



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

E QUÍMICA MEDICINAL

**AVALIAÇÃO DO PERFIL
ANTI-INFLAMATÓRIO AGUDO DE
*Lippia origanoides***

GABRIELLA DOS SANTOS MARINHO FIGUEIREDO

RIO DE JANEIRO

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
E QUÍMICA MEDICINAL

AVALIAÇÃO DO PERFIL
ANTI-INFLAMATÓRIO AGUDO DE
Lippia origanoides

GABRIELLA DOS SANTOS MARINHO FIGUEIREDO



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Avaliação do perfil anti-inflamatório agudo de *Lippia origanoides*

Gabriella dos Santos Marinho Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

Prof. Dra. Giselle Fazzioni Passos

Prof. Dra. Josiane Sabbadini Neves

Profa. Dr. Leandro Miranda-Alves

Prof. Dr. Jorge Luis Mendonça Tributino (Revisor)

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

RIO DE JANEIRO
Março de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Figueiredo, Gabriella dos Santos Marinho

Avaliação do perfil anti-inflamatório agudo de *Lippia origanoides* / Gabriella dos Santos Marinho Figueiredo. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015.

xvi, 95 f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f 75

1. *Lippia origanoides*
 2. Produtos naturais
 3. Plantas medicinais
 4. Inflamação
 5. Migração celular.
- I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai maior, amigo, protetor, porto-seguro, sabe de tudo no meu coração, unipresente em todos os momentos da minha vida!

Aos meus amados pais! Por tantas e tantas renúncias, pelo exemplo, pela preocupação, pelo incentivo, pela educação, pelo apoio e amor incondicionais... É muito bom deixar vocês felizes! Agradeço a Deus por isso! Vocês me fazem ir mais longe!

À minha irmã! Ver que você se orgulha de mim me deixa muito feliz! Eu te amo muito e agradeço pela amizade, pela paciência, pelo apoio, pela doçura, pelo carinho, pela torcida... Não só ao longo desses dois anos, mas da vida inteira! Você é um exemplo pra mim!

Ao meu vizinho e vizinha. Mesmo não entendendo quando eu tentava explicar tantas e tantas vezes: “- tô fazendo mestrado, vô!” ou “- meu mestrado e o laboratório são a mesma coisa, vizinha, eu vou pro laboratório pra fazer a pesquisa do mestrado!”, sempre se orgulhavam ao me ver estudando. Que Deus sempre me dê forças e também vida e saúde a vocês para que possamos ter infinitos bons momentos. Amo vocês!

Ao meu namorado, amigo e incentivador. Você me dá sorte, me faz pensar grande e me faz sentir capaz e pensar positivamente! Obrigada pelo carinho, amizade, por me fazer uma pessoa melhor!

À minha orientadora Patricia Dias Fernandes, sem a qual eu não estaria realizando esta conquista! Pelos esclarecimentos, pela curiosidade, por todos os momentos e por me dar o norte quando eu perdia a direção, achando que nada ia dar certo, que não ia dar tempo!!! Muito obrigada por ter me recebido no lab e pelo apoio em tantos momentos!

A todos os que fazem parte do LaFDI, Alan, Andrea, Carol, Faby, Jota, Lala, Milena, Natália, Paty e Tatá. Para cada um guardo um agradecimento especial. Sou grata por ter conhecido e convivido com todos vocês, com os quais pude aprender muitas coisas! Lala e Jota, vocês fizeram a diferença nestes momentos finais... Obrigada pelos ouvidos e por todo o carinho! E aos que já passaram pelo lab e fizeram parte da minha vida

durante a pós: Carlinha, Mariana e Stephanie. A todos, agradeço pelos bons momentos, pelas risadas, ajudas, e por terem feito o dia-a-dia mais leve! Valeu, pessoal!!!

Às professoras Dra. Suzana Guimarães Leitão e Dra. Gilda Guimarães Leitão, pela doação dos extratos – ferramentas para a realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Giselle Fazzioni Passos, Dra. Josiane Sabbadini Neves e Dr. Leandro Miranda-Alves pela participação na banca examinadora.

Ao professor Dr. Jorge Luis Mendonça Tributino por aceitar prontamente em ser revisor do meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. Sou muito orgulhosa por ter estudado com aqueles que considero verdadeiros mestres!

Ao funcionário do nosso biotério, Jorge, por cuidar dos nossos animais e ser sempre solícito.

Aos funcionários do ICB que sempre estiveram prontos em me atender.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, instituição na qual me orgulho de ter estudado e da qual guardo um grande carinho e respeito.

Ao Instituto Vital Brazil pela doação dos animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelos auxílios financeiros concedidos ao laboratório.

RESUMO

Avaliação do perfil anti-inflamatório agudo de *Lippia origanoides*

Gabriella dos Santos Marinho Figueiredo

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Lippia origanoides Humboldt Bonpland Kunth (*L. origanoides*) é um arbusto aromático conhecido como “salva-de-marajó”. As partes aéreas são utilizadas para tratar problemas gastrointestinais e por parteiras de Oriximiná (PA, Brasil) para tratar sangramentos pós-parto (“para limpar a mulher por dentro”) e outras inflamações uterinas. Embora existam dados etnofarmacológicos, não há evidências científicas sobre os mesmos. Este trabalho visa, portanto, avaliar, em modelos de inflamação, os efeitos do extrato etanólico (EB) das folhas de *Lippia origanoides* e também de uma mistura de flavonoides (MF), isolada do EB. Um *voucher* (CESJ39532) encontra-se depositado no herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora/Brasil. As folhas foram secas, trituradas e extraídas por maceração com etanol (EB). A MF foi obtida a partir do EB através de cromatografia de contra corrente. O efeito anti-inflamatório foi avaliado no modelo da lambadura de pata induzida por formalina, no qual os extratos reduziram a resposta de lambadura na fase inflamatória. Nenhum efeito sobre a atividade locomotora foi observado para EB ou MF. No modelo da bolsa de ar subcutânea (BAS), os extratos reduziram a migração leucocitária. Além disso, o EB reduziu o extravasamento de proteínas plasmáticas, os níveis de TNF- α , óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS, 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no exsudato. A MF foi capaz de reduzir o extravasamento de proteínas plasmáticas, os níveis de TNF- α (5 mg/kg e 10 mg/kg), IL-1 β e IL-10, além da produção de NO e ROS (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Assim, concluímos que *L. origanoides* possui efeitos anti-inflamatórios e a MF pode contribuir para este efeito.

Palavras-chave: 1. *Lippia origanoides* 2. Produtos naturais 3. Plantas medicinais 4. Inflamação 5. Migração celular

**Rio de Janeiro
Janeiro de 2015**

ABSTRACT

Evaluation of the acute anti-inflammatory profile of *Lippia origanoides*

Gabriella dos Santos Marinho Figueiredo

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Abstract da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Lippia origanoides Humboldt Bonpland Kunth (*L. origanoides*) is an aromatic shrub known as “salva-do-marajó”. The aerial parts are used to treat gastrointestinal and respiratory problems and by Oriximiná (PA, Brazil) midwives to treat postpartum bleeding (“to clean woman inside”) or women inflammation. Although there are Ethnobotanical data, there is no scientific evidence about these informations. In this regard, this work aimed to evaluate the effects of ethanolic extract, from the leaves of *L. origanoides* (collected at Embrapa Amazônia Ocidental), beyond the effects of a flavonoids mixture (MF), isolated from the extract, in models of inflammation. A voucher (CESJ39532) is deposited at herbarium of Federal University of Juiz de Fora/Brazil. Leaves were dried, triturated and extracted by maceration with ethanol (EB) in order to prepare the ethanolic extract. MF was obtained from the EB by countercurrent chromatography. Anti-inflammatory effect was evaluated in the formalin test, in which the extracts reduced the licking response during the inflammatory phase. We didn't observe any effects on the locomotor performance for both extracts. In the subcutaneous air pouch (SAP), the extracts reduced the leukocyte migration. Still in SAP, the EB was capable to reduce plasma protein leakage and TNF- α exsudate levels, besides nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). With respect to MF, it was also capable to reduce plasma protein leakage, TNF- α (5 mg/kg and 10 mg/kg), IL-1 β and IL-10 exsudate levels. NO levels were also reduced, besides ROS (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). In this way, we concluded that *L. origanoides* has anti-inflammatory effects and the MF obtained from it may contribute to these effects.

Keywords: 1. *Lippia origanoides* 2. Natural products 3. Medicinal plants 4. Inflammation 5. Cell migration

**Rio de Janeiro
Março de 2015**

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Esquemas	xiii
Lista de Gráficos	xiv
Lista de Abreviaturas	xvi

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Processo inflamatório.....	2
1.2 Vasodilatação e exsudação.....	3
1.3 Migração leucocitária	4
1.4 Mediadores inflamatórios.....	7
1.4.1 Classificação dos mediadores inflamatórios e suas ações.....	7
1.5 Espécies reativas de oxigênio.....	11
1.6 Óxido nítrico.....	12
1.7 Tratamento do processo inflamatório.....	14
1.8 Plantas medicinais: alternativas para novas terapias.....	16
1.9 <i>Lippia origanoides</i> Humboldt, Bonpland e Kunth.....	17
1.9.1 Constituição química.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Material vegetal	24
3.2 Extrato etanólico de <i>Lippia origanoides</i>	24
3.3. Mistura de flavonoides.....	24
3.4. Reagentes.....	24
3.5 Preparo das soluções.....	25
3.6 Preparo e administração do EB, MF e fármacos controles.....	27
3.7 Animais.....	27
3.8 Modelo da lambadura de pata induzida por formalina.....	28
3.9 Avaliação do desempenho locomotor através do modelo de <i>rotarod</i>	29

3.10 Modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	29
3.10.1 Contagem total de leucócitos na medula, no sangue e no exsudato.....	31
3.10.2 Dosagem de proteína.....	31
3.10.3 Dosagem de óxido nítrico.....	31
3.10.4 Dosagem de citocinas.....	32
3.11 Determinação da redução de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	33
3.12 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Efeito anti-inflamatório do extrato bruto e da mistura de flavonoides de <i>Lippia origanoides</i> no modelo da lambadura de pata induzida por formalina....	35
4.2 Efeito anti-inflamatório do extrato bruto e da mistura de flavonoides de <i>Lippia origanoides</i> na avaliação do desempenho locomotor (<i>rotarod</i>).....	37
4.3 Efeito anti-inflamatório do extrato bruto e da mistura de flavonoides de <i>Lippia origanoides</i> no modelo da bolsa de ar subcutânea.....	39
4.3.1 Migração de células.....	39
4.3.2 Quantificação de proteínas totais	43
4.3.3 Quantificação de óxido nítrico.....	46
4.3.4 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10).....	48
4.4. Dosagem de espécies reativas de oxigênio	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sinais canônicos da inflamação	2
Figura 2: Eventos e ações da migração leucocitária.....	5
Figura 3: Cinética celular da resposta inflamatória aguda.....	6
Figura 4: Síntese de prostanoídes e leucotrienos.....	8
Figura 5: Amplificação da resposta inflamatória por ROS	12
Figura 6: Relaxamento vascular mediado pelo óxido nítrico.....	13
Figura 7: <i>L. origanoides</i> H.B.K.	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Avaliação do desempenho locomotor.....	38
---	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Protocolo do modelo de lambedura de pata induzida por formalina.....	28
Esquema 2: Protocolo do modelo de avaliação da atividade locomotora (<i>rotarod</i>).....	29
Esquema 3: Protocolo do modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea.....	30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , no modelo da lambadura de pata induzida por carragenina.....	36
Gráfico 2: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , no modelo da lambadura de pata induzida por carragenina.....	37
Gráfico 3: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	40
Gráfico 4: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	41
Gráfico 5: Efeito do extrato bruto (EB) e da mistura de flavonoides (MF) sobre a contagem de leucócitos na medula.....	42
Gráfico 6: Efeito do extrato bruto (EB) e da mistura de flavonoides (MF) sobre a contagem de leucócitos no sangue.....	43
Gráfico 7: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	44
Gráfico 8: Efeito da mistura de flavonoide (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	45
Gráfico 9: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de óxido nítrico (NO) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	47
Gráfico 10: Efeito da mistura de flavonoide (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de óxido nítrico (NO) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	48
Gráfico 11: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	49

Gráfico 12: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de interleucina-1 β (IL-1 β) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	50
Gráfico 13: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de interleucina-10 (IL-10) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	51
Gráfico 14: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	53
Gráfico 15: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de interleucina-1 β (IL-1 β) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	54
Gráfico 16: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de <i>Lippia origanoides</i> , na produção de interleucina-10 (IL-10) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS).....	55
Gráfico 17: Efeito do extrato bruto (EB) ou da mistura de flavonoides (MF) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
±	Mais ou menos
5HT	Serotonina
AA	Ácido aracdônico
AAS	Ácido acetil salicílico
AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
ATT	<i>American type culture collection</i>
BAS	Bolsa de ar subcutânea
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
Ca²⁺	Íon cálcio
CESJ	Herbário Leopoldo Kieger
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa
CO₂	Dióxido de carbono
COBEA	Consciência pelo bem-estar animal
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
COXibes	Inibidores seletivos da ciclo-oxigenase 2
D	Dexametasona
d.p.	Desvio padrão
DAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
DCF-DA	Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FT	Fator tecidual

GC	Glicocorticoide
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofostato cíclico de guanosina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GTP	Trifosfato de guanosina
H	Horas
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₃PO₄	Ácido fosfórico
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão endotelial intercelular-1
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1β
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPPN	Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
L-NAME	L-nitro-arginina-metil-éster
<i>L. origanoides</i>	<i>Lippia origanoides</i> Humboldt, Bonpland e Kunth
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos
MF	Mistura de flavonoides
Mg	Miligramas
MG	Minas gerais
mg/kg	Miligramas por quilo
mg/mL	Miligramas por mililitro
Min	Minutos
mL	Mililitros

mM	Milimolar
N	Normal
n	Número da amostra
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NET	Rede extracelular de neutrófilos
NFκB	Fator nuclear-κb
NH₄HCO₂	Formiato de amônio
NK	Células <i>natural killer</i>
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂⁻	Ânion superóxido
°C	Grau Celsius
OH[•]	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.A.	Princípio ativo
p/v	Peso/volume
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato-salina
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotélio/plaqueta-1
PG	Prostaglandina
pg/mL	Picograma por mililitro
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaglandina I ₂
pH	Potencial hidrogeniônico

PLA₂	Enzima fosfolipase A ₂
PMA	Forbol miristato acetato
q.s.p.	Quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotações por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TFCP	Tampão fosfato citrato com perborato
TMB	Tetra-metil-di-hidrocloreto de benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TxA₂	Tromboxano A ₂
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
ZnSO₄	Sulfato de zinco
Mg	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processo inflamatório

A inflamação pode ser definida como uma resposta não específica do sistema imune ao desequilíbrio homeostático, tendo como objetivo a detecção e eliminação dos fatores responsáveis por este desequilíbrio (Freire e Van Dyke, 2013; Ashley e cols., 2012). Esta resposta compreende quatro componentes: o agente indutor da inflamação (bacteriano; viral; parasitário; danos estéreis, causados por agentes físicos, químicos ou por estresse tecidual), os sensores que o detectam, os mediadores inflamatórios induzidos por estes sensores e os tecidos alvos que são afetados por tais mediadores na tentativa de restaurar a homeostasia (Okin e Medzhitov, 2012).

Uma vez desencadeado, o processo inflamatório agudo promove o aparecimento dos chamados sinais canônicos da inflamação (Figura 1) – rubor, edema, calor e dor –, observados primeiramente por Cornelius Celsius, no século I a.C. Mais tarde, no século IX, Augustus Waller e Julius Cohnheim conceituaram fisiologicamente estes sinais, ao relatarem a emigração de leucócitos a partir dos vasos sanguíneos e outras alterações vasculares agudas, como vasodilatação e extravasamento de plasma. Ainda no século IX, Rudolph Virchow adicionou o quinto sinal cardinal, presente nos eventos agudos e crônicos, conhecido como distúrbio da função (Medzhitov, 2010).

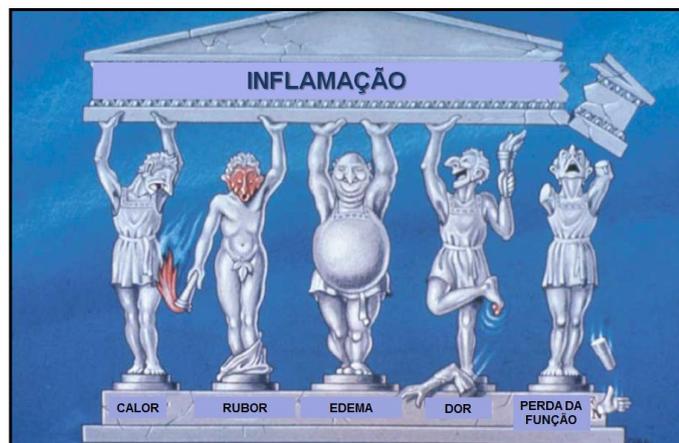


Figura 1: Sinais canônicos da inflamação (adaptado de Lawrence e cols., 2002).

O sucesso da resposta inflamatória aguda resulta não só da neutralização da causa da injúria, mas de uma fase de resolução que reverte os eventos celulares e vasculares, promove a produção de mediadores de resolução, diminui a produção de citocinas e o infiltrado leucocitário, além de controlar a apoptose de células e a fagocitose (Alessandri e cols., 2013). Se o processo de resolução falha, o dano persiste e pode resultar em inflamação crônica, caracterizada, dentre outros eventos, pela substituição de neutrófilos por macrófagos e outras células imunes (Ashley e cols., 2012). Estas desordens crônicas são caracterizadas por uma duração prolongada (semanas, meses ou anos) em que uma inflamação ativa, destruição e tentativas de reparo tecidual estão ocorrendo simultaneamente (Kumar e cols., 2012).

1.2 Vasodilatação e exsudação

A vasodilatação é mediada por substâncias como óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), histamina, bradicinina e neuropeptídeos. Este evento é responsável por aumentar o fluxo sanguíneo no local da injúria, resultando em calor e rubor, e por facilitar a chegada de mediadores solúveis e células inflamatórias (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Granger e Senchenkova, 2010).

Com a dilatação dos vasos e maior fluxo sanguíneo no local, há elevação da pressão hidrostática no interior dos capilares que, somada ao aumento da permeabilidade dos vasos – devido à retração das células endoteliais e modificação de suas propriedades de barreira (causado por substâncias liberadas durante o processo inflamatório, como substância P, componentes do complemento, leucotrienos, bradicinina e outros mediadores inflamatórios), promovem o fluxo transvascular de proteínas do plasma, fluidos do sangue e outros componentes intravasculares, originando o exsudato, observado como um edema local. O extravasamento destes

componentes resulta em diminuição da pressão oncótica intravascular, favorecendo o processo (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Alessandri e cols., 2013).

1.3 Migração leucocitária

Além dos eventos vasculares, a inflamação também é caracterizada pela migração leucocitária, sendo os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares) o primeiro e mais abundante tipo celular a chegar ao local da injúria. Estas células são recrutadas, inicialmente, por conta de alterações na superfície do endotélio, provocadas por moléculas oriundas de patógenos e/ou um gradiente de mediadores inflamatórios liberados por células sentinelas, como macrófagos e mastócitos residentes. Caracterizam-se por possuírem grânulos citoplasmáticos contendo proteínas pró-inflamatórias e enzimas proteolíticas. Além disso, os neutrófilos também contêm vesículas secretoras, que podem ser facilmente recrutadas até a membrana plasmática. Tais vesículas, por sua vez, são preenchidas de moléculas necessárias à adesão e transmigração deste tipo celular (Kolaczowska e Kubes, 2013).

Antes de efetivamente alcançarem o ambiente inflamado extravascular, é necessário que estas células migrem do centro do fluxo sanguíneo para a periferia dos vasos, caracterizando o processo de marginação. Em seguida, inicia-se o processo de rolamento, um movimento rotacional dos leucócitos pela parede do vaso. Tanto a marginação quanto o rolamento são interações fracas leucócito-endotélio e dependentes de glicoproteínas chamadas selectinas (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). Existem três tipos de selectinas, incluindo L-selectina, E-selectina e P-selectina, sendo a primeira encontrada na superfície de leucócitos. Já nas células endoteliais são encontradas as P-selectinas. Este é o subtipo expresso em maior proporção na superfície do endotélio

durante o processo inflamatório e é substituído temporalmente pelas E-selectinas (Kelly e cols., 2007)

Com o progresso do rolamento, tais células interagem com selectinas, citocinas, quimiocinas e produtos de patógenos. Isto resulta na expressão de integrinas da família β_2 na superfície dos neutrófilos, permitindo o desenvolvimento de uma interação de alta afinidade com moléculas de adesão intercelular (ICAM-1, do inglês, *endothelial intercellular adhesion molecule-1*) expressas pelo endotélio. Esta interação mais forte e o estímulo quimiotático contínuo são importantes para que ocorra a migração destas células através do endotélio (Amulic e cols., 2012) (Figura 2). Uma vez ativados e presos ao endotélio, os neutrófilos iniciam a transmigração. Este processo ocorre através de junções entre as células endoteliais, por meio da via paracelular ou transcelular (Sadik e cols., 2011). A via transcelular é mediada por moléculas de adesão endotélio-plaqueta (PECAM-I, do inglês, *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), expressas tanto na superfície dos neutrófilos, quanto na superfície lateral do endotélio. À medida que estas moléculas se ligam umas às outras, a interação entre integrinas e ICAM-I fica mais fraca e, assim, a diapedese é favorecida (Sherwood e cols., 2004); já a via paracelular é caracterizada quando os neutrófilos se “espremem” em movimentos ameboides por entre as junções das células endoteliais (Muller, 2014).

