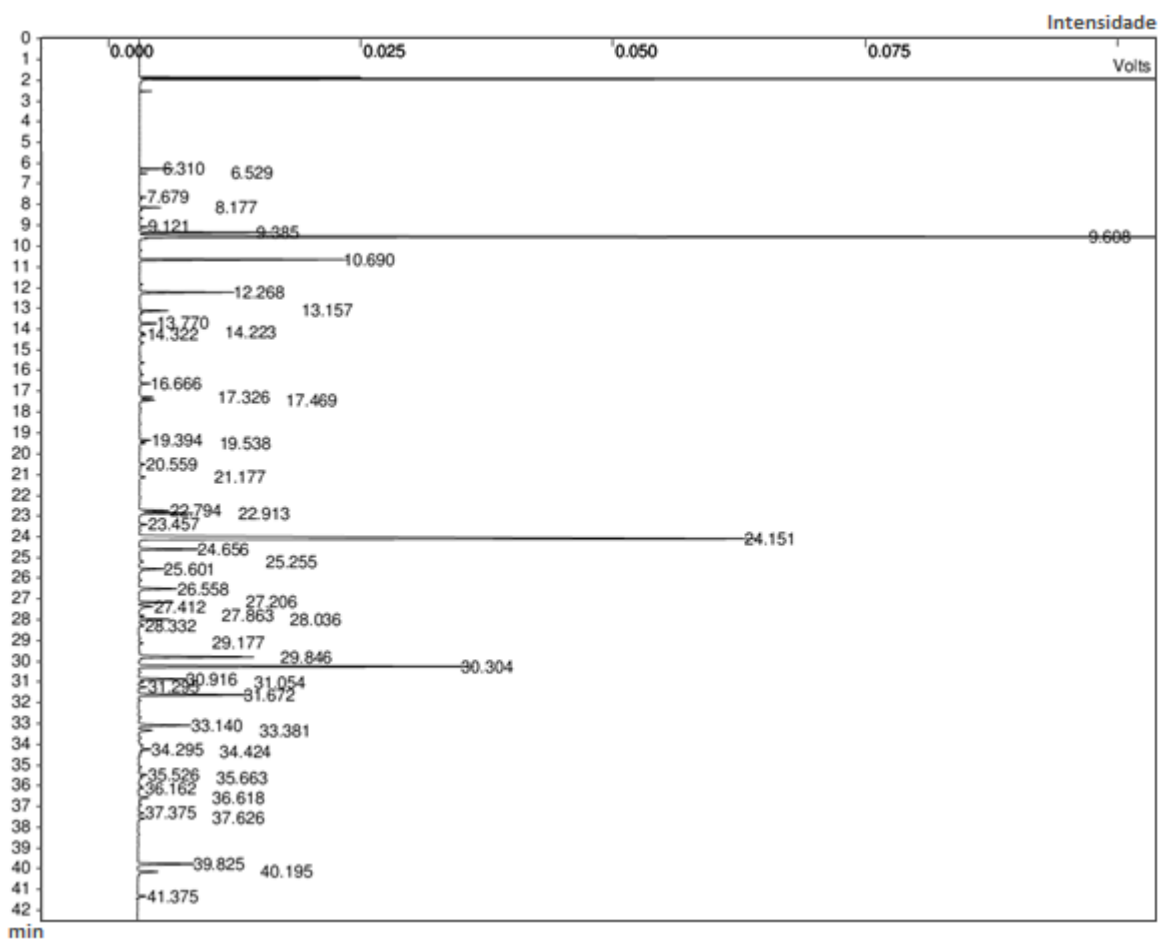
XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 70, n.5-6, p. 129-137, 2015.

APÊNDICE A - Perfil cromatografico dos óleos essenciais de *L. bromelyana* obtido por CG/DIC

A10ELB



A2OELB



A3OELB