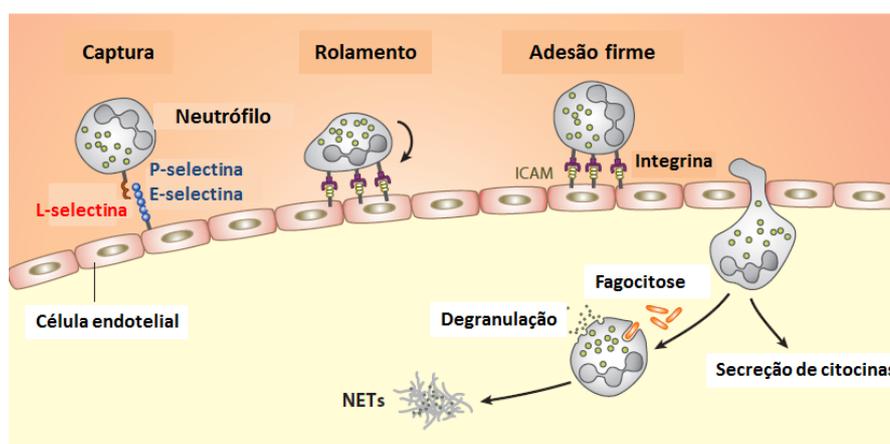


Figura 2:Eventos e ações da migração leucocitária (adaptado de Amulic e cols., 2012).

No caso de um dano estéril, os neutrófilos auxiliam na remoção de células mortas e debris, além de secretarem citocinas e quimiocinas que promovem *upregulation* de moléculas de adesão, favorecendo o recrutamento celular (Chen e Nuñez, 2010). Na infecção, os neutrófilos podem eliminar os patógenos através de fagocitose, degranulação de vesículas contendo enzimas proteolíticas ou imobilização dos patógenos através de redes extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês, *neutrophil extracellular traps*) (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

Com o progresso da resposta inflamatória aguda, os neutrófilos deixam de ser predominantes e são gradualmente substituídos por monócitos (Figura 3). No tecido, estas células se diferenciam em macrófagos e são responsáveis por promover a fagocitose de restos celulares e patógenos, além de liberarem substâncias a fim de combatê-los (Lawrence e cols., 2002). Existem evidências *in vivo* de que nos casos de inflamação estéril, os neutrófilos que uma vez migraram para o sítio inflamado podem retornar à vasculatura (Kolaczkowska e Kubes, 2013).

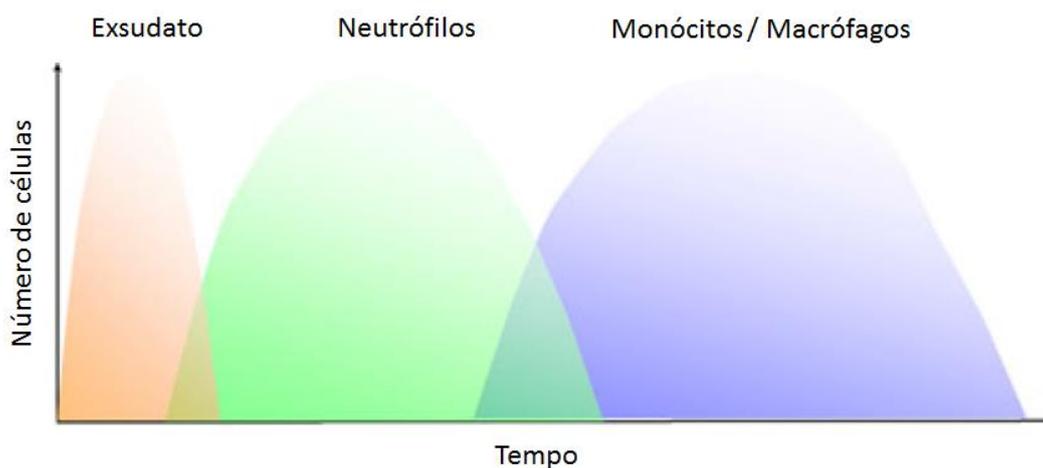


Figura 3: Cinética celular da resposta inflamatória aguda (adaptado de Freire e Van Dyke, 2013).

1.4 Mediadores inflamatórios

Durante o processo inflamatório, o tecido inflamado, leucócitos e demais células presentes no local da injúria produzem mediadores inflamatórios que atuarão sobre os tecidos e órgãos, gerando estímulos pró e anti-inflamatórios. Estas moléculas podem ser encontradas no interior dos tipos celulares envolvidos – como histamina – ou circulando pelo plasma como precursores inativos – como fragmentos do complemento, cininas ou componentes da cascata de coagulação (Medzhitov, 2008).

Enquanto mediadores pró-inflamatórios coordenam e amplificam a resposta inflamatória, aqueles ditos anti-inflamatórios tentam reverter as alterações vasculares, controlar a migração e ativação leucocitária, além de sinalizarem para a apoptose e fagocitose das células inflamatórias (Lawrence e cols., 2002).

1.4.1 Classificação dos mediadores inflamatórios e suas ações

De acordo com as suas propriedades bioquímicas, os mediadores inflamatórios podem ser agrupados da seguinte forma: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, componentes do complemento, citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e mediadores lipídicos (Medzhitov, 2008).

As aminas vasoativas compreendem histamina – presente, dentre outros tipos celulares, em basófilos e mastócitos – e serotonina – encontrada em células enterocromafins, plaquetas e mastócitos. A histamina, a partir da degranulação de mastócitos e/ou basófilos, promove vasodilatação das arteríolas e contração do músculo liso bronquial. Nas vênulas, promove vasoconstrição, aumentando a permeabilidade do endotélio vascular. Por sua vez, a serotonina, dentre outras ações pró-inflamatórias, como a ativação de monócitos, também aumenta a permeabilidade vascular (Larsen e Henson, 1983; Qin e cols., 2013).

Os mediadores lipídicos compreendem os eicosanóides – metabólitos do ácido aracdônico (AA), produzidos a partir da clivagem deste pelas enzimas lipoxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX). A clivagem pela LOX gera as lipoxinas, que detêm ação anti-inflamatória e promovem reparo tecidual, mas também leucotrienos, que exercem ação quimiotática. Já a COX produz prostanoídes, como as prostaglandinas E₂ (PGE₂) – que promovem vasodilatação, febre, e, sinergicamente com histamina e bradicinina, atuam sensibilizando nociceptores e induzindo a formação de exsudato –, prostaciclina (PGI₂) – envolvidas na vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária – e tromboxanos (TxA₂), produzido por leucócitos e plaquetas, com efeitos opostos (Figura 4). A partir dos fosfolipídeos de membrana, além do AA, também ocorre a formação do ácido lisofosfatídico, que origina os fatores de ativação plaquetária (PAF, do inglês *platelet activating factor*). Estes mediadores são responsáveis pelo recrutamento de leucócitos, vasodilatação, vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular (Kalter, 1984; Medzhitov, 2008).

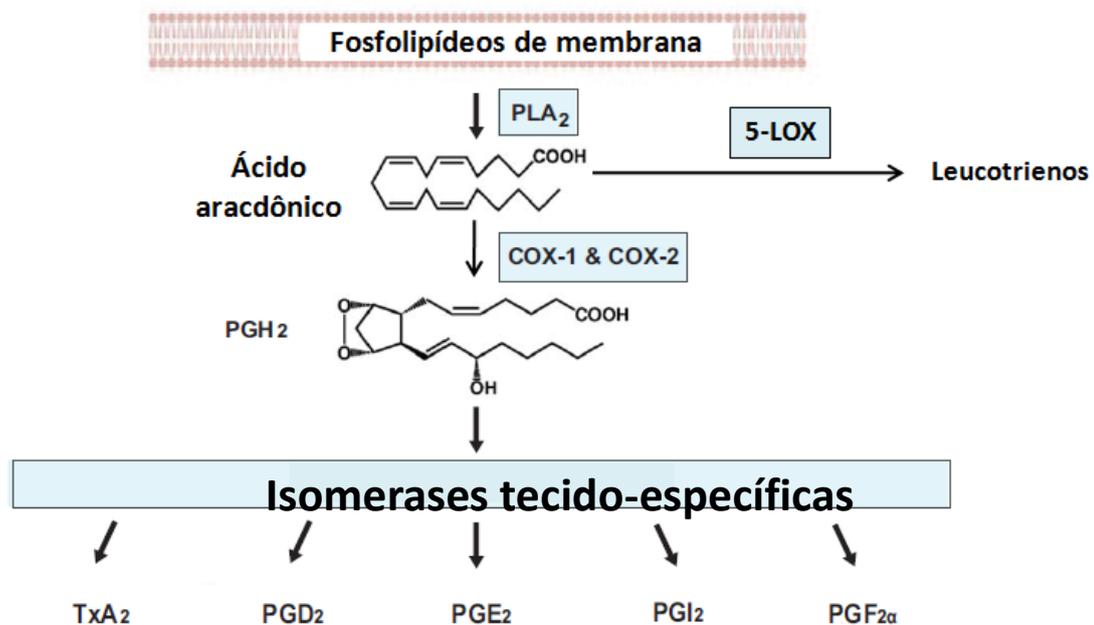


Figura 4: Síntese de prostanoídes e leucotrienos (adaptado de Ricciotti e FitzGerald, 2011).

As citocinas são moléculas proteicas, de curta meia-vida plasmática, secretadas por todas as células nucleadas mediante ativação de receptores acoplados à proteína G (GPCRs, do inglês *G protein coupled receptors*). Uma vez secretadas, podem atuar de forma autócrina, justácrina, parácrina, endócrina ou intracelular (Schimitz e cols., 2011). Dentre citocinas atuantes no processo inflamatório, podem ser citadas interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês, *tumor necrosis factor- α*) e interleucina-10 (IL-10). A família IL-1 é composta por onze citocinas, dentre as quais se destaca a interleucina-1 β (IL-1 β), cuja secreção ocorre através de diversos tipos celulares como macrófagos e neutrófilos. IL-1 β não se encontra constitutivamente expressa, sendo induzida por diversos estímulos pró-inflamatórios, como aqueles estéreis (por exemplo, células mortas) ou oriundos de patógenos. Dentre seus efeitos majoritários encontra-se a regulação positiva de mediadores inflamatórios, incluindo PGs, através da indução da expressão de COX-2 (Turner e cols., 2014; Kono e cols., 2014; Nonato e cols., 2011). TNF- α é um potente mediador inflamatório, podendo agir em sinergismo com IL-1 β . Encontra-se envolvida na indução de vias apoptóticas e não-apoptóticas, na expressão de outras citocinas pró-inflamatórias e produção de PG, na ativação das enzimas LOX e fosfolipase A2 (PLA₂, do inglês, *phospholipase A₂*), resultando na produção de AA e leucotrienos e também na migração de leucócitos (Sedger e McDermott, 2014). IL-10 é uma citocina pleiotrópica reconhecida pelo seu papel anti-inflamatório, do qual se destaca a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por macrófagos. Pode ser produzida por diversos tipos celulares, como monócitos, macrófagos, células T e mastócitos a fim de limitar a infiltração de leucócitos e o processo inflamatório de forma geral (Kotenko, 2002; Conti e cols., 2003; Akdis e cols., 2011). Alguns autores classificam as citocinas em pró ou

anti-inflamatórias. Contudo, segundo Kushner (1998), esta classificação não deve partir de uma análise individual das mesmas. Por exemplo, ainda que algumas citocinas sejam classificadas como anti-inflamatórias, são todas componentes intrínsecos de uma resposta inflamatória, onde se faz presente uma combinação de mediadores cujos efeitos dependerão do contexto em que se encontram inseridas.

As quimiocinas são uma classe de citocinas envolvidas no tráfego de células imunes, podendo uma mesma molécula atuar em mais de um receptor e este ligar mais de uma quimiocina, caracterizando uma relação de redundância (Koelink e cols., 2012). Encontram-se envolvidas tanto em funções homeostáticas, como maturação de leucócitos e a regeneração dos circulantes, quanto naquelas inflamatórias, como o recrutamento de células para as regiões inflamadas (Jin e cols., 2008).

A resposta inflamatória também é mediada por proteases plasmáticas que se encontram inter-relacionadas – o sistema complemento e peptídeos vasoativos (como alguns componentes da cascata de coagulação, fibrinopeptídeos e cininas). O sistema complemento é composto de proteínas séricas, produzidas, dentre outros, por hepatócitos, macrófagos e células epiteliais. Encontram-se envolvidas no *clearance* de patógenos e, dentre outras ações, podem regular a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, a contração do músculo liso e a quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos (Noris e Remuzzi, 2013). A ativação da cascata de coagulação também se encontra envolvida com diversos eventos no processo inflamatório. Sua ativação depende principalmente da expressão e exposição de fator tecidual pelo endotélio e monócitos ao ambiente intravascular, culminando na ativação de trombina, envolvida com a expressão de moléculas de adesão, liberação de citocinas e aumento da permeabilidade vascular. Uma vez formada, a trombina é capaz de clivar o fibrinogênio insolúvel para a formação de um coágulo de fibrina, que contribui para a adesão de

macrófagos e aumento da permeabilidade vascular (Petäjä, 2011; Kumar e cols., 2012; Popović e cols., 2012). O fator XIIa, intermediário da cascata de coagulação, é responsável por iniciar a via das cininas, culminando na produção do peptídeo vasoativo bradicinina, a partir da calicreína e do cininogênio de alto peso molecular. A bradicinina é responsável por provocar vasodilatação arteriolar e por efeitos nociceptivos – oriundos de sua capacidade de ativar nociceptores e aumentar a descarga de fibras aferentes simpáticas (Regoli e cols., 1980; Moalem e Tracey, 2006; Kumar e cols., 2012).

Dentre as enzimas proteolíticas, podem ser citadas metaloproteinases de matriz e catepsinas. Algumas de suas ações compreendem degradação de proteínas da membrana basal, remodelamento tecidual, promoção da migração leucocitária e apoptose (Medzhitov, 2008).

1.5 Espécies reativas de oxigênio

O metabolismo oxidativo, o envelhecimento de proteínas e outras reações metabólicas geram, naturalmente, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), sendo este também um mecanismo de defesa contra infecções e outras injúrias (Lópes-Armada e cols., 2013). Estas espécies são geradas a partir da redução do oxigênio e compreendem o ânion superóxido, (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\bullet). As ROS possuem elétrons desemparelhados, o que explica a sua alta reatividade, atacando componentes moleculares da célula para que consigam restituir o par de elétrons (Reczek e Chandel, 2015; Closa e Folck-Puy, 2004).

O processo inflamatório também pode ser amplificado pela geração de ROS (Figura 5). Os alvos destas espécies compreendem, por exemplo, a ativação do fator nuclear κB (NF κB , do inglês *nuclear factor κB*) e da via de MAP cinases (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinases*), envolvidos com a transcrição de genes pró-

inflamatórios; a indução da síntese de citocinas; e a ativação do endotélio, promovendo a expressão de moléculas de adesão e receptores celulares (Closa e Folck-Puy, 2004).

Diversas células inflamatórias, como neutrófilos, mastócitos e macrófagos também podem produzir ROS (Kundu e Surh, 2012). Em particular, os neutrófilos liberam estas espécies enquanto circulam e também quando se encontram aderidos ao endotélio. Os efeitos diretos das ROS incluem oxidação de proteínas, ligações cruzadas no código genético celular, peroxidação de membranas lipídicas ricas em colesterol, além de danos aos componentes da mesma, como a receptores e transportadores (Closa e Folck-Puy, 2004).

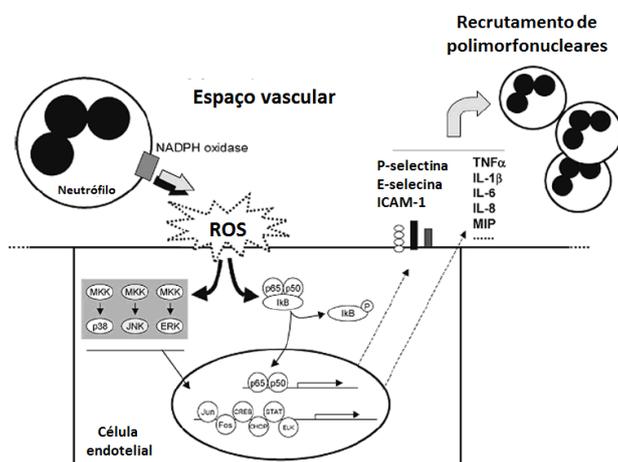


Figura 5: Amplificação da resposta inflamatória por ROS (adaptado de Closa e Folck-Puy, 2004).

1.6 Óxido nítrico

O NO é um radical livre produzido a partir da oxidação do aminoácido L-arginina pelas enzimas óxido nítrico sintases (NOS, do inglês *nitric oxide synthases*), na presença de diversos cofatores. Três subtipos de NOS já foram identificados – as constitutivas, neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), e a induzida (iNOS), inicialmente identificada em macrófagos, mas que pode ser expressa em qualquer célula ou tecido,

conquanto o estímulo inflamatório esteja presente (Lo Faro e cols., 2014; Duarte e cols., 2014).

A atividade das enzimas nNOS e eNOS é dependente de cálcio. A produção de NO por estas encontra-se na faixa de concentração picomolar e responde por uma série de ações benéficas ao organismo como vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. A primeira ocorre devido à difusão do NO para o músculo liso subjacente – após sua formação no endotélio –, onde estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs, do inglês *soluble guanylate cyclase*), resultando em produção aumentada de GMP cíclico (GMPc, do inglês *guanosine monophosphate cyclic*), a partir da guanosina trifosfato (GTP, do inglês *guanosine triphosphate*) (Figura 6). Este aumento de GMPc ativa a proteína cinase G, promovendo o relaxamento do músculo liso. A inibição da agregação plaquetária pelo NO também é dependente de GMPc e apresenta ação sinérgica com prostaciclina (Lo Faro e cols., 2014; Moncada e Higgs, 1993).

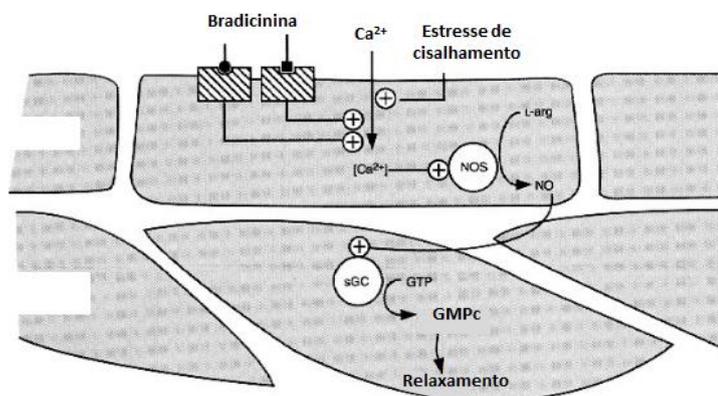


Figura 6: Relaxamento vascular mediado pelo óxido nítrico (adaptado de Moncada e Higgs, 1993).

O NO é um mediador fisiológico que pode atuar, por exemplo, regulando a respiração celular através da inibição reversível do complexo citocromo c oxidase. Contudo, pode se “transformar” em inflamatório, com propósito citostático e citotóxico.

A ativação de iNOS, independente de cálcio, garante que o NO seja produzido em quantidades aumentadas, por muitas horas ou até dias permitindo uma maior interação deste gás com ânions superóxidos, gerando peroxinitrito, com alto potencial oxidativo, que provoca uma inibição irreversível de enzimas importantes da cadeia transportadora de elétrons (Choudhari e cols., 2013; Moncada, 1999).

1.7 Tratamento do processo inflamatório

Tradicionalmente, o tratamento do processo inflamatório é realizado com terapias que promovem o alívio sintomático das condições agudas ou crônicas, a partir da neutralização de níveis aumentados de mediadores pró-inflamatórios e/ou da inibição da ativação e do recrutamento leucocitário (Alessandri e cols., 2013).

Os fármacos mais utilizados para tratamento são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), incluindo também os inibidores seletivos da ciclo-oxigenase 2 (COXibes), e os glicocorticoides (GC). Os AINES, através da inibição das isoformas da enzima COX, impedem a formação e liberação de prostanoídes, reduzem a dor e também apresentam um efeito benéfico de inibição da agregação plaquetária, sendo utilizados adicionalmente na terapia anti-plaquetária. Contudo, respondem pelo aparecimento de efeitos adversos relacionados ao trato gastrointestinal, devido à inibição da isoforma COX-1, responsável pelas ações protetoras da mucosa gástrica, como síntese e secreção de muco e bicarbonato, e inibição da secreção ácida (Alessandri e cols., 2013; Patrignani e Patrono, 2014). Citocinas pró-inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS) e fatores de crescimento podem causar a supra-regulação da enzima COX-2, causando uma produção aumentada de prostanoídes. Os COXibes previnem este efeito ao inibirem seletivamente esta isoforma, além de causarem efeitos colaterais muito menos severos na mucosa gástrica. Contudo, muitos foram retirados do

mercado devido a graves efeitos adversos causados no sistema cardiovascular, como angina, infarto do miocárdio e ataques isquêmicos. Sugere-se que estes efeitos se devam ao fato dos COXibes inibirem seletivamente a isoforma COX-2 – que tem como principal produto a PGI₂, responsável pela vasodilatação no local da injúria durante o processo inflamatório, mas também por exercer efeitos opostos a mediadores que estimulam a agregação plaquetária, elevam a pressão arterial e aceleram a aterogênese, como o TxA₂ derivado da isoforma COX-1 de plaquetas, cuja atividade não é afetada. Sendo assim, as ações deste último mediador prevalecem, favorecendo os efeitos adversos cardiovasculares (Fries e Grosses, 2005; Meirer e cols., 2014; Wang e cols., 2014). Por sua vez, os GC contribuem para a resolução do processo inflamatório através de mecanismos que envolvem tanto a transcrição, quanto a transrepressão de genes. Quando ligado ao seu receptor, o GC se transloca para o núcleo, prevenindo a transcrição de genes como os de citocinas pro-inflamatórias, NO e prostanoídes. Por outro lado, também pode promover a transcrição de genes como de IL-10 e do antagonista de IL-1 β . Além disso, os GC regulam positivamente a síntese de anexina A1. Esta proteína encontra-se constitutivamente expressa em neutrófilos, monócitos e macrófagos, sendo secretada mediante ativação destes tipos celulares. Dentre suas ações podem ser destacadas a inibição da adesão e transmigração leucocitária (Perretti e D'Acquisto, 2009). Juntos, esses eventos resultam em diversos efeitos, como a inibição da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, da transmigração, distribuição e morte/sobrevivência de leucócitos. Entretanto, apesar de serem os fármacos anti-inflamatórios mais efetivos, o uso a longo prazo encontra-se associado a efeitos adversos como osteoporose, doenças metabólicas e cardiovasculares (Dejager e cols., 2014; Coutinho e Chapman, 2011).

Ainda que a maioria dos anti-inflamatórios atuais promova a inibição da síntese de mediadores inflamatórios, fatores endógenos que muitas vezes participam da manutenção das condições fisiológicas também podem ser afetados, causando uma perturbação da homeostasia e, conseqüentemente, efeitos adversos. Assim, a busca de novos fármacos que resolvam o processo de forma homeostática, eficiente e bem tolerada pelos usuários é de grande importância (Alessandri e cols., 2013).

1.8 Plantas medicinais: alternativa para novas terapias

Mais da metade dos novos fármacos introduzidos no mercado desde a década de 90 podem ser atribuídos a produtos naturais, indicando que até hoje são vastamente pesquisadas e empregadas como fonte de novas terapias (Hao e cols., 2014).

O conceito de que o uso de plantas medicinais remete a uma terapia mais natural tem crescido entre a população, junto ao fato de que podem provocar, em alguns casos, efeitos adversos menos pronunciados e serem tão ou mais efetivas que medicamentos sintéticos. Isto graças à complexa composição dos extratos de produtos naturais, que pode influenciar os processos farmacocinéticos – como absorção, metabolização e excreção – de um único composto bioativo. Além disto, os componentes presentes podem atuar de forma sinérgica e em diversas etapas de uma mesma via de sinalização – diferente de fármacos sintéticos, que são desenhados em sua maioria para atuar em um alvo específico –, contribuindo para um melhor efeito biológico (Gosslau e cols., 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 70 – 95% da população mundial depende da medicina popular para a atenção primária em saúde, e a maioria destas práticas medicinais compreende o uso de produtos naturais (Carmona e Pereira, 2013).

1.9 *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth

As plantas do gênero *Lippia* compreendem aproximadamente duzentas espécies, que podem ser encontradas na forma de ervas, arbustos ou pequenas árvores e encontram-se distribuídas pela América Central e do Sul, além de alguns lugares da África. Pertencem à família Verbenaceae, caracterizada por abranger mais de setecentas espécies distribuídas entre as zonas tropicais e temperadas. Geralmente, aquelas encontradas em zonas tropicais caracterizam-se por serem aromáticas (Pascual e cols., 2001; Maisch, 1985).

Na literatura, já existem descritos usos de espécies de *Lippia* contra distúrbios respiratórios (como *L. Alba* N.E. Brown, *L. dulcis* Trevir., *L. chevalieri* Moldenke, *L. graveolens* H.B.K., *L. micromera*, Schauer., *L. microphylla* Cham., *L. multiflora* Moldenke e *L. nodiflora* (L.) Michx) e gastrointestinais (como *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, *L. citriodora* H.B.K. ou *L. triphylla* (L'Hér.) Kuntze, *L. dulcis* Trevir., *L. micrômera* Schau, *L. origanoides* H.B.K., *L. reptans* H.B.K., *L. stoechadifolia* H.B.K. e *L. Turbinate* Griseb; malária (*L. chevalieri* Moldenke, *L. multiflora* Moldenke e *L. Nodiflora* (L.) Michx); como antiespasmódica (como *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, *L. citriodora* (Ort.) H.B.K. ou *L. triphylla* (L'Hér), *L. dulcis* Trevir., *L. geminata* H.B.K., *L. graveolens* H.B.K. e *L. Nodiflora* (L.) Michx); como adoçante em preparações culinárias (como *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, *L. citriodora* (Ort.) H.B.K., *L. graveolens* H.B.K., *L. micromera* Schau) (Pascual e cols., 2001).

A *Lippia origanoides* Humboldt, Bonpland e Kunth (*L. origanoides*) é um arbusto aromático de até três metros de altura (Figura 7), distribuído nas regiões da Amazônia, Guianas, Venezuela e Colômbia, onde é conhecida como “orégano do monte”, e em países da América Central, como Cuba, Guatemala e México, neste reconhecida como substituta do orégano (Maisch, 1985; Pascual, 2001). Dentre as

atividades e usos descritos para a espécie, encontram-se atividade antimicrobiana do óleo essencial (Oliveira e cols., 2007; Barreto e cols., 2014); além do uso como remédio contra gripe, bronquite e asma, do uso das folhas como tempero alimentício e do decocto como estimulador de apetite (Pascual e cols., 2001).



Figura 7: *L. origanoides* H.B.K.

(<https://www.flickr.com/photos/ignezmotta/8535627021>, em 20 de maio de 2014).

No Brasil, foi conduzido um estudo por Oliveira (2004) na cidade de Oriximiná, estado do Pará, onde a planta é conhecida como “salva-de-marajó”. Nele constatou-se o uso da infusão de folhas e flores de *L. origanoides* contra dores de estômago, cólicas, diarreia, inflamação uterina, corrimento vaginal, cólicas menstruais, febre, para “descer o sangue da mulher” (como é dito popularmente), além de anti-séptico. Em outro estudo realizado, observou-se que a planta constitui uma das principais espécies medicinais dentre aquelas utilizadas por comunidades quilombolas (Oliveira, 2014).

1.9.1 Constituição química

Ainda se conhece pouco acerca da constituição química desta espécie. Os dados da literatura analisam principalmente os componentes do óleo essencial de *L. origanoides* (Oliveira, 2014). Baseado nisto, Stashenko e cols. (2010) propuseram três quimiotipos (A, B, C) desta planta, ou seja, de plantas morfologicamente idênticas, porém com diferentes constituições químicas. O quimiotipo A, de aroma cítrico, apresenta majoritariamente *p*-cimeno – detentor de atividade antioxidante e neuroprotetora (Oliveira e cols., 2015) –, α - e β -filandreno – relacionados à redução da nocicepção e hiperalgesia (Lima e cols., 2012), bem como à atividade antimicrobica e anti-oxidante (Martins e cols., 2014) – e limoneno – promotor de atividades inibitórias sobre a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandinas E₂(PGE₂) e citocinas pró-inflamatórias (Yoon e cols., 2010); os quimiotipos B e C, com fragrância de orégano, apresentam em sua maioria os terpenos fenólicos carvacrol e timol, respectivamente – responsáveis por atividades anti-inflamatórias, como redução de citocinas pró-inflamatórias (Kara e cols., 2014) e do infiltrado leucocitário (Riella e cols., 2012). Um quarto quimiotipo, D, de sinonímia de *Lippia schomburgkiana* Schauer, também foi identificado (Silva e cols., 2009), possuindo o constituinte 1,8-cineol como majoritário, relacionado à atividade inibitória sobre a produção de ROS e a peroxidação lipídica (Porres-Martínez e cols., 2014). Além deste, foi identificado por Ribeiro e cols. (2014) o que seria o quimiotipo E, rico em (E)-metilcinamato – envolvido com ações antiespasmódicas e miorelaxantes (Lima e cols., 2014) – e (E)-nerolidol, com fragrância frutada/amadeirada e relacionado com atividade anti-bacteriana (Khaoukha e cols., 2014) e anti-parasitária (Silva e cols., 2014).

Em relação aos componentes não voláteis, poucos já foram identificados. Contudo, na espécie *L. origanoides* já foi relatada a presença de duas naftoquinonas e

do flavonoide pinocembrina (Stashenko e cols., 2010; Oliveira e cols., 2014). As naftoquinonas pertencem à classe das quinonas, metabólitos secundários de plantas. Em relação às atividades farmacológicas destes compostos, encontram-se relatadas, dentre outras, propriedades microbidas, anti-virais e antitumorais. Além disso, as naftoquinonas compreendem as vitaminas do tipo K, necessárias no processo de coagulação do sangue (Da Silva e cols., 2003). Nas raízes de *L. origanoides* já foram encontrados dois tipos de naftoquinonas – catalponol e tectoldimetil éter (Brieskorn e Pohlmann, 1976). Contudo, no levantamento bibliográfico realizado para este trabalho, não foram encontrados relatos acerca da atividade farmacológica destas naftoquinonas específicas.

Os flavonoides são compostos fenólicos encontrados nas folhas, floras, sementes, frutos, cascas e raízes, desempenhando funções de defesa e crescimento. Dentre as ações terapêuticas já descritas para estes componentes, encontram-se atividade antimicrobiana, anti-hipertensiva e anti-inflamatória, além de possuírem atividade sequestrante de radicais livres e inibirem a produção de prostaglandinas (Havsteen, 2002). A pinocembrina possui propriedades antioxidantes e antifúngicas já descritas, além de ser um agente promissor no tratamento de câncer e também na quimioprevenção. Este flavonoide pertence à classe das flavanonas, relacionadas com atividades antiproliferativa, anti-inflamatória, antifúngica e anticarcinogênica (Stashenko e cols., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação anti-inflamatória aguda de *L. origanoides* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, a fim de confirmar o seu uso popular e contribuir para seu estudo etnofarmacológico.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a ação anti-inflamatória aguda do extrato bruto de *L. origanoides* e de uma mistura de flavonóides isolados do mesmo através dos modelos da lambadura de pata induzida por formalina e da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS);
- 2) sugerir uma possível explicação para sua ação anti-inflamatória através da dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-10), NO, ROS e proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As partes aéreas do quimiotipo B de *Lippia origanoides* foram coletadas na cidade de Oriximiná, no estado do Pará (Brasil), em outubro de 2002, pelo professor Danilo Oliveira, da Faculdade de Farmácia, UFRJ. Uma exsicata de registro CESJ 39532 foi depositada no herbário de Universidade Federal de Juiz de Fora, após identificação pela Dr. Fátima Regina Gonçalves Salimena.

3.2 Extrato etanólico de *Lippia origanoides*

O preparo do extrato etanólico (EB) de *L. origanoides* foi conduzido pelo grupo da professora Suzana Guimarães Leitão, da Faculdade de Farmácia, da UFRJ. O tipo de extração utilizado foi maceração estática. Para isto, as folhas foram secas e trituradas até a obtenção de um pó. Este foi colocado em um erlenmayer ao qual se adicionou etanol 95% (160 g, 1/5 p/v) para sucessivas extrações. Em seguida, a solução foi homogeneizada e deixada em repouso por aproximadamente 1 semana, em erlenmayer fechado. Após este período, a solução foi filtrada e colocada em rota-vapor para evaporação do solvente.

3.3 Mistura de flavonoides

A mistura de flavonoides (MF) foi obtida a partir do pré-fracionamento do EB por cromatografia de contra-corrente, no laboratório da professora Gilda Guimarães Leitão, do Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais, da UFRJ.

3.4 Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: dimetilsulfóxido (DMSO) P.A., éter etílico (Fisher Biotech); fosfato dissódico de dexametasona (Aché); tween 20 e tween 80 (Isolar); cloridrato de xilazina 2% (Vetbrands) e cloridrato de cetamina 10% (Ceva); formaldeído, ácido fosfórico e ácido acético foram adquiridos da Reagen; ácido

acetilsalicílico (AAS), carragenina, tampão de fosfato-citrato com perborato (TFCP) e pastilhas de tetra-metil-di-hidrocloro de benzidina (TMB), formiato de amônio (NH_4CO_2), molibdato de amônio, naftiletlenodiamina, sulfanilamida, forbol miristato acetato (PMA) e 2,7 – diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA)(Sigma), nitrito de sódio (Isofar), hidróxido de sódio e fosfato monossódico (Reagen), sulfato de zinco (Vetec), *KitsELISA BD OptEIA™ Set Mouse* para TNF- α , IL-1 β , IL-10, (BDBiosciences, San Diego, EUA); *kit PierceBCA™ ProteinAssay* (ThermoScientific); *TrypticaseSoyBroth* (BectonDicksonMicrobiology Systems).

3.5 Preparo das soluções

- Tampão fosfato salina (PBS):

KH_2PO_4 (anidro)	1,78 g
Na_2HPO_4 (anidro)	7,61 g
NaCl	8,5 g
H_2O ultrapura	q.s.p. 1000 mL

- Formalina: solução de formaldeído 2,5% (v/v) diluído em PBS.
- AAS: solução a 100 mg/mL, em Tris-HCl 1M, pH 8,0.
- Carragenina: solução a 10 mg/mL (1% p/v) em PBS.
- Dexametasona: solução 100 mg/mL, em água.
- Reagente BCA: reagentes A e B presentes no *kit*, misturados na proporção 50:1,

respectivamente. No momento do uso são utilizados 195 μL desta mistura, preparada conforme abaixo.

Reagente B	1 mL
Reagente A	q.s.p. 50 mL

- Reagente de *Griess*: reagentes A e B misturados na proporção 1:1.

Reagente A:

sulfanilamida	1 g
H ₂ O ultrapura	q.s.p. 100 mL

Reagente B:

dicloreto de naftilenodiamina	0,1 g
H ₃ PO ₄ 10%	q.s.p. 100 mL

- Fonte de nitrato redutase: a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi diluída em 5 mL de meio *TrypticaseSoyBroth*, em condições anaeróbias, a 37 °C, por 18 a 20 horas (h). Centrifugou-se o meio por 15 minutos (min), a 11.000 rotações por minuto (r.p.m.), seguido de lavagem com PBS, para que fossem obtidas alíquotas de 100 µL, na concentração de 150 mg/mL, armazenadas a -70 °C.

- Diluente de ensaio:

Soro fetal bovino	10 mL
PBS	q.s.p. 100 mL

- Tampão diluente:

NaHCO ₃	7,13 g
Na ₂ CO ₃	1,59 g
H ₂ O ultrapura	q.s.p. 1000 mL

Ajustar pH para 9,5 utilizando NaOH 10 N

- Tampão de lavagem:

Tween 20	0,05 mL
PBS	q.s.p. 100 mL

- Solução de substrato: 1 pastilha de TMB é solubilizada em 1 mL de DMSO e 1 cápsula de TFCP é solubilizada em 100 mL de água ultrapura para preparo da solução de uso abaixo.

TMB	1,0 mL
-----	--------

TFCP	9,0 mL
▪ Anestésico:	
Cloridrato de cetamina	4,5 mL
Cloridrato de xilazina	1,5 mL
Salina	q.s.p 40 mL
▪ PMA: solução a 10 nM, em PBS	
▪ DCF-DA: solução a 200 μ M, em PBS	

3.6 Preparo e administração do EB, MF e fármacos controle

O EB ou a MF foram dissolvidos em DMSO para preparo de uma solução estoque a 100 mg/mL, armazenada a -20 °C. No momento dos ensaios foram feitas soluções intermediárias em Tween 80. O EB e MF foram administrados por via oral (v.o.) em doses variando entre 10 e 100 mg/kg e 1 e 10 mg/kg, respectivamente. Como fármacos de controle positivo foram utilizados AAS (200 mg/kg, v.o.) e, por via intraperitoneal (i.p.), dexametasona (D; 0,5 mg/kg,). Como controle negativo utilizou-se apenas o veículo (Tween 80).

3.7 Animais

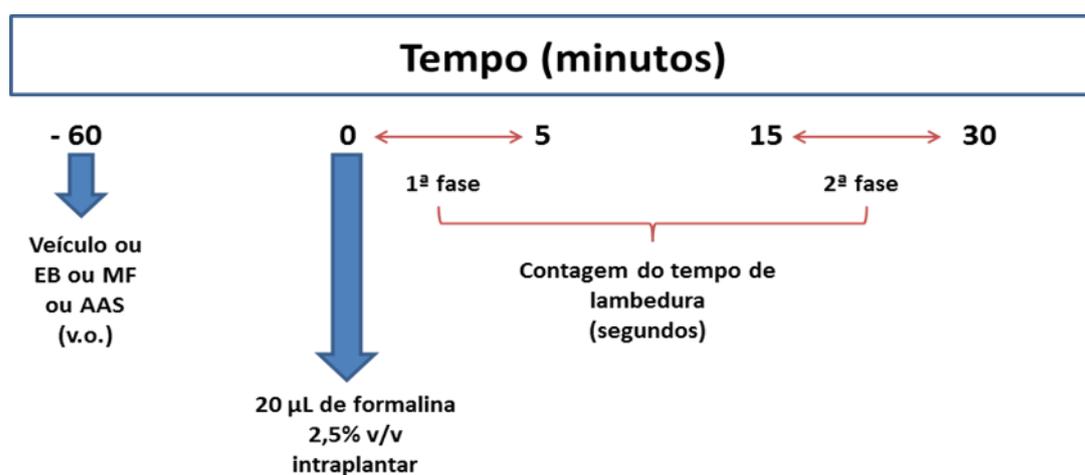
Camundongos *Swiss Webster* (n = 6 – 8 por grupo), fêmeas, pesando entre 23 – 30 gramas, doados pelo Instituto Vital Brasil (Niterói, Rio de Janeiro) foram utilizados. Os animais permaneceram no biotério do Programa de Farmacologia/ICB, com temperatura controlada entre 22 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 h e água e comida *ad libitum*.

Doze horas antes da realização dos experimentos, retirou-se a ração a fim de se prevenir uma interferência da alimentação na absorção das substâncias administradas oralmente.

Os protocolos de experimentação em animais de laboratório obedeceram aos critérios da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e às normas do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e receberam o protocolo #DFBCICB015-04/16.

3.8 Modelo da lambedura de pata induzida por formalina

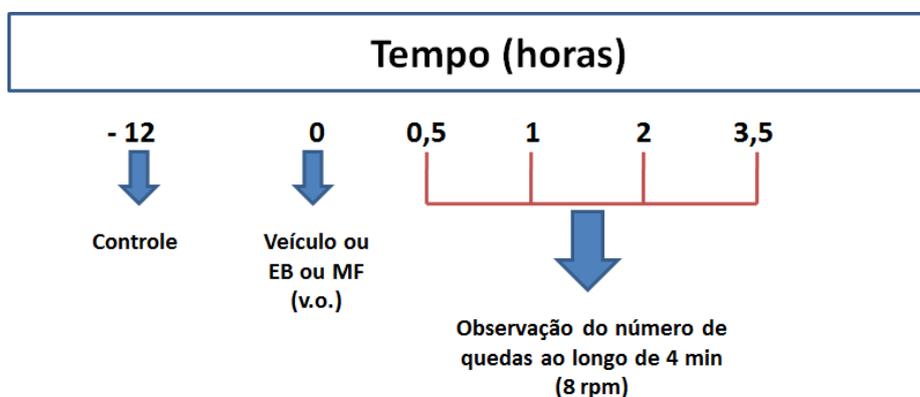
Adaptado de Hunskaar e Hole (1987), no qual os animais receberam injeção subcutânea, na região plantar, contendo 20 µL de solução de formalina (2,5 % v/v). Imediatamente após a injeção, contava-se o tempo (em segundos) no qual o animal permanecia lambendo a pata injetada nos primeiros 5 min. Após um intervalo de 10 min, contava-se novamente por mais 15 min. Sessenta minutos antes da injeção de formalina, os animais foram tratados oralmente com EB (10, 30, 50 ou 100 mg/kg), MF (1, 3, 5, 10 mg/kg), veículo ou AAS (200 mg/kg). O protocolo experimental está demonstrado no esquema 1.



Esquema 1. Protocolo do modelo da lambedura de pata induzida por formalina. Extrato bruto (EB); mistura de flavonoides (MF); ácido acetil salicilico (AAS).

3.9 Avaliação do desempenho locomotor através do modelo de *rotarod*

Modelo adaptado de Godoy e cols. (2004). Os animais são colocados em um aparato giratório (8 r.p.m.), denominado *rotarod*, para observação do desempenho locomotor. Doze horas antes do início do experimento os animais foram treinados até que permanecessem por 60 segundos sem cair. Após este período, todos foram tratados oralmente com veículo ou com 100 mg/kg do EB ou com 10 mg/kg da MF, 30 min antes de serem colocados no *rotarod*, e observados durante 4 min ao longo de 3,5 h, conforme esquema 2, a seguir.



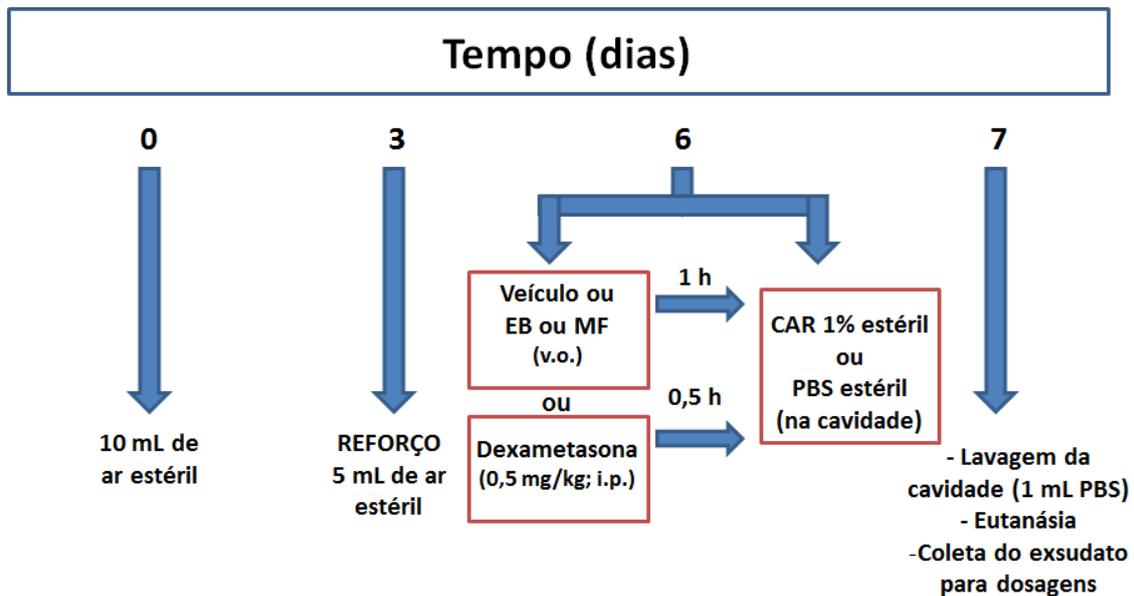
Esquema 2: Protocolo do modelo de avaliação da atividade locomotora em *rotarod*. Extrato bruto (EB); mistura de flavonoides (MF); via oral (v.o.).

3.10 Modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS)

No modelo da BAS (Romano e cols., 1997; Raymundo e cols., 2011), 10 mL de ar estéril (coletados em fluxo laminar, previamente esterilizado por radiação ultravioleta) foram injetados por via subcutânea no dorso dos animais para criação de uma cavidade estéril. Após três dias, mais 5 mL de ar estéril foram injetados. No sexto dia, os animais foram tratados oralmente com EB (10, 30, 50 ou 100 mg/kg), MF (1, 3, 5, 10 mg/kg), veículo ou com dexametasona (i.p., 0,5 mg/kg). Sessenta minutos após o tratamento, os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Tratados por v.o. com veículo:
 - Receberam injeção de 1 mL de PBS na BAS;
 - Receberam injeção de 1 mL de solução de carragenina (1% p/v) na BAS;
- Tratados por v.o. com EB, MF ou i.p. com dexametasona:
 - Receberam injeção de 1 mL de solução de carragenina (1% p/v) na BAS.

Vinte e quatro horas após a injeção de carragenina, os animais foram sacrificados em câmara contendo CO₂ e a cavidade, lavada com 1 mL de PBS para coleta do exsudato e contagem de leucócitos no mesmo. Após, a amostra foi centrifugada a 1.000 r.p.m., por 8 min, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido, aliqotado e armazenado a -20 °C para as dosagens subsequentes. O protocolo experimental está demonstrado no esquema 3.



Esquema 3: Protocolo do modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea. Extrato bruto (EB); mistura de flavonoides (MF); via oral (v.o.); intra-peritoneal (i.p.) carragenina (CAR).

3.10.1 Contagem total de leucócitos na medula, no sangue e no exsudato

Ainda no modelo da migração celular induzida por carragenina na BAS, os camundongos foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina (112,5 mg/kg + 7,5 mg/kg, respectivamente) para a coleta de sangue, lavado de medula e exsudato da cavidade. A tubos contendo 15 μ L de EDTA (100 mg/mL) foram adicionados 100 μ L de sangue coletados do plexo orbital de cada animal. Para a coleta do lavado de medula, retirou-se o fêmur dos camundongos, o qual foi lavado com 1 mL de PBS. Já do exsudato, toda a quantidade recolhida foi separada em *ependorfs*. Em todas as situações descritas, a contagem de leucócitos totais foi realizada em contador automático pocH-100iV Diff (Sysmex).

3.10.2 Dosagem de Proteína

Para a quantificação da concentração de proteínas no exsudato utilizou-se o *kit* PierceBCATMProteinAssay (ThermoScientific, EUA), composto pelos reagentes A e B, misturados na proporção 50:1, respectivamente, no momento dos ensaios. Uma alíquota de 5 μ L do sobrenadante do exsudato foi incubada com 195 μ L do reagente pronto, a 37 °C, por 30 min. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices, EUA), a 570 nm. O resultado foi expresso em μ g/mL, a partir de uma curva-padrão com diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA).

3.10.3 Dosagem de óxido nítrico

Para a dosagem da concentração de óxido nítrico no exsudato da BAS utilizou-se técnica descrita por Bartholomew (1984) e adaptada por Raymundo e cols. (2011) seguida da técnica de Griess (Green e cols., 1982).

Amostras do exsudato foram desproteinizadas onde 200 μL da amostra foram incubados com 20 μL de ZnSO_4 (10 % p/v) por 10 min, a 4 °C. Em seguida foram adicionados 4 μL de NaOH (2,5 N), seguido por nova incubação, por 10 min, a 4 °C. As amostras foram centrifugadas a 10.000 r.p.m., por 10 min, a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Um volume de 150 μL do sobrenadante foi incubado por duas horas, a 37 °C, com 15 μL de NaH_2PO_4 0,5 M (pH 7,2), 15 μL de NH_4HCO_2 2,4 M (pH 7,2) e 10 μL de uma alíquota de *E. coli*, não patogênica, diluída em PBS. Após centrifugação a 10.000 r.p.m., 10 min, temperatura ambiente, coletou-se 100 μL do sobrenadante.

Para a dosagem do nitrito formado misturaram-se partes iguais do sobrenadante e do reagente de Griess. Uma curva padrão de nitrato de sódio foi utilizada para o cálculo da quantidade de nitrito acumulado. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices, EUA), em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em micromolar (μM de NO produzido).

3.10.4 Dosagem de Citocinas

Para a quantificação de citocinas no exsudato foram utilizados *kits ELISA BD OptEIA™ Set Mouse* para TNF- α , IL-1 β , IL-10. De forma resumida, imunoplaquetas foram incubadas por 18 h, a 4°C, com anticorpo de captura específico para a citocina. Após diversas lavagens as placas foram incubadas com 50 μL de cada amostra (exsudato da BAS) ou com curva padrão, por período de 18 h, a 4°C.

Após novas lavagens, incubação com anticorpo de detecção correspondente a cada citocina e adição do substrato, a reação foi parada com adição de H_3PO_4 1 N. A absorbância foi obtida em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices, EUA), em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como pg/mL de citocina.

3.11 Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A técnica foi descrita por Srivastava e cols. (2009). A partir do experimento da BAS, coletou-se 1 mL do exsudato de animais tratados com veículo (v.o.) e carragenina na cavidade. Este foi transferido para *ependorf* de forma a se obter a concentração de 10^5 células/mL. Em seguida, foi realizada uma incubação a 37 °C e 5% de CO₂ por 1 h. Após este período, 100 µL de EB (10, 30, 50 e 100 µg/mL) ou MF (1, 3, 5 e 10 µg/mL) ou PBS foram adicionados aos *ependorfs*, seguido de nova incubação por 30 min nas condições já especificadas. Ao término, as células foram tratadas com 1 µL de PMA 10 nM e incubadas por 45 min nas referidas condições. Após incubação, foram adicionados 10 µL de solução de DCF-DA 200 µM, seguido de nova incubação por 30 min, a 37 °C e 5% de CO₂. A fluorescência emitida, proporcional à concentração de ROS, foi captada em citômetro de fluxo, no canal FL-1.

3.12 Análise Estatística

Os grupos experimentais foram compostos por 6 a 8 animais. Os resultados encontram-se descritos como a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prisma*[®] (versão 5.0., GraphPad Software inc., San Diego, CA, EUA) usando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni. Valores de “p” menores que 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito anti-inflamatório do extrato bruto e da mistura de flavonoides de *Lippia origanoides* no modelo da lambedura de pata induzida por formalina

O modelo da lambedura de pata induzida por formalina caracteriza-se por ser bifásico, no qual a primeira fase compreende a estimulação de nociceptores, mediada centralmente e, a segunda fase, envolve a ativação de processos inflamatórios que esimulam e sensibilizam os nociceptores (Adzu e cols., 2014).

Na 1ª fase do experimento, o grupo tratado com veículo (grupo controle) apresentou tempo de lambedura de $69,9 \pm 8,0$ segundos. O pré-tratamento com ácido acetil salicílico (AAS, 200 mg/kg) fez com que este mesmo tempo fosse de $57,9 \pm 8,8$ segundos, não havendo, portanto, diferença significativa entre tais grupos. Também não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com o EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg) e o grupo controle: o grupo pré-tratado com a dose de 10 mg/kg permaneceu lambendo a pata injetada por $56,0 \pm 9,6$ segundos; com a dose de 30 mg/kg, $58,8 \pm 15,6$ segundos; com a de 50 mg/kg, $50,0 \pm 2,8$ segundos; e com a de 100 mg/kg, $47,6 \pm 9,1$ segundos. Já na 2ª fase do modelo, quando comparado ao grupo veículo ($246,2 \pm 27,5$ segundos), o pré-tratamento com AAS foi capaz de reduzir o tempo de lambedura para $123,4 \pm 32,2$ segundos (redução de 49,8%). O pré-tratamento com o EB também foi capaz de reduzir este tempo na dose de 10 mg/kg ($150,9 \pm 21,5$ segundos; redução de 38,6%); 30 mg/kg ($97,8 \pm 17,6$ segundos; redução de 60,2%); 50 mg/kg ($46,1 \pm 4,3$ segundos; redução de 81,3%) e 100 mg/kg ($93,9 \pm 9,4$ segundos; redução de 61,8%). A dose de 50 mg/kg apresentou a melhor inibição, com redução do tempo de lambedura significativamente maior que até mesmo o fármaco utilizado como controle positivo, AAS (Gráfico 1).

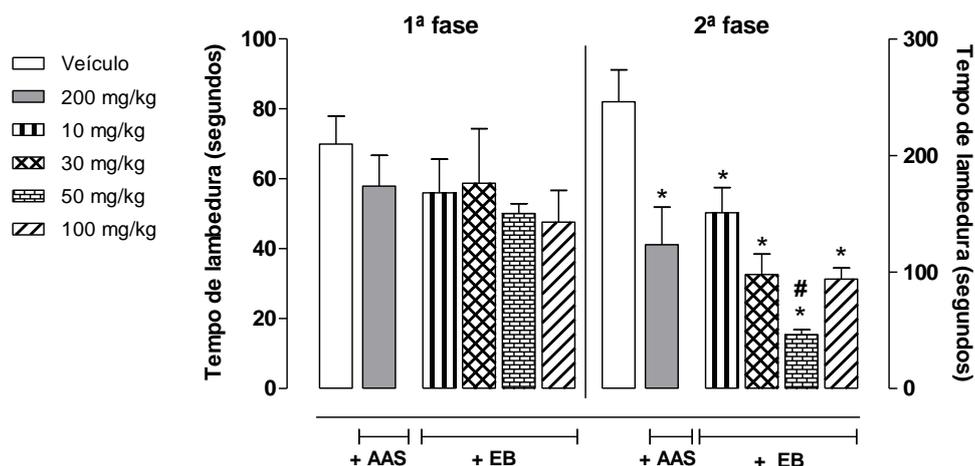


Gráfico 1: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, no modelo da lambedura de pata induzida por formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80), ácido acetil salicílico (AAS, 200 mg/kg), ou EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção intraplantar de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n= 6 – 8). A análise estatística foi obtida a partir da comparação dos grupos pré-tratados com AAS ou EB com o grupo pré-tratado com veículo (*), ou comparando os grupos pré-tratados com EB com o grupo pré-tratado com AAS (#), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O rendimento no processo de obtenção da mistura de flavonoides (MF) a partir do EB foi de 10%, ou seja, para cada 100 mg de EB, obtinha-se 10 mg da MF. Portanto, seguimos este parâmetro na escolha das doses da MF a serem testadas – sendo as do EB 100 mg/kg, 50 mg/kg, 30 mg/kg e 10 mg/kg, utilizamos, para a MF, 10 mg/kg, 5 mg/kg, 3 mg/kg e 1 mg/kg. Assim, no gráfico 2, pode ser observado o efeito da MF. Na 1ª fase a MF não foi capaz de reduzir de forma significativa o tempo de lambedura de pata. Já na 2ª fase do experimento, a dose de 3 mg/kg ($118,3 \pm 19,6$ segundos) foi tão efetiva quanto o AAS em reduzir o tempo de lambedura de pata (51,9% e 49,8% de inibição, respectivamente) em relação ao grupo pré-tratado com veículo. As doses de 5 mg/kg

(156,3 ± 20,3 segundos) e 10 mg/kg (166,6 ± 22,0 segundos) também reduziram de maneira similar a lambedura de pata, com 36,4% e 32,3% de inibição, respectivamente.

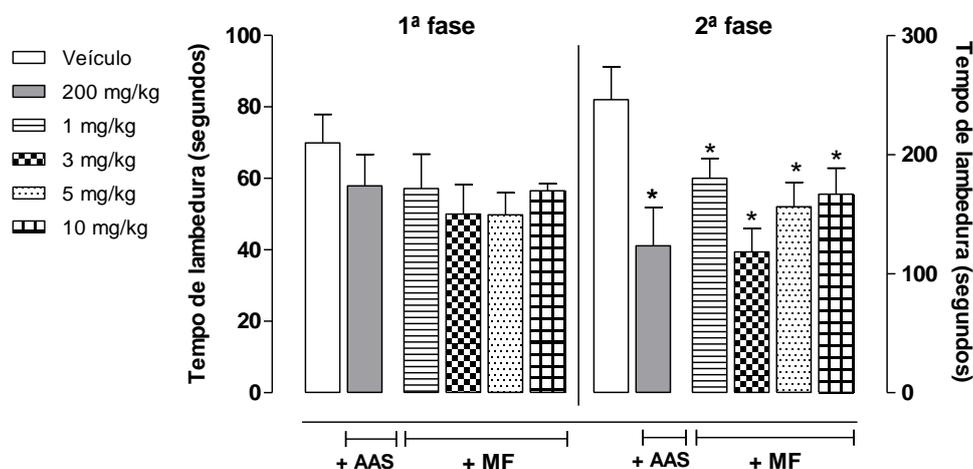


Gráfico 2: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, no modelo da lambedura de pata induzida por formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80), ácido acetil salicílico (AAS, 200 mg/kg) ou MF (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção intraplantar, de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como média ± d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n= 6 – 8). A análise estatística foi obtida a partir da comparação dos grupos pré-tratados com AAS ou MF com o grupo pré-tratado com veículo (*), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.2 Efeito do extrato bruto e da mistura de flavonoides de *Lippia origanoides* na avaliação do desempenho locomotor (*rotarod*)

Alguns procedimentos experimentais para avaliação da nocicepção, como a formalina, utilizam-se da avaliação de mudanças na latência de respostas motoras, após o estímulo nociceptivo. Assim, interpretar um aumento no tempo de latência como uma evidência de analgesia é incorreto se a intervenção analgésica interfere com a atividade motora (Cartmell e cols., 1991).

Para avaliarmos se a redução do tempo de lambedura da pata não seria devido a um algum efeito miorelaxante ou sedativo causado pelos extratos em teste, avaliamos o desempenho locomotor dos animais no aparato de *rotarod*. Os resultados demonstrados na tabela 1 indicam que não houve diferença significativa no número de quedas dos animais pré-tratados com veículo quando comparados ao pré-tratamento com EB (100 mg/kg) ou com a MF (10mg/kg) sugerindo que, nas doses testadas, nenhum dos extratos causou qualquer alteração no desempenho dos animais.

Tabela 1: Avaliação do desempenho locomotor. Os animais foram tratados oralmente com veículo, extrato bruto (EB, 100 mg/kg) ou mistura de flavonoides (MF, 10 mg/kg) e o desempenho locomotor foi avaliado nos tempos de 0,5 h; 1 h; 2 h e 3,5 h após o tratamento. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de quedas de cada animal (n= 6 – 8). A análise estatística foi obtida a partir da comparação dos grupos pré-tratados com veículo com aqueles pré-tratados com EB (*) ou MF (*), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Desempenho locomotor	Tempo após o tratamento (h)			
	0,5 h	1 h	2 h	3,5 h
Veículo (Tween 80)	0,8 \pm 0,8	0,2 \pm 0,4	0	0
EB 100 mg/kg	0	0,25 \pm 0,4	0	0,25 \pm 1,3
Veículo (Tween 80)	0,2 \pm 0,4	0	0,2 \pm 0,4	0
MF 10 mg/kg	0	0,25 \pm 0,5	0,25 \pm 0,5	1 \pm 1,4

4.3 Efeito do extrato bruto e da mistura de flavonoides de *Lippia origanoides* no modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea

Tanto o EB quanto a MF foram capazes de reduzir o tempo de lambertura induzido por formalina na fase inflamatória do modelo, caracterizada pela liberação local de mediadores endógenos, como histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina (Parada e cols., 2001; Tjølsen e cols., 1992) sugerindo assim um possível efeito anti-inflamatório. Desta forma, também procuramos avaliar os efeitos do EB e da MF no modelo de inflamação aguda da bolsa de ar subcutânea (BAS), no qual podemos estudar diversos parâmetros bioquímicos envolvidos na resposta inflamatória, como a formação do exsudato, a liberação de mediadores solúveis, além da migração leucocitária (Shang e cols., 2010; Leclerc e cols., 2013).

4.3.1 Migração de células

Inicialmente foi realizada a avaliação da migração celular para a BAS. Como pode ser observado no gráfico 3, após 24 h da injeção de carragenina na cavidade dos animais pré-tratados oralmente com o veículo ocorreu um aumento significativo da migração de leucócitos ($67,7 \pm 4,2 \times 10^3$ células/ μL) quando comparado ao grupo que recebeu PBS na cavidade ($2,0 \pm 0,3 \times 10^3$ células/ μL). O pré-tratamento dos animais com dexametasona (D, 0,5 mg/kg, i.p.) causou uma redução de 48% ($34,9 \pm 3,7 \times 10^3$ células/ μL) no número total de leucócitos que migraram para a cavidade. Já nos animais pré-tratados oralmente com EB (10, 30, 50, 100 mg/kg) e que receberam injeção de carragenina na cavidade foram verificadas, respectivamente, os seguintes valores de migração celular: $45,0 \pm 7,0$; $39,6 \pm 3,0$; $31,2 \pm 6,8$; $44,3 \pm 10,7 \times 10^3$ células/ μL . Estes

valores correspondem às seguintes porcentagens de inibição: 33,5%; 41,5%; 54,0% e 34,6%, respectivamente.

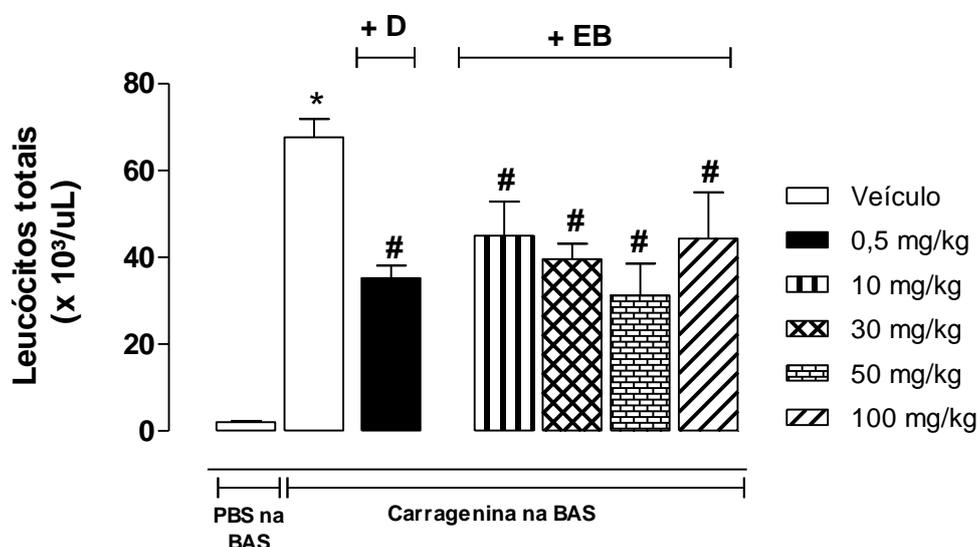


Gráfico 3: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, na migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Os efeitos na migração celular também foram estudados para a MF (gráfico 4). A injeção de carragenina promoveu uma migração de $70,4 \pm 4,2 \times 10^3$ células/ μL para a cavidade quando comparado ao grupo tratado oralmente com veículo e que recebeu PBS na cavidade ($4,2 \pm 2,2 \times 10^3$ células/ μL). O pré-tratamento com dexametasona promoveu uma migração de $36,3 \pm 3,7 \times 10^3$ células/ μL , reduzindo em 48% a migração leucocitária, efeito observado também para as doses de 3 mg/kg ($51,0 \pm 5,1 \times 10^3$ células/ μL , redução de 27,6%), 5 mg/kg ($55,8 \pm 10,5 \times 10^3$ células/ μL , redução de

20,7%) e 10 mg/kg ($38,4 \pm 6,5 \times 10^3$ células/ μL , redução de 45,5%). A dose de 1 mg/kg não apresentou significância estatística, reduzindo em 1,1% a migração celular ($69,6 \pm 14,9 \times 10^3$ células/ μL).

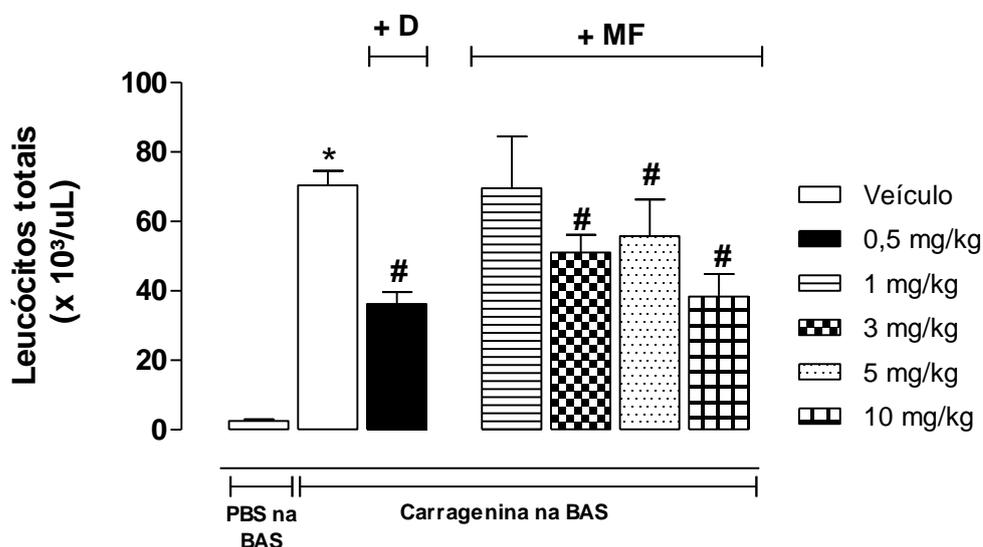


Gráfico 4: Efeito da mistura de flavonoides (MF), das folhas de *Lippia origanoides*, na migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou MF (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Também foi necessário verificar se a inibição da migração celular observada com o EB e com a MF não estaria ocorrendo devido a um efeito mielotóxico provocado por estes extratos ou, ainda, devido à inibição da transmigração dos leucócitos a partir do sangue para o local da injúria. Como demonstrado no gráfico 5, o número de células nos grupo veículo foi de $3,3 \pm 1,0 \times 10^3$ células/ μL para o que recebeu PBS na BAS e de

$4,6 \pm 1,0 \times 10^3$ células/ μL para o que recebeu carragenina na BAS. Os grupos pré-tratados com MF (10 mg/kg) ou EB (100 mg/kg) apresentaram, respectivamente, $3,6 \pm 1,0 \times 10^3$ células/ μL e $3,2 \pm 1,0 \times 10^3$ células/ μL . Portanto, nenhum efeito mielotóxico foi observado após o tratamento com os extratos.

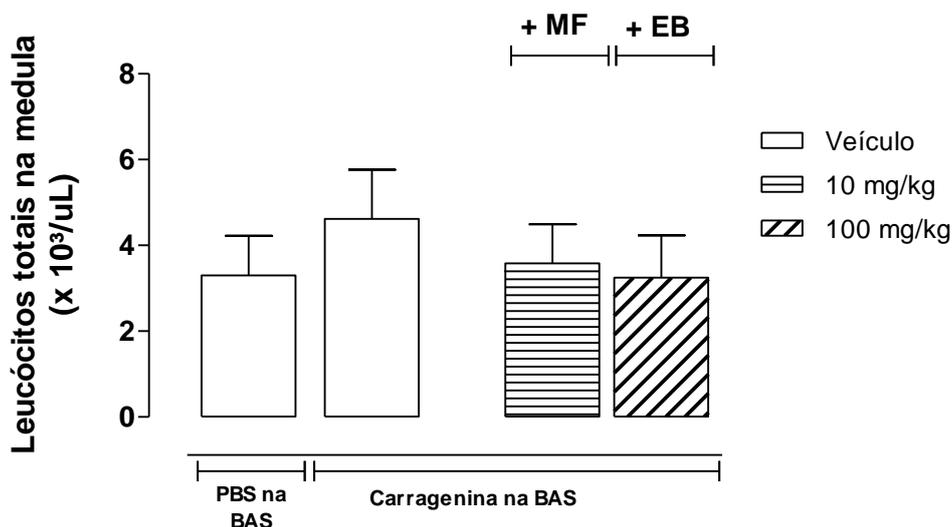


Gráfico 5: Efeito do extrato bruto (EB) e da mistura de flavonoides (MF) sobre a contagem de leucócitos na medula. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou MF (1, 3, 5 e 10 mg/kg) ou EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n = 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou EB e o veículo (#). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O gráfico 6 mostra que o pré-tratamento com EB ou MF não causou alteração na contagem de leucócitos no sangue. O grupo pré-tratado com veículo apresentou uma contagem, no sangue, de $6,3 \pm 0,6 \times 10^3$ células/ μL para aquele que recebeu PBS na BAS e $6,2 \pm 1,1 \times 10^3$ células/ μL para aquele tratado com carragenina na BAS. As contagens de $5,2 \pm 0,7 \times 10^3$ células/ μL e $6,7 \pm 0,6 \times 10^3$ células/ μL foram obtidas para os grupos pré-tratados com MF (10 mg/kg) e EB (100 mg/kg), respectivamente.

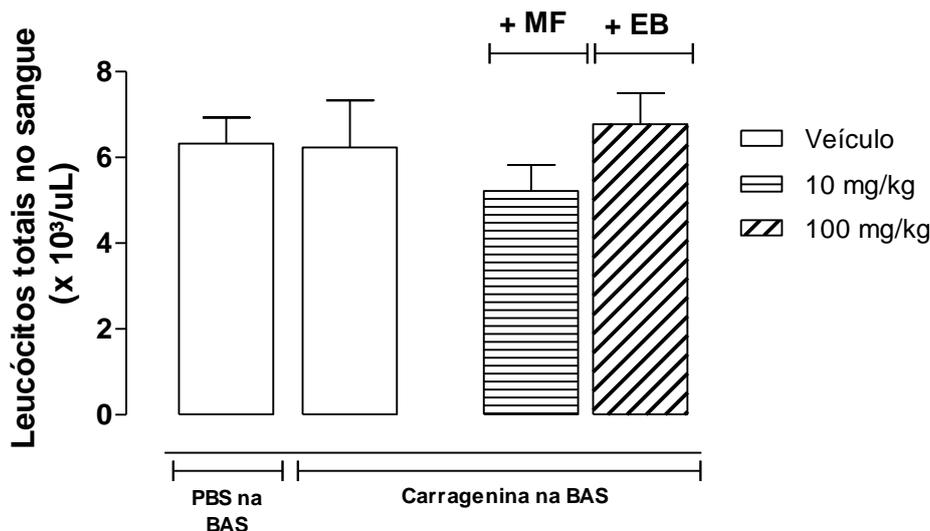


Gráfico 6: Efeito do extrato bruto (EB) e da mistura de flavonoide (MF) sobre a contagem de leucócitos no sangue. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou MF (1, 3, 5 e 10 mg/kg) ou EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$) ($n = 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou EB e o veículo (#). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.3.2 Quantificação de proteínas totais

A injeção de carragenina desencadeia uma resposta inflamatória que compreende o extravasamento de proteínas do plasma, como a albumina. Além disto, está associada também a uma citotoxicidade, o que, junto do extravasamento plasmático, responde pelo aumento da concentração de proteínas no local da injúria (Martin e cols., 1994).

Tal aumento encontra-se ilustrado nos dois gráficos a seguir, nos quais pode ser observado uma concentração total de proteínas de $246,6 \pm 12,8 \mu\text{g/mL}$ (gráfico 7) e $183,4 \pm 20,5 \mu\text{g/mL}$ (gráfico 8) no que diz respeito ao grupo pré-tratado oralmente com veículo e carragenina na cavidade. O pré-tratamento com dexametasona (D, 0,5 mg/kg, i.p.) reduziu a concentração de proteína total no exsudato em 54,2% (total de $113,0 \pm$

2,8 µg/mL de proteína), como mostra o gráfico 7. O grupo que recebeu oralmente o EB na dose de 30 mg/kg apresentou uma redução de 35,6% ($158,7 \pm 12,1$ µg/mL de proteína), seguido de 22,1% obtido no grupo pré-tratado com a dose de 50 mg/kg ($192 \pm 16,5$ µg/mL de proteína). As doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg não apresentaram significância estatística na redução da concentração de proteínas totais ($252,3 \pm 23,2$ µg/mL e $218,7 \pm 67,7$ µg/mL, respectivamente).

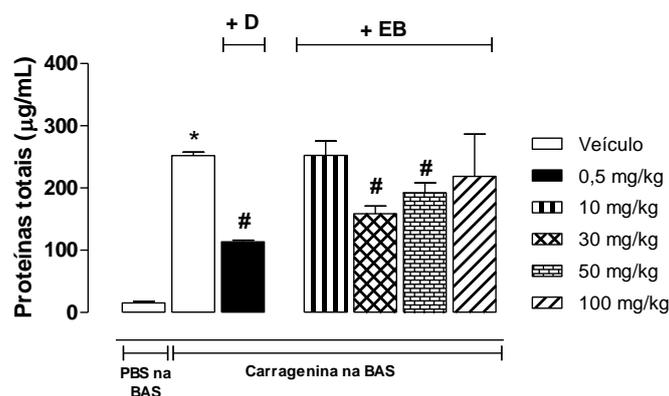


Gráfico 7: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de proteínas (µg/mL) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

O gráfico 8 ilustra uma redução dose-dependente da concentração de proteínas plasmáticas no exsudato após tratamento com a MF. As doses de 1 mg/kg ($172 \pm 32,5$ µg/mL de proteínas totais) e 3 mg/kg ($141,3 \pm 25,3$ µg/mL de proteínas totais) não apresentaram resultados significativos quando comparados ao grupo pré-tratado

oralmente com veículo e carragenina na cavidade ($183,4 \pm 20,5 \mu\text{g/mL}$ de proteínas totais). Contudo, ao aumentarmos a dose para 5 mg/kg e 10 mg/kg , observamos as respectivas reduções – $45,3\%$ ($100,3 \pm 21,3 \mu\text{g/mL}$ de proteínas totais) e $45,9\%$ ($99,3 \pm 15,9 \mu\text{g/mL}$ de proteínas totais), apenas 10% a menos, aproximadamente, que o fármaco dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$), com 54% de redução ($83,6 \pm 13,4 \mu\text{g/mL}$ de proteínas totais).

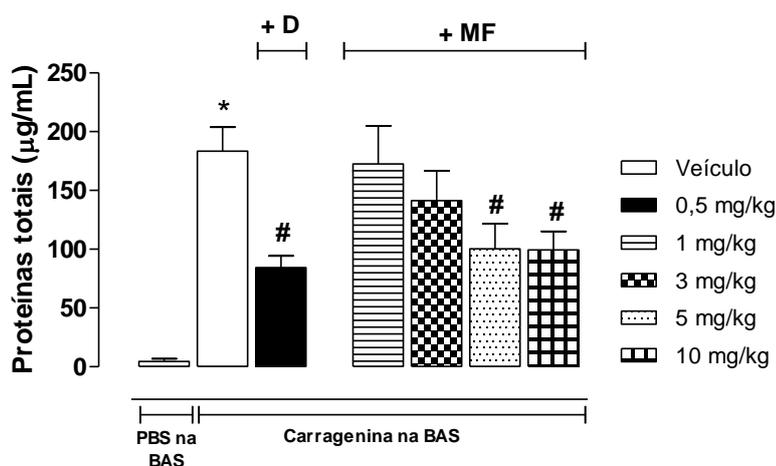


Gráfico 8: Efeito da mistura de flavonoide (MF) isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, sobre o extravasamento de proteínas plasmáticas na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou MF (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com a MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.3.3 Quantificação de óxido nítrico

O NO é uma molécula biológica, que regula processos como a vasodilatação, a neurotransmissão, a inibição da agregação plaquetária, além da morte de patógenos (Owona e cols., 2013). Contudo, também se encontra envolvido no desenvolvimento do processo inflamatório, atuando principalmente sobre os estágios mais iniciais. Sua produção exacerbada é prejudicial ao hospedeiro, levando à progressão da inflamação e de doenças relacionadas (Cho e cols., 2015; Yang e cols., 2013). Assim, resolvemos estudar a ação dos extratos sobre a concentração de NO no exsudato.

O gráfico 9 mostra os efeitos do EB sobre a concentração de NO presente no exsudato. O grupo veículo que recebeu carragenina na BAS apresentou uma concentração de $146,5 \pm 5,0 \mu\text{M}$ de NO, enquanto o grupo veículo que recebeu PBS na BAS, $30,4 \pm 4,6 \mu\text{M}$. Já o fármaco de controle positivo, dexametasona, apresentou redução de 57,2 % ($62,7 \pm 2,5 \mu\text{M}$ de NO). Após o pré-tratamento com EB, pode ser observada uma redução significativa da concentração de NO em todas as doses testadas. As doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg reduziram, respectivamente, em 27% ($125,7 \pm 2,5 \mu\text{M}$), 47,1% ($91,2 \pm 12,2 \mu\text{M}$) e 34,1% ($113,7 \pm 16,5 \mu\text{M}$). Na dose de 50 mg/kg foi evidenciado o melhor resultado, com uma inibição do aumento de NO de 74% ($45,5 \pm 13,4 \mu\text{M}$).

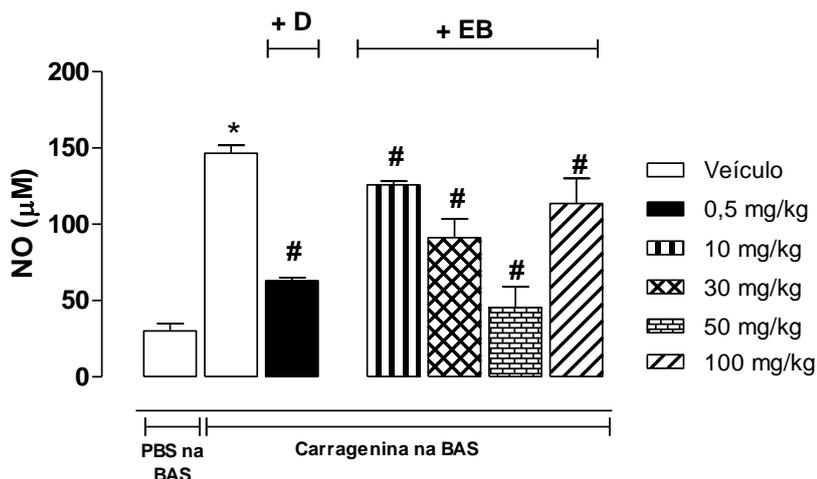


Gráfico 9: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de óxido nítrico (NO) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (10, 30, 50 e 100mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de NO (μ M) ($n = 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Também foi observada redução nos níveis de NO nos animais pré-tratados com a MF que receberam carragenina na BAS (gráfico 10). A dose de 10 mg/kg reduziu em 64,4% ($51,2 \pm 16,2 \mu$ M) e a de 5 mg/kg, em 48,1% ($74,7 \pm 9,5 \mu$ M). Já as doses de 3 mg/kg e 1 mg/kg apresentaram inibições de 29,4% ($101,7 \pm 23,4 \mu$ M) e 25,5% ($107,3 \pm 14,6 \mu$ M). O fármaco dexametasona reduziu em 57,1% ($61,7 \pm 2,3 \mu$ M). Estes percentuais foram calculados com base na concentração de NO encontrada no grupo pré-tratado oralmente com veículo e carragenina na BAS, $144,0 \pm 6,7 \mu$ M.

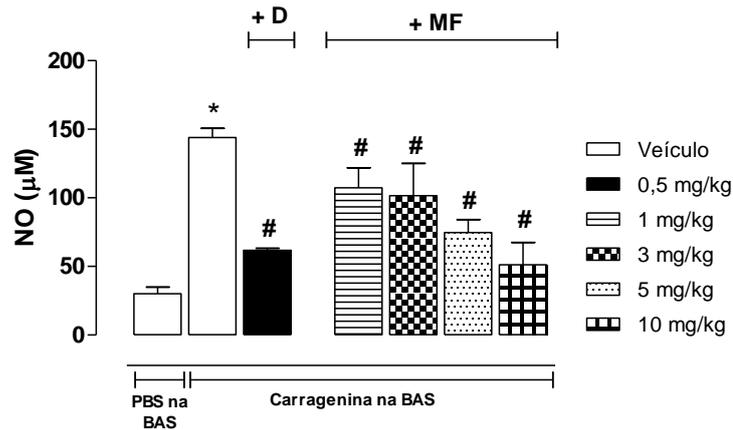


Gráfico 10: Efeito da mistura de flavonoide (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de óxido nítrico (NO) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou MF nas doses (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de NO (μ M) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com a MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.3.4 Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-10)

O processo inflamatório pode ser iniciado por diversos estímulos inflamatórios, os quais aumentam a síntese e também secreção de citocinas pró-inflamatórias. Estas têm a capacidade de atuar em alvos específicos, levando à liberação local de mediadores inflamatórios a partir de leucócitos, além de atraí-los para o local da injúria (Bellik e cols., 2013). Desta forma, a partir do exsudato recolhido da BAS também foi realizada a dosagem de citocinas importantes no processo infamatório, como TNF- α , IL-1 β e IL-10. Os resultados encontrados para os grupos pré-tratados com veículo ou EB estão ilustrados nos gráficos 11, 12 e 13 para TNF- α , IL-1 β e IL-10, respectivamente. No

grupo dos animais pré-tratados com veículo que receberam a injeção de PBS na cavidade, foi quantificada, para TNF- α , a concentração de $26,0 \pm 8,0$ pg/mL, enquanto no exsudato dos animais que receberam injeção de carragenina, quantificou-se $440,2 \pm 92,0$ pg/mL. A concentração de TNF- α após o tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) teve uma redução de 45,4 % ($240,1 \pm 2,4$ pg/mL). Nos grupos dos animais pré-tratados com EB, somente a dose de 100 mg/kg não foi capaz de reduzir a concentração de TNF- α ($428,7 \pm 97,7$ pg/mL). Para as doses de 10, 30 e 50 mg/kg foram encontrados 55,5% ($195,8 \pm 68,8$ pg/mL) , 65,6% ($151,6 \pm 30,3$ pg/mL) e 54,1% ($202,2 \pm 38,9$ pg/mL) de redução, respectivamente.

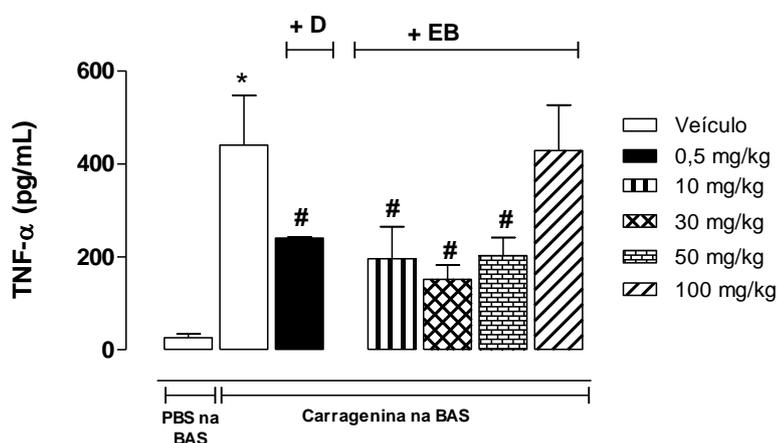


Gráfico 11: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de TNF- α (pg/mL) (n= 6 – 8). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A injeção de carragenina na BAS nos animais pré-tratados oralmente com o veículo causou um aumento significativo na concentração da citocina IL-1 β (957,6 \pm 67,25 pg/mL) em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS (221 \pm 49,2 pg/mL). O pré-tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) causou uma redução de 84,6%, já que a concentração encontrada foi de 147,3 \pm 1,6 pg/mL. Nos grupos que receberam o pré-tratamento com as diferentes concentrações de EB não foram observadas reduções significativas em comparação ao grupo injetado com carragenina.

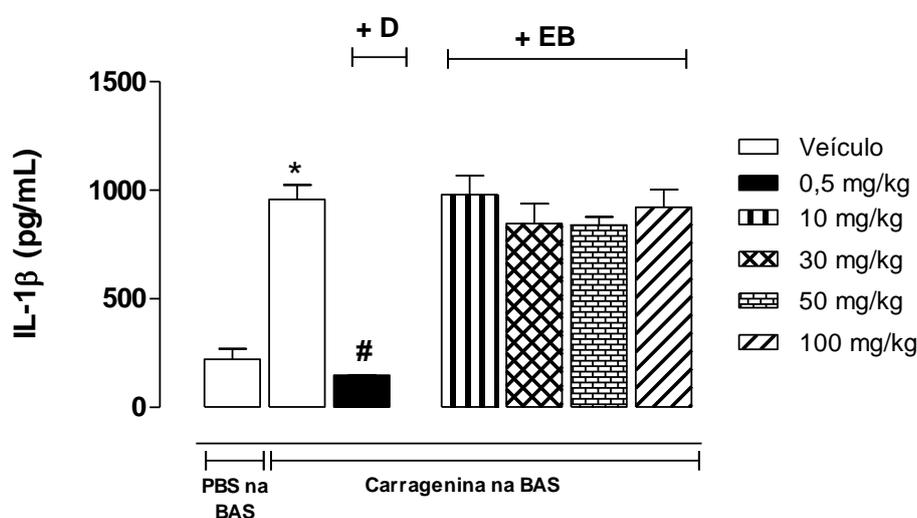


Gráfico 12: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de interleucina-1 β (IL-1 β) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de IL-1 β (pg/mL) (n= 6 – 8). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

No grupo injetado com PBS na cavidade e pré-tratado com veículo, a concentração de IL-10 no lavado da cavidade foi de $144,3 \pm 43,3$ pg/mL, enquanto o grupo injetado com carragenina na BAS foi de $385,2 \pm 20,0$ pg/mL. O pré-tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) aumentou a concentração de IL-10 ($719,4 \pm 4,9$ pg/mL). Não foi observada redução significativa nas concentrações de IL-10 nos grupos que receberam oralmente o EB nas diferentes doses 24 horas antes da injeção de carragenina na BAS. Ao contrário, o gráfico mostra um aumento da concentração desta citocina no exsudato dos animais pré-tratados com a dose de 50 e 100 mg/kg ($483,3 \pm 62,5$ e $639,6 \pm 43,2$ pg/mL, respectivamente).

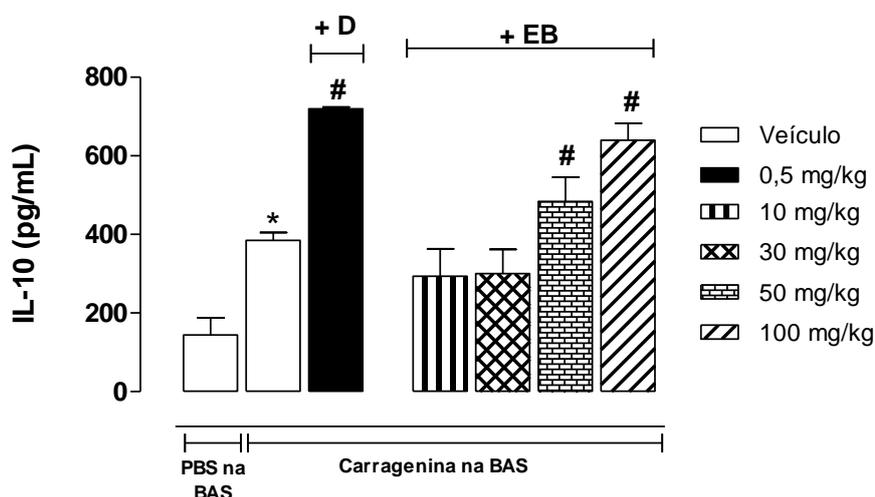


Gráfico 13: Efeito do extrato bruto (EB), das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de interleucina-10 (IL-10) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (10, 30, 50 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de IL-10 (pg/mL) ($n= 6 - 8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o EB ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Ao analisarmos os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 no exsudato dos animais pré-tratados com a MF, observamos que houve um aumento na concentração destas no grupo que recebeu veículo oralmente e injeção de carragenina na cavidade em relação ao grupo que recebeu injeção de PBS, como mostrado a seguir. No gráfico 14, a carragenina promoveu um aumento da concentração de TNF- α ($270,5 \pm 74,2$ pg/mL) quando comparado ao grupo que recebeu apenas PBS ($41,5 \pm 14,8$ pg/mL) na BAS. O fármaco dexametasona, administrado por via intraperitoneal, na dose de 0,5 mg/kg, fez com que a concentração encontrada fosse de $147,5 \pm 7,9$ pg/mL, ou seja, redução de 45,5%. O pré-tratamento com as maiores doses da MF, 5 mg/kg e 10 mg/kg, promoveu uma redução na concentração de TNF- α presente no exsudato de 57,5% ($115,0 \pm 16,7$ pg/mL) e 51,8% ($130,5 \pm 33,7$ pg/mL), respectivamente. As doses de 1 mg/kg e 3 mg/kg não apresentaram redução significativa ($282,0 \pm 26,9$ pg/mL e $211,0 \pm 39,4$ pg/mL, respectivamente).

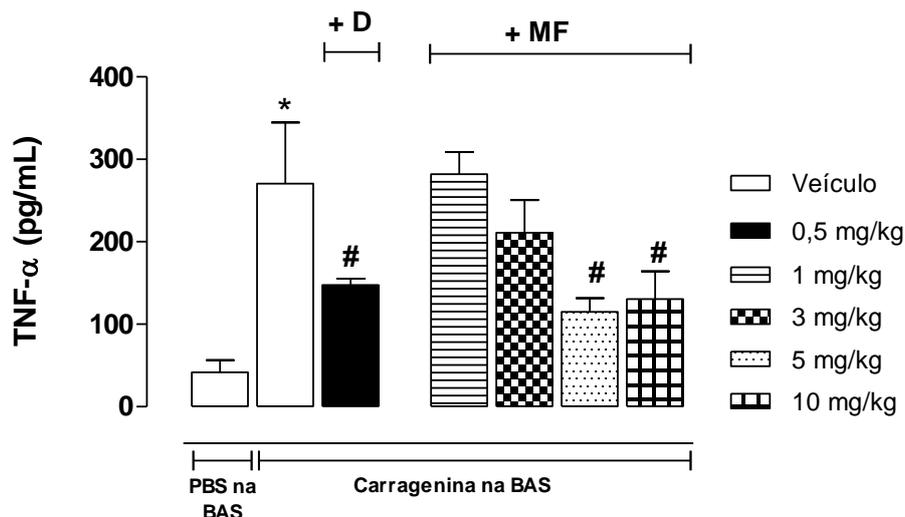


Gráfico 14: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, na produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de TNF- α (pg/mL) (n= 6 – 8). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Já as concentrações de IL-1 β (gráfico 15) apresentaram uma redução em todas as doses testadas, quando comparadas àquelas encontradas no grupo pré-tratado com veículo e carragenina na BAS (1038,5 \pm 21,9 pg/mL). Além disto, também houve redução de 84,6% após tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.), tendo sido encontrado 159,7 \pm 3,5 pg/mL de IL-1 β . Os valores obtidos a partir do pré-tratamentos com MF foram de 838,7 \pm 42,6 pg/mL na dose de 1 mg/kg; 644,2 \pm 85,4 pg/mL na dose de 3 mg/kg; 778,3 \pm 44,6 pg/mL na dose de 5 mg/kg; 670,0 \pm 90,9 pg/mL na dose de 10

mg/kg. Estas concentrações representam, respectivamente, reduções de 19,2%; 37,9%; 25,0%; 35,4%.

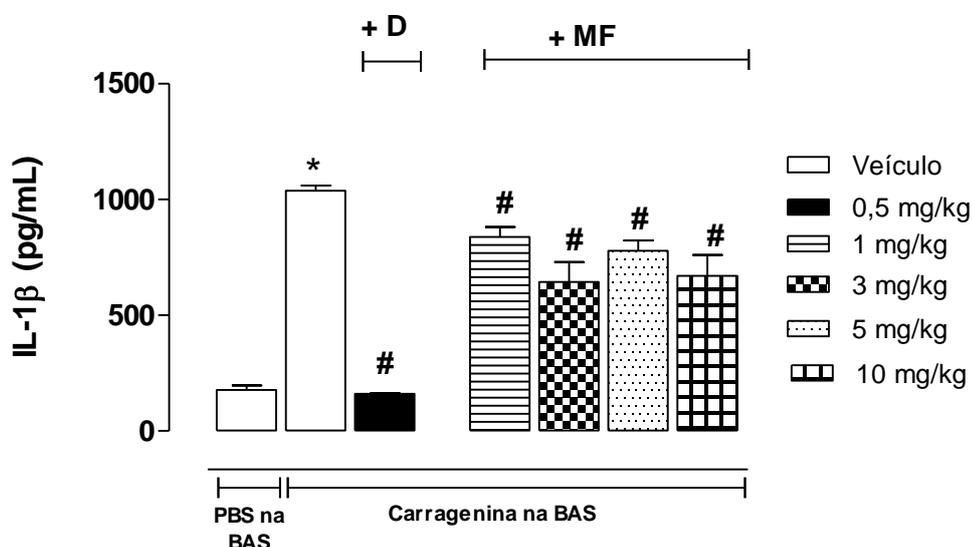


Gráfico 15: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de interleucina-1 β (IL-1 β) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de IL-1 β (pg/mL) (n= 6 – 8). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

As concentrações de IL-10 (gráfico 16) aumentaram após a injeção de carragenina na BAS, de $189,5 \pm 33,2$ pg/mL no grupo injetado com PBS para $338,7 \pm 37,3$ pg/mL. O pré-tratamento com dexametasona aumentou esta concentração para $576,7 \pm 5,7$ pg/mL. Reduções nos níveis desta citocina foram observadas após o tratamento com todas as doses. Para a dose de 1 mg/kg foi encontrado $134,3 \pm 15,0$ pg/mL; para 3 mg/kg, $115,0 \pm 21,2$ pg/mL; para 5 mg/kg, $217,7 \pm 26,7$ pg/mL; e, para

10 mg/kg, $202,5 \pm 21,9$ pg/mL. Assim, as porcentagens de redução foram, respectivamente, 60,3%; 66,0%; 35,9%; e 40,2%.

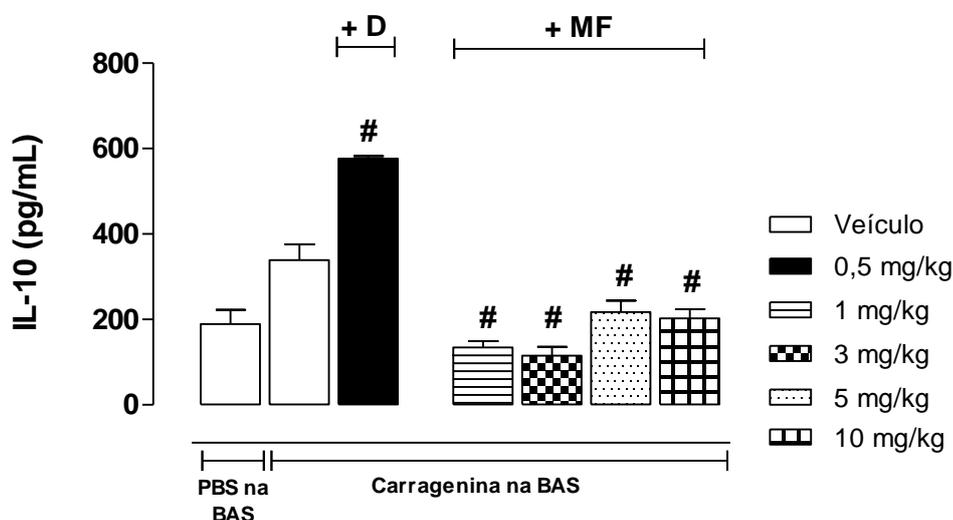


Gráfico 16: Efeito da mistura de flavonoides (MF), isolada a partir do extrato bruto (EB) das folhas de *Lippia origanoides*, na produção de interleucina-10 (IL-10) induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80) ou EB nas doses (1, 3, 5 e 10 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente com dexametasona (D, 0,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração total de IL-10 (pg/mL) ($n=6-8$). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com o MF ou D e o veículo (#) ou entre os grupos veículo, que receberam carragenina ou PBS na cavidade (*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.4 Dosagem de espécies reativas de oxigênio

A produção de ROS é uma etapa central para o progresso do processo inflamatório, no qual estas espécies são produzidas por células envolvidas nas respostas de defesa, como os neutrófilos polimorfonucleares. Uma vez sintetizadas, podem oxidar proteínas necessárias para a sinalização celular e promover disfunção endotelial (Mittal e cols., 2014). Para promovermos e, assim, estudarmos a produção de ROS por tipos

celulares, como os neutrófilos, podemos utilizar diversos tipos de estímulos, dentre eles, aquele por PMA. Os efeitos deste composto não dependem de qualquer estímulo a receptores – após a sua entrada na célula, o PMA promove a ativação direta da proteína cinase C, ocorrendo um acúmulo e ativação da enzima NADPH oxidase, o que leva ao aumento da produção de ROS (Franck e cols., 2009).

O gráfico 17 mostra os efeitos do EB (10, 30, 50 e 100 µg/mL) e da MF (1, 3, 5 e 10 µg/mL) sobre a produção de ROS. As células pré-tratadas com PBS emitiram uma fluorescência em torno de $7727,9 \pm 794,6$. Já aquelas ativadas com PMA apresentaram uma intensidade de $1474101,8 \pm 65643,8$. O pré-tratamento com o EB reduziu a fluorescência de forma significativa nas concentrações de 50 µg/mL ($1071611,2 \pm 65330,4$; 27,3% de redução) e 100 µg/mL ($826824,5 \pm 77759,9$; 43,9% de redução), quando comparado às células somente ativadas com PMA. Embora as concentrações de 10 µg/mL e 30 µg/mL não tenham reduzido significativamente a intensidade de fluorescência, encontramos, respectivamente, os valores de $1444764,7 \pm 100292,5$ (redução de 1,9%) e $1194342,0 \pm 134325$ (redução de 19,0%). Já a MF apresentou, de forma significativa, menor intensidade de fluorescência apenas na concentração de 10 µg/mL ($1014696,6 \pm 114143,5$; redução de 31,2%). O pré-tratamento com a MF na concentração de 1 µg/mL fez com que a intensidade encontrada fosse de $1621248,3 \pm 146913,5$ (aumento de 10,0%); na dose de 3 µg/mL, $1438563,0 \pm 171031$ (redução de 2,4%); na dose de 5 µg/mL, $1254878,0 \pm 89648$ (redução de 14,9%).

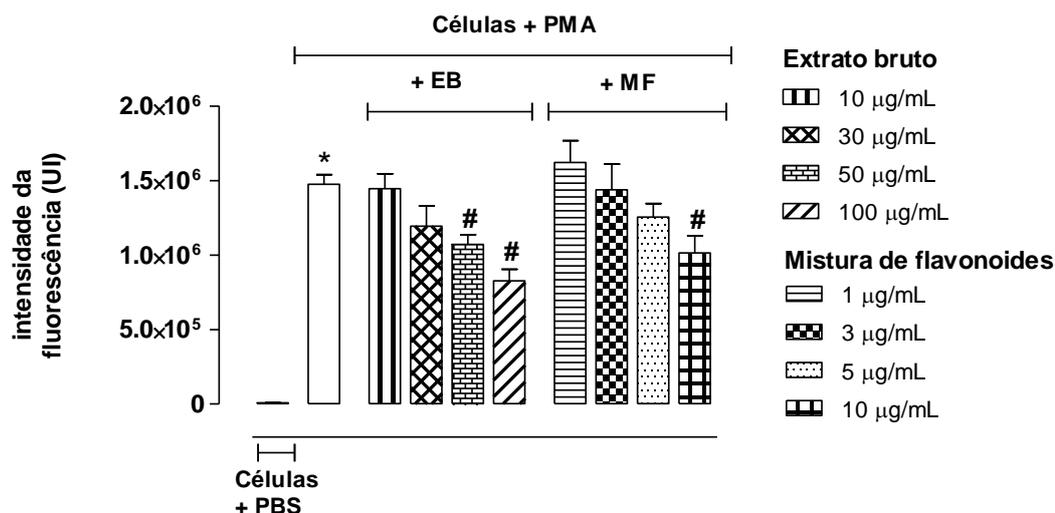


Gráfico 17: Efeito do extrato bruto (EB) ou da mistura de flavonoides (MF) sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (Tween 80), 60 min antes da injeção de carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). As células coletadas da BAS foram incubadas por 1 h em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, foram incubadas nas mesmas condições por 30 min com diferentes concentrações do EB (10, 50, 30 e 100 µg/mL) ou MF (1, 3, 5 e 10 µg/mL). Ao fim, foi adicionado 1 µL de acetato miristato de forbol (PMA, 10 nM) para incubação por 45 min nas referidas condições. Para emissão da fluorescência, 10 µL de solução de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA, 200 µM) foram adicionados, seguido de incubação por 30 min, a 37 °C e 5% de CO₂. A fluorescência emitida é proporcional à concentração de ROS. Os resultados são expressos como média ± d.p. da fluorescência emitida (n = 3). A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Bonferroni, comparando-se os grupos pré-tratados com EB ou MF com aquele pré-tratado com PMA (#) ou entre os grupos pré-tratados com PMA ou PBS (*). Os valores de p < 0,05 foram considerados significativos.

5. DISCUSSÃO

L. origanoides (Verbenaceae) é uma planta aromática encontrada na América Central e também na região norte da América do Sul. Dentre seus empregos, encontra-se o uso como tempero alimentício, mas também a utilização da infusão de suas folhas na medicina popular para tratamento de dores de estômago, flatulências, indigestão, infecções dos brônquios e pulmões, além da recomendação para tratamento da asma e tuberculose (Teles e cols., 2014). Especialmente no Brasil, na cidade de Oriximiná (Pará), Oliveira e cols. (2007) identificaram o uso desta espécie contra cólicas menstruais, corrimento vaginal, febre, inflamação uterina e diarreia, dentre outras aplicações. Tendo em vista a vasta utilização popular para condições inflamatórias (Oliveira e cols., 2007) e a escassez de dados na literatura que comprovem cientificamente os benefícios desta espécie, o grupo da professora Suzana Guimarães Leitão (Faculdade de Farmácia, UFRJ) extraiu o EB de *L. origanoides* para que nosso grupo o testasse em modelos de inflamação aguda *in vivo*. Além disto, visto a presença de flavonoides - ubíquos em plantas vasculares (Di Carlo e cols, 1999) – e a capacidade anti-inflamatória deste grupo de componentes (Serafini e cols. 2010), a professora Gilda Guimarães Leitão (IPPN, UFRJ), a partir do EB, extraiu a MF para que também avaliássemos cientificamente a atividade anti-inflamatória do mesmo.

Iniciamos nossos estudos com o modelo da lambadura de pata induzida por formalina. Neste modelo, a solução de formalina (2,5% v/v), quando injetada na pata do animal, produz uma resposta bifásica. Na primeira fase, denominada neurogênica (0 – 5 min após a injeção de formalina), ocorre a ativação direta de nociceptores localizados em fibras aferentes primárias do tipo C. Isto resulta na liberação de determinados componentes, dentre os quais podem ser citados os neurotransmissores substância P e glutamato e o mensageiro bradicinina (Boonyarikpunchai e cols., 2014; Nascimento e cols., 2015). Já a segunda fase (15 – 30 min após a injeção de formalina),

dita inflamatória, encontra-se relacionada à ativação periférica de nociceptores, combinada a mecanismos de sensibilização central (Abdala e cols., 2014). Caracteriza-se pelo desenvolvimento de uma dor inflamatória, na qual mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, bradicinina, NO e prostaglandinas se fazem presentes (Watanabe e cols., 2012; Boonyarikpunchai e cols., 2014)

A nocicepção induzida por formalina é um modelo de atividade antinociceptiva válido e que possui boa correlação com a dor clínica (Pandurangan e cols., 2014). Este modelo permite não só a avaliação de fármacos antinociceptivos, mas também o estudo do possível mecanismo de ação, visto que fármacos que atuam centralmente, como a morfina, inibem as duas fases, enquanto os que atuam periféricamente, como AINEs e corticoides, inibem, majoritariamente, a segunda fase (Abdala e col., 2014; Boonyarikpunchai e cols., 2014).

Como pode ser observado nos gráficos 1 e 2, não houve redução do tempo de lambadura na primeira fase para EB ou MF. Na segunda fase, todas as doses testadas, tanto do EB quanto da MF, apresentaram efeito. Este resultado nos sugere que o perfil dos extratos em teste não se assemelha a de fármacos com ação central, como a morfina, capaz de inibir ambas as fases, mas a daqueles classificados como anti-inflamatórios com ação periférica, impedindo tanto a atuação periférica e/ou liberação e/ou formação de mediadores como, conseqüentemente, a sensibilização da medula espinhal.

Na natureza podem ser encontradas plantas, utilizadas na forma de extrato bruto ou semi-purificados, que atuam sobre o sistema nervoso central ou como miorrelexantes (Carlini, 2003; Pinho-da-Silva e cols., 2010). Flavonoides, como a luteolina, interagem com receptores do ácido γ -aminobutírico do subtipo A, como também o fazem a apigenina e a crisina (Hara e cols., 2014; Salgueiro e cols., 1997); a espécie *Lychnophora passerina*, popularmente conhecida como arnica, é comumente utilizada

para tratar reumatismos e contusões (Capelari-Oliveira e cols., 2011) e a espécie *Xanthium strumarium* L. (“abrofo”), utilizada contra espamos (Tribess e cols., 2015). Assim, a partir dos resultados obtidos no modelo da lambadura de pata induzida por formalina, foi necessário verificar o desempenho locomotor dos animais. Para tal, foi utilizado o aparato do *rotarod*, no qual um número de quedas elevado dos grupos pré-tratados com o EB ou com a MF, em comparação ao grupo pré-tratado com o veículo, poderia ser indicativo de uma diminuição da atividade motora espontânea, sugerindo que os extratos em teste estariam provocando ações sedativa ou relaxante muscular (Liu e cols., 2012) e, conseqüentemente, originando um resultado falso-positivo no teste da lambadura de pata induzida por formalina e em outros de antinocicepção (Basting e cols., 2014). Contudo, o EB e a MF, na maior dose utilizada em nossos experimentos, não provocaram qualquer alteração na atividade locomotora, descartando a hipótese levantada.

Tendo em vista a inibição da fase inflamatória pelo EB e pela MF no modelo da lambadura de pata induzida por formalina, resolvemos estudar o perfil anti-inflamatório dos extratos no modelo da migração celular induzida por carragenina na bolsa de ar subcutânea (BAS). Este modelo promove uma resposta inflamatória que nos permite estudar fármacos classificados como AINES (Sedgwick e Less, 1986), além de fornecer a possibilidade de analisarmos localmente os efeitos celulares e humorais que ocorrem no processo inflamatório agudo, a partir de rápida coleta do exsudato para quantificações da composição celular e bioquímica (Romano e cols., 1997). Além disto, o modelo da BAS não envolve o contato com órgãos internos e, portanto, evita que os mesmos sejam danificados, o que prejudicaria a coleta de amostras (Martin e cols., 1994).

A resposta imune à injeção de carragenina envolve a ativação de macrófagos residentes, mastócitos e células endoteliais, o que resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , bem como de mediadores, como o NO, serotonina e histamina (Fecho e cols., 2007). Além disto, a carragenina é capaz de aumentar a expressão de ICAM-1 e de promover o *up regulation* da expressão e secreção de TNF- α (Liu e cols., 2015). Esta combinação de eventos e diversos mediadores inflamatórios liberados resulta em efeitos como o aumento da permeabilidade vascular e a migração leucocitária (Li e cols., 2015).

Quando mediadores inflamatórios (como, por exemplo, histamina, bradicinina, TNF- α , prostaglandinas e NO) são expostos ao ambiente vascular, não só o extravasamento de fluido aumenta, como a sua composição também – diversas proteínas plasmáticas passam a ser encontradas no espaço extravascular (Franco-Penteado e cols. 2001; Ding e cols., 2005; Nagy e cols., 2008; Gomez e cols., 2013). Sugere-se que tais fatores são capazes de induzir a contração das células endoteliais para formar junções intercelulares de tamanho suficiente para permitir o extravasamento de proteínas do plasma (Nagy e cols., 2008). Já foi observado, por exemplo, que a injeção intra-pleural de TNF- α e IL-1 β , anterior à administração de carragenina, causou grande aumento do exsudato (Fröde e cols, 2001). O tratamento local ou sistêmico com o inibidor das isoformas da enzima NOS, L-NAME, reduziu significativamente o aumento da permeabilidade vascular, indicando o papel modulador do NO neste fenômeno (Franco-Penteado e cols., 2001).

Tanto o EB quanto a MF foram capazes de reduzir significativamente a concentração de proteínas totais no exsudato. Soromou e cols. (2012) relataram que o flavonoide pinocembrina foi capaz de reduzir a concentração total de proteínas em modelo de injúria pulmonar aguda induzida por LPS, efeito este correlacionado à

diminuição de citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β e IL-6), que promovem perda da integridade endotelial e epitelial. Carvacrol também reduziu o exsudato em modelo de pleurisia induzido por carragenina em ratos, apresentando efeitos similares ao fármaco indometacina, sugerindo que este componente pode inibir a liberação de prostanoídes (Fachini-Queiroz e cols., 2012). Assim, a diminuição da concentração de proteínas plasmáticas pode, portanto, estar relacionada com a ação dos extratos sobre a concentração de mediadores inflamatórios que atuam no aumento da permeabilidade vascular, como citado anteriormente. Dentre eles, as citocinas TNF- α , IL-1 β e o mediador NO, estudados neste trabalho.

Além do aumento no volume e na composição do exsudato, a injeção de carragenina na BAS produz uma migração de células inflamatórias na qual há predomínio de leucócitos polimorfonucleares nas primeiras 24 h, com aumento gradual de mononucleares após este período (Martin e cols., 1994). Dentre outros eventos, a migração celular é proporcionada graças à expressão de moléculas de adesão. Em murinos, o promotor de P-selectina contém sítios de ligação para o fator nuclear κ B (nF- κ B), envolvido na regulação da inflamação, sobrevivência das células, proliferação e diferenciação. Diversos ligantes e seus receptores podem ativar a via do nF- κ B, como as famílias TNF e IL-1 e seus respectivos receptores. Assim, a transcrição de selectinas pode ser induzida por mediadores inflamatórios, como as citocinas supracitadas (Kelly e cols, 2007; Hayden e Ghosh, 2014).

A molécula de adesão E-selectina também é sintetizada e expressa no endotélio pelo estímulo de tais mediadores. Outra relação das citocinas com a migração celular encontra-se no fato de que a ação daquelas pró-inflamatórias, como TNF- α , promove a síntese de quimiocinas, que são então secretadas por leucócitos e células residentes. Estas moléculas estão implicadas na migração celular, se ligando a receptores

específicos expressos na superfície de leucócitos, ativando-os (Kelly e cols., 2007, García-Ramallo e cols, 2002). Dentre estas quimiocinas, podem ser citadas CXCL1 e CXCL8 (Lo e cols., 2014; Borish e Steinke, 2003). Assim como o TNF- α , a citocina IL-1 β também está envolvida na migração celular. Como já descrito por Perreti e cols. (1993), a injeção de IL-1RA, antagonista do receptor de IL-1 β , inibiu a migração de neutrófilos na BAS. Ao analisarmos os efeitos do pré-tratamento com o EB, vimos que o mesmo foi capaz de reduzir a migração celular em todas as doses testadas. Também observamos que houve redução da migração leucocitária ao testarmos a MF. Assim, pensamos se a redução da migração celular por ambos os extratos não poderia ser resultado de menor ativação dos neutrófilos em virtude da inibição dos níveis de TNF- α e IL-1 β , o que poderia responder, também, pelo *downregulation* de moléculas de adesão no endotélio e/ou menor síntese de quimiocinas.

Assim, para melhor compreendermos os efeitos anti-inflamatórios do EB e da MF, que envolvem a redução da migração celular e da permeabilidade vascular, quantificamos a concentração das citocinas pro-inflamatórias, TNF- α e IL-1 β , no exsudato. Em um estudo de Kara e cols (2014), mostrou-se que na inflamação causada por LPS, o carvacrol inibiu a liberação de TNF- α , mesmo em doses mais baixas. Além disso, relatou-se que no modelo de pleurisia induzida por carragenina, também foi observado redução de TNF- α , responsável pela supressão do recrutamento de leucócitos, sem alteração da morfologia dos mesmos. Esta mesma ação do carvacrol também foi demonstrada em modelo de pleurisia induzido por carragenina (Guimarães e cols., 2012). Esta citocina é responsável pelo *upregulation*, *in vitro*, de ICAM-1 (Olyslaegers e cols., 2013). Além disso, a ligação de TNF- α a seu receptor leva à ativação das enzimas LOX e PLA₂, gerando metabólitos como AA, leucotrienos e diacilglicerol. A via do NF- κ B também pode ser ativada. Juntas, estas ações respondem

pela produção de prostaglandinas, citocinas e quimiocinas, além de induzirem a migração celular (Sedger e cols., 2014). Assim, a regulação negativa de TNF- α causada pelo EB pode ser um dos fatores que contribuíram para a menor migração leucocitária. Em relação à citocina IL-1 β , não foram observadas reduções em sua concentração nas diferentes doses utilizadas do EB. Segundo Lopez-Castejon (2011), moléculas expressas por patógenos ou a injúria tecidual são estímulos para a ativação do complexo protéico do inflamossoma. Uma vez ativado, este complexo promove a clivagem da enzima pro-caspase-1 em caspase-1, a qual, por sua vez, cliva a forma inativa de IL-1 β na forma ativa, fazendo com que esta citocina seja secretada da célula. Há evidências de que esta secreção de IL-1 β ocorra através de um mecanismo não convencional. Em 1990, Anna Rubartelli verificou que o tratamento com BFA de macrófagos previamente ativados inibiu a secreção de TNF- α e IL-6, mas não de IL-1 β . O BFA é um metabólito de fungos que causa colapso do Golgi e impede a sua redistribuição do retículo endoplasmático, além de inibir completamente o mecanismo de secreção proteica convencional. Embora não possamos afirmar o mecanismo de ação molecular do EB, este diferente padrão de secreção de IL-1 β poderia ser uma hipótese a ser investigada para explicarmos a inibição dos níveis de TNF- α , mas não de IL-1 β pelo EB. Também devemos considerar a complexa composição do EB, onde existem diversos componentes atuando de forma antagônica e/ou sinérgica, fazendo com que houvesse a inibição da produção/liberação de uma citocina, mas não de outra.

A MF foi capaz de reduzir as concentrações de TNF- α , além de reduzir os níveis de IL-1 β em todas as doses testadas. Embora seja escasso o conhecimento acerca dos componentes não voláteis, o flavonoide pinocembrina já foi identificado na espécie *L. origanoides* (Oliveira e cols., 2014). Em modelos de endotoxemia induzido por LPS em ratos e em células RAW 264.7, o pré-tratamento com pinocembrina diminuiu a

produção de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , ação esta atribuída à inibição da via do NF- κ B (Soromou e cols., 2012). Além disso, em modelo de isquemia, o pré-tratamento com pinocembrina também reduziu a expressão de TNF- α , IL-1 β , além de moléculas de adesão, como ICAM-1 (Gao e cols., 2010). A diminuição destas citocinas pro-inflamatórias, portanto, vai ao encontro de outros efeitos já observados para a MF, como a diminuição do extravasamento de proteínas plasmáticas e da migração celular.

Sabendo que citocina IL-10 pode ser expressa por diversos leucócitos, como monócitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos B e T, dentre outros (Kasten e cols., 2010), e que sua função primária consiste em limitar as respostas inflamatórias, inibindo citocinas e quimiocinas responsáveis pelo desenvolvimento do processo (Cho e cols., 2014), também procuramos estudar se os extratos em teste também poderiam exercer alguma influência sobre esta citocina anti-inflamatória. Cho e cols. (2014) verificaram que camundongos IL-10^{-/-} desenvolveram severa inflamação intestinal, uma vez que não houve controle sobre as respostas imunes desencadeadas pelas bactérias residentes da flora intestinal.

Observamos que com o aumento da dose do EB, os níveis de IL-10 também se elevaram e chegaram próximos àqueles encontrados após o tratamento com o fármaco de controle positivo, dexametasona. Outros experimentos são necessários para elucidarmos se isto se deve a uma dificuldade de ação do extrato em doses maiores ou se, realmente, existe uma regulação positiva sobre a produção de IL-10. No EB estão presentes todos os componentes fitoquímicos da planta, dentre eles os componentes voláteis timol e carvacrol, sendo este último o monoterpene majoritário (Oliveira e cols., 2007). Lima e cols. (2013) relataram que o carvacrol foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 e a expressão do seu RNAm em modelo de edema de pata induzido pela adjuvante de Freud.

Alguns flavonoides são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e embora também possam estimular a produção de IL-10 (Capelari-Oliveira e cols., 2011), ao analisarmos a concentração desta última citocina após o tratamento com a MF, observamos que houve diminuição dos seus níveis no exsudato. Sugerimos que composição diversificada de flavonoides na mistura, os quais podem interagir entre si, esteja provocando, por algum mecanismo ainda não elucidado, a redução desta citocina. Contudo, tal inibição pode ser favorável, sendo um efeito protetor da MF, uma vez a expressão excessiva de IL-10 por macrófagos, por exemplo, pode resultar em uma atuação autócrina e/ou parácrina desta, levando à perda da capacidade destas células de lidar com a injúria (Conti e cols., 2003).

Nossos resultados ainda não nos permitem dizer onde exatamente o EB e a MF atuam para reduzir os níveis das citocinas. Contudo, poderiam estar reduzindo a migração celular ao inibirem a produção e/ou liberação de citocinas, ou ainda, poderiam impedir a ligação destas moléculas a seus receptores. Ainda assim, nossos dados complementam aqueles já descritos na literatura de que extratos derivados de plantas podem atuar sobre os níveis de citocinas, influenciando-os de maneira positiva ou negativa (Spelman e cols., 2006).

O NO é um mediador que participa no relaxamento do músculo liso vascular, na vasodilatação e neurotransmissão, no controle da pressão e fluxo sanguíneos, bem como no recrutamento de neutrófilos (Júnior e cols., 2014). Assim como as citocinas, o NO é um mediador produzido nos locais da injúria (Tong e cols., 2014). A administração de L-NMMA, um inibidor não específico das isoformas de NOS, mas que exibe certa seletividade pela isoformas neuronal e endotelial, foi capaz de inibir a produção de NO logo após a injeção de carragenina, como mostrou Prajapati e cols. (2014). Já a produção por iNOS responde pela manutenção da resposta inflamatória após a injeção

(Lee e cols., 2014). Ao analisarmos o efeito dos extratos sobre a produção de NO, observamos que tanto o EB quanto a MF foram capazes de diminuir a concentração deste mediador no exsudato coletado da BAS. A ativação de macrófagos e neutrófilos promove a geração de citocinas e quimiocinas, além de NO, a fim de sustentar e amplificar a resposta inflamatória (Jeong e cols., 2014). Portanto, a diminuição da migração celular causada pelos extratos pode ter auxiliado na redução do acúmulo de NO. Como a expressão de iNOS requer síntese proteica, induzida por LPS ou citocinas, como TNF- α , IL-1 β ou IFN- γ , a redução das citocinas pró-inflamatórias estudadas também deve ser considerada, pois poderia estar contribuindo para uma menor expressão da enzima (Nisar e cols., 2013; Toffoli-Kadri e cols., 2014). Citocinas como IL-4, IL-10 ou corticoides atuam inibindo a indução de iNOS (Toffoli-Kadri e cols., 2014).

De fato, plantas medicinais possuem a capacidade de inibir a atividade e/ou expressão da enzima iNOS (Dzoyem e Eloff, 2015). Da mesma forma, é sabido que os flavonoides podem inibir a produção de NO através da modulação de vias sinalizadoras pró-inflamatórias ou através de uma atividade *scavenger* (“sequestradora”) (Liberal e cols., 2014). A diminuição da concentração de NO também pode ter auxiliado na redução dos níveis de TNF- α e IL-1 β , já que níveis aumentados de NO podem induzir a produção de tais citocinas (Nisar e cols., 2013).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) incluem, principalmente, o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^\bullet) (D’Autréaux e Toledano, 2007). Estas espécies podem ser produzidas como subprodutos do metabolismo celular ou através da atividade das enzimas NADPH oxidases, presentes em diversas células, p. ex., endoteliais e os neutrófilos polimorfonucleares. A produção por este tipo celular é primordial para o progresso da

resposta inflamatória, pois uma produção aumentada de ROS pelos mesmos no local da inflamação pode causar disfunção endotelial e injúria tecidual (Mittal e cols., 2014). Portanto, a redução da migração de polimorfonucleares pode explicar, em parte, as menores concentrações de ROS. O contrário também é verdadeiro. A produção destas espécies regula a expressão de moléculas de adesão no endotélio, a saber, selectinas e integrinas, bem como desagrega as junções aderentes e oclusivas do mesmo (Mittal e cols., 2014). As ROS também podem regular fatores de transcrição, como o NF- κ B (Yung e cols., 2006). A ação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-1, resulta em aumento intracelular de superóxidos e peróxidos de hidrogênio ROS (Rhee e cols., 2003; Bartosz, 2009). Assim, a redução destas citocinas também estaria ligada a uma menor produção de ROS. Contudo, a correlação dos efeitos anti-inflamatórios com a atividade antioxidante dos extratos não foi tão pronunciada, indicando que a atuação destes sobre outros componentes da resposta inflamatória também é importante para o efeito global de ambos. Observamos também que apenas as maiores concentrações foram capazes de reduzir a produção de ROS. Mais uma vez atribuímos tal fato à composição dos extratos, embora ainda desconhecida. Sugerimos que o aumento da concentração pode ter feito com que aumentasse a proporção de determinados componentes importantes para tal atividade.

Embora a planta investigada seja tradicionalmente utilizada contra distúrbios inflamatórios (Oliveira e cols., 2014), alguns parâmetros não foram significativamente afetados. Além disso, ao estudarmos os efeitos da MF a fim de compará-los com o EB e verificarmos se a primeira seria o grupo de substâncias responsáveis em sua maioria pela atividade do segundo, não observamos, de forma geral, uma correlação direta. Assim, tentamos enumerar algumas hipóteses que podem tentar explicar estes fatos:

1) O estudo etnobotânico que identifica a utilização da planta em questão como anti-inflamatório, relata o uso das folhas da mesma na forma de infusão (Oliveira e cols., 2007; Dzoyem e Eloff, 2015). Assim, nos extratos que utilizamos os compostos ativos poderiam se encontrar em quantidades diferentes daquelas observadas na infusão.

2) Outros mecanismos que não investigamos podem estar envolvidos no controle da resposta inflamatória, afetando de forma positiva ou negativa os componentes analisados neste trabalho (Dzoyem e Eloff, 2015);

3) Há uma ideia de que as plantas clinicamente efetivas devem conter um princípio ativo que poderia substituir completamente a atividade do extrato. Contudo, a literatura mostra algumas exceções, como o caso do extrato bruto da espécie *Artemisia annua*, que contém diversos compostos que potencializam a sua atividade *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*. Outro exemplo são as raízes das espécies de Croton, utilizadas no tratamento de feridas. O extrato bruto possui antocianidinas, que podem ocorrer junto a diterpenos e fenóis simples, sendo todos estes compostos responsáveis pela resolução da ferida, uma vez que enquanto alguns atuam, por exemplo, como antimicrobianos, outros o fazem como anti-inflamatórios (Phillipson, 2001);

4) Reforçando esta ideia, sabe-se que reconstituir o efeito biológico de um extrato a partir de componentes individuais pode ser complicado, tendo em vista que estes, quando minoritários, ou outros não identificados, podem atuar sinergicamente ou antagonicamente, ou ainda, somente conseguirem exercer o seu papel individual no microambiente do extrato (Gossiau e cols., 2011);

5) A farmacocinética também pode influenciar a atividade de plantas medicinais. A maioria dos compostos naturais exibe baixa absorção, biodisponibilidade, pequena meia-vida e/ou pobre penetração nos tecidos, influenciados pela baixa lipossolubilidade e/ou alto peso molecular (Hao e cols., 2014; Kesarwani e Gupta, 2013);

6) Extratos de plantas medicinais podem exercer efeito bifásico, dependendo da dose/concentração em que são utilizadas, assim como fármacos já existentes no mercado, como a isoprenalina (Spelman e cols., 2006). Em baixas doses, este fármaco ativa receptores β -adrenérgicos e, em maiores, quando os receptores β encontram-se saturados, ativa também receptores α -adrenérgicos. Este efeito bifásico já foi relatado para a espécie *Withania somnifera*, que foi capaz de diminuir e aumentar TNF- α (Spelman e cols., 2006). Esta pode ser uma hipótese, além da solubilidade, para a menor inibição na dose de 100 mg/kg pelo extrato bruto.

Nossos resultados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura para o gênero *Lippia*. Dentre alguns exemplos, podem ser citados que o óleo essencial da espécie *Lippia gracilis* foi capaz de reduzir componentes do processo inflamatório como a migração celular, o volume de exsudato, o extravasamento de proteínas, bem como a produção de alguns mediadores inflamatórios, i.e., NO, PGE₂, TNF- α e INF- γ (Guilhon e cols., 2011), além da atividade da enzima mieloperoxidase (Riella e cols., 2012). O extrato, obtido com 10 mL de acetona, das folhas de *Lippia javanica* foi capaz de inibir em 97% a produção de NO, além de inibir as enzimas 15-lipoxigenase e acetilcolinesterase e apresentar atividade *scavenger* (Dzoyem e Eloff, 2015). *Lippia sidoides* demonstrou possuir efeitos gastroprotetores e anti-oxidantes, além de inibir a produção de TNF- α e IL-1 β em modelo de periodontite (Monteiro e cols., 2007; Botelho e cols., 2007). *Lippia nodiflora* também demonstrou possuir atividade antioxidante e antitumoral (Vanajothi e cols., 2012).

Neste trabalho demonstramos que *Lippia origanoides* possui efeito anti-inflamatório agudo, através da avaliação de seu EB e de uma MF isolada do mesmo. Nossos dados contribuem para compreensão acerca de alguns usos populares desta espécie, como aqueles realizados pelas comunidades quilombolas, da região de

Oriximiná (Pará) – contra inflamações do útero, corrimentos vaginais, desordens gastrointestinais, doenças respiratórias, dentre outros.

6. CONCLUSÕES

Após os estudos realizados, concluímos que:

1. Os extratos foram capazes de reduzir a nocicepção inflamatória causada pela formalina no modelo de lambadura de pata, sem que afetassem a atividade locomotora dos animais.
2. Os extratos possuem atividade anti-inflamatória já que ambos foram capazes de reduzir o extravasamento de proteínas plasmáticas, o infiltrado leucocitário, a produção de citocinas, como TNF- α e IL-1 β , e os níveis de NO no modelo da migração celular induzida por carragenina na BAS. Além disso, o EB mostrou uma tendência em aumentar os níveis de IL-10. Outros estudos devem ser conduzidos para complementação de nossos resultados.
3. No que diz respeito à MF, nossos dados mostram que existe a possibilidade da mesma de contribuir para o efeito global do EB, embora não seja possível dizer em que extensão isto ocorre e quais parâmetros são afetados. Assim, outros estudos farmacológicos, fitoquímicos e bioquímicos são necessários para propormos um mecanismo de ação, descobrirmos outros componentes e, mais ainda, para elucidarmos se existem constituintes ativos individuais responsáveis pelos efeitos biológicos observados com a espécie e qual a contribuição dos mesmos quando parte do extrato bruto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALA, S.; DÉVORA, S.; MARTÍN-HERRERA, D.; PÉREZ-PAZ, P. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palensis* link, and endemic Canary Island species. **Journal of Ethnopharmacology**. 155: 626-632. 2014.

ADZU, B.; AMIZAN, M. B.; OKHALE, S. E. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardized rootbark extract of *Xeromphis nilotica*. **Journal of Ethnopharmacology**. 158: 271-275. 2014.

AKDIS, M.; BURGLER, S.; CRAMERI, R.; ELWEGGER, T.; FUJITA, H.; GOMEZ, E.; KLUNKER, S.; MEYER, N.; O'MAHONY, L.; PALOMARES, O.; RHYNER, C.; QUAKED, N.; SCHAFFARTZIK, A.; VEEN, W. V.; ZELLER S.; ZIMMERMANN,

M.; AKDIS, C. A. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 127: 701-721. 2011.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; PINHO, V.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**. 139: 189-212. 2013.

AMULIC, B; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**. 30: 459-489. 2012.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 43: 385–406. 2012.

BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. R.; MOURAO, R. A.; SANTOS, B. H. C.; COUTINHO, H. D. M.; ABREU, A. P. L.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia origanoides* H.B.K. essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Integrative Medicine**. 6: 560-564. 2014.

BARTHOLOMEW, B. A rapid method for the assay of nitrate in urine using the nitrate reductase enzyme of *E. coli*. **Food and Chemical Toxicology**. 22:541-543. 1984.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**. 77: 1303-1315. 2009.

BASTING, R. T.; NISHIJIMA, C. M.; LOPES, J. A.; SANTOS, R. C.; PÉRICO, L. L.; LAUFER, S.; BAUER, S.; COSTA, M. F.; SANTOS, L. C.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; SANTOS, A. R. S.; SANTOS, C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. 157: 257-267. 2014.

BELLIK, Y.; BOUKRAË, L.; ALZHRANI, H. A.; BAKHOTMAH, B. A.; ABDELLAH, F.; HAMMOUDI, S. M.; IGUER-OUADA, M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**. 18: 322-353. 2013.

BOONYARIKPUNCHAI, W.; SUKRONG, S.; TOWIWAT, P. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 124: 67-73. 2014.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 111(2): S460-S475. 2003.

BOTELHO, M. A.; RAO, V. S.; CARVALHO, C. B. M.; BEZERRA-FILHO, J. G.; FONSECA, S. G. C.; VALE, M. L.; MONTENEGRO, D.; CUNHA, F.; RIBEIRO, R. ; BRITO, G. A. *Lippia sidoides* and *Myracrodruon urundeuva* gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 113: 471-478. 2007.

BRIESKORN, C. H., POHLMANN, R. The occurrence of isomeric catalponol and tectol dimethyl ether in the root of *Lippia organoides* H.B.K. **Archiv der Pharmazie**. 309: 829-836. 1976.

CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; CAMPOS, F. T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J. A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**. 135: 393-398. 2011.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 75: 501-512. 2003.

CARMONA, F; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 23(2): 379-185. 2013.

CARTMELL, S. M.; GELGOR, L.; MITCHELL, D. A review rotarod procedure for measuring the effect of antinociceptive drugs on motor function in the rat. **Journal of Pharmacological Methods**. 26: 149-159. 1991.

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nature**. 10: 826-837. 2010.

CHO, M. J.; ELLEBRECHT, C. T.; PAYNE, A. S. The dual nature of interleukin-10 in pemphigus vulgaris. **Cytokine**. 2014. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.002>

CHO, Y. C.; JU, A.; KIM, B. R.; CHO, S. Anti-inflammatory effects of *Crataeva nurvala* Buch. Ham. are mediated via inactivation of ERK but not NF- κ B. **Journal of Ethnopharmacology**. 162: 140-147. 2015.

CHOU DHARI, S. K.; CHAUDHARY, M.; BADGE, S.; GADBAIL, A. R.; JOSHI, V. Nitric Oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**. 11: 118-128. 2013.

CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **Life**. 56: 185-191. 2004.

CONTI, P.; KEMPURAJ, D.; KANDERE, K.; GIOACCHIANO, M. D.; BARBACANE, R. C.; CATELLANI, M. L.; FELACO, M.; BOUCHER, W.; LETOUNEAU, R.; THEOHARIDES, T. C. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunology Letters**. 86: 123-129. 2003.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 335: 2-13. 2011.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**. 26: 407-416. 2003.

D'AUTRÉAUX, B.; TOLEDANO, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. **Nature**. 8: 813-824. 2007.

DEJAGER, L.; VANDEVYVER, S.; PETTA, I.; LIBERT, C. Dominance of the strongest: inflammatory cytokines *versus* glucocorticoids. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 25: 21-33. 2014.

DI CARLO, G. MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspect of a class of natural therapeutics drugs. **Life Sciences**. 65: 337-353. 1999.

DING, M.; YE, T. X.; ZHAO, G. R.; YUAN, Y. J.; GUO, Z. X. Aqueous extract of *Salvia miltiorrhiza* attenuates increased endothelial permeability induced by tumor necrosis factor- α . **International immunopharmacology**. 11: 1641-1651. 2005.

DUARTE, J.; FRANCISCO, V.; PEREZ-VIZCAINO, F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. **Food & Function**. 5: 1653-1658. 2014.

DZOYEM, J. P.; ELOFF, J. N. Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**. 160: 194-201. 2015.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D. B.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012: 1-10. 2012.

FECHO, K.; MANNING, E. L.; MAIXNER, W.; SCHIMITT, C. P. Effects of carrageenan and morphine on acute inflammation and pain in Lewis and Fischer rats. **Brain, Behaviour, and Immunity**. 21: 68-78. 2007.

FRANCK, T.; KOHNEN, S.; DE LA REBIÈRE, G.; DEBY-DUPONT, G.; DEBY, C.; NIESTEN, A.; SERTEYN, D. Activation of equine neutrophils by phorbol myristate acetate or N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces a different response in reactive oxygen species production and release of active myeloperoxidase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 130: 243-250. 2009.

FRANCO-PENTEADO, C. F.; DESOUZA, I.; TEIXEIRA, S. A.; RIBEIRO-DASILVA, G.; NUCCI, G.; ANTUNES, E. Role of nitric oxide on the increased vascular permeability and neutrophil accumulation induced by staphylococcal enterotoxin B into the mouse paw. **Biochemical Pharmacology**. 10: 1305-1311. 2001.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**. 63: 149-164. 2013.

FRIES, S.; GROSSES, T. The cardiovascular pharmacology of COX-2 inhibition. **Hematology**. 2005: 452-457. 2005.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF- α and IL-1 β in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**. 13(3): 162-168. 2001.

GAO, M.; ZHU, S.; TAN, C.; XU, B.; ZHANG, W.; DU, G. Pinocembrin protects the neurovascular unit by reducing inflammation and extracellular proteolysis in MCAO rats. **Journal of Asian Natural Products Research**. 12(5): 407-418. 2010.

GARCÍA-RAMALLO, E.; MARQUES, T.; PRATS, N.; BELETA, J.; KUNKEL, S. L.; GODESSART, N. Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. **The Journal of Immunology**. 169: 6467-6473. 2002.

GODOY, M. C. M.; FIGUERA, M.R.; FLORES, A. E.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M.R.; ZANATTA, N; MARTINS, M. A. P.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. α 2-adrenoreceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dypirone. **European Journal of Pharmacology**. 496: 93-97. 2004.

GOMEZ, I.; FOUDI, N.; LONGROIS, D.; NOREL, X. The role of prostaglandin E₂ in human vascular inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**. 89: 55-63. 2013.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Molecular Nutrition & Food Research**. 55: 74-82. 2011.

GRANGER, D. N.; SENCHENKOVA E. Impaired vasomotor responses. In:____. **Inflammation and the Microcirculation**. San Rafael: Morgan & Claypool Life Sciences, p. 1-2. 2010. cap. 4. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53373/?report=reader>. Acesso em: 25 out. 2014.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. 126: 131-138. 1982.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J. R. P.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. 135: 406-413. 2011.

GUIMARÃES, A. G.; XAVIER, . A.; SANTANA, M. T.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, C. A.; BRITO, F. A.; BARRETO, E. O.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; OLIVEIRA, R. C. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Carvacrol

attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. **Naunyn-schmiedebergs Archives of Pharmacology**. 385: 253-263. 2012.

HAO, H.; ZHENG, X.; WANG, G. Insights into drug discovery from natural medicines using reverse pharmacokinetics. **Trends in Pharmacological Sciences**. 35: 168-177. 2014.

HARA, K.; HARANISHI, Y.; TERADA, T.; TAKAHASHI, Y.; NAKAMURA, M.; SATA, T. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 125: 78-84. 2014.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**. 96: 67-202. 2002.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Seminars in Immunology**. 26: 253-266. 2014.

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

JEONG, D.; YI, Y.; SUNG, G.; YANG, W. S.; PARK, J. G.; YOON, K. YOON, D. H.; SONG, C.; LEE, Y.; RHEE, M. H.; KIM, T. W.; KIM, J.; CHO, J. Y. Anti-inflammatory activities and mechanisms of *Artemisia asiatica* ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**. 152: 487-496. 2014.

JIN, T.; XU, X.; HERELD, D. Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. **Cytokine**. 44: 1-8. 2008.

JÚNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; SILVA, G. F.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: evidence for the

involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**. 153: 469:477. 2014.

KALTER, E. S. Inflammatory mediators and acute infections. **Resuscitation**. 11: 133-140. 1984.

KARA, M.; USLU, S.; DEMIRCI, F.; TEMEL, H. .; BAYDEMIR, C. Supplemental carvacrol can reduce the severity of inflammation by influencing the production of mediators of inflammation. **Inflammation**. 2014. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25416233>>. Acesso em 2 mar 2015.

KASTEN, K. R.; MUENZER, J. T.; CALDWELL, C. C. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 2010.

KELLY, M; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 120: 3-10. 2007.

KESARWANI, K.; GUPTA, R. Bioavailability enhancers of herbal origin: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 3(4): 253-266. 2013.

KHAOUKHA, G.; BEN JEMIA, M.; AMIRA, S.; LAOUER, H.; BRUNO, M.; SCANDOLERA, E.; SENATORE, F. Characterization and antimicrobial activity of the volatile componentes of the flowers of *Magydaris tomentosa* (Desf.) DC. collected in Sicily and Algeria. **Natural Product Research**. 28: 1152-1158. 2014.

KOELINK, P. J.; OVERBEEK, S. A.; BRABER, S.; KRUIJF, P.; FOLKERTS, G.; SMIT, M. J.; KRANEVELD, A. D. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. **Pharmacology & Therapeutics**. 133: 1-18. 2012.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews**. 13: 159-175. 2013.

KONO, H.; OND, A.; YANAGIDA, T. Molecular determinants of sterile inflammation. **Current Opinion in Immunology**. 26: 147-156. 2014.

KOTENKO, S. V. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 13: 223-240. 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. Inflammation and repair. In: Richard N. Mitchell. **Robbins & Cotran – Pathologic Basis of Disease**. Canada: Elsevier, p. 93. 2012.

KUNDU, J.K.; SURH, Y. J. Emerging avenues linking inflammation and cancer. **Free Radical Biology & Medicine**. 52(9): 2013-2037. 2012.

KUSHNER, I. Semantics, inflammation, cytokines and common sense. **Cytokine & Growth Factor**. 9: 191-196. 1998.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Reviews of Immunology**. 1: 335-359. 1983.

LAWRENCE, T; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature**. 2: 787-795. 2002.

LECLERC, P.; IDBORG, H.; SPAHIU, L.; LARSSON, C.; NEKHOTIAEVA, N.; WANNBERG, J.; STENBERG, P.; KOROTKOVA, M.; JAKOBSSON, P. J. Characterization of a human and murine mPGES-1 inhibitor and comparison to mPGES-1 genetic deletion in mouse models of inflammation. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**. 107: 26-34. 2013.

LEE, C. W.; PARK, S. M.; KIM, Y. S.; JEGAL, K. H.; LEE, J. R.; CHO, I. J.; KU, S. K.; LEE, J. Y.; AHN, Y.; S., Y.; JU, S. A.; KIM, S. C.; AN, W. G. Biomolecular evidence of anti-inflammatory effects by *Clematis mandshurica* Ruprecht root extract in rodent cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 155: 1141-1155. 2014.

LI, Y.; HUANG, S.; LEE, M.; DENG, J.; HUANG, G. Anti-inflammatory activities of cardamonin from *Alpinia katsumadai* through heme oxygenase-1 induction and inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathway in the carrageenan-induced paw edema. **International Immunopharmacology**. 25: 332-339. 2015.

LIBERAL, J.; FRANCISCO, V.; COSTA, G.; FIGUEIRINHA, A.; AMARAL, M. T.; MARUES, C.; GIRÃO, H.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; BATISTA, M. T. Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation. **Journal of Ethnopharmacology**. 158: 113-122. 2014.

LIMA, D. F.; BRANDÃO, M. S.; MOURA, J. B.; LEITÃO, J. M.; CARVALHO, F.A.; MIÚRA, L.M.; LEITE, J. R.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, F.R. Antinociceptive activity of the monoterpene α -phellandrene in rodents: possible mechanisms of action. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 64: 283-292. 2012.

LIMA, F.J.; COSKER, F.; BRITO, T.S.; RIBEIRO-FILHO, H.V.; SILVA, C.M.; ARAGÃO, K.S.; LAHLOU, S.; SOUZA, M.H.; SANTOS, A.A.; MAGALHÃES, P.J. Antiespasmotic and myorelaxant effects of the flavoring agent methyl cinnamate in gut: potential inhibition of tyrosine kinase. **European Journal of Pharmacology**. 740: 192-199. 2014.

LIMA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; KANETO, C. M.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**. 699: 112-117. 2013.

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features *versus* adverse biological effects. **Carbohydrate polymers**. 121: 27-36. 2015.

LIU, Z. L.; GAO, W.; MAN, S.; WANG, J.; LI, N.; YIN, S.; WU, S.; LIU, C. Pharmacological evaluation of sedative-hypnotic activity and gastro-intestinal toxicity of *Rhizoma paridis* saponins. [Journal of Ethnopharmacology](#). 144: 67-72. 2012.

LO, H.M.; LAI, T. H.; LI, C.H.; WU, W.B. TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. **Acta Pharmacologica Sinica**. 35(3): 339-350. 2014.

LO FARO, M. L.; FOX, B.; WHATMORE, J. L., WINYARD, P.G.; WHITEMAN, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**. 41: 38-47. 2014.

LÓPEZ-ARMADA, M. J.; RIVEIRO-NAVEIRA, R. R.; VAAMONDE-GARCÍA, C.; VALCÁRCEL-ARES, M. Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. **Mitochondrion**. 13: 106-118. 2013.

LOPEZ-CASTEJON G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 22: 189-195. 2011.

MAISCH, J. M. On some useful plants of the natural order of Verbenaceae. **American Journal of Pharmacology**. 57: 189-99. 1985.

MARTIN, S. W.; STEVENS, A. J.; BRENNAN, B. S.; DAVIES, D.; ROWLAN, M.; HOUSTON, J. B. The six-old-day rat air pouch model of inflammation: characterization of the inflammatory response to carrageenan. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. 32: 139-147. 1994.

MARTINS, M. R.; ARANTES, S.; CANDEIAS, F.; TINOCO, M. T.; CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**. 151: 485-492. 2014.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**. 140: 771-776. 2010.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. 454: 428-435. 2008.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. **Basic and Clinical Pharmacology & Toxicology**. 114: 83-91. 2014.

MITTAL M.; SIDDIQUI, M. R.; TRAN, S.; REDDY, S. P.; MALIK, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & Redox Signaling**. 20(7): 1126-1165. 2014.

MOALEM, G.; TRACEY, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. **Brain Research Reviews**. 51: 240-264. 2006.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **Journal of the Royal Society of Medicine**. 92: 164-169. 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**. 329: 2002-2012. 1993.

MONTEIRO, M. V. B.; LEITE, A. K. R. M.; BERTINI, L. M.; MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. The anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. 111: 378-382. 2007.

MOTTA, I. *L. organoides*. Disponível em <https://www.flickr.com/photos/ignezmotta/8535627021>. Acesso em 20 mai. 2014.

MULLER, W. A. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. **The American Journal of Pathology**. 184: 886-896. 2014.

NAGY, J. A.; BENJAMIN, L.; ZENG, H.; DVORAK, A. M.; DVORAK, H. F. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**. 11: 109-119. 2008.

NASCIMENTO, G. E.; CORSO, C. R.; WERNER, M. F. P.; BAGGIO, C. H.; IACOMINI, M.; CORDEIRO, L. M. C. Structure of an arabinogalactan from the edible

tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate Polymers**. 116: 300-306. 2015.

NISAR, A.; MALIK, A. H.; ZARGAR, M. A. *Atropa acuminata* Royle Ex Lindl. Blunts production of pro-inflammatory mediators eicosanoids., leukotrienes, cytokines *in vitro* and *in vivo* models of acute inflammatory responses. **Journal of Ethnopharmacology**. 147: 584-594. 2013.

NONATO, F. R.; NOGUEIRA, T. M. O.; BARROS, T. A. A.; LLUCHESE, A. M.; OLIVEIRA, C. E. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: evidence for a role of IL-1 β inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**. 136: 518-524. 2011.

NORIS, M.; REMUZZI, G. Overview of complement activation and regulation. **Seminars in Nephrology**. 33: 479-492. 2013.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology**. 22: 733-740. 2012.

OLIVEIRA, D. R. 2004. 111 f. Dissertação. Levantamento Etnobotânico das Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade de Oriximiná (Pará) com enfoque etnofarmacológico para o Gênero *Lippia*. Rio de Janeiro: UFRJ/NPPN.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**. 101: 236-240. 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G.G.; FERNANDES, P. D.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 24: 206-214. 2014.

OLIVEIRA, T. M.; CARVALHO, R.B.; COSTA, I. H.; OLIVEIRA, G. A.; SOUZA, A.A.; LIMA, S.G.; FREITAS, R.M. Evaluation of p-cymene, a natural antioxidant. **Pharmaceutical Biology**. 53: 423-428. 2015.

OLYSLAEGERS, D. A. J.; DEDEURWAERDER, A.; DESMARETS, M. B.; VERMEULEN, B. L.; DEWERCHIN, H. L.; NAUWYNCK, H. J. Altered expression of adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**. 166: 438-449. 2013.

OWONA, B. A.; NJAYOU, N. F.; LAUFER, S.; MOUNDIPA, P. F.; SCHLUESENER, H. J. A fraction of stem bark extract of *Entada africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 149: 162-168. 2013.

PANDURANGAN, K.; KRISHNAPPAN, V.; SUBRAMANIAN, V.; SUBRAMANYAN, R. Antinociceptive effect of certain dimethoxy flavones in mice. **European Journal of Pharmacology**. 727: 148-157. 2014.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. 102(4): 937-944. 2001.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. 76: 201-214. 2001.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1851(4): 422-432. 2014.

PERRETTI, M.; D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. 9: 62-70. 2009.

PERRETTI, M.; APPLETON, I.; PARENTE, L.; FLOWER, R.J. Pharmacology of interleukin-1 induced neutrophil migration. **Agents Actions**. 38: 64-65. 1993.

PETÄJÄ, J. Inflammation and coagulation. An overview. **Thrombosis Research**. 127: s34-s37. 2011.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**. 56: 237-243. 2001.

PINHO-DA-SILVA, L.; MENDES-MAIA, P. V.; GARCIA, T. M. N.; CRUZ, J. S.; MORAIS, S. M.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; LAHLOU, S.; LEAL-CARDOSO, J. H. *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. **Phytomedicine**. 17: 721-725. 2010.

POPOVIĆ, M.; SMILJANIĆ, K.; DOBUTOVIĆ, B.; SYROVETS, T.; SIMMET, T.; ISENOVIĆ, E. R. Thrombin and vascular inflammation. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 359(1-2): 301-313. 2012.

PORRES-MARTÍNEZ, M.; GONZÁLEZBURGOS, E.; CARRETERO, M. E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Major selected monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance. **Pharmaceutical Biology**. 4: 1-9. 2014.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate polymers**. 105: 97-112. 2014.

QIN, L.; ZHAO, D.; XU, J.; REN, X.; TERWILLIGER, E.; PARANGI, S.; LAWLER, J.; DVORAK, H. F.; ZENG, H. The vascular permeabilizing factors histamine and serotonin induce angiogenesis through TR3/Nur77 and subsequently truncate it through thrombospondin-1. **Blood**. 121(11): 2154-2164. 2013.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hypis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. 134: 725-732. 2011.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**. 33: 8-13. 2015.

REGOLI, D.; BARABÉ, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. **Pharmacological Reviews**. 32: 1-36. 1980.

RHEE, S.G.; CHANG, T.S.; BAE, Y.S.; LEE, S.R.; KANG, S.W. Cellular regulation by hydrogen peroxide. **Journal of the American Society of Nephrology**. 14(8): S211-S215. 2003.

RIBEIRO, . F.; ANDRADE, E. H. A.; SALIMENA, F. R. G.; MAIA, J. G. S. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**. 55: 249-259. 2014.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 31: 986-1000. 2011.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R.R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R.L.; THOMAZZI, S.M. 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.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO,S.; ECHTENACHER, B.; Di SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor. **Mediators of Inflammation**. 6: 32-38. 1997.

RUBARTELLI, A.; COZZOLINO, F.; TALIO, M.; SITIA, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. **The European Molecular Biology Organization Journal**. 9: 1503-1510. 1990.

SADIK, C. D.; KIM, N. D.; LUSTER, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology**. 32: 452-460. 2011.

SALGUEIRO, J. B.; ARDENGHL, P.; DIAS, M.; FERREIRA, M. B. C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 58(4): 887-891. 1997.

SCHIMITZ, M. L.; WEBER, A.; ROXLAU, T.; GAESTEL, M.; KRACHT, M. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1813: 2165-2175. 2011.

SEDDER, L. M.; McDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: from mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. 25: 453-472. 2014.

SEDDGWICK, A.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Action**. 18: 439-446. 1986.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as antiinflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**. 69: 273-278. 2010.

SHANG, J. H.; CAI, X. H.; FENG, T.; ZHAO, Y. L.; WANG, J. K.; ZHANG, L. Y.; YAN, M.; LUO, X. D. Pharmacological evaluation of *Alstonia scholaris*: anti-inflammatory and analgesic effects. **Journal of Ethnopharmacology**. 129: 174-181. 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. 18: 385-405. 2004.

SILVA, M.P.; OLIVEIRA, G. L.; DE CARVALHO, R. B.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L.; DE MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**. 19: 3793-3803. 2014.

SILVA, N. A.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; SOUSA P. J. C.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana* Schauer. **Natural Products Community**. 4: 1281-1286. 2009.

SOROMOU, L. W.; CHU, X.; JIANG, L; WEI, M.; HUO, M.; CHEN, N.; GUAN, S.; YANG, X.; CHEN, C.; FENG, H.; DENG, X. *In vitro* and *in vivo* protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. **Internation Immunopharmacology**. 14: 66-74. 2012.

SOROMOU, L. W.; CHU, X.; JIANG, L; WEI, M.; HUO, M.; CHEN, N.; GUAN, S.; YANG, X.; CHEN, C.; FENG, H.; DENG, X. Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion. **Journal of Immunotoxicology**. 11(1): 56–61. 2014.

SPELMAN, K. M. S.; BURNS, J. J. N. D.; NICHOLS, D. N. D.; WINTERS, N. N. D.; OTTERSBERG, S. M. S., TENBORG, M. N. D. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative Medicine Reviews**. 11(2): 128-150. 2006.

SRIVASTAVA, N; GONUGUNTA, V. K. Nitric oxide production occurs downstream of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. **Planta**. 229: 757-765. 2009.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**. 33: 93-103. 2010.

TELES, S.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, L. M.; MALHEIRO, R.; MACHADO, S. S.; LUCHESE, A. M.; SILVA, F. Organic and mineral fertilization influence on biomass and essential oil production, composition and antioxidant activity of *Lippia origanoides* H.B.K. **Industrial Crops and Products**. 59: 169-176. 2014.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. 51: 5-17. 1992.

TOFFOLI-KADRI, M. C.; CAROLLO, C. A.; LOURENÇO, L. D.; FELIPE, J. L.; NÉSPOLI, J. H. B.; WOLFF, L. G. C.; RESENDE, G. M. S.; LIMA, J. R.; FRANCO, V. N. P.; VIEIRA, M. C.; SIQUEIRA, J. M. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory properties of *Achyrocline alata* (Kunth) DC. **Journal of Ethnopharmacology**. 153: 461-468. 2014.

TONG, L.; CHEN, T.; CHEN, Z.; SHANG, P.; PI, H.; RUAN, H.; WU, J. Anti-inflammatory activity of omphalocarpin isolated from *Radix toddaliae* Asiaticae. **Journal of Ethnopharmacology**. 155: 1553-1560. 2014

TRIBESS, B.; PINTARELLI, G. M.; BINI, L. A.; CAMARGO, A.; FUNEZ, L. A.; GASPER, A. L.; ZENI, A. L. B. Ethnobotanical study of plants used for therapeutic purposes in the Atlantic Forest region, Southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. 164: 136-146. 2015.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1843: 2563-2582. 2014.

VANAJOTHI, R.; SUDHA, A.; MANIKANDAN, R.; RAMESHTHANGAM, P.; SRINIVASAN, P. *Luffa acutangula* and *Lippia nodiflora* leaf extract induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. **Biomedicine & Preventive Nutrition**. 2: 287-293. 2012.

WANG, Z.; CHEN, J.; LIU, J. Cox-2 inhibitors and gastric cancer. **Gastroenterology Research and Practice**. 2014: 1-7. 2014.

WATANABE, C.; MIZOGUCHI, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, S. The involvement of the spinal release of glutamate and nitric oxide in peripheral noxious

stimulation-induced pain-related behaviors – study in mouse spinal microdialysis. **Neuroscience Letters**. 525: 11-114. 2012.

YANG, Y. Z.; TANG, Y. Z.; LIU, Y. H. Wogonoside displays anti-inflammatory effects through modulating inflammatory mediator expression using RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. 148: 271-276. 2013.

YOON, W. J.; LEE, N. H.; HYUN, C. G. Limonene supresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E₂, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Oleo Science**. 59: 415-421. 2010.

YUNG, L. M.; LEUNG, F. P.; YAO, X.; CHEN, Z.; HUANG, Y. Reactive species in vascular wall. **Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets**. 6: 1-19. 2006.